

**MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII  
MOLDOVA UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI**

Cu titlu de manuscris:  
C.Z.U.: 579.62:638.154.3(043)

**BUGNEAC VERONICA**

**TITLUL TEZEI: "UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE  
ÎN PROFILAXIA ȘI COMBATEREA LOCII AMERICANE ȘI EUROPENE  
LA ALBINE".**

**CIFRUL ȘI DENUMIREA SPECIALITĂȚII: 431.03 Microbiologie,  
virusologie, epizootologie, micologie și imunologie veterinară**

**Teză de doctor în științe medical-veterinare**

**Conducător științific:** STARCIUC Nicolae,  
doctor habilitat în științe medical-  
veterinare, profesor universitar

**Consultant științific:** SÎRBU Tamara, doctor în biologie,  
conferențiar cercetător

**Autor:** BUGNEAC Veronica, doctorand

**CHIȘINĂU 2024**

**©BUGNEAC VERONICA, 2024**

## CUPRINS

<b>Adnotare (în română, rusă și engleză)</b> .....	6
<b>LISTA TABELELOR</b> .....	9
<b>LISTA FIGURILOR</b> .....	10
<b>ABREVIERI ȘI SIMBOLURI</b> .....	12
<b>INTRODUCERE</b> .....	13
<b>1. IMPORTANȚĂ ECONOMICĂ, RĂSPÎNDIRE, MĂSURI DE PROFILAXIE ȘI COMBATERE ÎN LOCA AMERICANĂ ȘI EUROPEANĂ LA APIS MELIFERA ÎN REPUBLICA MOLDOVA</b> .....	20
1.1. Importanța albinelor <i>Apis Melifera</i> și factorii decisivi în dezvoltarea ramurii apicole .....	20
1.2. Situația epidemiologică față de unele boli bacteriene ale puietului apicol.....	23
1.3. Particularități epidemiologice, tabloul clinic și patomorfologic în loca americană și europeană.....	26
1.4. Metode și mijloace de diagnostic utilizate în bolile bacteriene ale albinelor.....	31
1.5. Măsuri sanitare veterinare de profilaxie utilizate în sectorul apicol.....	34
1.6. Metode de administrare și eficiența unor preparate cu proprietăți pre și probiotice utilizate în profilaxia bolilor contagioase la albine.....	36
1.7. Utilizarea unor produse microbiene în profilaxia unor boli infecțioase și la creșterea eficienței familiilor de albine.....	39
1.8. Măsuri de asanare și eradicare a unor boli contagioase la familiile de albine.....	46
1.9. Concluzii la compartimentul 1 .....	48
<b>2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE</b> .....	49
2.1. Baza experimentală și materialul utilizat în efectuarea investigațiilor științifice în unitățile apicole și în condiții de laborator.....	49
2.2. Metodele de cercetare și mijloacele tehnice utilizate pentru studiu în unitățile apicole și în condiții de laborator.....	50
2.3. Analiza, sistematizarea și interpretarea rezultatelor științifice .....	54
2.4. Concluzii la compartimentul 2 .....	56
<b>3. IDENTIFICAREA UNOR TULPINI DE MICROMICETE CU POTENȚIAL ANTIFUNGIC ȘI ANTIMICROBIAN</b> .....	57
3.1. Izolarea patogenilor aspergilozei ( <i>Aspergillus</i> ) și loci americane ( <i>Paenibacillus larvae</i> ) din stupinele de albine și caracteristica proprietăților morfo-culturale ale acestora .....	57

3.2. Identificarea tulpinilor de micromicete cu proprietăți enzimatic semnificative și eficiența față de agenții patogeni ai locii americane, locii europene și aspergilozei la familiile de albine .....	61
3.3. Selectarea mediilor de cultură a micromicetelor cu potențial enzimatic și antimicrobian semnificativ.....	69
3.4. Tehnici de obținere a produselor din micromicete și utilizarea lor ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă, fungicidă și antioxidantă.....	81
3.5. Concluzii la Capitolul 3.....	88
<b>4. UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE ÎN SCOP DE PROFILAXIE A UNOR BACTERIOZE LA FAMILIILE DE ALBINE.....</b>	<b>89</b>
4.1. Date cu referire la situația epidemiologică a bolilor infecțioase la albine în Republica Moldova.....	89
4.2. Metodica de stabilire a gradului de viabilitate și a statusului de sănătate a familiilor de albini în perioada activă a anului și în perioada de iernat.....	93
4.3. Metode și mijloace de igienă și de dezinfecție în apicultură.....	99
4.4. Date cu referire la microbiocenoza familiilor de albine înaintea perioadei de iernat și după perioada de iernat .....	100
4.5. Eficacitatea utilizării unor produse din micromicete la familiile de albine în perioada de pregătire pentru iernat.....	105
4.6. Eficacitatea utilizării exometaboliților din micromicete la familiile de albine.....	109
4.7. Măsurile sanitare veterinare la stupinele contaminate cu boli contagioase.....	117
4.8. Concluzii la Compartimentul 4 .....	118
<b>CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.....</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXE.....</b>	<b>141</b>
Anexa 1. Buletin de analiza de la CRDV cu confirmarea diagnosticului " <i>Loca europeană</i> " .....	142
Anexa 2. Prelevarea materialului patologic pentru cercetări de laborator de la stupina 1, suspectă în contaminare cu " <i>Loca Europeană</i> " .....	143
Anexa 3. Colonii de fungi izolate de la familiile de albine, stupina 2.....	144
Anexa 4. Forme bacteriene izolate din probele pentru cercetare de la puietul de albine afectat.a) Streptococi; b) Stafilococi; c) asociere de bacterii coliforme; d) colonii de <i>Salmonella spp.</i> .....	145
Anexa 5. Cerere de Brevet de Invenție.....	146

Anexa 6. Act de implimentare Nr.1 G.Ț ” Maican Ion”.....	147
Anexa 7. Act de implimentare Nr.2. G.Ț ”Usafii Maxim”.....	148
Anexa 8. Act de implimentare Nr.3 Facultatea de Medicină veterinară a UTM .....	149
Anexa 9. Copia certicatului de participare la Congresul științific internațional ” Ion Ionescu de la Brad” Iași .....	150
Anexa 10. Copia certicatului de participare la Simpozionul Științific ” Inovații în zootehnie și siguranța produselor animaliere realizări și perspective ”.....	151
Anexa 11. Copia. Diploma medaliei de aur la Salonul internațional de invenții și inovații în antreprenoriat Universitatea de Stat ”Ion Creangă” Chișinău .....	152
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	153
CURICULUM VITAE.....	154

## ADNOTARE

BUGNEAC Veronica :”**Utilizarea unor produse din micromicete în profilaxia și combaterea locei americane și europene la albine**”, teză de doctor în științe medical-veterinare, Chișinău, 2024.

**Structura tezei:** introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 180 titluri, 11 anexe, 113 pagini text de bază, 52 figuri, 13 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 12 lucrări științifice și o cerere de brevet de invenție.

**Cuvinte-cheie:** albine, puietul albinelor, exometaboliți din micromicete, microorganisme benefice, antimicrobian, antifungal, stimulatoare, profilaxie, microfloră, mediu nutritiv.

**Scopul lucrării:** identificarea și aprecierea potențialului antimicrobian și antioxidant al unor produse din micromicete și utilizarea lor în profilaxia unor boli bacteriene la familiile de albine.

**Obiectivele cercetării:** Identificarea tulpinilor de micromicete cu potențial antimicrobian și enzimatic pentru utilizarea în profilaxia și combaterea unor boli bacteriene și micotice la albine; obținerea produselor din micromicete și utilizarea lor în biostimularea familiilor de albine precum și ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă; studiul bacteriologic efectuat pentru stabilirea gradului de contaminare la familiile de albine după perioada iernatului; evaluarea acțiunii exometaboliților din micromicete ca supliment în hrana în perioada de pregătire pentru iernat și după perioada de iernat asupra familiilor de albine.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Au fost identificate tulpini de micromicete din genul *Penicillium*, ca producători de substanțe bioactive care pot fi utilizate pentru profilaxia și combaterea bacteriei locei americane (*Paenibacillus larvae*) și europene (*Melissococcus plutonius*) și a aspergilozei la familiile de albine *Apis mellifera*. Au fost obținute produse pe baza micromicetelor identificate cu acțiune antioxidantă, bactericidă, fungicidă și de stimulare a creșterii familiilor de albine. A fost stabilită componența bacteriologică a microflorei din stupinele de albine. A fost demonstrată acțiunea pozitivă a hranei suplimentată cu exometaboliți din micromicete *Penicillium funiculosum* și *Penicillium corylophilum* asupra indicilor de sănătate a albinelor în perioada de după iernare și efectul pozitiv asupra stimulării indicilor productivi ai familiilor de albine.

**Rezultatul obținut, care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante:**

Folosirea antibioticilor pentru controlul bolilor contagioase la puietul familiilor de albine este limitată sau interzisă din cauza apariției reziduurilor în produsele apicole. Ca alternativă a antibioticilor sunt propuse soluțiile de exometaboliți, obținute în baza micromicetelor din genul *Penicillium*, cu potențial antimicrobian și anti oxidativ pentru profilaxia și combaterea unor boli bacteriene și fungice, de asemenea sunt recomandate pentru utilizare ca supliment alimentar în hrana albinelor pentru stimularea indicilor de sănătate și productivi ai familiilor de albine.

**Semnificația teoretică:** datele obținute prezintă interes teoretic pentru domeniul apicol ca produse alternative ecologice pentru înlocuirea antibioticilor, dar și ca material pentru studiul de perspectivă.

**Valoarea aplicativă:** Pentru profilaxia și combaterea aspergilozei, locei americane și europene sunt propuse soluțiile de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium* sp. 91 și *Penicilium* sp. 97, iar soluția de exometaboliți ai micromicetei *Penicillium funiculosum* în calitate de supliment alimentar în hrana albinelor pentru stimularea indicilor de sănătate înainte de iernat și după iernat, pentru stimularea indicilor productivi ai familiilor de albine *Apis mellifera*.

**Implementarea rezultatelor științifice:** rezultatele obținute au fost implementate în stupinele de albine a 2 gospodării țărănești (2 acte de implementare), vor fi utilizate ca material teoretic și practic pentru apicultorii din republică în scopul controlului bolilor contagioase la puietul familiilor de albine, sunt folosite ca material didactic în procesul de instruire a studenților la Facultatea de Medicină Veterinară a UTM (act de implementare).

## АННОТАЦИЯ

БУГНЕАК Вероника: «Использование продуктов микромицетов в профилактике и борьбе с американским и европейским гнильцом у пчел», диссертация на соискание учёной степени доктора ветеринарных наук, Кишинев, 2024.

**Структура диссертации:** введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, библиография 180 источников, 11 приложений, 113 страниц основного текста, 52 фигуры, 13 таблиц. Опубликовано 12 научных работ, 1 заявка на патент.

**Ключевые слова:** пчелы, пчелиный расплод, экзометаболиты микромицетов, полезные микроорганизмы, противомикробное, противогрибковое средство, стимуляторы, профилактика, микрофлора, питательная среда.

**Цель работы:** выявление и оценка антимикробного и антиоксидантного потенциала некоторых препаратов из микромицетов и их использование в профилактике бактериальных заболеваний пчелиных семей.

**Задачи исследования:** Идентификация штаммов микромицетов, обладающих антимикробным и ферментативным потенциалом для использования в профилактике и борьбе с бактериальными и грибковыми заболеваниями пчел; получение продуктов из микромицетов и их использование в биостимуляции пчелиных семей, а также как альтернатива препаратам бактерицидного и фунгицидного действия; бактериологическое исследование после зимовки для определения уровня зараженности пчелосемей; оценка действия экзометаболитов микромицетов в качестве пищевой добавки в период подготовки к зимовке и после зимовки на пчелиных семьях.

**Научная новизна и оригинальность:** Идентифицированы штаммы микромицетов рода *Penicillium* как продуценты биологически активных веществ которые можно использовать для профилактики и борьбы с американскими и европейскими локусными бактериями и аспергиллезом у пчелиных семей *Apis mellifera*. На основе идентифицированных микромицетов получены продукты, обладающие антиоксидантным, бактерицидным, фунгицидным и ростостимулирующим действием пчелиных семей. Установлен бактериологический состав микрофлоры пчелиных ульев. Показано положительное влияние корма с добавлением экзометаболитов *P. funiculosum* и *P. corylophilum* на показатели здоровья пчел в период после зимовки и положительное влияние на стимуляцию продуктивных показателей пчелиных семей.

**Полученный результат, способствующий решению важной научной проблемы:** Применение антибиотиков для борьбы с заразными болезнями расплода пчелиных семей ограничено или запрещено в связи с наличием их остатков в продуктах пчеловодства. В качестве альтернативы антибиотикам предложены растворы экзометаболитов, микромицетов рода *Penicillium*, обладающие противомикробным и антиоксидантным потенциалом для профилактики и борьбы с бактериальными и грибковыми заболеваниями, их также рекомендуют использовать в качестве пищевой добавки в корм для стимулирования показателей здоровья и продуктивности пчелиных семей.

**Теоретическая значимость:** Полученные данные представляют теоретический интерес для области пчеловодства как альтернативные экологические продукты для замены антибиотиков, а также как материал для перспективных исследований.

**Прикладное значение:** Для профилактики и борьбы с аспергиллезом, американским и европейским гнильцом предложены растворы экзометаболитов штаммов *Penicillium sp.* 91 и *Penicillium sp.* 97, а раствор экзометаболитов микромицета *Penicillium funiculosum* в качестве пищевой добавки в корм пчел для стимуляции показателей здоровья перед зимовкой, а после зимовки для стимуляции продуктивных показателей пчелиных семей.

**Внедрение научных результатов:** полученные результаты внедрены в пчелиные ульи 2-х крестьянских хозяйств (2 акта внедрения), будут использоваться как теоретический и практический материал для пчеловодов республики с целью борьбы с заразными болезнями в расплоде пчелиных семей, используются как дидактический материал в процессе обучения студентов на Факультете Ветеринарной Медицины УТМ (акт внедрения).

## ANNOTATION

BUGNEAC Veronica: "**The use of some products from micromycetes in the prophylaxis and combating of the American and European foulbrood in bees**", doctoral thesis in medical-veterinary sciences, Chisinau, 2024.

**Thesis structure:** introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography with 180 titles, 11 annexes, 113 pages of basic text, 52 figures, 13 tables. The obtained results are published in 12 scientific papers and an application for an invention patent.

**Key words:** bees, bee brood, exometabolites of micromycetes, beneficial microorganisms, antimicrobial, antifungal agent, stimulants, prevention, microflora, nutrient medium

Purpose of the work: to identify and evaluate the antimicrobial and antioxidant potential of some preparations from micromycetes and their use in the prevention of bacterial diseases of bee colonies.

**Objectives of the research:** Identification of micromycete strains with antimicrobial and enzymatic potential for use in the prevention and control of bacterial and fungal diseases of bees; obtaining products from micromycetes and their use in the biostimulation of bee colonies, as well as an alternative to bactericidal and fungicidal drugs; bacteriological research is carried out in bee colonies after the wintering period to establish level of bacterial contamination; evaluation of the effect of exometabolites of micromycetes as a food additive during the period of preparation for wintering and after wintering on bee colonies.

**Scientific novelty and originality:** Strains of micromycetes of the genus *Penicillium* have been identified as producers of biologically active substances which can be used for prevention and control of American and European foulbrood bacteria (*larvae u M. plutonius*) and aspergillosis in bee colonies *Apis mellifera*. Based on the identified micromycetes, products were obtained that have antioxidant, bactericidal, fungicidal and growth-stimulating effects on bee colonies. The bacteriological composition of the microflora of bee hives has been established. The positive effect of food with the addition of exometabolites *P. funiculosum* and *P. corylophilum* on the health of bees in the period after wintering and a positive effect on stimulating the productive performance of bee colonies have been shown.

**The result which contributes to solving an important scientific problem:** The use of antibiotics to combat infectious diseases of the brood of bee colonies is limited or prohibited due to the presence of their residues in beekeeping products. As an alternative to antibiotics, solutions of exometabolites, micromycetes of the genus *Penicillium*, which have antimicrobial and antioxidant potential for the prevention and control of bacterial and fungal diseases, are proposed; they are also recommended for use as a food additive in feed to stimulate the health and productivity of bee colonies.

**Theoretical significance:** The data obtained are of theoretical interest for the field of beekeeping as alternative ecological products for replace antibiotics, as well as material for future research.

**Applicative value of the work:** For the prevention and control of aspergillosis, American and European foulbrood, solutions of exometabolites of *Penicillium sp.* 91 and *Penicillium sp.* 97, strains have been proposed, and a solution of exometabolites of the micromycete *Penicillium funiculosum* as a food additive in the food of bees to stimulate health indicators before wintering, and after wintering to stimulate the productive indicators of bee colonies.

**Implementation of the scientific results:** The results obtained were introduced into the beehives of 2 peasant farms (2 acts of implementation), will be used as theoretical and practical material for beekeepers of the republic in order to combat infectious diseases in the brood of bee colonies, are used as didactic material in the process of training students at the Faculty of Veterinary Medicine UTM (act of implantation).



## LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1. Componenta mediului <i>amidono-amoniacal</i> (g/l ).....	52
Tabelul 3.1. Activitatea antimicrobiană a tulpinilor de micromicete față de agenții patogeni al aspergilozei, locii americane și locii europene .....	64
Tabelul 3.2. Activitatea catalazei tulpinilor de micromicete obținute în rezultatul screeningului.....	67
Tabelul 3.3. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii <i>P.sp. 62</i> cultivată pe diferite medii nutritive în dependență de durata de cultivare .....	71
Tabelul 3.4. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii <i>P.sp. 97</i> cultivată pe diferite medii în dependență de durata de cultivare.....	73
Tabelul 3.5. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii <i>Penicillium sp. 91</i> cultivată pe diferite medii în dependență de durata de cultivare.....	75
Tabelul 3.6. Activitatea antimicrobiană a tulpinilor de micromicete în dependență de mediul de cultură.....	78
Tabelul 3.7. Diametrul zonelor de inhibiție a fitopatogenilo sub acțiunea exometaboliților tulpinilor <i>Penicillium sp. 91</i> și <i>Penicillium sp. 97</i> .....	83
Tabelul 3.8. Acțiunea temperaturii asupra CFC în dependență de durata de tratare.....	86
Tabelul 3.9. Activitatea catalazei soluțiilor de exometaboliți în dependență de temperatura și durata de tratare .....	86
Tabelul 4.1. Numărul de stupi la unitățile apicole monitorizate.....	90
Tabelul 4.2. Incidența cazurilor de boli contagioase la stupinele de albine pe parcursul anilor 2013-2017.....	91
Tabelul 4.3. Unii indicii de sănătate ai familiilor de albine hrănite cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu soluții de exometaboliți din micromicete .....	107

## LISTA FIGURILOR

Fig. 2 1. Tehnica efectuării diluțiilor succesive pentru înocularea pe medii nutritive agarizate ....	51
Fig. 3.1. Aspectul microorganismelor izolate din stupine.....	58
Fig. 3.2. Aspectul coloniilor <i>Aspergillus niger</i> .....	59
Fig. 3.3. Morfologia tulpinii <i>Aspergillus niger</i> .....	59
Fig. 3.4. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Aspergillus flavus</i> (1 -după 4, 2- după 14 zile de cultivare pe mediul de cultură malț-agar).....	60
Fig. 3.5. Morfologia celulelor tulpinii <i>Aspergillus flavus</i> .....	60
Fig. 3.6. Tulpina <i>Paenibacillus larvae</i> : 1- colonii, 2 - bastonașe (după 2 zile de cultivare) , 3 – bastonașe și spori ( după 1 lună de păstrare pe mediul agarizat).....	61
Fig. 3.7. Pregătirea mediilor de cultură pentru inocularea microorganismelor.....	63
Fig. 3.8. Pregătirea blocurilor de geloză și introducerea lor în godeuri pe cutii Petri însămânțate cu patogeni.....	63
Fig. 3.9. Zonele de inhibiție ale patogenului <i>Aspergillus flavus</i> .....	65
Fig.3.10. Zonele de inhibiție a patogenului <i>Aspergillus niger</i> sub acțiunea exometaboliților micromitetelor studiate: 1) <i>Penicillium sp. 62</i> ; 2) <i>Penicillium sp. 97</i> .....	65
Fig. 3.11. Zonele de inhibiție a patogenilor <i>A. niger</i> și <i>A. flavus</i> sub acțiunea exometaboliților de <i>Penicillium</i> .....	66
Fig. 3.12. Zonele de inhibiție a patogenului <i>P. larvae</i> : 1 - centru tetracilină, dreapta <i>Penicillium sp. 62</i> ; 2 - centru neomicină, stânga – <i>Penicillium sp. 104</i> .....	66
Fig. 3.13. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Penicillium sp. 62</i> cultivate pe mediile de cultură: malț-agar, Czapek, Sabouraud, amidono-amoniacal.....	70
Fig. 3.14. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Penicillium sp. 97</i> cultivate pe diferite medii de cultură (Malț-agar, Czapek, Sabouraud, amidono-amoniacal).....	72
Fig. 3.15. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Penicillium sp. 91</i> cultivate pe diferite medii agarizate: Malț-agar; Czapek; Sabouraud; Amidono-amoniacal.....	74
Fig. 3.16. Colonii ale tulpinii <i>Penicillium sp. 11</i> după 14 zile de cultivare pe diferite medii de cultură (1- malț-agar; 2 – Czapek; 3 – Sabouraud; 4 – amidono amoniacal) .....	76
Fig. 3.17. Aspectul coloniilor tulpinii <i>Penicillium sp. 19</i> , după 7 zile de cultivare pe diferite medii de cultură (1 malț-agar, 2 – Czapek, 3 – Sabouraud, 4 – amidono-amoniacal) .....	77
Fig. 3.18. Acțiunea exometaboliților tulpinii <i>Penicillium sp. 62</i> asupra patogenului <i>Aspergillus flavus</i> în dependență de mediul de cultivare (dreapta – Malț-agar, stînga – Czapek), 1-față, 2 – revers .....	79
Fig. 3.19. Acțiunea exometaboliților tulpinilor de micromicete asupra patogenului <i>Aspergillus flavus</i> în dependență de mediul de cultivare (dreapta – Malț-agar, stînga – Czapek), 1-față, 2 – revers .....	79
Fig. 3.20. Activitatea antibacteriană a tulpinii <i>Penicillium sp. 91</i> față de <i>Penibacillus larvae</i> în dependență de mediul de cultivare.....	80
Fig.3.21. Cultivarea submersă a culturilor de micromicete pe agitator și obținerea soluție de exometaboliți .....	82
Fig. 3.22. Acțiunea soluție de exometaboliți ai tulpinii <i>Penicillium sp. 97</i> asupra patogenilor 1- <i>Aspergillus flavus</i> și 2 – <i>Asperillus niger</i> (a) – martor (netratat, b) – tratat cu soluție de	

exometaboliți) după 5 zile de cultivare .....	83
Fig. 3.23. Acțiunea exometaboliților fără CFC ai tulpinii <i>Penicillium corylophilum</i> CNMN FD 20 asupra fitopatogenilor prelevați din stupul de albini (1 – <i>A. flavus.</i> , 2 – <i>A.niger.</i> a – martor (netratat, b – tratat cu soluție de exometaboliți) după 5 zile de cultivare .....	87
Fig. 4.1. Examinarea clinică a stupinei nr.1 și prelevarea materialului pentru cercetare .....	94
Fig. 4.2. Prelevarea materialului pentru cercetare.....	96
Fig. 4.3. Colonii de microorganisme pe mediile nutritive.....	96
Fig. 4.4. Colonii de <i>E.coli</i> pe mediul Endo.....	97
Fig. 4.5. Colonii de <i>Salmonella</i> și <i>Enteribacterii</i> pe mediul <i>Salmonella Shigiella Agar</i> .....	97
.....	97
Fig. 4.6. Colonii de Streptococi și Stafilococi pe agarul peptonat .....	98
Fig. 4.7. Colonii de fungi microscopici pe mediul Saburo.....	98
Fig. 4.8 Colonii de <i>E.coli</i> , ob.10x90 .....	98
Fig. 4.9. Colonii de Streptococi și Stafilococi, ob.10x90.....	98
Fig. 4.10. Prelevarea probelor după iernat .....	101
Fig. 4.11. Investigații de laborator.....	101
Fig. 4.12. Intensitate de creștere pe mediile de cultură.....	102
Fig. 4.13. Colonii bacterien de Streptococi și Stafilococi.....	102
Fig. 4.14. <i>Salmonella Shigiella</i> pe mediu Agar .....	102
Fig. 4.15. Colonii fungice pe mediu Saburo.....	102
Fig. 4.16. Bacteriile coliforme <i>E. coli</i> și <i>Salmonella spp.</i> .....	103
Fig. 4.17. Bacterii din genul Streptococcus și Stafilococcus, floră bacilară .....	103
Fig. 4.18. Administrarea turtelor cu supliment toamna.....	106
Fig. 4.19. Examinarea stupinei primăvara .....	106
Fig. 4.20. Numărul de pătrate cu puiet căpăcit, % față de lot martor (100%) în varianta cu exometaboliți ai micromicetei <i>Penicillium funiculosum</i> ( <i>Penicillium sp.</i> 11) ( $P < 0,05$ ) .....	110
.....	110
Fig. 4.21. Prolificitatea mătcilor de albine, % față de lotul martor (M=100%) sub acțiunea EM tulpinii <i>Penicillium funiculosum</i> ( <i>Penicilliu sp.</i> 11) ( $P < 0,05$ ).....	110
Fig. 4.22. Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor (M = 100%), obținute în varianta cu utilizarea EM de <i>Penicillium funiculosum</i> ( <i>Penicillium sp.</i> 11) ( $P < 0,05$ ) .....	111
.....	111
Fig. 4.23. Numărul de pătrate a puietului căpăcit, % față de lot martor (M=100%) tulpina <i>Penicillium piceum</i> ( <i>P. sp.</i> 19) ( $P < 0,01$ ).....	112
Fig. 4.24. Prolificitatea, % față de lot martor (M =100%), în varinta cu soluție de EM ai tulpinii <i>Penicillium piceum</i> ( <i>P. sp.</i> 19) ( $P < 0,01$ ).....	113
Fig. 4.25. Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor (M=100%) în varianta în care hrana albinilor a fost suplimentată cu soluție de EM ai tulpinii <i>Penicillium piceum</i> ( <i>Penicillium sp.</i> 19) ( $P < 0,05$ ).....	114
Fig. 4.26. Numărul de patrate cu puiet căpăcit, % față de lot martor (M=100%) în varianta cu EM ai tulpinii <i>Penicillium corylophilum</i> ( <i>Penicillium sp.</i> 62) ( $P < 0,05$ ).....	115
Fig. 4.27. Prolificitatea mătcilor de albine, % /față de lot martor (M=100%) la administrarea soluției de EM ai tulpinii <i>Penicillium corylophilum</i> ( <i>P. sp.</i> 62) ( $P < 0,01$ ) .....	116
Fig. 4.28. Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor, Tupina <i>Penicillium corylophilum</i> ( <i>P. sp.</i> 62) ( $P < 0,05$ ).....	116

## ABREVIERI ȘI SIMBOLURI

P.1 - *Paenibacillus larvae*.

MC- mediul Czapek

CNMN - Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene

CRDV – Centru Republican de Diagnostic Veterinar

CFC - Celule formatatoare de colonii

MA- Maț-agar,

MC- Czapek,

MS- Mediul Sabourand,

mg/l – miligram / litru

Aa - Amidono-amoniacal.

ELISA- metoda imunoenzimatică

PCR - reacția în lanț a polimerazei

pH - aciditatea activă

UE – Uniunea Europeană

UFC - unitățile formatatoare de colonii

U/ml - unități într-un mililitru

UI – unități internaționale

OIE – Oficiul Internațional de Epizootii

ONU – Organizația Națiunilor Unite

spp. – specii

Exp. – experimental

ml/l – mililitru/ litru

% - procent

## INTRODUCERE

**Actualitatea și importanța temei abordate** incidența bolilor contagioase la puietul familiilor de albine rămâne o problemă permanentă pentru apicultori la nivel mondial, iar folosirea antibioticilor pentru controlul acestora este limitată sau interzisă din cauza apariției reziduurilor în produsele apicole. Utilizarea exometaboliților din micromicete constituie o alternativă a antimicrobienilor, fiind administrați ca supliment alimentar ce contribuie la stimularea indicilor productivi ai familiilor de albine, precum prezintă și o acțiune antimicrobiană.

Bolile infecțioase sunt comune pentru toate organismele vii, inclusiv pentru albine. Astfel de boli pot produce mortalitatea coloniilor întregi de albine, iar în multe cazuri majoritatea cazurilor nici nu există metode de combatere a lor. În rezultat se depopulează familiile de albine, multe din ele devenind neproductive și scade posibilitatea de a le înmulți. De aceea, depistarea bolilor la albine, prevenirea și combaterea lor, au o importanță deosebită în apicultură.

La momentul actual există programe de monitorizare și supraveghere sanitar veterinară a unităților apicole la nivel național, care prevăd măsuri de control și supraveghere, sau măsuri de eradicare în caz de apariție a bolilor infecțioase la albine. În ultimii ani, atât în lume, cât și în R. Moldova, a fost înregistrată o agravare accentuată a situației epidemiologice privind bolile albinelor, datorită modificărilor adverse din ecosferă. Este cunoscut faptul că la nivel mondial peste 300 de specii de plante cultivate sunt dependente total sau parțial de polenizarea albinelor, iar producția a 75% din culturile care asigură produse comercializate pe piața mondială depinde de polenizare. La unele culturi agricole (peste 90), albinele sporesc producția cu cel puțin 30% (bumbac, plante medicinale, culturi agricole, furaje pentru animale), iar aproximativ 10 % din culturile agricole entomofile depind în totalitate de polenizarea cu albine [17, 58].

Albinele sunt insecte eusociale cu interacțiune strânsă cu mediul înconjurător. Din acest considerent, asupra sănătății albinelor acționează și efectele produse în timpul colectării nectarului și polenului, fiind expuse la o multitudine de xenobiotice. De asemenea alimentația deficitară, în special la sfârșitul iernii sau primăvara timpuriu (lipsa microelementelor, glucidelor, substanțelor proteice, vitaminelor) și neadecvată (polen îmbibat cu produsele agrochimice și biocide) a coloniilor de albine, pot provoca o disbioză a microbiotei, ce prin urmare duce la scăderea capacității coloniilor de a răspunde la mediul înconjurător. În degradarea moleculelor potențial toxice ajută genomul care codifică enzime, acestea însă au o diversitate mai mică a genelor de detoxifiere decât genomul altor insecte. Din acest considerent, pentru a degrada moleculele potențial toxice, albinele se pot baza și pe alte componente, care le modelează fiziologia, cum ar fi microbiomul intestinal [5, 25, 141].

Este cunoscut faptul, că mediul înconjurător joacă un rol major în modelarea microbiomului albinelor. Terenurile agricole, fiind tratate cu diferite substanțe chimice (pesticide, insecticide), contribuie la perturbarea statusului bacterian din intestinul albinelor, sporind vulnerabilitatea coloniilor de albine față de diferiți germeni de ordin infecțios (virusi, bacterii, fungi) sau față de diferiți paraziți specifici pentru familiile de albine. Pentru protejarea coloniilor de albine se recomandă ca stupinele cu albini mai sensibile să fie amplasate în locații mai puțin umede, sau umbrite [52, 53, 125,160].

Componența microflorei coloniilor de albine variază și în funcție de locul culesului și tipul polenului colectat. În polen, sunt diverse comunități simbiotice de microbi, care oferă o varietate de beneficii albinelor. Microbii asociați cu proviziile de polen sunt o sursă pentru sănătatea albinelor, dar pot reprezenta o resursă alimentară majoră pentru dezvoltarea larvelor de albine. Totodată diversitatea și compoziția microbiotei intestinale la albine depinde de ecosistemul în care activează [41, 141].

Conform datelor științifice componența microbiomului la albine și produsele apicole constau în principal din bacterii lactice din genurile *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, care formează un mediu simbiotic favorabil [8]. Componența speciilor și numărul bacteriilor din microbiomul intestinal al albinelor depinde de mai mulți factori: anotimp, mediul înconjurător, sursa, cantitatea și calitatea nectarului, starea albinei, prezența microorganismelor în nectar [13, 160].

Albinele și microflora acidului lactic s-au dezvoltat reciproc una de cealaltă: bacteriile au primit o nișă cu nutrienți disponibili, iar albinele au primit protecția de la microorganisme dăunătoare. Pentru a menține un status microbial echilibrat și o rezistență fiziologică satisfăcătoare la familiile de albine, precum și pentru diminuarea riscului de apariție a unor boli infecțioase este necesar sistematic de monitorizat familiile de albine cu prelevarea probelor pentru cercetare a statusului microbial, precum și fortificarea statusului fiziologic al organismului albinelor prin alimentarea suplimentară a unor preparate biologice active.

Obținerea în apicultură a unor producții sporite este strâns legată de menținerea în stupină a familiilor de albine sănătoase și puternice prin întreprinderea unor măsuri eficiente biologice de creștere și întreținere, de igienă și eventual de ordin medicamentos sau biostimulator. Aceste măsuri au caracter profilactic și terapeutic, având rolul de a preveni apariția unor boli de origine infecțioasă, parazitară, metabolică sau efectuarea tratamentului în caz de apariție a acestor disfuncții și boli la familiile de albine. Menținerea stării de sănătate a familiilor de albine este o preocupare permanentă a medicilor veterinari și apicultorilor, care trebuie să corespundă prevederii legislației sanitare veterinare. Respectarea măsurilor de igienă este necesară, pentru a

preveni contaminarea familiilor de albine și pentru a păstra starea de sănătate a acestora este una obligatorie în apicultură [1, 19, 88, 153].

Starea igienei a familiilor de albine (a stupilor) este garanția stării de sănătate a acestora. Albinele au o viață de familie foarte bine organizată, fiecare individ al familiei de albine are o misiune. Menținerea unui status igienic satisfăcător în familiile de albine este o prerogativă a apicultorilor și respectiv a medicilor veterinari [40, 139].

Conform studiilor recente se menționează faptul că albinele din întreaga lume au dispărut în procent de până la 80%, motivele fiind diferite în funcție de regiune. Printre principalele motive fiind defrișările masive, lipsa locurilor sigure pentru cuiburi, lipsa florilor, utilizarea necontrolată a pesticidelor, schimbările survenite în sol, numărul în scădere al apicultorilor, precum și răspândirea unui număr mare de boli la albine, mai cu seamă a celor infecțioase. Din cele menționate rezultă faptul că sunt necesare soluții care ar diminua riscurile și impactul factorilor menționați asupra sănătății familiilor de albine precum și limitarea utilizării produselor medicamentoase cu impact negativ asupra familiilor de albine, inclusiv asupra produselor apicole consumate de către om [1, 6, 47, 139].

O problemă serioasă pentru apicultură este intensificarea agriculturii, schimbarea climatică, care duc la malnutriția coloniilor de albine, ca rezultat are loc diminuarea activității funcțiilor reproductive și a productivității, slăbirea rezistenței familiilor de albine la boli și dăunători. De asemenea ca rezultat al diferitor schimbări apărute în perioada de iarnă, primăvara timpuriu coloniile de albine se află, de regulă, în stare de convalescență. Organismul albinelor este foarte slăbit din cauza insuficienței de substanțe nutritive, în special de proteine, hidrocarburi microelemente, care au un rol catalizator în procesele fiziologice. În organismul albinei substanțele bioactive, intrând în componența unor enzime și hormoni, îndeplinesc funcții multiple la nivel celular, astfel jucând un rol hotărâtor în metabolism. Sursele principale naturale de aprovizionare a organismului albinelor cu substanțe nutritive sunt nectarul și polenul, culese de la florile plantelor melifere însă, în lipsa acestora sau în cazul infectării acestora, apare necesitatea elaborării diverselor diete artificiale, care au ca scop susținerea nutriției albinelor în diverse condiții și pe tot parcursul anului.

Metaboliții microbieni sunt considerați factori importanți ai microbiotei, cu toate că, sunt confundate cu interacțiunile dintre dietă, funcția microbiotei și fiziologia gazdei. Albina lucrătoare găzduiește o microbiotă simplă care produce acizi organici ca produse de fermentare a nectarului și polenului alimentar. Abundența bacteriană din intestinul albinei este parțial asociată cu epiteliul rectului anterior. Polenului nedigerat îi revine rolul de substrat de creștere a microbiotei în intestinul albinelor, iar impactul produselor de fermentație bacteriană acționează asupra stării generale a albinei. Pentru suplinirea hranei coloniilor de albine cu substanțe

bioactive sunt utilizate procedee de hrănire cu diete de diferită natură: chimică, pe bază de plante, dar și de origine microbiană (bacterii, cianobacterii, microoalge, bifidobacterii, lactobacterii).

**Scopul lucrării:** constă în identificarea și aprecierea potențialului antimicrobian și antioxidant al unor produse din micromicete și utilizarea lor în profilaxia unor boli bacteriene la familiile de albine.

#### **Obiectivele cercetării:**

1. Identificarea tulpinilor de micromicete cu potențial antimicrobian și enzimatic pentru utilizarea în profilaxia și combaterea unor boli bacteriene și micotice la albine;
2. Obținerea produselor din micromicete și utilizarea lor ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă, precum și în biostimularea familiilor de albine;
3. Studiul bacteriologic efectuat pentru stabilirea gradului de contaminare la familiile de albine după perioada iernatului;
4. Evaluarea acțiunii exometaboliților obținuți din micromicete ca supliment în hrana albinelor în perioada de pregătire pentru iernat și după perioada de iernat asupra familiilor de albine.

#### **Ipoteza de cercetare:**

Folosirea antibioticelor pentru tratamentul bolilor la albine este limitată sau interzisă din cauza apariției reziduurilor în produsele apicole. Utilizarea soluțiilor de exometaboliților din micromicete constituie o alternativă a antibioticelor, fiind administrați ca supliment alimentar în hrana albinelor contribuie la stimularea indicilor productivi ai familiilor de albine, precum și o acțiune antimicrobiană împotriva bolilor precum *loca americană*, *loca europeană* și *aspergiloza*.

**Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese** pentru realizarea experimentelor: în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate stupine cu familii de albine și tulpini de micromicete.

Pentru realizarea obiectivelor propuse în această lucrare au fost efectuate cercetări în următoarea ordine:

- Izolarea fitopatogenilor din probele prelevate din stupinele de albine și identificarea lor (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*);
- Efectuarea screeningului din 22 tulpini de micromicete din CNMN după criteriul de antagonism față de fitopatogenii *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*, selectați din stupinele cu albine și *Melissococcus plutonius*;
- Efectuarea screeningului din 22 tulpini de micromicete din CNMN după criteriul enzimatic (activitatea catalazei);
- Studiul particularităților morfo-culturale ale tulpinilor selectate *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 19 și *Penicillium* sp. 62;



- Elaborarea tehnicii de obținere a produselor din micromicete și utilizarea lor ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă, fungicidă și antioxidantă. Tulpinile de micromicete *Penicillium sp. 11*, *Penicillium sp. 19* și *Penicillium sp. 62*, *Penicillium sp. 91* și *penicillium sp. 97* au fost cultivate submers în rezultatul căruia s-au obținut soluții de exometaboliți, care au fost separați de biomasă prin filtrare. Soluțiile de exometaboliți ulterior au fost tratate termic la temperatura de 60<sup>0</sup>C, timp de 1 oră pentru distrugerea celulelor formatoare de colonii (CFC);
- Montarea experimentelor în stupine. Pregătirea hranei pentru albine suplimentată cu soluție de exometaboliți. Pentru estimarea eficienței soluției de exometaboliți, au fost desfășurate experiențe de testare comparativă a acestora pe familii de albine formate din patru loturi, câte 10 familii în fiecare lot: lotul I – martor (albinele căruia au fost hrănite numai cu sirop de zahăr de 50%); lotul II – *Penicillium sp. 11* (3 variante - albinele căruia au primit în hrană sirop de zahăr de 50% cu adaos de metaboliți ai tulpinii *Penicillium sp. 11* în cantitate de 10 ml/litru; 25 ml/litru; 50 ml/l), lotul III – *Penicillium sp. 19* (3 variante - albinele căruia au primit în hrană sirop de zahăr de 50% cu adaos de metaboliți ai tulpinii *Penicillium sp. 19* în cantitate de 10 ml/litru; 25 ml/litru; 50 ml/litru) și lotul IV – *Penicillium sp. 62* (3 variante - albinele căruia au primit în hrană sirop de zahăr de 50% cu adaos de metaboliți ai tulpinii *Penicillium sp. 62* în cantitate de 10 ml/litru; 25 ml/litru; 50 ml/litru). Amestecul de sirop de zahăr cu soluțiile menționate de exometaboliți a fost administrat în cantitate de 200 ml pentru fiecare ramă cu albine o singură dată, primăvara timpuriu.
- Interpretarea rezultatelor s-a efectuat după fiecare etapă în concordanță cu rezultatele obținute în cercetările efectuate și metoda utilizată.

### **Sumarul compartimentelor tezei**

**Capitolul 1** „Importanța economică, răspândire, măsuri de profilaxie și combatere în loca americană și europeană la *Apis mellifera* în Republica Moldova,,

În prima parte a I capitol am argumentat importanța economică și măsurile de profilaxie și combatere în Loca americană și europeană, ținând cont de condițiile de întreținere, factorii de mediu, evoluția clinică a bolilor specifice albinelor. Pentru rezolvarea acestor probleme și îmbunătățirea rezistenței la factorii infecțioși și de mediu s-a căutat rezolvarea cu ajutorul celor mai noi metode de diagnostic și profilaxie.

În a doua parte a capitolului am accentuat metodele de profilaxie, combatere și administrarea unor preparate cu proprietăți pre- și probiotice, preparate pe baza unor tulpini de microorganisme cu proprietăți antimicrobiene remarcabile, utilizate împotriva unor boli contagioase la albine.

Capitolul se încheie cu concluzii.

**Capitolul 2 „Material și metode de cercetare”** conține descrierea obiectelor și metodelor utilizate pentru realizarea cercetărilor. În calitate de obiecte de cercetare au servit stupine de albine și 22 tulpini de micromicete din CNMN, dintre care au fost selectate selectate 5 tulpini cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante semnificative: *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 19, *Penicillium* sp. 62, *Penicillium* sp. 91 și *Penicillium* sp. 97. Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost utilizate metodele de cercetare: microbiologice, biochimice și statistice.

Aplicarea metodelor clasice și a celor moderne, dotarea corespunzătoare cu echipamentele și mediile nutritive utilizate în studiu au asigurat descrierea obiectivă a impactului preparatelor de origine microbială asupra valorilor principalelor caractere de dezvoltare ale familiilor de albine.

Prelucrarea statistică a datelor a fost efectuată prin calcularea mediei aritmetice, deviației standard și intervalului de încredere pentru o medie cu ajutorul MO Excel.

Capitolul se încheie cu concluzii.

### **Capitolul 3 „Identificarea unor tulpini de micromicete cu potențial antimicrobian și antioxidant”**

În acest capitol este descrisă izolarea și identificarea unor patogeni din stupinile de albine (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae*). Efectuarea screeningului din 22 tulpini de micromicete din CNMN, reprezentanți ai genului *Penicillium*, după criteriul enzimatic (activitatea catalazei) și antimicrobian față de fitopatogenii selectați din stupinile de albine: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai aspergilozei și *Paenibacillus larvae*, agent patogen al lozii americane, dar și față de *Melissococcus plutonius*, agent patogen al lozii europene.

În cea de a doua parte a capitolului se valorifică selectarea mediilor de cultură a micromicetelor cu potențial enzimatic și antimicrobian, precum și tehnicile de obținere a produselor din micromicete și utilizarea lor ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă și antioxidantă.

Capitolul se încheie cu concluzii.

**Capitolul 4 „Utilizarea unor produse din micromicete în scop profilactic a unor bacterioze la familiile de albine”** Cercetările au fost efectuate în perioada 2013-2017 unde s-au monitorizat 5 stupine cu un număr variabil de familii de albine. Făcând o analiză a rezultatelor, am observat că ce-a mai înaltă incidență dintre bolile înregistrate la puietul albinelor fost

înregistrată în Loca americană. Utilizarea preparatelor medicamentoase pentru profilaxia sau tratamentul bolilor la albine, necesită consultația și prescripția medicului veterinar. Important este și faptul că în caz de utilizare a medicamentelor veterinare se vor folosi doar medicamentele veterinare autorizate și puse pe piață pentru albine.

În cadrul cercetărilor noastre unul din scopuri a fost de a monitoriza starea de sănătate, riscurile prezenței și dezvoltării unor boli contagioase la familiile de albine din cadrul stupinei, de la care au fost prelevate probe de material biologic și patologic pentru a stabili starea de sănătate și componența microbiocenozei familiilor de albine. Rezultatele investigațiilor microbiologice au demonstrat o creștere semnificativă a coloniilor de microorganisme pe toate tipurile de medii nutritive de cultură. După incubarea mediilor de cultură la termostat, s-au studiat proprietățile morfologice ale coloniilor bacteriene ce s-au dezvoltat pe mediile nutritive de cultură, iar din coloniile obținute, au fost preparate frotiuri, colorate după metoda Gram pentru cercetări microscopice. Rezultatele obținute permit de menționat că una din cele mai riscante perioade de supravețuire a familiilor de albine este perioada rece a anului, sau perioada de iernat. S-a observat că un procent considerabil din albinele moarte, sunt rezultatul prezenței formelor bacteriilor condiționat patogene care sub acțiunea unor factori favorizanți, devin patogene pentru unele familii de albine.

Din aceste considerente ne-am propus studierea proprietăților antibacteriene ale tulpinilor de micromicete. Ca cultură de referință pentru stabilirea proprietăților bactericide și bacteriostatice a fost folosită cultura agentului patogen *Paenibacillus larvae*. Indicii de sănătate ai familiilor de albine la care am tras atenția sunt: numărul de pătrate cu puiet căpăcit, cantitatea de miere pe ramă, prolificitatea familiei de albine.

Analizând rezultatele cu referire la indicii enumerați mai sus, se poate de menționat că cel mai înalt nivel a fost înregistrat la familiile de albine la care în hrană s-a administrat exametaboliților din micromicete în doză de 25 ml/l de sirop de zahăr.

Capitolul se încheie cu concluzii.

Compartimentul „**Concluzii generale și recomandări**” prezintă analiza rezultatelor obținute, formulate succint în concluziile generale, care reflectă valoarea practică a lucrării prin recomandările oferite.

Compartimentul „**BIBLIOGRAFIA**” cuprinde 180 surse citate în teză.

Compartimentul „**ANEXE**” conține: cererea brevet de invenție; actele de implementare.

# 1. IMPORTANȚĂ ECONOMICĂ, RĂSPÎNDIRE, MĂSURI DE PROFILAXIE ȘI COMBATERE ÎN LOCA AMERICANĂ ȘI EUROPENĂ LA *APIS MELIFERA* ÎN REPUBLICA MOLDOVA.

## 1.1. Importanța albinelor *Apis mellifera* și factorii decisivi în dezvoltarea ramurei apicole.

Apicultura a fost din vechime, una din ramurile importante ale sectorului agricol ce joacă un rol decisiv în economia națională și în economia țării noastre. *Albinele melifere*, împreună cu albinele sălbatice și alți polenizatori, îndeplinesc funcții importante de ordin ecosistemic și agricol prin polenizarea florilor, inclusiv a culturilor, servicii fără de care agricultura în special, cultivarea plantelor entomofile (plantele polenizate de insecte) nu ar exista. Albinele participă la polenizarea culturilor agricole entomofile, măbind productivitatea cu 50-200% și îmbunătățesc calitatea fructelor, legumelor și semințelor [59]. *Apis mellifera* este apreciată la nivel global datorită avantajelor sale apicole precum în ecologie și economia global [79].

Sectorul apicol oferă nu numai cel mai valoros produs alimentar natural - miere, propolis, polen, ceară de albine, veninul de albine, lăptișor de matcă, care sunt folosite ca aditivi alimentari în alimentație, dar sunt utilizate în scopuri medicinale, contribuind în mod semnificativ la bunăstarea omului. Sunt folosite ca produse alimentare de înaltă calitate, fiind căutate de public ca parte a unui mod de viață sănătos constituind, prin urmare, resurse suplimentare pentru îmbunătățirea situației economice a apicultorilor. În cadrul ecosistemelor agricole principalii polenizatori sunt coloniile de albine. De asemenea prin acțiunile lor coloniile de albine contribuie la conservarea resurselor de mediu asigurând astfel dezvoltarea durabilă a zonelor rurale.

Mierea are un efect fiziologic pozitiv, în special în ceea ce privește sănătatea, având în vedere proprietățile sale antiseptice, antiinflamatoare și vindecătoare. Totodată, ea întărește sistemul imunitar. În plus, toate aceste produse sunt folosite în parfumerie, cosmetic, medicină și diferite ramuri ale industriei alimentare. Dezvoltarea și creșterea productivității apiculturii în lumea modernă este posibilă numai printr-un studiu profund al condițiilor de viață al albinelor, a caracteristicilor lor biologice și fiziologice, atât ale fiecărui individ, cât și ale familiei de albine în ansamblu. Albinele trăiesc în familii numeroase (50-70 de mii de indivizi) și sunt capabile să colecteze multă miere și polen în rezervă, vizitând un număr mare de flori pentru aceasta. Fiecare familie de albine aparține unei anumite specii, *Apis mellifera* este singura insectă socială care a intrat în relații mutualiste cu oamenii [116].

Din vremuri străvechi au fost vîinate de pe copaci și roci coloniile de albine sălbatice, ca producători de miere, punându-se astfel bazele apiculturii. Astfel până în secolul XIX – lea, când a apărut tehnologia de producere a zahărului, mierea era considerată ca unicul îndulcitor, utilizat

în industria alimentară. Mierea albinelor a fost apreciată nu numai ca aliment, ci și ca medicament. Sectorul apicol s-a schimbat substanțial, cu noi presiuni din partea agenților patogeni și agrochimici în utilizarea terenurilor [32; 150].

Albinele sălbatice au fost studiate în primul rând ca producători de miere având drept scop facilitarea atât a recoltării cât și colectării ei, apoi în calitate de polenizatori ai plantelor agricole. Mierea de albine este apreciată după însușirile sale nutritive dar și după acțiunile sale terapeutice. Ca principalul produs al apiculturii, mierea de albine este rezultatul combinației dintre nectar, mană sau sucurile dulci, colectate de către albinele lucrătoare din diferite părți ale plantelor în amestec cu unele substanțe formate în glandele salivare ale albinelor.

Importanța apiculturii se datorează polenizării plantelor, producerea produselor apicole valoroase, ridicarea nivelului de trai, creșterea speranței de viață a omului, educațional, apiterapie, ecologic – apimonitorizare și ca obiect de studiu în biologie.

Densitățile crescute ale albinelor melifere gestionate în intervalele lor native și non-native ar putea afecta albinele sălbatice prin competiția resurselor și schimbările în comunitățile de plante [3, 125].

Odată cu creșterea gradului de conștientizare a publicului cu privire la mortalitatea ridicată a albinelor, mulți proprietari de terenuri și apicultori s-au întrebat dacă aceste preii restaurate ar putea îmbunătăți semnificativ nutriția coloniilor de albine [29]. S-au dezvoltat astfel specii de albine destinate producției de miere. Albinele sălbatice au fost permanent învăluite de o aură de mister, datorită comportamentului și naturii lor extrem de sociale. De multe ori s-au făcut analogii între comportamentul social al albinelor și cel al oamenilor [44].

De-a lungul timpului apicultorul modern a reușit să aplice tehnologii de producție intensive viabile și sustenabile din punct de vedere economic și de gestiune a resurselor de mediu. Apicultorul modern al zilelor noastre poate aduna astfel produsele apicole din stup cu o mare ușurință și eficiență sporită, mult mai mare decât cea a vânătorului de miere sau a culegătorului de pe timpuri [46].

În calitate de polenizatori și producători de numeroase produse de consum uman, albinele au o mare importanță ecologică, economică și de sănătate [111]. Ecosistemele urbane pot găzdui comunități de albine mai bogate decât zonele agricole intens intensificate, în special în spațiile verzi urbane bogate în resurse, cum ar fi alocațiile și grădinile de familie. În același timp, apicultura urbană a crescut în multe orașe europene, ridicând îngrijorarea că adăugarea rapidă a unui număr mare de albine gestionate ar putea epuiza resursele florale existente, declanșând competiția între albinele sălbatice și albinele melifere [30]. De aceea termenul de apicultură are un alt înțeles în raport cu celelalte ramuri de producție din agricultură și totodată un rol deosebit de important în ceea ce privește legăturile și relațiile între componentele ecosistemului.

Practicarea apiculturii își are începutul odată cu necesitățile omului în obținerea mierii și subprodusele acesteea. La începutul practicării apiculturii, apicultorii foloseau metode simple de creștere, pe măsură ce această ramură de producție se dezvoltă au apărut noi proceduri destul de complicate, iar utilajul și tehnologiile devin din ce în ce mai performante. Apicultura este o activitate economică profitabilă, dar este important că nivelul tehnologiei de producție trebuie să se potrivească cu realitatea economică de pe piețele solicitate [83].

Pentru dezvoltarea sectorului apicol în ultimii ani, s-au implementat de o serie de măsuri, prin care s-au dezvoltat programe de susținere destinate crescătorilor de albine. Ajutorul acordat a survenit ca rezultat a existenței unor șir de probleme cu care apicultorii se confruntă mai des. Prin pierderea masivă în mortalitatea înaltă în coloniile de albine, cheltuieli exagerate pentru obținerea mierii de albine și concurența dură existentă pe piață. Rolul economic a apiculturii ca parte a agriculturii este stabilită de importanța produselor apicole obținute, pe care omul le recoltează de la albine, dar și rolul apiculturii în celelalte ramuri de producție agricolă, în care albinele au funcție de polenizare. Importanța polenizării culturilor agricole și a florei spontane are beneficii deosebite în ceea ce privește dezvoltare biodiversității în ansamblu. Biodiversitatea florei spontane determină valoarea medicală a produselor apicole, acestea fiind utilizate cu succes în apiterapie cu scopul tratării diferitelor boli. Albinele, prin modul lor de viață, sunt dependente de mediul natural în special prin hrană și comportamentul reproductiv, omul având responsabilitatea de a-i asigura protecția și un management durabil, prin asigurarea unui mediu sănătos și minimizarea riscurilor asupra existenței și bunăstării speciei, asigurându-i eficiența economică în polenizare și producție [ 153, 161].

Prin polenizarea speciilor de plante cultivate și spontane, albina meliferă contribuie la creșterea productivității culturilor agricole, dar și la conservarea, restabilirea și protecția biodiversității prin polenizarea florei spontane, fiind o verigă de bază în lanțul trofic al tuturor speciilor. Albinele melifere, față de alte specii de albine (sociale sau solitare) sporesc eficiența polenizării, ca urmare a unor particularități anatomice și biologice. Asigurarea unui mediu curat ne obligă să conservăm resursele naturale, având în vedere relația dintre depozitarea corespunzătoare a acelor produse și viața oamenilor. Albinele sunt considerate resurse biologice de importanță vitală. Scopul de polenizare a plantelor sălbatice și cultivate – proces care contribuie la fertilizarea și formarea semințelor, legumelor și fructelor - albinele joacă un rol important în viața și dezvoltarea a sute de mii de specii care formează vegetația Pământului. Resursele anorganice și energia solară din plante, prin fotosinteză materie organică, care la rândul ei formează acoperirea solului fertil și furajele pentru insecte, păsări, mamifere și alte creaturi [89]. Aceste relații ecologic-trofice sunt esențiale pentru noi ca existență și pentru mediu. Dacă dorim să le menținem în continuare relațiile în relația lor logică și atât de utilă, este

necesară salvarea apiculturii ca ramură importantă a activității umane. Mai mult ca atât este necesară capacitatea de a crea toate condițiile pentru apicultura, în scopul conservării și dezvoltării nelimitate a potențialului apicol.

Organizațiile specializate ale ONU au dat albinelor al patrulea loc în clasificarea agenților de detectare a poluării mediului. Dirijarea activităților sale pe o rază de zbor de aproximativ 3 kilometri (o albină acoperă o zonă aproximativ 2.500 ha) la diferite înălțimi deasupra solului, detectează poluanți în aer, apă și plante (substanțe nocive ca urmare a activităților industriale, trafic, pesticide, particule radioactive) care le afectează negativ viața prin intoxicare. Deci, albinele sunt agenți de detectare a poluării mediului. Dezvoltarea economică, creșterea populației trebuie să fie însoțită de îmbunătățirea tehnologică și dezvoltarea industrială accelerată. Graba și organizarea necorespunzătoare au provocat o poluare sporită mediul înconjurător și o parte din daunele aduse naturii devin ireversibile [161].

## **1.2. Situația epidemiologică față de unele boli ale puietului apicol.**

În ultima perioadă mediul înconjurător a devenit neospitalier față de om și se datorează acestuia aproape în exclusivitate, deoarece toate neajunsurile menționate se datorează activității umane, iar apicultura, în aceste condiții, se confruntă cu mari neajunsuri. La toate acestea se mai adaugă și unele boli ale puietului apicol provocate de fungi sau virusii.

*Ascosphaera apis* ce determina boala ascoferoza sau "puietul varos". Micozele se caracterizează prin faptul că după moarte puietul își păstrează forma, se mumifică, se deshidratează și se întărește. Ascoferoza este o boala cu un grad mare de contagiozitate și constituie o problema deosebită în multe țări deținătoare de colonii de albine. Stadiul larvar este probabil cel mai vulnerabil la, dar efectele nutriției larvelor asupra susceptibilității la boli a albinelor nu sunt bine cunoscute [56, 57]. Boala apare de obicei în lunile aprilie – mai, evoluează progresiv în iunie și descrește ca intensitate în iulie-august. Prezența și prevalența agenților patogeni fungici la albinele melifere au consecințe de amploare, punând în pericol alte specii și amenințând securitatea albinelor. Dar, ținând seama de faptul că sporii ierneză în intestinul albinelor adulte și în miere, este de așteptat ca și în aceste colonii, în anul următor, puietul văros să apară din nou, pentru că, la un moment dat apar factorii favorizanți: creșterea umidității în stup și lipsa ventilației eficiente [20, 101, 115].

Infecția larvelor în colonie se face: pe cale bucală, de către albinele doici, odată cu hrana. Transmiterea bolii de la colonia bolnavă la una sănătoasă se face prin: furțișag, fagurii cu larve bolnave, fagurii cu păstură și miere, transferul de faguri cu albine, ustensile, inventarul apicol și echipamentul de protecție nedezinfectate.

Sursa primară de infecție o constituie: larvele bolnave mumificate, fagurii cu păstură și

mierea. Sursele secundare de infecție sunt: stupii și inventarul apicol, coloniile de albine, măci și trântori proveniți din colonii cu origine necunoscută din punct de vedere sanitar veterinar.

Boala se recunoaște după aspectul în mozaic al fagurelui cu puiet datorat alternanței de celule căpăcite normale cu celule care conțin mumii albe, cretacee, larvele infectate se îngălbenesc își pierd segmentația, se deshidratează și capătă consistența cretei; celulele care conțin larve afectate sunt descăpăcite de albine, putându-se observa conținutul invadat de miceliul alb al ciupercii; mumiile sunt neaderente la pereții celulei fiind îndepărtate de albine și se găsesc pe fundul stupului, pe scândura de zbor și în fața stupului. Ascosferoza poate fi diagnosticată și în teren pe baza semnelor clinice, dar confirmarea trebuie să se facă prin examene de laborator. Cu toate ca boala poate fi ușor recunoscută în stupină de către apicultori insistăm că trebuie efectuat și un examen de laborator. Nu sunt de loc puține cazurile în care ascosferoza seamănă foarte bine cu evoluția concomitentă într-o colonie și a locii americane, sau europene. Pe același fagure pot exista atât larve afectate de ascosferoza (puiet văros) cât și larve afectate de locă.

Prognosticul formelor ușoare de ascosferoză depistate la timp, este favorabil dacă se aplică măsuri sanitare veterinare specifice și tratament eficient. Aceasta poate deveni nefavorabil la coloniile slabe și în condiții de mediu nefavorabile apiculturii. Este o boală cronică specifică albinelor, care poate persista în colonii ani de zile, reducând atât producția de puiet, cât și de miere [152].

*Aspergiloza* în popor mai este numită puietul pietrificat este o boală infecto-contagioasă comună larvelor și albinelor adulte făcând parte din categoria zoonozelor. Boala fungică este provocată de *Aspergillus flavussingur* sau în asociere cu *Aspergillus niger* și *Aspergillus fumigates*. *Aspergiloza* este o boala cu un grad redus de incidența, cu toate că, *Aspergillus flavus* este foarte raspândit în natură, se întâlnește în pamânt, în gunoiul de grajd, în apă, pe suprafața plantelor și animalelor în stare epifită. Foarte puține studii s-au concentrat pe aspectele epidemiologice ale puietului pietrificat și ale larvelor bolnave de către albinele lucrătoare, este posibil ca un număr mare de cazuri să rămână nediate diagnosticate. Tulpinile de *Aspergillus* sunt omniprezente și asociate cu boli la multe insecte, plante, animale și oameni. Sunt considerați agenți patogeni oportuniști, care necesită gazde imunocompromise pentru a stabili infecția. Studiile microbiologice au arătat că sunt prevalențe mari de *Aspergillus* în stupine, care apar saprofit pe substraturile stupilor la albine [56].

Boala evoluează primăvara și toamna, în special după un cules abundent de polen când datorită preparării și aplicării necorespunzătoare a polenului în celule, păstura este contaminată ușor. Evoluția bolii este agravată de timp umed și ploios, condiții care se întâlnesc și în stupinele



amplasate în locuri umede, lipsite de soare. Această infecție provoacă până la 50% descompunere a nimfelor sau pupelor albinelor [102].

Situația epidemiologică a bolii este infecția albinelor și a larvelor, care în colonie se face pe cale bucală, odată cu hrana. Albinele culegătoare care vin în contact cu sporii acestor fungi, în special de pe suprafața plantelor melifere, îl transportă în colonia de albine și dacă întâlnesc condiții favorabile de umiditate și căldură se dezvoltă inițial pe fagurii cu păstură și pe corpul albinelor moarte, de unde se răspândesc la întreaga populație de puiet și la restul albinelor adulte. Răspândirea bolii va fi eficientă prin îndepărtarea puietului bolnav, ce afectează negativ albinele. Transmiterea bolii de la colonia bolnavă la una sănătoasă se face prin mai multe căi: furțișag, fagurii cu larve bolnave, fagurii cu păstură și miere, transferul de faguri cu albine, ustensile, inventarul apicol și echipamentul de protecție nedezinfectate [16].

Sursa primară de infecție o constituie: albinele și larvele bolnave pietrificate și fagurii cu păstură; Sursele secundare de infecție sunt: stupii și inventarul apicol, coloniile de albine, mătcile și trântori proveniți din colonii cu origine necunoscută din punct de vedere sanitar veterinar. Clinic și anatomopatologic boala se recunoaște după următoarele: larvele mor imediat înainte sau după momentul căpăcirii; în celulele necăpăcite se poate observa pânze de mucegai galben-verzui sau negru; zona de fagure afectat, se lărgeste progresiv cuprinzând mai multe celule cu puiet și formând insule sau plaje de mucegai; larvele sunt invadate de miceliu galben-verzui, se deshidratează, sunt aderente la pereții celulei și au consistență dură; albinele prezintă stări de agitație, incapacitate de zbor, cad în fața stupului, fac mișcări dezordonate ale membrelor, cavității bucale și mor în câteva ore prin toxemie; cadavrele prezintă abdomenul ușor mărit care în scurt timp devine dur ca și toracele; miceliul invadează corpul albinelor cu începere de la intestin, străbate tegumentul și iese prin orificiile naturale acoperind întreg corpul albinei cu un strat de miceliu de culoare galben-verzuie [56].

Diagnosticul bolii se stabilește prin: examen clinic și anatomopatologic și examene de laborator. Aspergiloza poate fi diagnosticată și în teren pe baza semnelor clinice, dar confirmarea trebuie să se facă prin examene de laborator. Prognosticul este favorabil dacă se iau măsuri de înlăturare a condițiilor care favorizează dezvoltarea micozei [54].

Puietul în sac este o boală infecto-contagioasă specific larvelor de albină, cărora le determină moartea în stadiul de puiet căpăcit, larvele luând aspectul caracteristic de sac plin cu lichid. Agentul patogen al bolii este un virus filtrabil, denumit *Morator aetatule*, care se localizează în celulele glandelor hipofaringiene, toracice, celulele dermice, corpul gras și celulele nervoase. Odată cu preluarea hranei infectate, poate avea loc contaminarea atât a albinelor, cât și a larvelor, care sunt foarte sensibile în perioada de transformare în prenimfă. Contaminarea cu acest patogen prin cavitatea bucală poate avea lor și la înlăturarea larvelor bolnave de către

albinele sănătoase. Răcirea bruscă a vreții, cât și ploile prelungite în timpul sezonului activ sunt principalii factor de apariție a acestei boli. În deosebi această boală se acutizează primăvara, când sunt infectate o mare parte din albinele doici astfel, considerându-se că acest virus a supraviețuit în albinele adulte în timpul iernii fără puiet [48]. Ca și în cazul altor boli boala puietului în sac se răspândește de la o colonie la alta prin furtisaj, prin schimbarea fagurilor infectați de către apicultori dintr-un stup în altul, dar și a. Se consideră că acest agent patogen este mereu prezent în coloniile de albine și își intensifică activitatea când apar condițiile favorabile pentru dezvoltarea sa. Evoluția acestei boli depinde foarte mult de puterea familiei în care a apărut, care poate vindeca sau stimula dezvoltarea ei fără intervenția din exterior a apicultorului. Clinic și anatomopatologic boala se recunoaște după următoarele: aspectul de puiet împrăștiat al fagurelui cu puiet afectat; moartea larvelor la 4 zile după căpăcire; celule cu căpăcele scufundate sau perforate; din alb-sidefiu, culoarea larvelor devine treptat galben-cenușiu și apoi brun; după moarte larvele extrase din celule au aspectul unui sac plin cu lichid; prin deshidratare larva se transformă într-o cojiță brună așezată pe plașeul celulei cu capul recurbat spre abdomen, dând aspectul cunoscut de ”papuc chinezesc”; larva moartă nu prezintă miros, nu este aderentă la pereții celulei, iar conținutul nu este filant; albinele adulte din coloniile afectate de boală pierd apetitul pentru polen și au o viață mai scurtă. Diagnosticul bolii se stabilește prin examene de laborator. Prognosticul bolii poate fi grav dacă nu se iau măsuri de menținere a unei stări de igienă în stupi și stupină, prin eliminarea și topirea fagurilor vechi, a celor cu puiet afectat, mort și rămas neclozionat și nu se asigură hrană din surse sigure, calitative și cantitative [48].

### **1.3. Particularități epidemiologice, tabloul clinic și patomorfologic în loca americană și europeană.**

Loca americană este o boală cu evoluție gravă produsă de un bacil sporogen *Paenibacillus larvae* care afectează în speță puietul albinelor, semne de boală apar de regulă după căpăcire și provoacă mari pierderi economice în apicultură [154.10]. Maladia are un caracter enzootic, cu difuzibilitate mare în stupina contaminată, evoluează sezonier, în lunile aprilie – august, cu vârf evolutiv în iulie – august. Primăvara și vara suprafața de puiet capătă o culoare pestriță. Vara târziu, când activitatea de creștere a puietului regresează, se observă câteva celule rămase. Dar și atunci când imaginea externă pare să arate bine este posibil ca unele celule să fie atacate. Căpăcelele acestor celule sunt înfundate și în mare parte perforate. Sub căpăcel, larva se descompune într-o masă păstoasă de culoarea cafelei cu lapte care se întinde ca un filament. Pe alocuri în jghebul din partea inferioară a celulei se află o masă uscată sub formă de solzi, ea aderă de peretele celulei și poate fi înlăturată cu greu [160]. În prezent, acest agent patogen este larg răspândit în albinele europene - *Apis mellifera*. Cu toate acestea, se știe puțin

despre contagiozitatea și patogenitatea *Paenibacillus larvae* la albinele asiatice care cuibează cavitatea, *Apis cerana*. Mai mult, cunoștințele comparative despre contagiozitatea și patogenitatea *Paenibacillus larvae* între ambele specii de albine melifere sunt limitate [82].

*Loca Americană* se manifestă în două forme: forma de înmulțire bastonașul și forma de durată sporii. Bastonașele cu flagel se reproduc relativ repede prin diviziune, ele se umflă și formează sporii. Flagelii se pierd și constituie în diagnosticul de laborator o dovadă importantă. Numai sporii sunt contagioși și doar larvele pot fi infectate. Albinele sunt transmițătoare de spori, prin hranirea puietului. În intestinul mijlociu al larvei, sporii se transformă în 24 de ore în bastonașe. Acestea trebuie să pătrundă prin peretele intestinal pentru a se putea înmulți în lumenul intestinal. Numărul sporilor care provoacă o infecție depinde de etapa de dezvoltare a larvei, în cazul larvelor foarte tinere sunt foarte puțini spori. Deja după 48 de ore de la infectare sunt prezenți peste 10.000 de spori și după patru - cinci zile peste 10 milioane de spori pentru infestare. Infestarea are loc de cele mai multe ori la larvele tinere, factorul decisiv fiind greutatea larvei. Numărul de spori necesari unei noi infestări poate fi condițiile de dezvoltare din intestinul mijlociu al larvei în plin proces de schimbări. Dar nu fiecare larvă este la fel de sensibilă față de infestare. Decisiv pentru agentul patogen este dacă el poate să producă rapid un număr suficient de bastonașe, pentru a pătrunde mucoasa intestinului mijlociu. Larvele în colonii cu rezistență diferită par să se deosebească atât în perioada de dezvoltare a intestinului, cât și în compoziția conținutului din intestin. De o mare însemnătate este și compoziția lăptișorului. La albinele din coloniile mai rezistente efectul antibacterian al lăptișorului și implicit inhibarea germinării sporilor este mai puternică decât la celelalte. În afară de aceasta, reacțiile de apărare în hemolimfă influențează rezistența [10, 89, 129]. Puietul familiilor de albine se poate opune infestării în mod diferit. Larvele de matcă sunt cele mai sensibile, iar cele de trântori mai puțin sensibile. Infestarea se face pe cale orală, odată cu hrana administrată de albinele doici, sporii pătrund în intestinul larvei, iar din a șasea zi se multiplică foarte repede producând moartea în 3 - 4 zile. Albinele tinere, încercând să îndepărteze larvele moarte din celule, se contaminează și transmit sporii la alte larve. Cantitatea de spori din mierea contaminată, extrasă are rol potențial pentru contaminarea totală cu spori a familiei de albini, în același timp are valoare de prognostic nefavorabil în evaluarea riscului de apariție a viitoarelor focare de *Loca Americana* la nivelul stupinei [129, 157].

În timpul iernării există o sursă de spori la albinele adulte, ceea ce favorizează creșterea riscului de infecție în primăvară. Mai mult ca atât mierea contaminată poate fi ca un rezervor de infecție al sporilor de *Paenibacillus larvae*, comparativ cu puietul bolnav, capabile pentru a produce colonii bolnave clinic. Transmiterea bolii de la o familie bolnavă la alta sănătoasă, precum și de la o stupină la alta se face prin furțișag, trântori, adăpare, unelte din stupină, diferiți

paraziți (molia de ceară), trecerea fagurilor de la un stup la altul și prin hrănirea cu miere infestată. Prin examinarea mierii s-a putut dovedi că nu în toate coloniile a căror hrană conține spori, loca americană poate să izbucnească [95, 158]. Suprafețele fagurilor de puiet din aceste colonii sunt adesea pestrițe. Hotărâtor în această evoluție este instinctul de curățenie al albinelor care, parțial este determinat genetic. Albinele pot recunoaște starea celulelor înainte ca căpăcelul să se schimbe în baza descompunerii bacteriene din celulă. Puterea de apărare a coloniei de albine este însă stabilită și de capacitatea albinelor de a separa sporii din hrana din gușa de miere cu ajutorul ventriculului. Sporii ajung în intestinul albinelor unde cel puțin o parte din ei germinează. Sporii sunt eliminați cu fecalele. Pericolul de infecție există în acest caz numai atunci, când fecalele sunt depuse în cuib, datorită unei alte boli. Nu în fiecare colonie transmiterea lui *Bacillus larvae* duce, în mod obligatoriu, la înmulțirea și răspândirea acestuia în colonie și deci, la izbucnirea epidemiei. Celulele bolnave din stadiile incipiente ale infecției pot fi ușor trecute cu vederea [10,60].

Prognosticul este nefavorabil datorită faptului că boala are o evoluție gravă, agentul patogen este foarte rezistent, iar îndepărtarea larvelor moarte din fagurii care constituie sursa de contaminare. Simptomatic fagurii cu puiet infectat au aspect caracteristic: căpăcele înfundate, de culoare mai închisă și uneori perforate, larvele moarte răspândesc un miros asemănător cleiului de tâmplărie sau de pește alterat. Larvele moarte își pierd forma și culoarea, se încrețesc și se îngălbenesc, devenind apoi crem și în cele din urmă brune. Conținutul lor se transformă într-o masă vâscoasă care se întinde sub formă de filament. Pe măsura trecerii timpului, larvele se usucă, masa vâscoasă se reduce treptat până se transformă într-o cojiță dispusă în lungul peretelui inferior al celulei, de care este strâns lipită, ceea ce face să nu poată fi scoasă afară de către albine. Pentru stabilirea diagnosticului se procedează ca în cazul locii americane, trimițându-se probe la laboratorul veterinar. Diagnosticarea precoce a coloniilor infectate, dar care nu sunt încă bolnave, ne oferă posibilitatea de a elimina aceste colonii de sporii de *Paenibacillus larvae* prin metoda roiului scuturat, prevenind astfel distrugerea coloniei. Prin urmare, supravegherea coloniilor de albine pentru infectarea cu *Paenibacillus larvae*, urmată de măsuri sanitare adecvate este o intervenție foarte importantă pentru controlul locii americane. Pentru identificarea sporilor de *Paenibacillus larvae* în coloniile infectate, se folosesc în mod obișnuit mostre fagure de miere, albine adulte sau resturi de stup [10, 45].

*Loca Europeană* este o boală infectocontagioasă, care afectează de regulă larvele tinere, determinându-le moartea în stadiul de puiet necăpăcit. Boala este produsă de un streptococ, *Melissococcus plutonius* în combinație cu alte câteva bacterii Gram-pozitive (*Achromobacter eurydice*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus dendritiformis*) implicate ca urmare a infecției secundare [51]. Boala are un

caracter enzootic la o parte din coloniile aceleiași stupine, datorită contaminării mecanice a puietului cu agentul patogen rezistent în timp. Patogenitatea unei bacterii depinde de virulența acesteia, iar înțelegerea mecanismelor care influențează virulența poate permite îmbunătățirea controlul bolii [65].

Loca europeană evoluează sezonier, în perioada aprilie – mai, uneori cu intermitență, alteori până toamna târziu, în deosebi la familiile slabe care au iernat cu rezervă insuficientă de hrană și neprotejate corespunzător împotriva frigului. Este o boală cu răspândire globală, care afectează albinele melifere, ce duce la infecții letale ale larvelor și în cazuri severe, chiar la moartea coloniilor. În ultimul timp, a fost documentată o profundă diversitate genetică și fenotipică pentru agentul cauzal *Melissococcus plutonius*. Cu toate acestea, lucrările experimentale privind impactul diverselor tulpini de *M. plutonius* asupra gazdelor cu fundal genetic diferit lipsesc complet și rolul invadatorilor secundari este puțin înțeles [90, 91].

Contagiozitatea bolii este datorată următoarelor cauze: multiplicării florei bacteriene patogene în intestinul larvelor; înmulțirii germenilor pe seama hranei existente în intestinul larvei; menținerii florei bacteriene în coloniile bolnave, în fagurii cu puiet afectat, în rezervele de păstură și în organismul mătcilor și albinelor; creșterii virulenței germenilor microbieni; toxinelor eliminate de flora bacteriană și difuzării acestora în tot organismul larvei; gravelor perturbări fiziologice care se produc în organismul larvelor, urmate de îmbolnăvire și moarte. Infecția epidemiologică a larvelor în colonie se face pe cale bucală, de către albinele doici, odată cu hrana și pe cale transovariană, prin măci. Infestarea cu Loca Europeana începe atunci, când larvele ingeră bacteriile, care pot fi prezente în alimentele din puiet, sau pot fi transmise de la albinele infectate. Bacteriile se înmulțesc la nivelul intestinului mijlociu al larvelor infectate, care concurează cu larvele pentru alimente, adesea determinând moartea larvelor înainte de capturare. Odată cu înaintarea infecției, albinile bolnave suferă un răspuns sistemic cu o schimbare a metabolismului și a sistemului de apărare imun activ. Mai mult, larvele sunt capabile să-și refacă răspunsul la o invazie secundară în infecțiile în stadiu avansat [89, 90]. Larvele devin apoi o masă semi-fluidă și își schimbă culoarea de la un alb perlat sănătos la o culoare galbenă, apoi maro. Larvele moarte se usucă lent devenind o substanța „cauciucată” care aderă vag la nivelul celulei [158]. Albinele încearcă să îndepărteze larvele moarte, în timp ce le elimină larvele devin infectate, părțile bucale ale albinelor asistente devin contaminate cu bacterii. Loca Europeana este răspândită de albinele asistente cu larve în timpul hrănirii. Ocazional, unele larve infectate vor supraviețui infecției ca larve și vor deveni adulți, care răspândesc bacteriile în materiile fecale, infectând în continuare colonia. Pe măsură ce boala contaminează colonia, aceasta poate deveni mai susceptibilă la furtișag. Orice albină venită la furtișag, care vine în contact cu bacteria de Loca Europeana acționează ca vectori care răspândesc bacteriile. În cazuri grave de boală,

aceasta va duce la moartea coloniei. Loca Europeană este extrem de contagioasă și poate rămâne viabilă timp de câțiva ani în miere, ceară și echipamente. Tratamentul necontrolat cu antibiotice a dus la apariția unor tulpini rezistente la antibiotice, solicitând proceduri de tratament alternative sigure care ar putea controla aceste boli. Se știe că microflora intestinală al albinelor afectează sănătatea generală a albinelor prin creșterea rezistenței acestora la o serie de boli prin modificarea răspunsului imun și producția de diferiți metaboliți antimicrobieni. În totalmente aceste bacterii rezistente din intestin sunt identificate ca bacterii probiotice și asigură sănătatea acestor albini minuscule [103].

Contaminarea bolii are loc de la colonia bolnavă la una sănătoasă ce se face prin: furțișag, fagurii cu larve bolnave, fagurii cu păstură, mătci, trântori, albine rătăcite, transferul de faguri cu albine, paraziți, prădători, ustensile, inventarul apicol și echipamentul de protecție nedezinfectat.

Sursa primară de infecție o constituie larvele bolnave și fagurii cu păstură. Sursele secundare de infecție sunt: stupii și inventarul apicol, fagurii cu detritusuri larvare, colonii de albine, mătci și trântori proveniți din colonii cu origine necunoscută din punct de vedere sanitar veterinar. Perioada maximă de incubație a bolii este de 45 zile.

Clinic și anatomopatologic boala se recunoaște după următoarele: aspectul de puiet împrăștiat al fagurelui afectat, datorat alternanței de celule cu ouă, larve necăpăcite și celule goale în zone compacte cu puiet căpăcit; așezarea larvei în poziție anormală în celulă (răsucită cu partea dorsală sau ventrală spre deschiderea celulei); tegumentul larvei devine aproape transparent evidențiind traheile și tubul digestiv; culoarea larvei din alb-sidefiu se schimbă în galben intens până la maroniu mat; corpul își pierde turgescența segmentația se accentuează, devine flasc și se transformă într-o masă păstoasă semilichidă, neaderentă la pereții celulei; în funcție de agentul cauzal, larvele afectate pot degaja un miros acru sau ușor aromat dar în cele mai multe cazuri, acestea nu degajă nici un miros caracteristic; larvele moarte se deshidratează, se mulează pe fundul celulelor, au aspectul unor solzișori, de culoare maronie și de consistența cauciucului, ce pot fi ușor extrași din celule [129, 158]. Pentru a testa rapid, se poate folosi o scobitoare sau ceva asemanator și se sondează celula, apoi scoasă. Odată uscat, rămâne o substanța cauciucată pe scobitoare. Semnele clinice dispar de cele mai multe ori spontan la sfârșitul sezonului activ dar boala poate să reapară. Diagnosticul bolii se stabilește prin examen clinic, anatomopatologic și examene de laborator. Loca europeană poate fi diagnosticată și în teren pe baza semnelor clinice, dar confirmarea trebuie să se facă prin examene de laborator [117, 129].

Prognosticul formelor ușoare de locă europeană depistate la timp, este favorabil dacă se efectuează tratament medicamentos eficient. Aceasta poate deveni nefavorabil la coloniile slabe și în condiții de mediu nefavorabile apiculturii.

#### **1.4. Metode și mijloace de diagnostic utilizate în bolile bacteriene ale albinelor.**

Diagnosticarea bolii în stadiile incipiente ale dezvoltării sale ne va permite să identificăm rapid centrul infecției și să simplificăm în mod semnificativ tratamentul. În caz contrar, boala se poate răspândi la toate familiile de albini provocând pierderi imense apicultorului. Astfel, este nevoie de un control mai riguros, cum ar fi desfacerea cuibului numai la umbră la temperatura aerului începând de la 14<sup>0</sup>C, dar se mai admite și o revizie fugitivă la temperatura de 10-12<sup>0</sup>C. Pentru examinare vor fi luate anumite măsuri atât pînă la, cât și în timpul examinării cuibului: pregătirea și sterilizarea inventarului necesar, folosirea echipamentului de protecție, spălarea minuțioasă a miinilor, utilizarea fumului pe deasupra ramelor numai în caz de necesitate. După desfacerea cuibului examinarea se face cu un anumit scop și foarte rapid cu respectarea anumitor reguli: sunt strict interzise mișcările bruște ale apicultorului, lovirea în stup, strivirea albinelor infectate, să stea în fața sau în cale albinelor, ca să nu le impiedice să zboare, să evite furtișagul [22, 72]. În unele cazuri verificarea activității familiilor de albine se poate face fără deschiderea cuibului numai privind activitatea albinelor de la urdiniș, sau examinarea numai a porțiunii din fața urdinișului. Pe baza semnelor clinice și a examenelor de laborator de înaltă precizie (laboratoarele sanitar-veterinare raionale sau la Centru Republican de Diagnostică Veterinară din Chișinău) se poate pune diagnosticul precis.

Astfel, diagnosticul prezumtiv se pune pe baza semnelor clinice, iar diagnosticul de certitudine se stabilește în laborator. Pentru aceasta este nevoie de colectarea probelor. Proba se va colecta pe o porțiune de aproximativ 20 cm<sup>2</sup> în dimensiune ce va conține o parte din puietul mort cu puțină miere prezentă în probă. Monstra va fi plasată într-un recipient închis și trimisă la laborator pentru diagnostic. În cazul probele cum ar fi mierea, lăptișorul de matcă, polenul de albine și ceara de albine, acestea se colectează aproximativ 50 g într-un recipient curățat și se trimite la laborator. Cultura bacteriană trebuie păstrată la temperatura de 4<sup>0</sup>C care poate fi păstrată pînă la 6 luni sau în formă liofilizată pe mediul de cultură care este compus din zaharoză (10%) extract de drojdie (5%) în 0.1 M KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, pH 6.6. Cultura uscată se depozitează la 4<sup>0</sup>C și poate fi păstrată cîțiva ani. Proba trebuie să fie etichetată vizibil și informații precum tipul eșantionului, se vor înregistra numele fermei, numărul stupului, locația, data și colectarea probelor de fagure cu puiet suspect, cu dimensiuni de minimum 10/15 cm. În cadrul diagnosticului de laborator se efectuează și examenul anatomopatologic, bacterioscopic și bacteriologic. Metodele de diagnosticarea a puietului apicol a fost stabilit pentru certificarea produselor apicole. Prin respectarea tehnicilor, aceasta va promova producția de albine și produse apicole sigure și de calitate pentru consumul uman atât la nivel național cât și internațional [161].

## Teste de diagnostic pentru *Paenibacillus larvae*

*Testul de lapte Holst* este un test simplu bazat pe nivelul ridicat de enzime proteolitice produse prin sporularea larvelor de *Paenibacillus larvae* [68].

*Testul de reducere a nitraților* poate fi efectuat pe un mediu precum BHIT, cu azotat de potasiu adăugat (1–2 mg/L de mediu). După ce a apărut creșterea, adăugăm o picătură de reactiv acid sulfanilic-alfa-naftol se va produce o culoare roșie, dacă nitratul a fost redus la nitriți. Diagnosticul nu ar trebui să fie bazat numai pe acest test, ci comparate împreună cu simptomele, morfologia bacteriană și caracteristicile de creștere ale colonie bacteriene [97].

*Testul catalazei* se picură o picătură de peroxid de hidrogen 3% este plasată pe o cultură în creștere activă pe mediu solid, majoritatea bacteriilor aerobe descompun peroxidul în apă și oxigen, producând spumă spumoasă, dar *Paenibacillus larvae* este aproape întotdeauna negativă pentru această reacție [67].

*Test anticorp fluorescent*. Tehnica anticorpilor fluorescenți necesită prepararea anticorpilor specifici colorați cu un colorant fluorescent. [147].

Loca europeană este produsă de bacteria *Melissococcus pluton* (*Streptococcus pluton*) provoacă boala puietului. *Streptococcus pluton* a fost reclasificat în noul gen *Melissococcus* de către Bailey și Collins [14]. *M. pluton* este observat în general la începutul ciclului de infecție înainte de apariția microflorei variate asociate cu aceasta boală. Celula *M. pluton* este scurtă, nu formează spori și are formă de lancetă. Celula măsoară 0,5–0,7 μm în lungimea 2,0 – 5,0 μm și apare individual, în perechi sau în lanțuri. Când este colorat cu carbol fuchsin, apare violet închis pe un fundal mai deschis. O oarecare distorsiune apare în timpul procesul de fixare și colorare; acest lucru poate fi redus prin colorare negativă. *M. pluton* poate fi, de asemenea, detectat folosind imunosorbent legat de enzime teste antiseruri policlonale [7], sau reacția în lanț a polimerazei [64].

*Test de laborator*: metodele de diagnostic se face prin tehnici de diagnostic de laborator, cum ar fi metoda patologică, metoda bacteriologică, reacția în lanț a polimerazei (PCR). Sensibilitatea și specificitatea dintre abordările menționate sunt diferite.

*Metodă patologică*: principul acestei metode este de a observa orice simptom clinic la celula de albine.

*Examen microscopic*: tehnica microscopică este de a observa morfologia bacteriei *Paenibacillus larvae* pentru a distinge loca americană și alte boli ale puietului. Metoda are o specificitate scăzută, deoarece este utilizată în mod obișnuit ca test rapid pentru verificarea prealabilă [10].

### **Metoda bacteriologică**

Această metodă se bazează pe detectarea bacteriilor patogene în stupul de albine, care se va face prin pași de cultivare și izolare bacterienă, în vederea obținerii unei culturi pure. Medii



folosite sunt agar-sânge sau orice mediu adecvat. Identificarea bacteriilor este confirmată în continuare printr-un set de teste biochimice pentru a confirma prezența *Paenibacillus larvae*.

**Metoda imunologică:** această metode se bazează pe reacția specifică dintre antigen și anticorp.

*Reacția în lanț a polimerazei (PCR)* detectarea lui P. l. ADN-ul larvelor se va face prin purificarea ADN-ului bacterian simplificându-și gena ARN 16 S [10].

Septicemia este bacteria *Pseudomonas aeruginosa (Pseudomonas apisepctica)*, care provoacă septicemie la albinele adulte. Această boală are ca rezultat distrugerea țesuturilor conjunctive ale toracelui, picioarelor, aripilor și antenelor la albini. În consecință, albinele afectate mor atunci când sunt manipulate, având un miros putred. *P. aeruginosa* tijele măsoară 0,5–0,8 x 1,5–3,0 μm. Sunt gram negativi și apar singuri, în perechi sau în lanțuri scurte. Un frotiu bacterian și colorația Gram poate fi ușor pregătită după îndepărtarea unei aripi din torace și scufundând baza aripii într-o picătură de apă pe o lamă de microscop. Pentru a izola acest organism, întindeți baza unei aripi pe mediu Agar de izolare, la temperatura de creștere este de 37<sup>0</sup> C. *P. aeruginosa*. Cultura se caracterizează prin excreția de pigmenți difuzibili galben-verzui în lumina ultravioletă (lungime de undă este sub 260 nanometri). Septicemia poate fi, de asemenea, diagnosticată prin reproducerea simptomelor bolii în albine sănătoase, în cușcă. Acest lucru se realizează prin prepararea unui extract de apă (macerati echivalentul unei albine suspecte per ml de apă) și inoculând albinele sănătoase în torace sau scufundarea acestora în extract de apă. Albinele cu septicemie mor în 24 de ore [10].

Boala Spiroplasma este bacteria care provoacă spiroplasma la albinele adulte melifere. *Spiroplasma* este un procariont elicoidal, mobil, fără pereți celulari care se găsește în hemolimfa albinelor adulte infectate. Organismul este un filament minuscul, încolăcit și uneori ramificat, cu diametrul de 0,7–1,2 μm. Lungimea crește odată cu vârsta și variază de la 2μ m până la mai mult de 10 μm [33]. Spiroplasma poate fi observată cel mai bine în hemolimfă, folosind microscopia în câmp întunecat. Ele pot fi, de asemenea, văzute utilizând imersia în ulei obiectivul unui microscop cu contrast de fază. Hemolimfa poate fi luată din albine adulte prin perforarea membranei intersegmentare direct în spatele mai întâi coxae, folosind un tub capilar fin făcut din vârful unei pipete Pasteur. Acest organism poate fi cultivat în mediu standard de bulion de micoplasmă și în mediul de cultură de țesuturi de fânțari [33, 123]. Atunci când sunt rezultatele testelor de laborator, medicul veterinară va interpreta rezultatele patologice și semne clinice pentru a trata și controla eficient boala. Au existat cazuri în care apicultorii bine pregătiți au diagnosticat incorect o boală într-un stup, ducând la pierderea inutilă a coloniilor și a producției de miere.

## **1.5. Măsuri sanitare veterinare de profilaxie utilizate în sectorul apicol.**

Combaterea bolilor bacteriene ale albinelor are la baza măsuri sanitare veterinare de profilaxie care se referă la toate bolile, precum și măsuri aplicate pentru fiecare boală în parte. Răspândirea agenților patogeni ai albinelor reprezintă o amenințare asupra dezvoltării sectorului apicol. Implementarea măsurilor de biosecuritate în apicultura joacă un rol esențial în sprijinirea sănătății albinelor în sectorul apicol. Loca americană și loca europeană sunt boli supuse declarării oficiale și sunt incluse pe Lista B la O.I.E. [117]. Pentru profilaxia acestor boli, în funcție de extinderea geografică și de gravitatea evoluției în stupine, trebuie să existe o bună colaborare între apicultori și medicii veterinari. Profilaxia bolilor bacteriene la albine este bazată, în principal, pe măsuri generale, reglementate și recomandate de normele sanitare veterinare. În cadrul măsurilor de prevenire a bolilor la albine, se impune respectarea unor reguli tehnologice sau de protecție sanitară foarte stricte, pe lângă acțiunile specifice pentru fiecare boală specifică, un rol important îl reprezintă aplicarea măsurilor de profilaxie generală, dintre care pentru perioada de iernat, se recomandă următoarele: alegerea vetrei de iernare, să poată fi protejată de vânturile reci, să se asigure liniștea necesară albinelor, să fie ușor de curățat de zăpadă iar apa după dezgheț să se scurgă ușor, protejarea de șoareci prin instalarea de grătare la urdiniș [103].

Supravegherea modului de iernare și starea familiilor de albine prin controale auditive fără a se recurge la deschiderea stupului: zumzetul moderat și uniform arată că familia de albine este în stare bună și că iernarea decurge normal; bâzâitul puternic arată că, familia este în suferință; zumzetul slab, însoțit de zgomotul asemănător foșnetului frunzelor, arată că familia este înfometată; când zumzetul este foarte slab sau nu se percepe aproape deloc, se va interveni, fără abuz însă, prin lovirea cu mâna a peretelui din față al stupului, iar dacă albinele răspund printr-un zumzet puternic, care însă încetează imediat, înseamnă că familia iernează în condiții bune. Îndepărtarea fără zgomot a zăpezii neafânate și a gheții de pe scândurelele de zbor ale stupilor și desfundarea urdinișurilor blocate de albinele moarte [103].

Asigurarea și supravegherea zborurilor de curățire ale albinelor având în vedere că, în sezonul nefavorabil, albinele au capacitatea de a acumula în intestinul gros o cantitate importantă de excremente, care pot declanșa diareea pe fond se pot instala boli grave, în special nosemoza, excremente care se vor elimina prin zboruri de curățire în zilele cu temperaturi de +12°C. Aprecierea modului de iernare a albinelor se face după aspectul diferitelor resturi scoase de pe fundul stupului, după cantitatea de albine moarte găsite pe jos, în fața urdinișului, respectiv: mortalitatea crescută a albinelor atenționează faptul că familia a iernat cu prea multe albine-vârstnice, uzura organismului lor din cauza unor boli, prezența albinelor umede, mucegăite, arată că în stup este prea multă umiditate[43].

Supravegherea obligatorie a apicultorului în stupină pentru a urmări modul de

desfășurare a zborului, identificarea familiilor, ce prezintă stări anormale și soluționarea altor situații constatate. Colaborarea permanentă cu serviciile sanitare veterinare și cu Asociația apicultorilor [ 48, 161].

Măsurile de combatere constau în evitarea factorilor favorizanți care pot determina apariția bolii. Răspândirea bolilor bacteriene este determinată de factorii favorizanți și anume:

- creșterea numărului de colonii de albine pe o suprafață mică cu transmitere de la o stupină la alta;
- practicarea apiculturii pastorale și aglomerarea temporară a stupinei lângă alte stupini având situații epidemiologice necunoscute;
- eliminarea unor medicamente precum antibioticele, oxitetraciclina și eritromicina utilizate în controlul acestei boli, pentru că acestea lasă reziduuri în miere;
- nerespectarea măsurilor de igienă obligatorii și a măsurilor sanitare impuse de lege (echipamente provenite din stupine infectate sunt obligatoriu sterilizate sau distruse);
- distrugerea familiilor de albine în care a fost confirmată loca americană prin ardere;
- dezinfecția și menținerea unei igiene corespunzătoare inventarului unei stupine (utilaje de bază, inventarul necesar pentru mânuirea și îngrijirea familiilor de albine, inventarul pentru însârmarea ramelor și fixarea fagurilor artificiali, inventarul pentru extracția și condiționarea mierii, inventarul pentru extracția și condiționarea mierii, inventarul divers apicol, inventarul gospodăresc, alte materiale consumabile);
- aplicarea legislației sanitar-veterinare în vigoare privind supravegherea bolilor infecto-contagioase la albine;
- supravegherea clinică și anatomopatologică a puietului căpacit, în perioada aprilie – septembrie la: cel puțin 15% din coloniile stupinelor „pepiniere măci”; 5% din coloniile stupinelor de producție; primăvara după iernat și toamna după stupăritul pastoral; la schimbarea vetrei stupinei;
- importul de material biologic apicol să provină numai dintr-o zonă indemnă de loca americană [18, 103].

Se consideră zonă indemnă de loca americană dacă 5 ani de la ultima izolare, la sondajele anuale de supraveghere efectuate de Direcția sanitar veterinară, probele au avut rezultate negative la agenții etiologici care produc boala. Loca americană este o boală obligatoriu declarabilă supusă investigațiilor de laborator și carantinei în zona respectivă. Recoltarea de probe de către medicul veterinar de liberă practică și medicul veterinar oficial din cadrul direcției sanitar-veterinare și trimiterea acestora către un laborator specializat în scopul supravegherii stupinei (pentru supraveghere – examen anatomopatologic și microscopic direct (bacterioscopic); pentru diagnostic – examen bacteriologic și PCR convențional). Probele pentru

examele de laborator se constituie din faguri întregi sau porțiuni de 20 cm<sup>2</sup>/probă, fagure cu puiet capac. Fagurii întregi pot conține și rezervă de hrană (miere căpăcită). Fagurele se ambalează corespunzător și va fi însoțit de o notă cu următoarele date: denumirea stupini, numele apicultorului, adresa exactă, numărul familiilor de albine din stupină și alte date legate de stupină [161].

#### **1.6. Metode de administrare și eficiența unor preparate cu proprietăți pre- și probiotice utilizate în profilaxia bolilor contagioase la albine.**

Din punct de vedere al hranei, albinele sunt independente de om, pentru că acestea își recoltează și își prepară singure hrana [114]. În anii care nu sunt condiții optime de dezvoltare a coloniilor de albine apicultorii trebuie să compenseze deficitul de substanțe energetice (mană, nectar) și substanțe proteice (polen) prin administrarea unor rețete de hrană; totodată hrănirea albinelor este necesară și în cazul insuficienței asupra feței de zbor determinată uneori de încărcătura prea mare de stupi în acea zonă. Hrănirea suplimentară a albinelor influențează direct și evident nu numai nivelul producțiilor apicole, dar și reproducția, starea de sănătate și implicit procesele de dezvoltare ale coloniilor de albine [112, 130, 76, 146]. În afară de caracterizarea tipurilor de hrană administrată, nutriția albinelor analizează și modul în care substanțele nutritive și energia sunt utilizate în organism, precum și eficiența utilizării acestora în diferite procese și producții ale coloniilor de albine [119].

Probioticele reprezintă o alternativă a antibioticelor pentru evitarea îmbolnăvirilor la nivelul sistemului digestiv al albinii, menținând sub control flora microbiană prin organismele vii pe care le conțin. În anumite perioade ale sezonului apicol, mai ales după culesul de rapiță și floarea soarelui se înregistrează mortalități ridicate ale albinelor, iar una din cauze este intoxicarea albinelor cu pesticide și neonicotinoide. Probioticele și suplimentele pentru albine se ocupă de menținerea unei flori microbiene sănătoase în tractul digestiv, oferind astfel protecție în apărarea împotriva bolilor. Utilizarea produsului îmbunătățește semnificativ sistemul imunitar al albinelor. Produsul nu conține organisme modificate genetic și este complet sigur pentru oameni, animale și plante. Produsul este în conformitate cu reglementările Comisiei Europene pentru produsele care pot fi utilizate în agricultura ecologică [114]. Albinele se pot intoxica atât prin recoltarea nectarului acestor flori, cât și a apei de pe frunze. În sprijinul acestui neajuns se folosesc anumite suplimente de hrană pentru albine, care conțin probiotice [27, 81].

Unul dintre ele, la noi în țară, este EM Probiotic, care poate fi folosit pentru producerea ecologica și convențională a produselor apicole. Utilizarea probioticului EM în apicultură produce miere fără substanțe chimice, care este mai sănătoasă și are o valoare mai mare. Este un produs bazat pe microorganisme eficiente și un probiotic puternic și antioxidant. Familiile

sănătoase de albine sunt cele mai importante în apicultură, deoarece numai comunitățile sănătoase pot da cea mai bună miere [73].

Avantajele produsului: împiedică dezvoltarea bolilor, cum ar fi boala intestinului - nosemoza. Protejează membrana mucoasei a intestinului în albine, îmbogățindu-l cu o microfloră benefică. În acest fel, flora intestinală produce substanțe antibacteriene împotriva agentului cauzal al bolilor intestinale și previne apariția nosemozei.

PH-ul produsului este de 3,5 - aciditate. Varroa în astfel de condiții nu este în măsură să supraviețuiască și să se manifeste. Produsul nu ucide Varroa, dar îl neutralizează. În plus, îmbunătățește sistemul imunitar al albinelor, care sa dovedit a fi foarte util în lupta împotriva Varroa. Prin pulverizarea probioticului în stup albinele sunt mai calme și nu mai este necesar sa se foloseasca fumul. Reduce riscul apariției moliei de ceară.

Utilizarea EM Probiotic previne condițiile de apariție a ciupercilor care atrag moliile de ceară în interiorul stupului. În acest caz, produsul este aplicat prin pulverizare sub formă de picături mici pe cadre și stupi. Stabilirea familiilor care sunt slăbite în timpul iernii. Îmbunătățește supraviețuirea și starea albinelor care sunt mai rezistente la boli și la efectele nocive ale pesticidelor. Prevenirea nosemozei: 50 ml de probiotice pe 1 litru de apă fiartă și răcită. Utilizarea EM Probiotic reduce utilizarea majorității medicamentelor. După aplicarea medicamentelor la albine, EM Probiotic ajută albinele să-și restabilească starea naturală. Pentru igiena instrumentelor de lucru, echipamentele utilizate pentru munca albinelor atât în stupi, cât și în jurul stupilor. Folosind acțiunea dezinfectantă a probioticului EM în exteriorul stupului, acizii organici produși de bacteriile acidului lactic inhibă eficient agenți patogeni, cum ar fi Nosema apis, Nosema ceranae și protejează împotriva Varroa, moliilo. În acest scop ramele și toate accesoriile sunt pulverizate cu EM. Pentru dezinfecție biologică - 0,6 l probiotic / 10 litri de apă [73].

Tratamentul nosemozei:

La fiecare 7-10 zile se pulverizează în fața stupului. La 1 litru de apă caldă, fără clor se adaugă 2 până la 3 dopuri EM probiotic și 4 până la 5 picături de nozevit. Soluția rezultată poate fi adăugată în turte și / sau sirop și pulverizată pe toate laturile.

Având în vedere că acestea sunt microorganisme vii, este necesară o îngrijire constantă atât pentru albine, cât și pentru microorganismele naturale care asigură un mediu sănătos și curat. Adăugarea în apa de băut: dozare 50 ml în apa de băut / colonie de albine. Odată cu adăugarea probioticului în apa, albinele nu merg în vasele înconjurătoare, ci rămân în cercul dorit. Datorită probioticului EM siropul are un termen de valabilitate mai mare și o valoare nutritivă mai mare și stimulează dezvoltarea coloniilor de albine. În timpul iernii, utilizați 50 ml pe 1 litru de apă nechlorată răcită. Ca aditiv pentru hrana albinelor: se adaugă 50 ml probiotic/1 kg turte [73].

*Prebioticele* sunt substanțe care beneficiază în dezvoltarea și multiplicarea microorganismelor în sistemul digestiv al animalelor. Administrate separat sau în același timp cu un probiotic, prebioticele creează în tractul intestinal condiții favorabile de mediu pentru microorganismelor utile; în același timp, prebioticele pot acționa specific împotriva colonizării germenilor cu potențial patogen (salmonele, clostridii, *E.coli*) pe mucoasa pereților intestinali. În grupa prebioticelelor se înscriu unele oligozaharide și acidifianti. Administrarea unor oligozaharide ca prebiotice prezintă o cale interesantă de manipulare a florei intestinale și a metabolismului monogastricelor fără a folosi antibiotice. Chiar dacă sunt glucide solubile, oligozaharidele rezistă atacului enzimelor digestive endogene, omul și animalele neputându-le metaboliza direct; ca urmare, acestea ajung nedegradate în intestin, unde au calitatea de a influența selectiv flora microbiană [114].

S-a constatat rolul că prin introducerea oligozaharidelor în rația animalelor, în doze mici, se obțin rezultate semnificative în sporul de greutate și starea de sănătate a animalelor, efectele fiind dependente de tipul oligozaharidelor, dar și de specia animalelor [114].

Hrana și apa acidificată, administrată animalelor, se realizează în scopul controlării microflorei digestive, îmbunătățirii valorificării hranei, stimulării producțiilor și menținerii stării de sănătate. Utilizarea acidifiantilor în alimentația albinelor are la bază, în principal, următoarele considerente:

- suplینirea cantității endogene de acid din stomac, insuficientă îndeosebi la albinele tinere; valoarea excesivă de acid la nivel stomacal are ca urmare îmbunătățirea conversiei pepsinogenului în pepsină, urmată de o mai bună digestie și valorificare, îndeosebi a proteinelor din hrană;
- prin micșorarea valorii pH-ului în sistemul digestiv are efecte de prevenire și proliferare unor agenți patogeni inadaptabili la mediu acid, precum Salmonella, Clostridium, Staphylococcus sau E.coli, fiind însă favorizată multiplicarea microorganismelor utile;
- acizii organici influențează și ca agenți chelatici, în prezența lor îmbunătățindu-se utilizarea substanțelor minerale din hrana ingerată;
- unii acizi organici joacă rol important în metabolismul energetic .

Acizii organici mai des utilizați în scop prebiotic sunt acidul formic, acidul propionic, acidul lactic, acidul citric, acidul fumaric, acidul sorbic; de asemenea, sunt utilizate săruri ale acestor acizi: propionați, citrați, formiați; Acidul citric este acidul organic cel mai des utilizat în alimentația albinelor, cunoscut de apicultori ca fiind sarea de lămâie. Acesta are rol în învertirea zahărului pe care îl conțin unele rețete de hrană pentru albine, scutind astfel o parte din secreția de invertază produsă de glandele faringiene ale albinelor. În unele studii este indicat faptul că siropul de zahăr învertit chimic cu acid citric în concentrație de 3 g/l sirop utilizat în hrana

albinelor a determinat o valoare a longevității mai mare cu 22% față de cea a albinelor hrănite cu sirop neînvertit, apropiindu-se de durata de viață a albinelor hrănite cu miere [89].

Malnutriția este un factor major care stă la baza pierderilor gestionate de colonii de albine, care poate fi contracarată prin hrănirea dietelor artificiale, care urmăresc să furnizeze macro și micronutrienți esențiali [84]. Suplimentele nutritive actuale pentru albine necesită îmbunătățire și resurse noi accesibile și ieftine. Algele și microalgele sunt considerate ca surse alternative de hrană și suplimente nutritive pentru animale, inclusiv albinele melifere. Biomasa de alge este promițătoare ca sursă alternativă de hrană, precum și ca sursă de produse naturale care modulează sănătatea pentru albine. Conform literaturii de specialitate efectele suplimentării cu alge asupra productivității coloniilor de albine, precum și efectele asupra fiziologiei și sănătății individuale al albinelor sunt evidente. Biomasa de alge pare a fi potrivită pentru utilizare ca aditiv pentru hrana albinelor și ca sursă de produse naturale care stimulează sănătatea. De se consideră că ar putea îmbunătăți dezvoltarea de suplimente nutritive durabile pe bază de alge pentru albine [109, 118, 127].

Unii cercetători recomandă efectuarea hrănilor de completare în luna august cu sirop de zahăr învertit cu acid citric 3 g/l sirop, cu scopul reducerii uzurii organismelor albinelor prin prelucrarea zahărului (conținutul în proteine al organismului fiind cu 3,5% mai mare față de cel al albinelor hrănite cu sirop neînvertit). Din punct de vedere al dozajului de acid citric sunt și studii care precizează faptul că folosirea unor cantități mai mari de 1g/l sirop are un efect invers al celui de invertire și anume are loc o cristalizare puternică în faguri pe timpul iernii [113].

Acidul acetic (oțetul) se folosește în optimizarea hranei pentru albine cu rol în invertirea mai bună a zahărului și totodată pentru schimbarea acidității siropului, fapt ce duce la diminuarea înmulțirii sporilor de nosema. Doza uzuală este de 1-2 ml/L sirop administrat [113].

În Republica Moldova ca prebiotic se folosește pe larg în profilaxia bolilor la familiile de albine produsul Super Protein Pattie.

### **1.7. Utilizarea unor produse microbiene în profilaxia unor boli infecțioase și la creșterea eficienței familiilor de albine.**

Polenizarea culturilor agricole este un factor important în obținerea unei roade bogate. Albinele melifere (*Apis mellifera*), ca principalii polenizatori ai plantelor agricole joacă un rol important în agricultură, totodată fiind și unicii producători de miere. Din păcate, în ultimii ani în întreaga lume au avut loc pierderi mari de familii de albine, din diferite motive cea ce necesită studierea mai amănunțită a factorilor ce stau la baza acestui declin [131]. În mai multe cercetări a fost demonstrată existența factorilor care duc la declinul familiilor de albine, bunăstarea și supraviețuirea lor, printre care: scăderea diversității genetice, pierderea habitatului,

lipsa furajelor (nectar și polen), prezența unei game largi de agenți patogeni și paraziți, introducerea de specii exotice, schimbările climatice sau practicile agricole intensive (pesticide/insecticidele folosite în sistemele agricole, pentru combaterea dăunătorilor, intensificarea tratamentelor împotriva paraziților) [35, 39, 63]. În ultimile două decenii, în rezultatul combinației acestor factori au fost înregistrate un număr tot mai mare de boli infecțioase virulente (loca americană, aspergiloza, nosemoză, varooză, diferiți viruși), care au dus la declinul coloniilor de albine [ 11, 12, 75, 80].

Albinele sunt insecte eusociale cu interacțiune strânsă cu mediul înconjurător. De aceea asupra sănătății albinelor acționează și efectele produse în timpul colectării nectarului și polenului, fiind expuse la o multitudine de xenobiotice. Deasemenea alimentația deficitară, în special la sfârșitul iernii sau primăvara timpuriu (lipsa microelementelor, glucidelor, substanțelor proteice, vitaminelor) și neadecvată (polen îmbibat cu produsele agrochimice și biocide) a coloniilor de albine, pot provoca o disbioză a microbiotei, scăderea capacității coloniilor de a răspunde la mediul înconjurător. În degradarea moleculelor potențial toxice ajută genomul care codifică enzime, acestea însă au o diversitate mai mică a genelor de detoxifiere decât genomul altor insecte. De aceea, pentru a degrada moleculele potențial toxice, albinele se pot baza și pe alte componente, care le modelează fiziologia, cum ar fi microbiomul intestinală [69, 92, 93, 105].

A fost demonstrat, că mediul înconjurător joacă un rol major în modelarea microbiomului albinelor. Terenurile agricole, fiind tratate cu diferite substanțe chimice (pesticide, insecticide), contribuie la perturbarea bacteriană din intestin, sporind vulnerabilitatea coloniilor de albine față de infecții (viruși, bacterii, fungi) [106]. În polen, sunt diverse comunități simbiotice de microbi, care oferă o varietate de beneficii albinelor. Microbii asociați cu proviziile de polen sunt o centrală pentru sănătatea albinelor, dar și pot reprezenta o resursă alimentară majoră pentru dezvoltarea larvelor de albine [41]. Totodată diversitatea și compoziția microbiotei intestinale la albine diferă în dependență de ecosistemele în care activează [96].

Conform datelor științifice componența microbiomului la albine și produsele apicole constau în principal din bacterii lactice din genurile *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, care formează un mediu simbiotic favorabil [28, 55, 78, 173]. Componența speciilor și numărul bacteriilor din microbiomului intestinal al albinelor depinde de mai mulți factori: anotimp, mediul înconjurător, sursa, cantitatea și calitatea nectarului, starea albinei, prezența microorganismelor în nectar [27, 28, 110]. Corby-Harris V. [34] presupune că, albinele și microflora acidului lactic s-au dezvoltat reciproc una de cealaltă: bacteriile au primit o nișă cu nutrienți disponibili, iar albinele au primit protecția de la microorganisme dăunătoare.



Studiile efectuate asupra microbiotei intestinale la albinele *Apis mellifera*, cât și a albinelor sălbatice *Apis florea* au demonstrat că, taxonii dominanti identificați nu diferă semnificativ. La *A. florea* taxonii dominanți aparțin familiei *Enterobacteriaceae* (79,47%), *Lactobacillaceae* (12,75%), *Oxalobacteraceae* (7,45%) și *Nocardiaceae* (0,13%). Bacteriile predominante au aparținut *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Lactobacillus*, *Massilia*, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pantoea*. Genurile *Rhodococcus* și *Morganella*, aparținând filelor *Actinobacteria* *Proteobacteria*, *Firmicutes*, și *Bacteroidetes* [58]. La albinele *Apis mellifera* a fost descoperită o varietate de filotipuri bacteriene, inclusiv mulți agenți patogeni posibili și organisme de alterare a alimentelor și bacterii potențial benefice, precum bacteriile lactice (LAB), care sunt locuitori permanenți ai tractului gastrointestinal al albinelor, inclusiv diferite specii de *Lactobacillus* (*L. mellis*, *L. mellifer*, *L. helsingborgensis*, *L. kullabergensis*, *L. melliventris* și *L. kimbladii*, *L. kunkeei*), de asemenea *Bartonella/Brucella*, dar care sunt reprezentate mai puțin [8, 31, 55, 86, 104].

Pentru profilaxia, tratamentul, ridicarea inunității și creșterea eficienței familiilor de albine în prezent se folosesc diferite metode cu aplicarea produselor de origine microbiană. Oamenii de știință din întreaga lume își concentrează interesul asupra utilizării probioticelor la albinele melifere ca metodă alternativă de profilaxie împotriva agenților cauzali, atât ai locii americane cât și europene. Bacteriile probiotice produc substanțe bactericide sau bacteriostatice, inclusiv bacteriocine, peroxid de hidrogen, siderofore, lizozime, proteaze, care acționează asupra altor populații microbiene [124, 137]. În calitate de probiotice sunt utilizate amestecuri de bacterii ce aparțin genurilor *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* [4, 13].

Boala locei americane este cauzată de *Paenibacillus larvae*. În prezent, acest agent patogen este larg răspândit în albinele europene-*Apis mellifera* care este letal atunci când larvele de albine sunt infectate cu spori la concentrație medie [82].

În profilaxia și combarerea *Paenibacillus larvae* (locei americane) a albinelor se propune a fi administrat și amestecul obținut din pudra de zahăr cu biomasa actinobacteriei *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-04 în doză de 1,8 - 2,2 g de biomasă uscată la 100 g pudră de zahăr. Amestecul se administrează câte 100 g la o familie de albine într-o singură repriză [26].

Combaterea acestei boi este studiată intens. Astfel, Bielik B et al. [17] au demonstrat în condiții de laborator, cât și confirmat într-un studiu pilot, efectul probiotic al tulpinii *Apilactobacillus kunkeei* V18 asupra *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius*. De asemenea a fost demonstrat că, metaboliții produși de bacterii, reprezentanți ai genului *Bifidobacterium* pot inhiba agentul patogen *Melissococcus plutonius* [110]. Pentru a stimula activarea sistemului imunitar la albine și a combate *Paenibacillus larvae* Evans J.D și Lopez D.L (2004) propun să fie folosit un amestec din bacterii nepatogene ca probiotic, pentru a spori

imunitatea albinelor, ajutând larvele de albine și la alte stadii de viață să supraviețuiască atacurilor agenților patogeni din câmp. A fost demonstrat atât în vitro, cât și în vivo că, flora combinată de acid lactic a albinelor inhibă creșterea patogenul *Paenibacillus larvae* în mod diferit în dependență de speciile de bacteria lactice prezente în intestin [151, 156]. Audisio M.C. și col. [12] în rezultatul studiului tulpinilor de *Lactobacillus spp.* și de *Enterococcus spp.*, izolate din intestinul albinelor lucrătoare *Apis mellifera* L., au selectat 2 tulpini: *L. johnsonii* și *E. faecium*, care sau manifestat ca producători semnificativi de acid lactic (valorile au fost cuprinse între 177 și 275 mM), iar in vitro au inhibat diferiți agenți patogeni umani de origine alimentară și agentul loci americane *Paenibacillus larvae*. Totodată *E. faecium* SM21 a produs compuși asemănători bacteriocinei cu efecte anti-*Listeria*. Zhang Z. și col. [160] au demonstrat că, anumiți membri ai intestinului influențează procesele neurologice ale albinelor.

În rezultatul studiului tulpinilor de *Lactobacillus* și *Bacillus* izolate din intestinul albinelor din nord-vestul Argentinei, Audisio M.C. și col. [11] au selectat două tulpini cu proprietăți probiotice semnificative: *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 și *Bacillus subtilis subsp. subtilis*. Testele efectuate în stupine, atât experimentale, cât și comerciale, au demonstrat că, fiecare tulpină posedă proprietăți probiotice și e capabilă să stimuleze familiile de albine: creșterea numărului de ouă de către matcă, ceea ce a produs, prin urmare, o creștere a numărului de albine și, în consecință, un randament mai mare de miere. Mai mult, bacteriile benefice au redus incidența a două boli importante ale albinelor: nosemoza și varooza.

Combaterea infecțiilor fungice la coloniile de albine este una dintre problemele ce necesită o abordare urgentă, căci aspergilozele sunt foarte periculoase.

Fungii din genul *Aspergillus* sunt agenți patogeni oportuniști și reprezintă una dintre cele mai relevante amenințări de origine fungică pentru sănătatea umană, animală, dar și a familiilor de albine, provocând boala aspergiloză (puietul petrificat). Este o patologie contagioasă comună, atât larvelor, cât și albinelor adulte, produsă de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* și *Aspergillus fumigatus* [36, 100]. Pentru combaterea acestei boli se folosesc mai multe metode, inclusiv utilizarea preparatelor de origine microbiană. Foley K. (2014) au studiat și demonstrat efectele nocive ale aspergilozei asupra familiilor de albine. Astfel, au testat 10 tulpini, izolate din stupine, reprezentanți ai genului *Aspergillus* asupra albinelor lucrătoare adulte, dar și asupra larvelor. În rezultatul studiului efectuat s-a dovedit că, trei tulpini (*A. flavus*, *A. nomius* și *A. phoenicis*) din cele zece specii identificate au fost patogene pentru larvele de albine. De asemenea, s-a demonstrat că, albinele adulte sunt foarte susceptibile la infecția cu *A. flavus* atunci când au îngerat conidii. Totodată niciuna dintre cele două tulpini de *A. fumigatus* utilizate în testele doză-răspuns nu a indus mortalitate la larve, dar au fost patogene pentru albinile lucrătoare din stupine.

Pentru a proteja puietul de albine de infecții și a suprima creșterea agenților patogeni fungici Miller D.L. [101] propune a fi utilizată bacteria *Bombella apis*. Rezultatele cercetărilor în această direcție au demonstrat că, tulpinile de *Bombella apis* inhibă creșterea a doi agenți patogeni fungici de insecte, *Beauveria bassiana* și *Aspergillus flavus*. *Bombella apis* protejează puietul de albine de infecția fungică prin secreția unui metabolit antifungic.

Supernatanți fără celule produși de *Lactobacillus johnsonii* AJ5 ar putea fi o alternativă naturală promițătoare pentru combaterea acarienul ectoparazitar *Varroa* și întărirea sănătății albinelor [37].

O problemă serioasă pentru apicultură este intensificarea agriculturii, schimbarea climatică, care duc la malnutriția coloniilor de albine, ca rezultat are lor diminuarea activității funcțiilor reproductive și a productivității, slăbirea rezistenței familiilor de albine la boli și dăunători. De asemenea ca rezultat al diferitor intemperii apărute în perioada de iarnă, primăvara timpuriu coloniile de albine se află, de regulă, în stare de convalescență. Organismul albinelor este foarte slăbit din cauza insuficienței de substanțe nutritive, în special de proteine, hidrocarburi microelemente, care au un rol catalizator în procesele fiziologice. În organismul albinei substanțele bioactive, intrând în componența unor enzime și hormoni, îndeplinesc funcții multiple la nivel celular, astfel jucând un rol hotărâtor în metabolism. Sursele principale naturale de aprovizionare a organismului albinelor cu substanțe nutritive sunt nectarul și polenul, culese de la florile plantelor melifere însă, în lipsa acestora sau în cazul infectării acestora, apare necesitatea elaborării diverselor diete artificiale, care au ca scop susținerea nutriției albinelor în diverse condiții și pe tot parcursul anului [84, 89].

Metaboliții microbieni sunt considerați factori importanți ai influenței microbiotei bazate pe dietă asupra gazdei. Cu toate acestea, modelele mecaniciste sunt confundate de interacțiunile dintre dietă, funcția microbiotei și fiziologia gazdei. Albina lucrătoare găzduiește o microbiotă simplă, care produce acizi organici ca produse de fermentare a nectarului și polenului alimentar. Abundența bacteriană din intestinul albinei este parțial asociată cu epiteliul rectului anterior. Polenului nedigerat îi revine rolul de substrat de creștere a microbiotei în intestinul albinelor, iar impactul produselor de fermentație bacteriană acționează asupra stării generale a albinei [122, 128].

Pentru suplینirea hranei coloniilor de albine cu substanțe bioactive sunt utilizate procedee de hrănire cu diete de diferită natură: chimică, pe bază de plante, dar și de origine microbiană (bacterii, cianobacterii, microalge, bifidobacterii, lactobacterii) [50, 126, 141].

Microoalgele și cianobacteriile sunt o sursă bogată și ușor accesibilă de substanțe bioactive (vitamine, enzime, micro - și macroelemente, proteine, hidrocarburi), utilizare în diferite domenii, inclusiv în apicultură.

Astfel, este cunoscută o sursă de produse naturale, care modulează sănătatea albinelor în baza biomasei de *Chlorella vulgaris* și *Arthrospira platensis* (spirulina) ce conțin 25 de metaboliți și includ lipide complexe, acizi grași esențiali, vitamine și substanțe fitochimice. *Chlorella vulgaris*, în această dietă, este o sursă de mai mulți acizi grași esențiali, care contribuie la creșterea valorii nutriționale, iar *Arthrospira platensis* este o sursă de proteine biodisponibile și substanțe fitochimice (în special carotenoide), care cresc rezistența la stres. Această dietă este o nutriție de precizie la albinele melifere [126].

Este cunoscut procedeul de hrănire a albinelor la sfârșit de iarnă sau primăvara timpuriu cu un amestec de zahăr pudră și miere de albine luate în raport de 7 : 3 respectiv, cu adaos de suspensie de 2% de biomasă a tulpinii de microalgă *Oocystis borgei* Snow CNMN-AV-08 în cantitate de 8-12 ml la 1 kg de amestec. Hrănirea albinelor se efectuează o singură dată în cantitate de 180-220 g de amestec la fiecare ramă cu albine. Utilizarea acestui procedeu contribuie la stimularea funcțiilor imunomodulatoare, fortificarea imunității organismului albinelor, creșterea viabilității puietului și a rezistenței familiilor de albine la boli [142].

De asemenea este cunoscut procedeul de hrănire a familiilor de albine *Apis mellifera* care prevede hrănirea albinelor la sfârșit de iarnă sau primăvara timpuriu cu un amestec de zahăr pudră și miere de albine luate în raport de 7 : 3, respectiv, cu adaos de suspensie de 2% de biomasă a tulpinii de microalgă *Scenedesmus quadricauda* CNMN-AV-10 (supliment nutritiv Scenecudri), în cantitate de 8-12 ml la 1 kg de amestec, totodată hrănirea albinelor se efectuează o singură dată în cantitate de 180-220 gr. de amestec la o ramă de albine. Aceasta contribuie la stimularea funcțiilor ovogeneze și a ponteii reginelor, creșterea cantității de puieți căpăciți și a numărului de albine lucrătoare eclozionate masiv, care a conduce la creșterea cantitativă a puterii familiilor de albine și la sporirea productivității lor [140].

Pe baza cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, sunt propuse mai multe procedee de hrănire a familiilor de albine. Este cunoscut procedeul de hrănire a familiilor de albine primăvara cu un amestec de soluție de 1% mas. de extract din biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 (supliment nutritiv Apispir) și sirop de zahăr de 50% luate în raport de 1:500. Biomasa de *Spirulina platensis* CNM-CB-02 conține vitamine, enzime, micro - și macroelemente [25].

Totodată a fost demonstrat că, în rezultatul cultivării cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în prezența compușilor organici coordinați, suplimentele nutritive bioactive utilizate la hrănirea albinelor, obținute din extractul biomasei sunt mai eficiente, comparativ cu suplimentul nutritiv bioactiv Apispir, obținut din extractul biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* cultivate doar pe mediul tradițional cunoscut, fără prezența compușilor organici coordinați [143].

Astfel, unul din procedee propuse constă în hrănirea albinelor primăvara cu un amestec de soluție de 1% mas. de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 și sirop de zahăr de 50% luate în raport de 1:500, respectiv, biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 fiind cultivată în prezența compusului organic coordinativ cu proprietăți imunomodulatoare – selenit de Fe(III) hexahidrat –  $\text{FeSeO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , care catalizează unele funcții importante din activitatea vitală a albinelor. Hrănirea albinelor cu acest amestec se efectuează în aprilie în cantitate de 100-130 ml de amestec la o ramă cu albine, la fiecare 2 zile, timp de două săptămâni [144].

Un alt procedeu constă în hrănirea familiilor de albine *Apis mellifera*, cu biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, obținută la cultivarea în prezența  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (suplimentul „Apispir+Cr”), administrat în componența mediului nutritiv în cantitate de 30-35 mg/L în una din primele trei zile de cultivare. Hrănirea albinelor cu amestec se efectuează în cantitate de 100-130 ml de amestec la o ramă cu albine, la fiecare 2 zile, timp de două săptămâni. Suplimentul nutritiv Apispir+crom conține: aminoacizii, peptidele, vitaminele, pigmentii, microelementele, în special, cromul care este catalizator al unor funcții importante de regenerare a celulelor țesuturilor ovariene ale mătcilor, precum și a glandelor lactogene ale albinelor lucrătoare [145].

De asemenea este cunoscut procedeu de hrănire a familiilor de albine ce include un amestec de soluție de 1% mas. de extract din biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 și sirop de zahăr de 50% luate în raport de 1:500, respectiv, totodată se utilizează biomasa tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 obținută la cultivare în prezența  $\text{Zn}(\text{CH}_2\text{ClCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , administrat în componența mediului nutritiv în cantitate de 30-35 mg/L în una din primele trei zile de cultivare, iar hrănirea albinelor cu amestec se efectuează în cantitate de 100-130 ml de amestec la o ramă cu albine, la fiecare 2 zile, timp de două săptămâni. Rezultatul utilizării acestui procedeu constă în sporirea productivității de miere a familiilor de albine *Apis mellifera* [143].

Sunt cunoscute suplimente nutritive bazate pe tulpini de bacterii sau produse bacteriene. În rezultatul studiului efectuat de către [5] cu administrarea unui amestec bacterian de bifidobacterii și *Lactobacilaceae* și a unui produs comercial HiveAlive™, pe bază de plante, s-a constatat că majoritatea tulpinilor bacteriene administrate au fost prezente în intestin. În microbiota intestinală nu au fost observate mari modificări, variații semnificative, comparativ cu lotul ne tratat, au fost observate numai pentru *Snodgrassella sp.* pentru amestecul bacterian, *Bartonella sp.* în HiveAlive™ și *Bombilactobacillus sp.* pentru ambele loturi.

Este cunoscut procedeu de creștere a familiilor de albine, care include hrănirea albinelor cu sirop de zahăr de 50%, în care se introduce un aditiv furajer, care include tulpini de lacto- și

bifidobacterii în cantitate de  $1 \times 10^6$  UFC/g, precum și, în % mas.: lactuloză până la 5, extract de drojdii până la 20, pectină până la 10, în cantitate de 50-200 mg/L de sirop. Hrănirea se efectuează din calculul un litru de amestec la o familie de albine, seara, peste fiecare 10-12 zile, începând din primele zile ale lunii aprilie până la începutul culesului principal. În rezultat are loc creșterea puterii familiei de albine, a prolificității mătcilor, a numărului de puiet căpăcit și în sporirea producției de miere [49].

De asemenea este cunoscut un procedeu de hrănire a albinelor cu un amestec din sirop de zahăr și suspensie a tulpinii *Bacillus subtilis* 11B, cu concentrația celulelor de  $1 \times 10^5 \dots 1 \times 10^8$  la 1 ml de sirop de zahăr, iar hrănirea albinelor se efectuează în decurs de 30 zile, pentru stimularea funcțiilor fiziologice ale albinelor și de protejare a lor împotriva bolilor infecțioase, care posedă un nivel înalt de activitate enzimatică și un spectru larg de acțiune antibacteriană [149].

Analiza datelor bibliografice referitor la utilizarea unor produse microbiene în profilaxia unor boli infecțioase și creșterea eficienței familiilor de albine demonstrează că, microorganismele sunt utilizate pe larg în apicultură în calitate de: biopreparate pentru combaterea patogenilor și acarienilor, probiotic, supliment nutritiv, pentru hrănirea albinelor, care contribuie la sporirea productivității reginei, vitezei de creștere a puietului de albine și asigură o sporire a cantității de miere.

### **1.8. Măsuri de asanare și eradicare a unor boli contagioase la familiile de albine.**

Există o serie de măsuri cu caracter general, pe care apicultorul le poate lua imediat, față de orice boala apărută în stupină. Dacă se detectează o boală în oricare dintre stupii, este important să aplicăm măsurile adecvate pentru a o eradica. Acest lucru trebuie făcut cât mai curând posibil pentru a preveni boala să se răspândească din stupină sau la stupul altor apicultori. Stupii slabi sunt mult mai probabil să fie afectați, astfel încât menținerea unei rezistențe bune a stupului va reduce riscul de răspândire a bolilor și dăunătorilor [155].

Deschiderea stupilor și intervențiile în viața coloniei de albine se va face numai când este strict necesar. Bolile se răspândesc mai ales de stupar prin lipsa măsurilor de igienă și de la mișcarea fagurilor cu puiet sau hrana de la un stup la altul.

Scoaterea ramelor, în special a celor cu puiet și scuturarea albinei acoperitoare, nu numai că deplasează larvele din patul lor cu hrana și lipsește pe tinerele ființe de grija doicilor, dar pînă când sosesc altele, care să acopere fagurele cu puiet, acesta stă și așteaptă flamînd, neacoperit și neîngrijit. Toate acestea se vor resfrînge în puterea de rezistență și vitalitatea viitoarelor albine. Când se face hrănirea albinelor să nu se schimbe hrănitorele, care trebuie să poarte numărul de ordine al stupului respectiv.

Fagurii mai vechi de trei ani trebuie schimbați cu alții noi, iar în cei care au fost larve bolnave, e mai bine să fie arși. Ladița de lucru portativă din prisacă, în care se pun obișnuit fagurii când se verifică coloniile, trebuie flambată, pentru a evita contaminarea și extinderea vreunei boli. Când se introduce o matcă în stup, colivia trebuie bine dezinfectată într-o baie de aburi cel puțin un sfert de oră și apoi pusă la uscat. Aceasta măsură are un dublu scop: ucide microbii ce eventual ar fi pe ea și înlătură mirosul mătcii precedente, miros ce persistă mult timp pe pereții interiori ai colivei. Toate ustensile folosite de apicultor la cercetarea stupilor trebuie mereu dezinfectate. De asemenea, dalta apicolă va fi dezinfectată după fiecare folosire. Stuparul trebuie în permanență să fie curat.

Stupii nu trebuie așezați prea simetric în prisacă, urmărindu-se prin aceasta o așezare estetică a ei, ci, puși în diferite poziții, mai cu seamă dacă nu este loc suficient. Pentru bună orientare a albinelor în prisacă, stupii vor avea scîndurelele de zbor vopsite în culori variate, iar pe tabla acoperișurilor se vor face desene geometrice, cercuri, triunghiuri, pătrate, linii pe la colțuri etc. pentru ca din zbor, albinele să-și identifice stupul și să se ducă direct la el.

Se vor planta, ca puncte de reper, diferiți arbuști, variați ca forma și specie. În prisacă stupii vor sta pe picioare sau postamente înalte de cel puțin 15-20 cm, căci umezeala pamîntului face să putrezească fundul stupului, întreținând și umiditate în interior, ceea ce dăunează familiei de albini. Adăpătorul să aibă în permanență apă curată care să curgă în fir subțire pe scîndură, iar scîndura pe care curge apa să fie des flambată.

Terenul din fața stupului trebuie bine curatat fără buruieni. Când în stupină a apărut o boala gravă cum e loca americana este bine ca vatra stupinei să fie săpată și pamîntul întors.

Stupii să fie fără crăpături, chituiți și vopsiți, feriți de curenți dăunători în interior. Să aibă căpace învelite cu tabla sau cardon gudronat, pentru ca umezeala să nu pătrundă în stupi.

Cel puțin o dată pe an, în primăvară, cu ocazia reviziei de fond, stupii se flambează în interior, împreună cu toate părțile componente.

Detectarea precoce a prevalenței sporilor subclinici și managementul carantinei, va oferi o soluție preventivă eficientă, durabilă, fără substanțe chimice, pentru a reduce atât incidența focarelor, cât și riscul de transmitere continuă la scară largă [98].

După o prealabilă curățire, stupii se dezinfectează cu o soluție caldă de sodă caustică 3 - 4 %, se lasă la soare timp de 6 ore, după care soda se îndepărtează prin clătire cu multă apă, se usucă și se revopsesc. Vatra stupinei, după curățirea mecanică, se dezinfectează cu oxid de calciu (var nestins)  $0,5 \text{ kg/m}^2$  prin prăfuire și întoarcerea unei brazde de pământ, reziduurile din stupi și stupină se distrug obligatoriu prin ardere. Inventarul apicol se dezinfectează prin flambare, iar echipamentul de pânză prin fierbere timp de 30 minute. Albinele moarte, stupii vechi și inventarul de mică valoare (perne, pături etc.) se distrug prin ardere. Mierea infectată se

diluează cu o cantitate egală de apă, după care se sterilizează prin fierbere până revine la volumul inițial și se folosește exclusiv în hrana oamenilor. Fagurii se reformează pentru extragerea cerii, iar boștina se arde. Obținerea unei vindecări definitive presupune luarea unor măsuri auxiliare privind distrugerea fagurilor cu mult puiet bolnav, transvazarea familiilor bolnave în stupi dezinfectați, dezinfecția stupilor, a inventarului și utilajului apicol, înlocuirea cât mai frecventă a fagurilor, păstrarea în stupină numai a familiilor de albine puternice și active.

Deasemenea schimbarea mătcii familiilor bolnave este o măsură recomandată pentru eradicarea bolii. Odată ce un stup prezintă manifestarea clinică a bolii, singura modalitate eficientă de a o eradica și de a preveni răspândirea bolii este prin arderea stupului, a echipamentului și a coloniei. Datorită naturii sale virulente și a efectelor dăunătoare asupra coloniilor de albine, loca americană este clasificată ca o boală de notificare la nivel mondial. Sunt necesare metode eficiente, sigure și durabile pentru a asigura bunăstarea coloniilor de albine [42].

### **1.9 Concluzii la compartimentul 1**

În rezultatul studierii literaturii pe tema abordată s-a constatat că:

1. Pe plan mondial și național, albinele au un rol important în agricultură, medicină, alimentație datorită produselor care se obțin de la familiile de albine, precum și rolul în polenizarea plantelor entomofile, de asemenea este de apreciat rolul apiterapiei în tratamentul diferitor boli;
2. Din cauza schimbărilor climaterice, influenței nefaste a omului albinele au avut de suferit, toate acestea au dus la dezvoltarea infecțiilor bacteriene, fungice și parazitare, intoxicații cauzate de folosirea substanțelor insecticide, pesticide, etc.;
3. Pentru rezolvarea acestor probleme și îmbunătățirea rezistenței la factorii infecțioși, parazitari și de mediu sunt propuse diferite metode de diagnostic, profilaxie și tratare.
4. Un rol important în combaterea, profilaxia și iradicarea bolilor la albine îl are gradul de instruire, calitățile de organizare ale medicului veterinar și apicultorului.
5. În combatarea și profilaxia bolilor la albine în prezent se utilizează diferite produse de origine microbiană, preparate cu proprietăți pre și probiotice cu rezultate remarcabile.
6. Personalul impicat în creșterea și întreținerea familiilor de albine trebuie să posede cunoștințe ample în diagnosticarea și iradicarea bolilor contagioase.



## 2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

### 2.1. Baza experimentală și materialul utilizat în efectuarea investigațiilor științifice în unitățile apicole și în condiții de laborator

Actualmente, la nivel național sunt elaborate planuri de monitorizare și de contingență în situații de confirmare a bolilor infecțioase și parazitare la familiile de albine. Pentru menținerea situației epidemiologice favorabilă se recomandă controlul periodic pentru identificarea oricărei formă de boală.

Printre bolile albinelor care se supun declarării obligatorii se menționează: Loca americană, Loca europeană, Nozemoza, Acarapioza, gândac de stup - *Aethina tumida*, varrooza și acarianul – *Tropilaelaps*.

Conform rapoartelor oficiale anuale prezentate de către ANSA și din observațiile proprii se poate de menționat că situația epidemiologică la familiile de albine din republică este variabilă de la an la an, cu incidența periodică a unor boli infecțioase de origine bacteriană precum: Loca americană, Loca europeană, Ascosferoza, Aspergiloza, Salmoneloza, iar din bolile de origine parazitare: Varrooza, Nozemoza și Acarapioza.

Cercetările au fost efectuate în perioada 2013-2017. Analizând datele cu referire la bolile de origine bacteriană monitorizate la 5 stupine au variat de la an la an: 2013 – 196 stupi; 2014 – 203 stupi; 2015 – 178 stupi; 2016 – 177 stupi; 2017 – 185 stupi.

Numărul de stupi varia în dependență de condițiile climaterice, posibilitățile apicultorilor, precum și de starea de sănătate, sau starea de viabilitate după perioada de iernat.

În perioada menționată, periodic s-au prelevat probe de albine, de puiet, resturi din stupi după perioade de iernat, precum și probe din stupi în cazul unor suspiciuni de boli, în baza de mortalitate majorată la albinele adulte și la puiet.

Pentru identificarea micromicetelor cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante în studiu au fost luate 22 tulpini din Colecția Națională de Microorganisme Nematogene (CNMN), care sunt depozitate ca potențiali producători de diverse substanțe bioactive ce prezintă interes biotehnologic.

În rezultatul screeningului efectuat, după proprietățile antimicrobiene și enzimatică (catalaza), au fost selectate 3 tulpini: *Penicillium* sp. 11 (*P. funiculosum* CNMN FD 21), *Penicillium* sp. 19 (*P. piceum* CNMN FD 21) și *Penicillium* sp. 62 (*P. verrucosum* CNMD FD), care au manifestat o activitate antioxidantă (a catalazei) înaltă și o activitate antimicrobiană semnificativă față de fitopatogenii testați. Deasemenea au fost selectate tulpinile *Penicillium* sp. 91 și *Penicillium* sp. 97 ce posedă sensibilitate antimicrobiană semnificativă față de patogenii luați în studiu.

În calitate de test-culturi au fost testate 2 tulpini de micromicete ce aparțin genului *Aspergillus*: *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai aspergilozei și bacteria *Paenibacillus larvae*, agent patogen al lozii americane la albine, care au fost izolate din probele prelevate din stupinele cu albine.

Echipament de laborator:

Microscope optice (Lomo Mikmed – 2; B-2921, Camera video; Balanțe electronice AQT 250, WTB-200; Balanță analitică BJIP-200; pH-metru portabil WTW; Autoclav GK/100/3; Sterilizator ГИ-40МО; Termostat Biobase.

## **2.2. Metodele de cercetare și mijloacele tehnice utilizate pentru studiu în unitățile apicole și în condiții de laborator**

### **Metodele de cercetare**

Pentru realizarea obiectivelor lucrării au fost utilizate următoarele metode:

**microbiologice:**

a) *Studierea microflorei din probele prelevate din stupinele de albine.*

În acest scop au fost utilizate mediile de cultură: *Malț-agar* și *Czapek* [177, 178].

Componența mediului nutritiv malț-agar (g/l):

Agar – 20;

Extract de malț 6 (Ba) – 1 litru;

pH – 5,5 – 6,0.

Componența mediului nutritiv Czapek (g/l):

Zaharoză – 30;

NaNO<sub>3</sub> – 2,0;

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0;

Mg SO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O – 0,5;

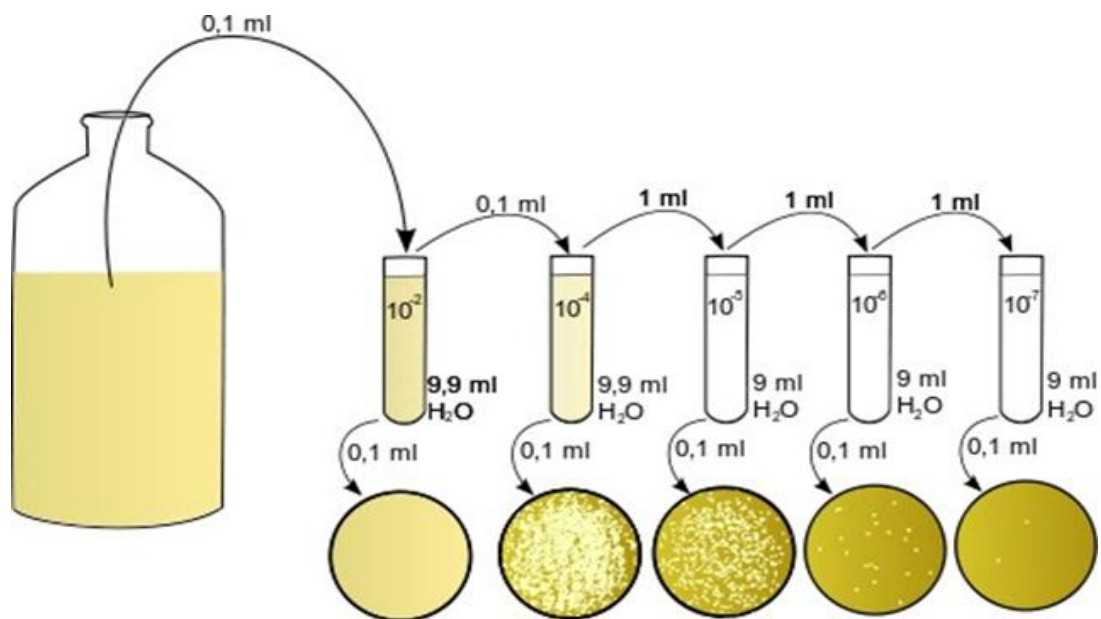
KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O – 0,01;

Agar – 20,0;

Apă distilată – 1L; pH - 6,5 -7,0.

Probele prelevate au fost supuse diluțiilor succesive, apoi câte 0,1ml suspensie de spori a fost inoculat pe cutii Petri cu medii agarizate menționate.

Diluțiile succesive s-au efectuat după schema din Fig 2.1.



**Fig. 2 1. Tehnica efectuării diluțiilor succesive pentru înocularea pe medii nutritive agarizate.**

Cultivarea tulpinilor de micromicete s-a efectuat în termostat la temperatura de 28<sup>0</sup>C, timp de 7 - 14 zile (în dependență de viteza de creștere a tulpinii).

Tulpinile izolate din probele prelevate din stupine *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, de pe cutiile Petri au fost inoculate în tuburi înclinate cu malț-agar și cultivate la temperatura de de 28<sup>0</sup>C, timp de 10 zile.

Tulpina *P. larvae* a fost izolată și cultivată pe mediul *Brain Heart Infusion agar* (BHI Difco).

Culturile *Aspergillus niger* și *Aspergillus fumigatus*, izolate din stupine, care sunt agenți patogeni ai aspergilozei (puietul pietrificat) la albine, dar și tulpina de bacterii *Paenibacillus larvae*, agent patogen al locii americane al albinelor *Apis mellifera* se păstrează la temperatura de 4<sup>0</sup>C, pe mediile agarizate menționate anterior.

*b) Studierea proprietăților morfo-culturale ale coloniilor de micromicete* crescute pe suprafața plăcilor Petri cu mediu agarizat.

Coloniile de *Aspergillus* și *Paenibacillus larvae*, izolate din probele prelevate din stupine au fost identificate în baza particularităților cultural ale coloniilor (dimensiune, formă, relief, marginea, riversul și miros) și examinării la microscop (miceliu, forma, suprafața sporilor, etc). Au fost efectuate și analize biochimice pentru *Paenibacillus larvae*.

Tulpinile de micromicete din CNMN, selectate în rezultatul screeningului efecuat după criteriul antimicrobian și enzimatic au fost cultivate pe diferite medii și studiate proprietățile morfo-culturale. Mediile de cultură agarizate: *Malț-agar*, *Czapek* (componenta descrisă anterior), *Sabouraud* și *amidono-amoniacal* [178, 175].

Componența mediului *Sabouraud* (g/l):

pepton – 10;

Glucoză – 40;

agar – 20; pH – 5,5 – 5,8.

**Tabelul 2.1. Componența mediului amidono-amoniacal(g/l)**

amidon solubil – 10;	Componența soluției de săruri:
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,0;	FeSO <sub>4</sub> – 0,1;
MgSO <sub>4</sub> – 1,0;	MgCl <sub>2</sub> – 0,1;
NaCl – 1,0;	ZnSO <sub>4</sub> – 0,1;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 2,0;	ZnSO <sub>4</sub> – 0,1;
CaCO <sub>3</sub> – 2,0;	H <sub>2</sub> O – 100 ml;
Soluție de săruri – 1ml	PH 5,6 – 5,8.

Culturile au fost examinate vizual și la microscopic și descrise particularitățile morfologice și culturale utilizând determinatoarele în vigoare: [162, 163, 164, 165, 172, 171].

*c) Identificarea micromicetelor cu proprietăți antimicrobiene și enzimatic semnificative*

Identificarea a fost efectuată conform indicatoarelor după proprietățile morfo- culturale descrie anterior [162, 164, 165, 168, 169, 179, ].

De asemenea în calitate de culturi test a fost testată și tulpina *Melissococcus plutonius*, agent patogen al locii europene, care a fost obținută din materialul colectat de la o stupină din s. Lozova, r-nul Strășeni.

*d) Determinarea proprietăților antimicrobiene a tulpinilor*

Proprietățile antimicrobiene au fost studiate conform metodei difuzimetrice, prin utilizarea blocurilor de geloză [170]. Metoda este bazată pe capacitatea de difuziune a metaboliților produși de microorganismele studiate în profunzimea gelozei și a acțiunii substanței active din zona de difuzie asupra culturilor fitopatogene. În calitate de tulpini-test au fost folosiți fitopatogenii: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae*. În conformitate cu mărimea zonelor de inhibiție tulpinile cercetate se împart în sensibile, moderat sensibile și rezistente:

- ø zonei de inhibiție până la 10mm - sensibilitate scăzută;
- ø zonei de inhibiție de 11-15mm - sensibilitate medie;
- ø zonei de inhibiție de 15-25mm - sensibile ;
- ø zonei de inhibiție mai mare de 25mm - sensibilitate sporită.

## **Biochimice**

### **Determinarea activității enzimatică – catalaza**

Pentru determinarea catalazei micromicetele au fost cultivate în baloane Erlenmayer, volumul 500 ml cu 100 ml mediu lichid cu compoziția (%):  $\text{KNO}_3$  – 0,5; glucoză – 4,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 0,15;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001; extract de drojdii – 0,1. Cultivarea s-a efectuat la temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , timp de 6 zile, pe agitator cu 160 - 180 rot./min. Valoarea pH-ului 6,3. În calitate de inocul s-a utilizat soluția apoasă de spori cu concentrația  $5 \times 10^6$  spori/ml mediu cultural. Lichidul cultural a fost separat de biomasă prin filtrare. Activitatea catalazei a fost determinată în lichidul cultural prin metoda titrimetrică [163].

#### **Etapele determinării catalazei:**

- 1) În colbe de 50 ml se adaugă soluție de  $\text{H}_2\text{O}_2$  în tampon fosfat (0,01 N soluție de  $\text{H}_2\text{O}_2$  în 0,006M tampon fosfat) se adaugă 0,5 ml soluție de exometaboliți. Se inhibează 3 min în congelator ( $-20^\circ\text{C}$ ), apoi reacția se oprește adăugând 2 ml soluție de acid sulfuric de 5 N.
- 2) Se adaugă în colbă 2 ml soluție de KI de 10% și câte 1-2 picături de soluție de molibdat de amoniu de 1%. Peste 3 minute se face titrarea cu tiosulfat de natriu de 0,01N.
- 3) Ca indicator pentru finisarea titrării se adaugă 1-2 picături soluție de amidon de 1 %. În proba martor în loc de 0,5 ml soluție de exometaboliți se adaugă 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  distilată.

Calculul se face conform formulei:  $X = (V_m - V_{ex}) \times 0,17/0,5 \cdot 0,034 \cdot 3 = (V_m - V_{ex}) \cdot 3,33 \cdot P$ , unde: X – activitatea catalazei în 1ml soluție de exometaboliți;

$V_m$  - cantitatea de tiosulfat utilizată la proba martor;

$V_{ex}$  - cantitatea de tiosulfat utilizată la proba experimentală (cu sol de exometaboliți);

0,17 - cantitatea de  $\text{H}_2\text{O}_2$ (mg), ce corespunde 1 ml tiosulfat de natriu de 0,01N;

0,034 – cantitatea  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ce corespunde 1 mk M;

0,5 – numărul ce indică diluția soluției de exometaboliți;

3 – timpul de incubare (min);

P– factorul de diluție.

#### **Prolificitatea mătcilor:**

Reprezintă studierea cantității de ouă depuse în 24 ore de matcă. O matcă poate depune într-o zi de la 1500 – 2000 ouă/zi, iar altele mai prolifică în jur de 2500 ouă/ zi. Prolificitatea mătci este dependentă de puterea familiei, modul de organizarea a cuibului, condițiile de creștere, capacitatea albinelor - doici de a produce lăptișor, cât și de cantitatea și calitatea rezervelor de hrană.

Pentru aprecierea prolificității, dezvoltării și creșterii familiei de albi, am apreciat cantitatea de puie capăcit, cu ajutorul rețelei cu pătrate cu dimensiunea de 5x5 cm, la fiecare 12 zile în 3 reprize (a 12 zi, 24 zi și 36 zi).

Astfel numărul de pătrate cu puie capăcit obținut am înmulțit la 100 și împărțit la 12, astfel se obține numărul de ouă într-o zi [48].

### **Cantitatea de miere la primul cules.**

A fost determinată reieșind din cantitatea de miere obținute de pe ramele din stupine a unei familii de albine.

Cantitate de puie capăcit. Numărul de celule cu puie capăcit din cuib se determină prin măsurarea cu rama Netz a numărului de pătrate (5 x 5 cm) ocupate cu puie capăcit care se înmulțește cu 100, rezultând numărul total de celule cu puie capăcit [74].

Puterea familiei reprezintă cantitatea de albină existentă în cuib la momentul aprecierii.

Pentru interpretarea rezultatelor puterii familiei de albi am folosit metoda "pătratelor", această metodă constă în numărarea pătratelor de puie capăcit 5x5 cm ce se egalează cu 100 celule, calcularea am efectuat-o la fiecare ciclu de 12 zile. Fiindcă o albină în dezvoltare se află în celula capăcită 12 zile, astfel împărțind cantitatea totală de puie la 12 vom afla câte albine în medie vor ecloziona în fiecare zi sau pe perioada ciclului. Aprecierea puterii familiei de albi odată la 12 zile nu este deranjatoare, însă obținem rezultate precise [48].

### **de analiză statistică a datelor.**

Rezultatele experimentale au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive (calculul mediilor aritmetice, abaterilor standard, coeficientului de variație) și statisticii inferențiale (testele de valabilitate și testele de semnificație). Calculul indicatorilor statistici a fost efectuat utilizând programul Microsoft Office Excel 2010. Gradul de semnificație a diferenței mediilor indicilor la loturile comparate a fost determinat utilizând criteriul student.

### **2.3. Analiza, sistematizarea și interpretarea rezultatelor științifice.**

Pentru realizarea obiectivelor propuse în această lucrare au fost efectuate cercetări în următoarea ordine:

- Izolarea fitopatogenilor din probele prelevate din stupinele de albine și identificarea lor (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*);
- Efectuarea screeningului din 22 tulpini de micromicete din CNMN după criteriul de antagonism față de fitopatogenii *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*, selectați din stupinele cu albine;

- Efectuarea screeningului din 22 tulpini de micromicete din CNMN după criteriul enzimatic (activitatea catalazei).
- Studiul particularităților morfo-culturale ale tulpinilor selectate *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 19 și *Penicillium* sp. 62 (examinarea vizuală și la microscop).
- Obținerea soluției de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 19 și *Penicillium* sp. 62 prin cultivarea submersă a culturilor. Lichidul cultural, obținut după cultivarea submersă a tulpinilor de micromicete (*P. funiculosum* CNMN FD 11, *P. piceum* CNMN FD 19 și *P. verrucosum* CNMN FD 62) a fost tratat termic timp de 1 oră la temperatura 60°C, pentru a distruge celulele formatoare de colonii (CFC) și a obține soluția de exometaboliți, care apoi a fost administrată în diferite concentrații în hrana albinelor.

Montarea experimentelor în stupine. Pregătirea hranei pentru albine suplimentată cu soluție de exometaboliți. Pentru estimarea eficienței soluției de exometaboliți, au fost desfășurate experiențe de testare comparativă a acestora pe familii de albine formate din patru loturi, câte 5 familii în fiecare lot: lotul I – martor (albinele căruia au fost hranite numai cu sirop de zahăr de 50%); lotul II – *P.sp.* 11 (3 variante - albinele căruia au primit în hrană sirop de zahăr de 50% cu adaos de metaboliți ai tulpinii *P.sp.* 11 în cantitate de 10 ml/litru; 25 ml/litru; 50 ml/l), lotul III – *P.sp.* 19 (3 variante - albinele cărora au primit în hrană sirop de zahăr de 50% cu adaos de metaboliți ai tulpinii *P. sp.* 19 în cantitate de 10 ml/litru; 25 ml/litru; 50 ml/litru) și lotul IV – *P.sp.* 62 (3 variante - albinele cărora au primit în hrană sirop de zahăr de 50% cu adaos de metaboliți ai tulpinii *P. sp.* 62 în cantitate de 10 ml/litru; 25 ml/litru; 50 ml/litru). Amestecul de sirop de zahăr cu soluțiile menționate de exometaboliți a fost administrat în cantitate de 200 ml pentru fiecare ramă cu albine o singură dată, primăvara timpuriu.

Pentru studierea acțiunii soluțiilor de exometaboliți în profilaxia bolilor contagioase, precum și ca stimulator de rezistență fiziologică a familiilor de albine, toamna, înainte de iernat au fost introduse în stup soluțiile de exometaboliți ai culturilor *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 62, în calitate de supliment în hrana albinelor (în turtele din făină de grâu). Au fost testate 3 concentrații de soluții de exometaboliți: 10 ml/l, 25 ml/l și 50 ml/l de sirop de zahăr. Rezultatele obținute în perioada cercetărilor de primăvară au fost evaluate conform parametrilor: % de albine moarte după iernat; cantitatea de miere rămasă din iarnă (%); comportamentul albinelor; activitatea de zbor a albinelor; prezența mucegaiului în stup; modul de căpăcire; rezistența la iernat.

Interpretarea rezultatelor s-a efectuat după fiecare etapă în concordanță cu rezultatele obținute în cercetările efectuate și metoda utilizată.

La finalul cercetărilor a fost evaluat impactul soluțiilor de exometaboliți de micromicete suplimentată în hrana albinelor asupra patogenilor: loca americană (*Paenibacillus larvaie*) și

aspergiloza (*Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*), dar și asupra creșterii și dezvoltării familiilor de albine *Apis mellifera* (prolificitatea mătcii, ouă/24 ore; cantitatea de puieț căpăcit; puterea familiei; cantitatea de miere).

#### **2.4. Concluzii la capitolul 2**

1. Pentru realizarea experimentelor, în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate stupine cu familii de albine și tulpini de micromicete.
2. Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost utilizate metodele de cercetare: microbiologice, biochimice, statistice.
3. Aplicarea metodelor clasice și a celor moderne, dotarea corespunzătoare cu echipamentele și mediile nutritive utilizate în studiu, au asigurat descrierea obiectivă a impactului preparatelor de origine microbială asupra valorilor principalelor caractere de reproducție a reginei și de dezvoltare ale familiilor de albine.



### 3. IDENTIFICAREA UNOR TULPINI DE MICROMICETE CU POTENȚIAL ANTIMICROBIAN ȘI ANTIOXIDANT

#### 3.1 Izolarea patogenilor aspergilozei (*Aspergillus*) și loci americane (*Paenibacillus larvae*) din stupinele de albine și caracteristica proprietăților morfo-culturale ale acestora

Albinele *Apis mellifera* L. sunt polenizatorii esențiali ai plantelor, care în prezent sunt afectați de mai mulți factori de stres care le perturbă funcția ecologică, reduc producția de miere, iar în situații extreme produc pierderi de colonii. În ultima perioadă dezvoltarea apiculturii este periclitată cu o deosebită amploare și de diferite maladii: aspergiloza, loca americană și europeană, salmoneloza, etc., provocate de fungi, bacterii, viruși, acarieni [ 9, 21, 52, 101].

Aspergiloza reprezintă una dintre cele mai relevante amenințări de origine fungică pentru sănătatea umană și animală, genul *Aspergillus* include agenți patogeni oportuniști, care pot infecta și albinele (*Hymenoptera*, *Apoidea*) în toate etapele de dezvoltare. Diagnosticul aspergilozei albinelor se face pe baza semnelor externe caracteristice ale puietului mort și ale adulților (larva devine verde deschis sau maro închis și tare), precum și după studii microscopice și micologice. Cercetările recente indică faptul că diferite specii de *Aspergillus* pot fi patogene, atât pentru larve cât și pentru albinele adulte [57]. Un studiu efectuat în Anglia a arătat că, din 10 specii recuperate din stupine, trei specii (*A. flavus*, *A. nomius* și *A. phoenicis*) au manifestat patogenitate pentru larvele de albine. Testate în dieta albinelor adulte în diferite concentrații, *A. flavus* s-a dovedit a fi patogen la toate dozele studiate, în timp ce *A. niger* și *A. fumigatus* nu au fost infecțioși pentru albine. Virulența mai puternică manifestată de *A. flavus* la albinele melifere rezultă din toxicitatea mai mare în comparație cu *A. niger* și *A. parasiticus*, cea ce e posibil ca mortalitatea larvelor să se datoreze mai degrabă toxicității decât invaziei fungice [57]. Micromicetele din genul *Aspergillus spp.*, sunt patogeni oportuniști și își dezvoltă patogenitatea numai în anumite circumstanțe, în special atunci când gazdele sunt imunocompromise, metodele de apărare sunt suprimate sau ocolite [54].

Bacteria Gram pozitivă *Paenibacillus larvae*, care formează spori, este agentul cauzal al loci americane, un agent patogen periculos pentru larvele de albine *Apis mellifera*. Aceasta este cea mai răspândită dintre bolile larvelor de albine. Larvele tinere (din primul și al doilea stadiu) sunt foarte susceptibile la această boală, ingestia a doar 10 spori infecțioși fiind suficientă pentru a provoca mortalitatea [160]. Bacteria *Paenibacillus larvae* este rezistentă la antibiotice, cea ce complică tratatea bolii. În prezent sunt cunoscute mai multe metode de combatere a acestei maladii. Astfel, studiile efectuate pe larve infectate in vitro și, de asemenea, pe stupi în câmp au demonstrat că fagii au un efect profilactic, prevenind infecția și, de asemenea, un efect curativ, ajutând la anihilarea infecției. Fagii *Paenibacillus larvae* par să fie siguri de utilizat și eficienți

ca tratament pentru AFB, iar interesul față de aceștia în următorii ani va continua să crească [148]. De asemenea pentru profilaxia și combaterea *Paenibacillus larvae* poate fi administrată în dieta familiilor de albine și amestecului de biomasă de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-04 cu pudră de zahăr în raport de 1,8-2,2 g. BAU la 100g pudră de zahăr o singură dată în cantitate de 100 g amestec la familie [120].

Pentru detectarea și studierea agenților patogeni ai aspergilozei și locii americane și europene au fost prelevate probe din stupine de albine. Au fost prelevate probe din stup, dar și din cadavrele larvelor și albinelor pentru depistarea agenților aspergilozei (*Aspergillus spp.*). Din camerele de miere și din camerele de puiet, cât și din puietul mort din stup și din afara stupului au fost prelevate probe pentru depistarea tulpinilor *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius*. Mierea a fost răzuită din faguri cu o linguriță. Prelevarea probelor a fost efectuată, în martie și mai. Toate probele au fost prelevate în vase sterile și studiate în laborator. După diluții succesive probele au fost inoculate în cutii Petri pe mediul mal-agar și mediul Czapek, pentru identificarea fungilor, iar pentru identificarea bacteriilor a fost utilizat mediul Brain Heart Infusion agar (BHI Difco). Coloniile crescute pe cutii Petri au fost examinate vizual și izolate, apoi cultivate în cultură pură.

În rezultatul examinării la microscop au fost depistate tulpini de fungi din genul *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. De asemenea au fost depistate diferite genuri de bacterii, au predominat însă bacteriile din genul *Bacillus* (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1. Aspectul microorganismelor izolate din stupine.**

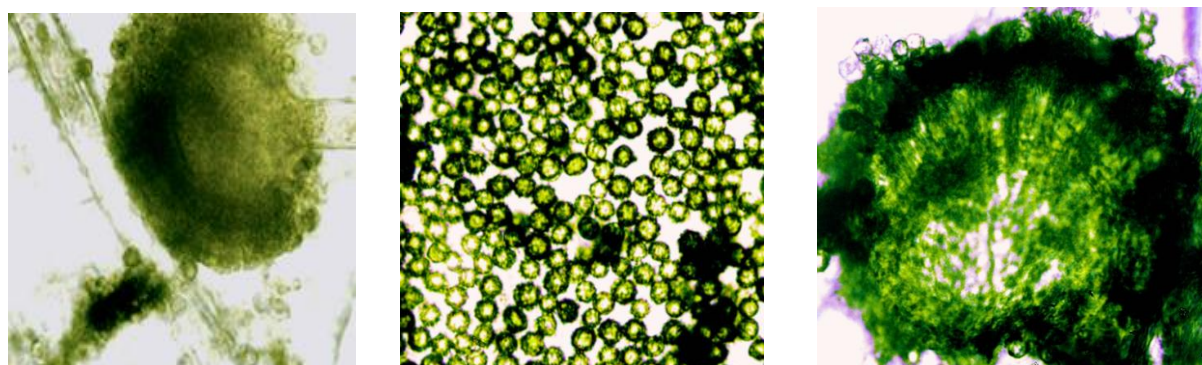
Pentru cercetări ulterioare au fost selectate tulpinile *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai aspergilozei și *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al locii americane, agentul patogen al locii europene, care au fost minuțios examinate și studiate particularitățile lor morfologice și culturale. Tulpina *Melissococcus plutonius* agentul patogen al locii europene, nu a fost depistată în stupinile de albine studiate.

Tulpina *Aspergillus niger* cultivată pe mediul malț-agar formează colonii mari de 4-5 cm, netede sau pufoase, de culoare neagră, miros slab de mucegai, miceliul crește abundent, bine dezvoltat, nu prea compact, riversul cărămiziu. Înălțimea coloniilor 1,0-2,0 mm, creșterea liniară

0,25-0,3 cm/zi. Măciuliile conidiale sunt mari de culoare neagră, inițial au forma rotundă, iar apoi se dezvoltă radial, la maturizare se dispersează în mai multe părți. Conidioforii sunt repartizați în 2 nivele, au lungimea de 1,5-3,0 mm, lățimea 15-20  $\mu$ , sunt netezi, incolori. Sterigmele primului nivel au dimensiunile 20-30 x 5-6  $\mu$ , iar cele situate la nivelul al doilea cu dimensiuni de 8-10 x 3-4  $\mu$ . Conidiile sferice, suprafața rugoasă, cu diametru de 4-6  $\mu$ , culoarea cafenie sau neagră Fig. (3.2)



**Fig. 3.2. - Aspectul coloniilor *Aspergillus niger***



**Fig. 3.3. -Morfologia tulpinii *Aspergillus niger***

Pe mediul agarizat Cezapek tulpina formează colonii de 2,5-3,0 cm, miceliul de substrat compact, alb, scufundat sau răspândit pe suprafața substratului în strat spongios. Măciuliile conidiale abundente, conglomerate, de culoare neagră sau cu nuanțe cafenii, concentrate în centrul coloniei, la început sferic, apoi radiar. Conidioforii variază între 1,5 - 3,0  $\mu$ m înălțime, 15 - 20  $\mu$ m lățime, incolori sau cafenii în partea superioară. Sterigmele cafenii, bietajate. Conidiile sferice, 4,5  $\mu$ m în diametru, cafenii, cu înveliș bine evidențiat, rugos. Reversum incolor. Exudatul lipsește. Mirosul tipic de mușeștii.

Tulpina *Aspergillus flavus* cultivată pe mediul malț-agar formează colonii cu diametrul de 3-4 cm, pufoase, catifelate, la mijloc miceliul mai înalt, culoarea inițial galbenă sau cafeniu deschis în centru cu nuanțe verzui, apoi verde, foarte sporulente, reversul cărămiziu. Conidioforii sunt incolori și cu textură aspră, provin din hife, pe care sunt fialidele în două rânduri, spori rotunzi, netezi de culoare verzuie cu dimensiuni de 3-6  $\mu$ m (Fig. 3.4 (1), Fig. 3.5).

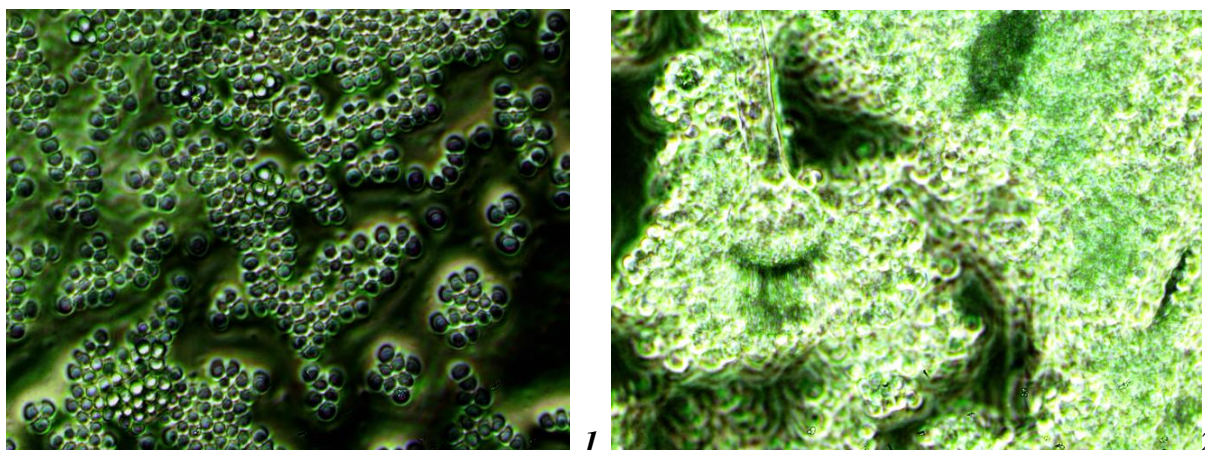


Pe mediul Czapek coloniile au dimensiunea de 2-3 cm, sferice, miceliul scurt, catifelat, culoarea inițial gălbuie, la mijloc cu nuanțe verzui, apoi verde deschis, sporulente, reversul cărămiziu. Conidioforii incolori, fialide în două rânduri, sporii rotunzi, netezi sau slab rugoși, verzui, dimensiune de 3-6 μm (Fig. 3.3 (2), Fig. 3.4).

Dezvoltarea optimală a culturii se manifestă la temperatura de 25...29°C.

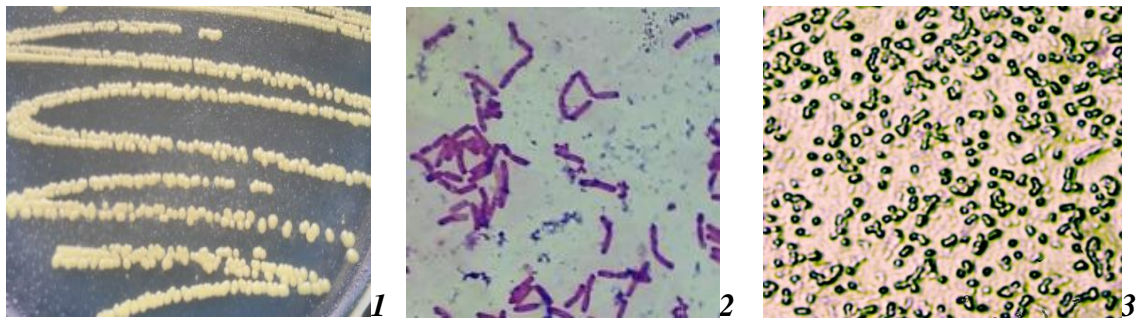


**Fig. 3.4. Aspectul coloniilor tulpinii *Aspergillus flavus* (1 -după 4, 2- după 14 zile de cultivare pe mediul de cultură malț-agar)**



**Fig. 3.5. Morfologia celulelor tulpinii *Aspergillus flavus***

*Paenibacillus larvae* este o bacterie Gram pozitivă, formează spori, este agentul cauzator al locei americane (AFB), cea mai devastatoare boală bacteriană a albinei. Cultivată pe mediul BHI Difco formează colonii rotunde de culoare gălbuie (Fig. 3.5(1)), marginea netedă, profilul ușor convex, consistența vâscoasă, gradul de transparență opac, aspectul coloniei – neteă lucioasă. La examinarea microscopică s-a constata că: forma celulelor - bacili groși solitari sau câte 2, după o perioadă îndelungată de timp pe mediul agarizat bacilii se îngroașă, mai mult solitari, formează spori (Fig. 3.5 (2)). Tulpina crește bine la temperatura de 30-36°C pe mediul nutritiv menționat anterior (BHI Difco), dar de asemenea crește și pe mediul agar-nutritiv.



**Fig. 3.6. Tulpina *Paenibacillus larvae*: 1- colonii, 2 - bastonașe (după 2 zile de cultivare), 3 – bastonașe și spori (după 1 lună de păstrare pe mediul agarizat).**

Tulpinile selectate au fost utilizate în cercetările ulterioare în calitate de cultură test.

### **3.2. Identificarea tulpinilor de micromicete cu proprietăți enzimatic semnificative și eficiența față de agenții patogeni ai locii americane, locii europene și aspergilozei la familiile de albine.**

Micromicetele se adaptează ușor la condițiile mediului înconjurător, deoarece au capacitatea de a produce enzime induse, care pot descompune mediul pe care sunt localizate și de a folosi unele din substanțele obținute ca sursă nutritivă. Datodită proprietăților enzimaticelor micromicetele sunt cei mai activi destructori ai diferitor materiale (lemn, beton, textile, cauciuc, petrol, etc.), cât și a produselor de origine vegetală și animală, fiind considerați ca sanitari ai naturii. În condiții favorabile și medii specifice micromicetele se dezvoltă rapid, formând timp de 2-3 zile colonii vizibile și bine diferențiate, de dimensiuni, formă și margine diferită în dependență de gen și specie. Coloniile de micromicete se caracterizează prin miceliul aerian și de substrat bine dezvoltat, de diferite culori (alb, galben, brun, roz, verde, negru, albastru, etc.) și diferite nuanțe în dependență de gen și specie [38, 62].

Micromicetele reprezintă sursa principală a biotehnologiei moderne. În ultimii ani pentru producerea unui spectru larg de substanțe bioactive se utilizează cu succes microorganismele, fapt determinat de caracteristicile tehnologice prețioase: ciclul scurt de dezvoltare, posibilitatea cultivării în condițiile reglării și obținerii sistemelor enzimaticelor cu o componență prognozată a unei cantități nelimitate de diferite substanțe bioactive. Un rol aparte îl au micromicetele din genul *Penicillium*. Micromicetele din genul *Penicillium* cu proprietăți biosintetice semnificative și-a găsit întrebuințarea în medicină și farmaceutică, precum și pentru obținerea substanțelor bioactive utilizate în diferite ramuri ale economiei [15, 77, 174].

Mucegaiurile produc pentru industria farmaceutică compuși deosebiți de importanți, precum antibioticele și enzimele cu rol terapeutic, dar pot fi și patogeni periculoși pentru om, plante, insecte ș.a. Totodată micromicetele (mucegaiurile) sunt un pericol pentru om, plante animale, insecte, provocând diferite maladii periculoase ce pot fi letale în anumite cazuri.

Mucegaiurile inferioare ce afectează albinele se caracterizează prin miceliu aseptat, colonii ce se dezvoltă rapid, au aspect păslos și culori alb, bej, cenușiu, brun, sunt extinse, avînd tendința de a ocupa tot spațiul disponibil. Rezistența albinelor la îmbolnăviri cu astfel de patogeni se datorează imunității naturale și dobândite, efectului antibiotic al secreției glandelor salivare și fitocidelor, bactericidelor și fungicidelor din nectarul și polenul plantelor. De asemenea albinele adulte "poartă" în intestinul mediu spori ai agenților patogeni, care proliferază când albinele nu dispun de hrană de calitate, când au organismul uzat și când condițiile din stup nu sunt corespunzătoare [57, 101] .

Răspândirea agenților patogeni se produce prin intermediul albinelor, trântorilor, paraziților albinelor, prădătorilor familiei de albine, apei, mierii și păsturei infectate, fagurilor cu puiet, miere sau păstura ramelor, componentelor stupilor, adăpătoarelor, hrănitorelor, utilajelor și uneltelor apicole și apicultorului.

Aspergiloza (puietul pietrificat) este o boală micotică provocată de *Aspergillus flavus* și mai rar de *Aspergillus niger*. Aspergiloza poate apărea în tot cursul sezonului activ, fiind favorizată de excesul de umiditate. Miceliul se dezvoltă în celule, ce poate fi confundat cu polenul galben-verzui. El se întinde pe suprafața fagurelui sub forma de insule. Infestarea se realizează odată cu recoltarea polenului. Puietul bolnav se deshidratează până când are o consistență dură, se acoperă cu un mucegai galben-cenușiu, apoi verzui. La albinele adulte, miceliul de nuanță verzuie apare pe suprafața corpului, în spațiile dintre inelele abdominale. Albinele bolnave de aspergiloză devin la început neliniștite, apoi prezintă mișcări anormale, cad de pe faguri, nu pot zbura, paralyzează și mor. În forma incipientă a bolii se transvazează familiile în alți stupi cu faguri noi, se topesc fagurii vechi, se dezinfectează întregul utilaj și se aplică tratamentul specific pentru loca americana. Dacă albinele adulte sunt afectate, familia de albine se arde [70, 71, 72].

Această boală este foarte periculoasă întrucât poate provoca afecțiuni pulmonare și la om. Este cunoscut că agenții antimicrobieni interferă cu procesele specifice, esențiale pentru creșterea și diviziunea agenților patogeni: bacterii, fungi. Ei pot fi grupați ca inhibitori ai peretelui celular bacterian și fungic, ori ca inhibitori ai funcției membranei citoplasmatică, inhibitori ai sintezei acizilor nucleici și inhibitori ai funcției ribosomale [38, 128].

#### **a) Selectarea tulpinilor de micromicete cu proprietăți antimicrobiene față de patogenii locii americane, locii europene și aspergilozei la familiile de albine.**

În prezent se efectuează multiple cercetări în obținerea unor biopreparate ce ar putea combate această maladie. Cercetările efectuate de către noi au fost efectuate în această direcție.

A fost efectuat screeningul din 22 tulpini de micromicete din CNMN, ce aparțin genului *Penicillium*, cu potențial antimicrobian cultivate pe mediul malț-agar.

Ca agenți patogeni au fost testate micromicetele *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și bacteria *Paenibacillus larvae*, izolate din stup și bacteria *Melissococcus plutonius*.

Ca martor au fost testați antibioticii Furazolidon, Tetraciclina și Neomicina.

La efectuarea screeningului au fost parcurse următoarele etape:

1. pregătirea mediilor pentru însămânțarea culturilor test și ale tulpinilor de micromicete utilizate în screening (Fig.3.7).



**Fig. 3.7. Pregătirea mediilor de cultură pentru inocularea microorganismelor**

2. Însămânțarea complexă a 22 de micromicete din CNMN pe mediul malț-agar și cultivarea timp de patru zile pentru obținerea unui gazon uniform.

3. Însămânțarea culturilor-test *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus* în cutii Perti pe mediul malț-agar și a bacteriilor patogene *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius* pe mediul Brain Heart Infusion agar (BHI Difco).

4. Pregătirea godeurilor pe cutiile Petri însămânțate cu patogeni și a blocurilor de geloză de pe cutiile Petri după 4 zile de cultivare a micromicetelor (Fig 3.8).



**Fig. 3.8. Pregătirea blocurilor de geloză și introducerea lor în godeur pe cutii Petri însămânțate cu patogeni.**

5. Difuzia exometaboliților de micromicete în mediul agarizat timp de 12 ore la temperatura camerei, apoi cultivarea în termostat la temperatura de 30-36°C, timp de 24 ore pentru bacterii și la temperatura de 28-30°C, timp de 4 zile pentru fungi.

6. Examinarea și măsurarea zonelor de inhibiție a patogenului testat.

Rezultatele obținute în acest screening sunt prezentate în Tabelul 3.1.

**Tabelul 3.1. Activitatea antimicrobiană a tulpinilor de micromicete față de agenții patogeni al aspergilozei, locii americane și locii europene**

№ d/o	Tulpinile testate	Diametrul zonei de inhibiție a test-culturilor (mm)			
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Melissococcus plutonius</i>
1	<i>Penicillium sp.</i> 11	15, 5 ± 2,5	0	0	
2	<i>Penicillium sp.</i> 19	0	0	0	
3	<i>Penicillium sp.</i> 32	<b>22,5 ± 2,5</b>	0	0	
4	<i>Penicillium sp.</i> 52	0	0	12,7 ± 1,5	12,0±1,0
5	<i>Penicillium sp.</i> 62	<b>28,2 ± 2,2</b>	<b>28,5 ± 2,6</b>	15,0 ± 1,2	15,0±1,5
6	<i>Penicillium sp.</i> 78	0	0	0	
7	<i>Penicillium sp.</i> 79	0	0	0	
8	<i>Penicillium sp.</i> 80	0	0	0	
9	<i>Penicillium sp.</i> 81	0	0	0	
10	<i>Penicillium sp.</i> 83	0	0	0	
11	<i>Penicillium sp.</i> 88	0	0	0	
12	<i>Penicillium sp.</i> 93	0	0	0	
13	<i>Penicillium sp.</i> 91	0	0	<b>20,3 ± 1,8</b>	<b>21,0±1,5</b>
14	<i>Penicillium sp.</i> 97	<b>32,0 ± 3,2</b>	<b>15,4 ± 1,1</b>	15,0 ± 1,3	15,0±1,0
15	<i>Penicillium sp.</i> 100	0	0	0	
16	<i>Penicillium sp.</i> 101	0	0	0	
17	<i>Penicillium sp.</i> 102	0	0	0	
18	<i>Penicillium sp.</i> 103	0	0	0	
19	<i>Penicillium sp.</i> 104	0	12,0 ± 2,3	10,2 ± 1,1	10,0±1,0
20	<i>Penicillium sp.</i> 106	0	0	0	
21	<i>Penicillium sp.</i> 109	0	0	0	
22	<i>Penicillium sp.</i> 110	0	0	<b>20,5 ± 2,3</b>	<b>19,5±1,5</b>
Marto r, antibi otice	Furazolidon (10 mg per rondelă)	0	0	0	
	Tetraciclina (30 mg per rondelă)	0	0	20,0 ± 1,2	
	Neomicina (15 mg per rondelă)	0	0	22,0 ± 1,3	

Din numărul total de micromicete testate sensibilitate față de patogenul *A. flavus* au manifestat 4 tulpini: *Penicillium sp.* 32; *Penicillium sp.* 62, la care diametrul zonei de inhibiție a creșterii test-tulpinii a constituit 22,5, 28,2 mm respectiv, iar la tulpina *Penicillium sp.* 11 diametrul zonei de inhibiție a fost de 15,5mm. O sensibilitate sporită față de acest patogen a manifestat tulpina *Penicillium sp.* 97, diametrul zonei de inhibiție fiind de 32 mm.



Față de *A. niger* – de asemenea 3 tulpini de micromicete (*Penicillium sp.* 62; *Penicillium sp.* 97 și *Penicillium sp.* 104) au manifestat sensibilitate, valorile zonelor de inhibiție fiind de 28,5, 15,1 și 12,0 mm respectiv (Figura 3.9, Figura 3.10). Preparatul testat furazolidon, ce posedă proprietăți antifungice nu a manifestat activitate față de patogenii de aspergiloză *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*.



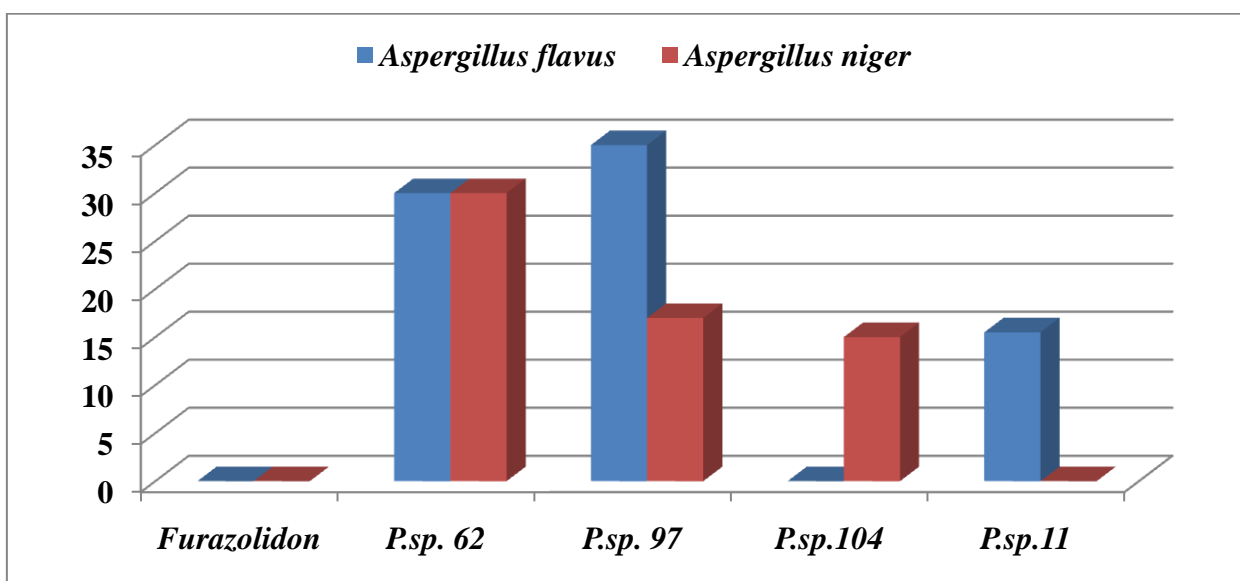
**Fig. 3.9** Zonele de inhibiție ale patogenului *Aspergillus flavus*.



**Fig. 3.10.** Zonele de inhibiție a patogenului *Aspergillus niger* sub acțiunea exometaboliților micromitetelor studiate: 1) *Penicillium sp.* 62; 2) *Penicillium sp.* 97.

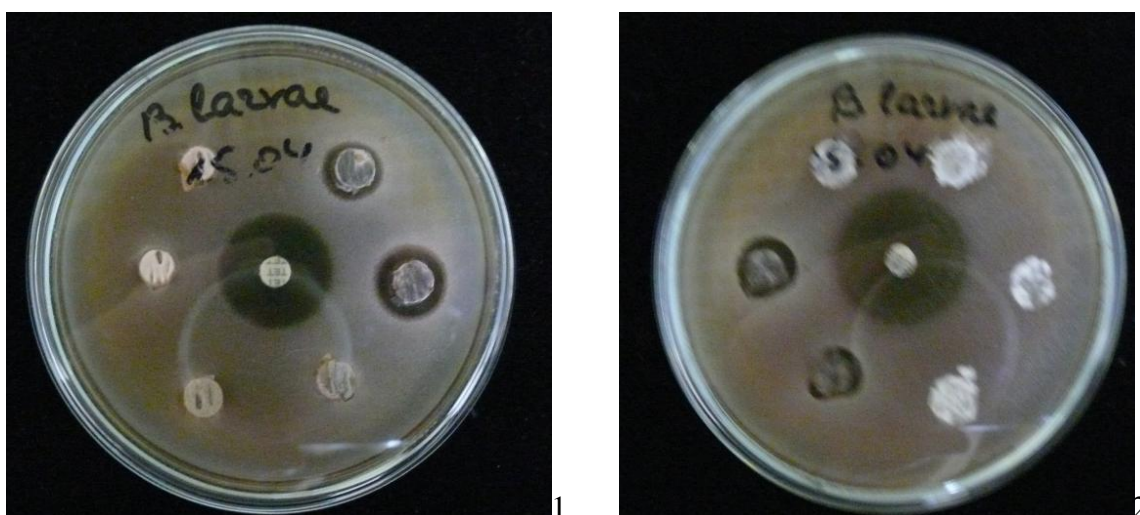
Astfel, tulpinile de micromicete testate au demonstrat o sensibilitate semnificativă față de patogenii genului *Aspergillus* comparativ cu preparatul furazolidon. Tulpina *Penicillium sp.* 62, posedă o sensibilitate sporită față de *A. flavus*, cât și față de *A. niger*, cu zone de inhibiție de 28,2 și respectiv 28,5 mm, iar tulpina *Penicillium sp.* 97 posedă o sensibilitate sporită față de *A.*

*flavus* (zona de inhibiție 32,0 mm) și este sensibilă față de *A. niger* (zona de inhibiție 15,0 mm) (Figura 3.11) [136, 167].



**Fig. 3.11. Zonele de inhibiție a patogenilor *A. niger* și *A. flavus* sub acțiunea exometaboliților de *Penicillium*.**

Rezultatele prezentate în Tabelul 3.1. ne demonstrează că, din 22 tulpini de micromicete testate proprietăți antibacteriene față de *P. larvae* și *Melissococcus plutonius* posedă numai 6 tulpini (*Penicillium sp. 52*, *Penicillium sp. 62*, *Penicillium sp. 91*, *Penicillium sp. 97*, *Penicillium sp. 104*, *Penicillium sp. 110*). Diametrul zonei de inhibiție a creșterii acestor patogeni variază de la 10,0 mm (*Penicillium sp. 104*) până la 21,0 mm (*Penicillium sp. 91*). Astfel, diametrul zonelor de inhibiție formate de către tulpinile *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 110* sunt la un nivel cu martorul tetraciclina și puțin mai mici decât zonele de inhibiție a neomicinei (Fig. 3.12).



**Fig. 3.12. Zonele de inhibiție a patogenului *P. larvae*: 1 - centru tetraciclina, dreapta *Penicillium sp. 62*; 2 - centru neomicină, stânga – *Penicillium sp. 104*.**

Conform rezultatelor prezentate diametrul maxim al zonelor de inhibiție a creșterii patogenului *P. larvae* a fost înregistrat de tulpinile *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 110 și constituie 20,3 mm și respectiv 20,5 mm, iar a tulpinii *Melissococcus plutonius* 21,0 mm și respectiv 19,5 mm. De asemenea sensibilitate față de acest patogen au manifestat și tulpinile *Penicillium sp.* 62 și *Penicillium sp.* 97 cu zone de inhibiție de 15,0 mm [133, 138].

#### **b) Selectarea tulpinilor de micromicete după criteriul activității catalazei.**

Micromicetele sunt cunoscute ca producători semnificativi de substanțe bioactive ca vitamine, enzime și antibiotice. Enzimele sunt catalizatorii tuturor reacțiilor biochimice din organismele vii. Miliardele de celule din corpurile vii sunt constant amenințate de compușii chimici cunoscuți sub numele de radicali liberi. Atunci când aceste molecule se acumulează la nivelul organismului, ele sunt capabile să deterioreze celulele și materialul genetic, ceea ce poate duce la diviziune celulară anormală, sau pieirea organismului. Pentru anihilarea radicalilor liberi sunt utilizați antioxidanți dintre care fac parte enzimele oxidative (catalaza, superoxidismutaza, etc). Anume enzimele oxidative joacă un rol important în anihilarea radicalilor liberi din organismele vii [92, 93]. Reacțiile produse în celulă pot provoca modificări oxidative, care duc la deteriorarea celulelor. Celulele au dezvoltat mai multe mecanisme de apărare antioxidantă, precum enzime, metaboliți, vitamine. Pentru anihilarea radicalilor liberi sunt utilizați antioxidanți dintre care enzimele oxidative (catalaza, superoxidismutaza, etc). catalaza este una dintre enzimele antioxidante , care atenuiază stresul oxidativ, prin distrugerea peroxidului de hidrogen celular în rezultatul căruia se produce apă și oxigen. Astfel, enzimele oxidative joacă un rol important în anihilarea radicalilor liberi din organismele vii [61, 108].

Reieșind din cele menționate la selectarea micromicetelor ca producători de substanțe bioactive pentru testarea asupra albinelor s-a ținut cont de acest lucru.

Astfel, a fost efectuat screeningul din 22 tulpini de micromicete după criteriul de sinteză a catalazei. Tulpinile de micromicete luate în studiu au fost cultivate submers în baloane Erlenmayer de 500 ml cu câte 100 ml mediu nutritiv, timp de 6 zile, la temperatura de 28-30°C, prin agitare continuă. Componența mediului nutritiv (%): KNO<sub>3</sub> - 0,5; glucoză – 4,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,15; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O – 0,25; MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O – 0,5; Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O – 0,001; CaCO<sub>3</sub>- 0,2; extract de drojzii – 0,5, pH – inițial 6,0-6,2, restul apă distilată până la 1 L. După separarea biomasei de lichidul cultural a fost determinată catalaza prin metoda titrerică.

Rezultatele obținute în aceste cercetări sun prezentate în Tab. 3.2.

**Tabelul 3.2. Activitatea catalazei tulpinilor de micromicete obținute în rezultatul screeningului**

<b>№ d/o</b>	<b>Tulpinile testate</b>	<b>Activitatea catalazei, U/ml</b>
1	<i>Penicillium sp. 11</i>	231,1±10,0
2	<i>Penicillium sp. 19</i>	116,6±4,5
3	<i>Penicillium sp. 32</i>	0
4	<i>Penicillium sp. 52</i>	9,5±0,5
5	<i>Penicillium sp. 62</i>	28,0±0,5
6	<i>Penicillium sp. 78</i>	8,0±0,2
7	<i>Penicillium sp. 79</i>	10,2±±0,3
8	<i>Penicillium sp. 80</i>	7,2±0,2
9	<i>Penicillium sp. 81</i>	1,7±0,1
10	<i>Penicillium sp. 83</i>	8,8±0,2
11	<i>Penicillium sp. 88</i>	21,6±0.4
12	<i>Penicillium sp. 93</i>	8,3±0,2
13	<i>Penicillium sp. 91</i>	0
14	<i>Penicillium sp. 97</i>	0
15	<i>Penicillium sp. 100</i>	3,0
16	<i>Penicillium sp. 101</i>	0
17	<i>Penicillium sp. 102</i>	9,7±0,3
18	<i>Penicillium sp. 103</i>	7,3±0,2
19	<i>Penicillium sp. 104</i>	10,0±0,5
20	<i>Penicillium sp. 106</i>	7,3±-.2
21	<i>Penicillium sp. 109</i>	5,7±0,2
22	<i>Penicillium sp. 110</i>	1,8±0,2

În rezultatul cercetărilor efectuate s-a stabilit că din cele 22 tulpini testate la 4 tulpini activitatea catalazei nu a fost depistată, la 2 tulpini activitatea catalazei a fost semnificativă (*Penicillium sp. 11* - 231,1 U/ml și *Penicillium sp. 19* - 116,6U/ml), de asemenea s-a evidențiat și tulpina *Penicillium sp. 62*, la care activitatea catalazei a constituit 28,8 U/ml. La restul tulpinilor, luate în studio, activitatea catalaze în lichidul cultural a variat în limitele 1,7 - 21,6 U/ml.

Deci, lichidul cultural al tulpinilor *Penicillium sp. 11*, *Penicillium sp. 19* și *Penicillium sp. 62* ar putea fi utilizat în scopul anihilării radicalilor liberi ce se formează în organismele vii.

De asemenea putem constata că, tulpinile ce posedă proprietăți semnificative antibacteriene (*Penicillium sp. 91*) sau antifungice (*Penicillium sp. 97*) nu au manifestat activitate catalazică în lichidul cultural.

Astfel, reieșind din rezultatul cercetărilor obținute în cele două screeninguri efectuate după criteriul proprietăților antimicrobiene, cât și activității catalazei pentru cercetările ulterioare au fost selectate tulpinile: *Penicillium sp. 11*; *Penicillium sp. 19*; *Penicillium sp. 62* ce au

manifestat o activitate catalazită semnificativă, totodată tulpinile *Penicillium sp.* 11 și *Penicillium sp.* 62 manifestă și activitate antimicrobiană semnificativă.

Tulpinile *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97 ar putea prezenta interes în profilaxia și combaterea patogenului *Paenibacillus larvae*, totodată tulpina *Penicillium sp.* 97 poate fi utilizată și în profilaxia și combarerea aspergilozei (*Aspergillus niger*, și *Aspergillus flavus*).

Astfel, în continuare au fost selectate mediile de cultură agarizate pentru tulpinile *Penicillium sp.* 11; *Penicillium sp.* 19; *Penicillium sp.* 62, *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97, pentru a obține creșterea cea mai bună și o sporulare abundentă, cea ce ar permite obținerea optimă a substanțelor bioactive, precum catalază și produse cu activitate antimicrobiană.





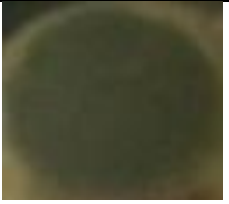


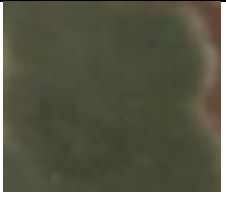






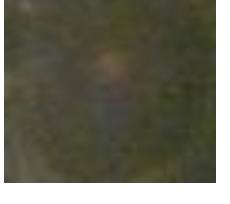

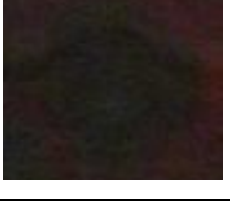


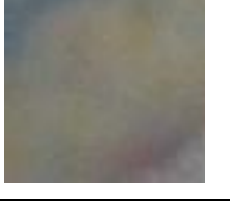
### **3.3. Selectarea mediilor de cultură a micromicetelor cu potențial enzimatic și antimicrobian semnificativ.**

Microorganismele utilizează diferite substanțe chimice din mediul de cultură, fie ca sursă de energie, fie ca material de construcție pentru creștere și multiplicare, producând modificări ale mediului inițial (dispariția unor substanțe din mediu, apariția unor produși noi, modificări de pH, producere de gaze etc.). Aceste modificări reflectă natura echipamentului enzimatic și deci, indirect particularitățile genetice ale microorganismelor respective. Mediile sintetice au o compoziție chimică definită și nu conțin nici un factor de creștere. Ele prezintă un avantaj major pentru studiile de determinare a capacității și a ratei de metabolizare a unui compus chimic al mediului, deoarece diferitele sale componente, în proporție bine determinată se pot doza cu precizie după dezvoltarea culturii. Diferența de concentrație semnifică gradul de utilizare a substanței respective. Aceste medii oferă posibilitatea de a izola și reproduce creșterea culturilor în condiții de laborator. Componenta mediilor sintetice se stabilește în dependență de capacitățile biosintetice și necesitățile culturilor care vor fi cultivate. De asemenea se ține cont și de capacitățile biosintetice specifice a microorganismelor, unele pot utiliza în calitate de sursă de azot sau carbot numai anumite substanțe chimice, fără de care cultivarea lor în condiții de laborator nu este posibilă. De aceea nu există o rețetă de mediu care să răspundă necesităților nutritive ale tuturor microorganismelor cultivate. Mediile uzuale constituie suportul nutritiv pentru un mare număr de microorganisme. Pentru izolarea și cultivarea micromicetelor sunt utilizate mai multe medii nutritive, care permit creșterea majorității micromicetelor, dintre care: Malț-agar; Czapek; Sabouraud Glucose Agar ; Amidono amoniacal; mediul Waksman ș.a. [2, 66, 87, 99, 107, 158, 159].

Peptonele din *Sabouraud Glucose Agar* sunt o sursă de factori care susțin creșterea azotică. Glucoza utilizată în mediile nutritive asigură o sursă de energie pentru creșterea microorganismelor. Concentrația ridicată de glucoză asigură un avantaj pentru creșterea micromicetelor (stabile din punct de vedere osmotic), în timp ce majoritatea bacteriilor nu

tolerează concentrația ridicată de zahăr. În plus, valoarea redusă a pH-ului din mediile menționate este optimă pentru micromicete, dar nu și pentru multe bacterii [107]. Conform datelor științifice mediul nutritiv joacă un rol important în creșterea și dezvoltarea micromicetelor și poate modifica proprietățile morfo-culturale și biosintetice ale culturii [85, 94, 166, 180].

Reieșind din cele menționate pentru selectarea mediului optim de cultură a tulpinilor selectate, ce posedă activitate antimicrobiană sau enzimatică, acestea au fost cultivate pe 4 medii nutritive: *malț-agar*; *Czapek*; *Sabouraud*, *amidono-amoniacal*. Examinarea și caracteristica particularităților morfo-culturale a tulpinilor s-a efectuat după 4, 7 și 14 zile de cultivare. Aspectul coloniilor tulpinii *Penicillium sp. 62* și descrierea lor sunt descrise în Fig.3.13, Tab. 3.3.

Durata de cultivare	Mediul de cultură			
	Malț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
4 zile				
7 zile (față)				
7 zile (revers)				
14 zile (față)				
14 zile (revers)				

**Fig. 3.13. Aspectul coloniilor tulpinii *Penicillium sp. 62* cultivate pe mediile de cultură: *malț-agar*, *Czapek*, *Sabouraud*, *amidono-amoniacal*.**



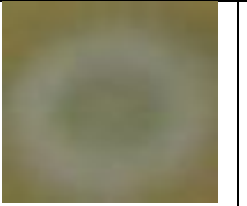
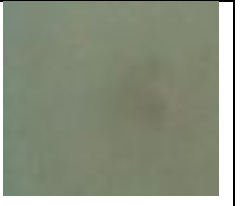

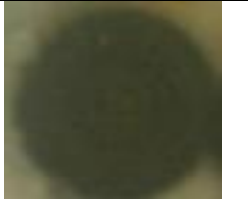
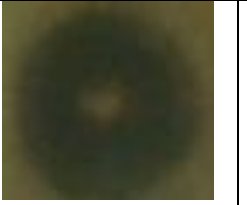
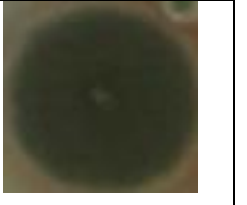
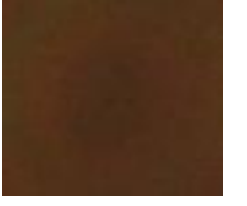



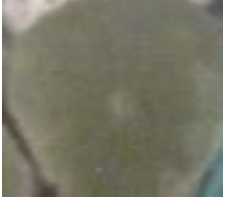

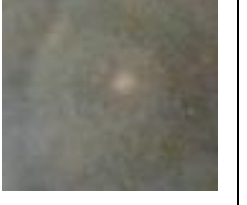


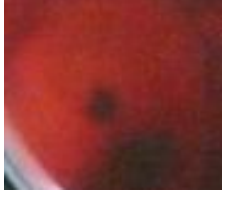


**Tabelul 3.3. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii *P.sp. 62* cultivată pe diferite medii nutritive în dependență de durata de cultivare.**

Durata de cultivare (zile)	Mediul agarizat			
	Malț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
<b>4</b>	Diametrul coloniei - 1,4-1,5cm. Culoarea inițial albă, apoi verde-albăstrie. Forma neregulată, profilul umbonat, marginea ondulată. Cu o bordură albă de 3mm. Reversul – cafeniu deschis.	Diametrul coloniilor 0,4 cm. Culoarea verde-albăstrie. Forma neregulată. Profilul umbonat, marginea ondulată. Bordură albă de 2mm. Reversul verzui.	Diametrul coloniei 1,1-1,3 cm, culoarea verde gălbuie, rugoasă. Forma neregulată, umbonată, cu o bordură albă de 4-5mm. Reversul gălbui.	Diametrul coloniei - 1,0 cm. Culoarea coloniei gălben-verde, neregulată, rugoasă. Profilul convex. Bordură albă cu d- 2mm. Reversul cărămiziu cu nuanțe de roz.
<b>7</b>	Diametrul coloniei - 3,0-3,5cm. Culoarea verde întunecat. Spori verzi. Forma rotundă, profilul plat, marginea întreagă cu o bordură albă de 2mm. Reversul cafeniu deschis.	Diametrul coloniei – 2,3-2,5 cm. Culoarea verde întunecat, rugoasă, forma neregulată, profilul plat, marginea ondulată. Bordură albă de 2mm. Reversul cafeniu-vișiniu.	Diametrul coloniei 2,3-2,5 cm, verde întunecată, în centru galbenă, rugoasă, umbonată, foarte sporulentă, neregulată. Bordură albă de 2 mm, pufoasă. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei- 2,4-2,5cm, culoarea verde închis, foarte sporulente, miceliul catifelat, forma neregulată, profilul plat. Marginea ondulată, pufoasă. Reversul roz, spre centru verzui.
<b>14</b>	Diametrul coloniei – 3,5 - 4,0 cm, culoarea verde închis. Foarte pufoase și sporulente. Colonii rotunde, plate, bordură albă de 2mm. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei – 2,5-3,0 cm, verde închis, rugoasă, neregulată, plată, foarte sporulentă. Marginea ondulată, bordură galbenă de 1mm. Reversul roșu-vișiniu. Colorează mediul în roșu.	Diametrul coloniei 2,5 cm, verde întunecat, rugoasă, neregulată sporulentă. Marginea ondulată, foarte sporulentă. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei 2,5cm, culoarea verde închis, foarte sporulentă, forma neregulată, profilul plat, marginea ondulată. Reversul roz cu nuanțe de verde, mai intens spre centru.

Confor descrierii particularităților morfo culturale ale tulpinii *Penicillium* sp. 62 prezentate în Tabelul 3.3, Figura 3.13, tulpina crește bine pe toate 4 medii agarizate testate: Malț-



agar; Czapek; Sabouraud și amidono-amoniacal. Diametrul coloniilor tulpinii testate pe mediul malț-agar după 14 zile de cultivare este de 4 cm, pe mediul Czapek de 3 cm, iar pe mediile Sabouraud și Amidono-amoniacal de 2,5 cm. Pe primele 2 medii și sporularea tulpinii este mai intensă. Aspectul coloniilor tulpinii *Penicillium sp. 97* cultivată pe mediile agarizate malț-agar, Czapek, Sabouraud și amidono-amoniacal sunt prezentate în Fig. 3.14, iar descrierea acestora este prezentată în Tab. 3.4.

Durata de cultivare	Mediul de cultură			
	Malț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
4 zile				
7 zile (față)				
7 zile (revers)				
14 zile (față)				
14 zile (revers)				

**Figura 3.14. Aspectul coloniilor tulpinii *Penicillium sp. 97* cultivate pe diferite medii de cultură (Malț-agar, Czapek, Sabouraud, amidono-amoniacal) .**



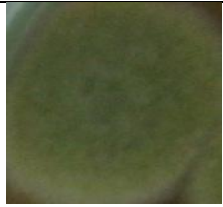













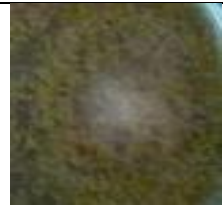



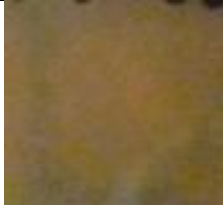
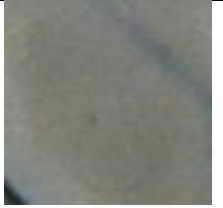
**Tabelul 3.4. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii *Penicilliu sp. 97* cultivată pe diferite medii în dependență de durata de cultivare.**

Durata de cultivare (zile)	Mediul agarizat			
	Maț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
<b>4</b>	Diametrul coloniei - 1,7 - 1,8 cm. Culoarea verde-întunecată. Forma umbonată, profilul umbonat, marginea ondulată. Cu o bordură albă – gălbuie de 3mm. Reversul – cafeniu deschis.	Diametrul coloniilor 0,8-0,9 cm. Culoarea verde-închis spre centru galbenă. Forma neregulată. Profilul umbonat, marginea ondulată. Bordură albă de 2mm. Reversul verzui.	Diametrul coloniei 1,0-1,1cm, culoarea verde spre centru galben, catifelată, rugoasă, circulară, marginea întreagă, profilul puțin convex, bordură albă de 4-5mm. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei-0,2-0,3 cm. Culoarea albă, circulară, marginea întreagă, rugoasă. Profilul convex. Reversul cărămiziu
<b>7</b>	Diametrul coloniei - 2,5 - 3,2 cm. Culoarea verde întunecat, catifelată, forte sporulentă, spori verzi. Forma neregulată, profilul plat, marginea cu hife împleticite. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei – 2,3-2,5 cm. Culoarea verde întunecat, rugoasă, forma neregulată, profilul plat, marginea ondulată. Bordură gălbuie – 1mm. Reversul roșu. Colorează mediul agarizat în roșu.	Diametrul coloniei 2,0-2,5cm, culoarea verde întunecat, în centru galbenă, rugoasă, profil ușor convex, neregulată, sporulentă. Bordură albă 2mm, foarte pufoasă. Reversul cărămiziu cu nuanțe roz.	Diametrul coloniei - 2,0-2,5 cm, culoarea verde închis, foarte sporulentă, miceliul catifelat, forma circulară, marginea întreagă, profilul plat. Reversul roz, spre centru mai întunecat.
<b>14</b>	Diametrul coloniei – 3,5 - 4,0 cm, culoarea verde închis, catifelată, sporulentă, neregulată, plată, marginea dințată. Reversul cărămiziu spre centru cu roz.	Diametrul coloniei – 3,0-4,0 cm, culoarea verde întunecat, catifelată, neregulată, plată, sporulentă. Marginea ondulată. Reversul roșu vișiniu. Colorează mediul agarizat în roșu.	Diametrul coloniei 2,5 3,0cm, culoarea verde întunecat, rugoasă, neregulată sporulentă. Marginea ondulată. Profilul ușor convex. Reversul cărămiziu, alocuri roz.	Diametrul coloniei 2,5-3,0 cm, verde închis, foarte sporulentă, circulară, plată catifelată, marginea întreagă. Reversul roz. Colorează mediul în roz.

Conform datelor prezentate în Fig. 3.14 și Tab. 3.4 tulpina *Penicillium sp. 97* crește și se dezvoltă bine pe toate 4 medii de cultivare testate. Mediile maț-agar și Czapek însă, pentru această tulpină, sunt mai prielnice pentru cultivare, deoarece crește și sporulează mai repede. Pe

aceste medii a fost înregistrat și diametrul maximal al coloniilor de 3,5 - 4,0 cm, cât și o sporulare mai intensă.

Tulpina *Penicillium sp.* 91 cultivată pe mediile de cultură menționate a demonstrat de asemenea că cea mai reușită variantă este cultivarea tulpinii pe mediul malț-agar. Colonile tulpinii *Penicillium sp.*91, cultivată pe diferite mediile agarizate sunt prezentare în Fig. 3.15, iar descrierea acestora în tab. 3.5.

Durata de cultivare	Mediul de cultură			
	Malț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
4 zile de cultivare				
7 zile (față)				
7 zile (revers)				
14 zile (față)				
14 zile (revers)				

**Fig. 3.15. Aspectul coloniilor tulpinii *Penicillium sp.* 91 cultivate pe diferite medii agarizate: Malț-agar; Czapek; Sabouraud; Amidono-amoniacal.**

În tab. 3.5 sunt descrise modificările particularităților morfo-culturale ale tulpinii *Penicillium sp.* 91, pe mediile malț-agar, Czapek, Sabouraud, Amidono-amoniacal ce au fost cultivate timp de 14 zile.

**Tabelul 3.5. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii *Penicillium sp. 91*, cultivată pe diferite medii, în dependență de durata de cultivare.**

Durata de cultivare (zile)	Mediul agarizat			
	Maț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
<b>4</b>	Diametrul coloniei - 3,5 - 4,5 cm. Culoarea verde-gălbui, forma și marginea rizoidă, foarte sporulentă și rugoasă, profilul convex. Cu o bordură albă de 4-5mm. Margine cu spori. Reversul – cărămiziu.	Diametrul coloniilor 2,5 cm. Culoarea galbenă, la mijloc albă, foarte pufoasă și sporulentă. Forma rizoidală. Profilul ombilicat, marginea rizoidă foarte sporulentă. Bordură albă de 5mm. Reversul transparent.	Diametrul coloniei 3,0-3,5 cm, culoarea verde albicioasă, rugoasă, cu spori verzi, forma și marginea rizoidală, profilul convex. Marginea albă cu spori verzi. Reversul galben deschis.	Diametrul coloniei-2,0-2,5 cm, culoarea verde intens, spori galbeni, neregulată, rugoasă. Profilul convex. Bordură albă cu d - 5 mm. Marginea dințată Reversul verzui.
<b>7</b>	Diametrul coloniei – 4,3 - 5,0 cm. Culoarea verde deschis cu nuanțe gălbui, rugoasă, forma și marginea rizoidală, profilul convex. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei – 2,5-3,0 cm. Culoarea galben verzui, foarte rugoasă, forma și marginea rizoidă, profilul ombilicat, foarte sporulentă. Reversul transparent cu nuanțe verzui.	Diametrul coloniei 4,5-5,0cm, culoarea verde cu hife albe în centru, spori verzi, rugoasă, forma și marginea rizoidă, convexă, în centru sporii lipsesc. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei-4,0-5,0cm, culoarea verde gălbui, foarte sporulent, sporii repartizați uniform, netedă, catifelată, forma neregulată, profilul umbonat, marginea dințată. Reversul verde suriu.
<b>14</b>	Diametrul coloniei – 5,0 - 6,0 cm, culoarea verde deschis, rugoase și foarte sporulente, forma și marginea rizoidală, profilul convex. Reversul cărămiziu închis.	Diametrul 2,8 -3,2 cm, culoarea galben-verde, foarte rugoasă, profilul convex, forma și marginea rizoidă, foarte sporulentă. Reversul cărămiziu cu nuanțe de roz și o bordură roză.	Diametrul 5,0–5,5 cm, rugoasă, culoarea verde, la mijloc hife albe fără spori, sporii verzi, forma neregulat, marginea rizoidă foarte sporulentă. Reversul cărămiziu.	Diametrul coloniei 5,0 cm, culoarea verde închis, foarte sporulentă, catifelată, forma neregulată, profilul umbonat, marginea dințată. Reversul verde-suriu.

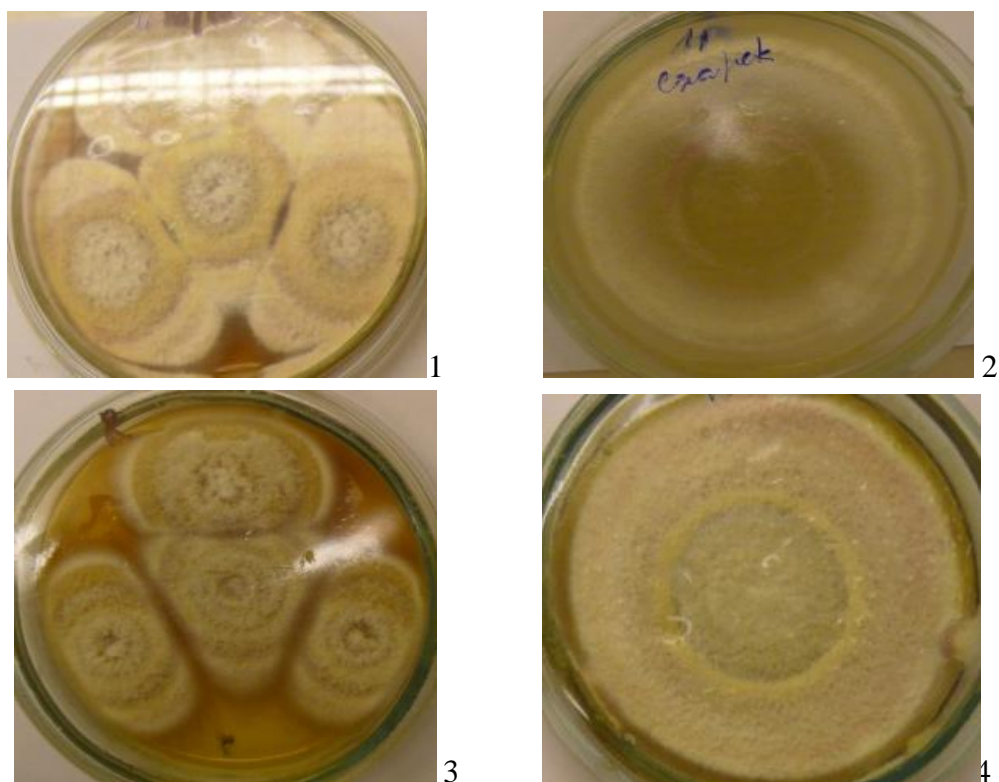
*Penicillium sp. 91* crește și se dezvoltă bine pe toate mediile testate. Mediul optim însă, pentru cultivarea micromicetei *Penicillium sp. 91*, conform diametrului coloniilor (5,5 - 6,0 cm)

și gradului de sporulare (foarte sporulente), este mediul malț-agar. Pe acest mediu tulpina dată se dezvoltă mai repede și mai bine, pe când pe mediul amidono-amoniacal creșterea și dezvoltarea tulpinii este mai lentă.

În rezultatul cultivării tulpinii *Penicillium sp. 11* pe diferite medii de cultură s-a demonstrat că, cea mai reușită variantă este cultivarea tulpinii pe mediul malț-agar (Figura 3.16).

Pe parcursul a 14 zile de cultivare pe mediul malț-agar tulpina *Penicillium sp. 11* își modifică culoarea, forma, sporularea, reversul. Astfel, în final tulpina formează colonii de 4,0– 5,0 cm, bombate, hifele împleticite spongios, sporularea foarte intensă, marginea netedă. Măciuliile conidiale abundente, conglomerate, galben-verzi. Culoarea coloniilor la început galben - verde, oranj sau albă în centru roză, apoi verde-cărămiziu cu nuanțe de roz, marginea galbenă sau incoloră (0,5cm). Reversul de culoare castanie sau cărămizie. Sporii rotunzi cu marginea netedă. Miros tipic de mucegai.

Pe mediul Czapek coloniile sunt bombate la mijloc, împleticite spongios, culoarea verde-surie, galbenă cu nuanțe roze. Treptat culoarea se schimbă în verde-cărămiziu la centru cu nuanță violet - brun. Marginea galben-deschis, apoi incoloră (0,3 cm). Măciuliile conidiale de culoare verde. Sporii rotunzi cu marginea netedă. Reversul de culoare cărămizie sau galben-brun. Miros tipic de mucegai.

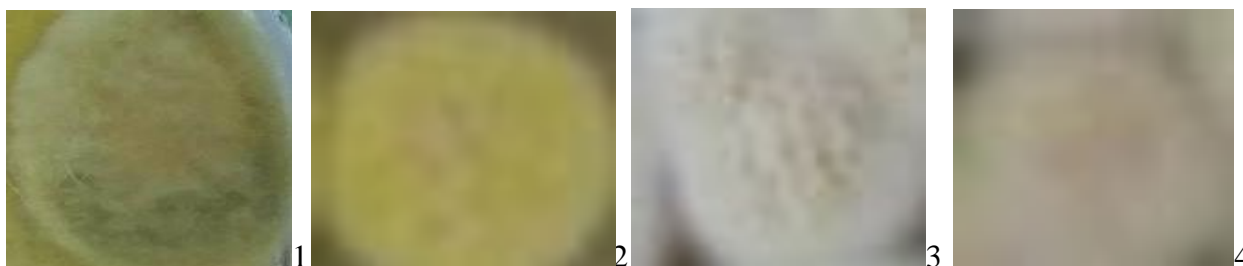


**Fig. 3.16** Colonii ale tulpinii *Penicillium sp. 11* după 14 zile de cultivare pe diferite medii de cultură (1- malț-agar; 2 – Czapek; 3 – Sabouraud; 4 – amidono-amoniacal).

Pe mediul Sabouraud tulpina crește bine, formează colonii mari de 3 - 4 cm, culoarea inițial albă apoi cărămizie cu nuanțe verzi, la mijloc miceliul mai dezvoltat, marginea netedă cu o bordură gălbuie sau cărămizie de 3-5mm, reversul cărămiziu. Miros tipic de mucegai. Sporii rotunzi netezi sau rugoși de culoare verzuie.

La tulpina *Penicillium sp.* 19 cultivată pe mediile agarizate luate în studiu a demonstrat o creștere abundentă pe toate cele 4 medii testate (Fig 3.17).

Pe mediul malț-agar tulpina formează colonii cu diametrul de 2,5 - 3,5 cm, culoarea galbenă la mijloc galben-verzuie. Coloniile inițial sunt de culoare albă, apoi la mijloc apare culoarea galbenă treptat devine verzuie, reversul inițial oranj treptat devine cafeniu-orangat, marginea regulată, foarte pufoase și sporulente. Exudația abundentă, culoarea picăturilor oranj.



**Figura 3.17. Aspectul coloniilor tulpinii *Penicillium sp.* 19 , după 7 zile de cultivare pe diferite medii de cultură (1 malț-agar, 2 – Czapek, 3 – Sabouraud, 4 – amidono-amoniacal).**

Conidioforii formează un mănunchi compact, au mărimea de 25-50 x 2,5-35 mcm, pereți netezi. Penele sunt tipic biverticilate și simetrice, alcătuite din 10-12 metule cu mărimea de 10-12 x 1,8-2,2 mcm, cu 7-9 sterigme (12-15 x 1,5-2,2 mcm), ascuțite la vârf. Conidiile sferice (2,5-3,0 mcm) sau elipsoidale (2,0-3,0 x 2,0-2,8 mcm), netede, de culoare verde închis ce formează lanțuri lungi.

Cultivată pe mediul mediu Czapek tulpina *Penicillium sp.* 19 formează colonii cu diametrul de 1,5-2,5 cm. Inițial culoarea este albă, apoi galbenă cu nuanțe verzui, forma regulată foarte pufoase, sporulente. Exudația în ambundență, culoarea picăturilor galbenă. Conidioforii au pereți netezi, mărime de 25-50 x 2,5-35 mcm. Conidiile sferice sau elipsoidale cu suprafața netedă, culoarea verde, mărimea 2,5-3.0 mcm, formează lanțuri lungi. Riversul de culoare oranj-cărămiziu. Mediul Sabouraud de asemenea este benefic pentru cultivarea tulpinii *Penicillium sp.* 19. Pe acest mediu coloniile au culoarea inițial galben deschis, apoi verde gălbuie, rotunde, bombate, cu marginea netedă, reversul cărămiziu. Exudația lipsește sau apar picături mici de culoare galbenă. Conidiile sferice sau elipsoidale (2-3 mcm), culoarea verde, marginea netedă sau rugoasă.

În rezultatul cercetărilor efectuate s-a demonstrat că, tulpinile *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62, *Penicillium sp.* 91, *Penicillium sp.* 97 cresc bine pe toate mediile nutritive testate (malț-agar, Czapek, Sabouraud și amidono-amoniacal), însă cea mai

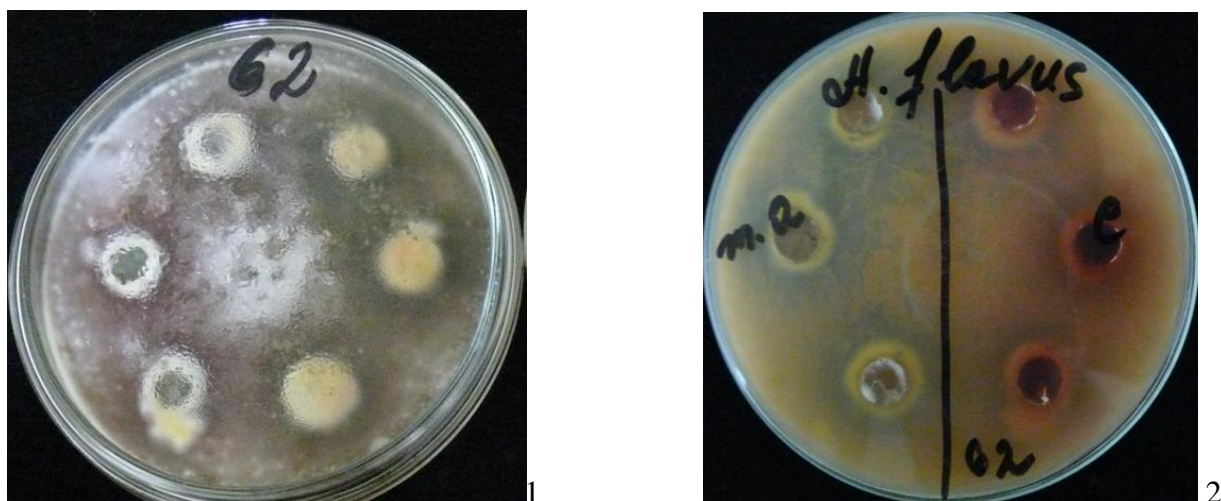
bună creștere la toate tulpinile studiate a fost înregistrată pe mediul malț-agar. Pe acest mediu, la toate tulpinile studiate, miceliul aerian a fost mai bine dezvoltat și sporularea mai intensă, comparativ cu restul mediilor testate. De asemenea o creștere semnificativă au înregistrat tulpinile și pe mediul Czapek. Astfel, pentru a evalua activitatea lor antimicrobiană în dependență de mediul de cultură, tulpinile menționate au fost cultivate pe mediul malț-agar și Czapek. Rezultatele sunt prezentate în Tab. 3.6.

**Tabelul 3.6 Activitatea antimicrobiană a tulpinilor de micromicete în dependență de mediul de cultură**

№ d/o	Tulpinile testate	Mediul de cultură	Diametrul zonei de inhibiție a test-culturilor (mm)			
			<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Melissococcus plutonius</i>
1	<i>Penicillium</i> sp. 11	Malț-agar	15,5 ± 2,5	0	0	0
		Czapek	14,0 ± 1,5	0	0	0
2	<i>Penicillium</i> sp. 19	Malț-agar	0	0	0	0
		Czapek	0	0	0	0
3	<i>Penicillium</i> sp. 62	Malț-agar	<b>29,0 ± 2,5</b>	28,5 ± 1,5	15,5 ± 2,0	16,0 ± 1,5
		Czapek	<b>25,5 ± 1,5</b>	26,8 ± 1,8	14,5 ± 1,0	15,0 ± 1,0
4	<i>Penicillium</i> sp. 91	Malț-agar			23,5 ± 1,5	24,0 ± 1,5
		Czapek			22,0 ± 1,6	22,0 ± 2,0
5	<i>Penicillium</i> sp. 97	Malț-agar	<b>33,5 ± 2,5</b>	<b>15,5 ± 2,0</b>	15,0 ± 1,0	15,0 ± 2,0
		Czapek	<b>28,0 ± 2,0</b>	<b>14,5 ± 1,5</b>	12,5 ± 1,5	13,5 ± 2,0

Rezultatele obținute au demonstrat că, la toate tulpinile studiate, cultivate pe mediul de cultură malț-agar activitatea antimicrobiană a fost mai mare comparativ cu mediul Czapek. Astfel, la cultivarea tulpinii *Penicillium* sp. 62 pe mediul malț-agar zona de inhibiție a patogenului *Aspergillus flavus* este de 29 mm, iar în rezultatul cultivării pe mediul Czapek de 25,5 mm (Fig. ). De asemenea sensibilitatea față de patogenii *Aspergillus niger*, *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius* este mai pronunțată la cultivarea tulpinii pe mediul malț-agar, comparativ cu mediul Czapek (Tab. 3.6, Fig. 3. 18). Diametrul zonei de inhibiție a patogenului *A. niger* sub acțiunea exometaboliților tulpinii cultivate pe mediul malț-agar constituie 25 mm comparativ cu 26,8 mm pe mediul Czapek. Totodată s-a constatat că, față de patogenul *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius* diametrul zonei de inhibiție, la utilizarea tulpinii cultivate pe mediul malț-agar este de 15,5 – 16,0 mm, iar la utilizarea tulpinii cultivate pe mediul Czapek de 14,5 -15,0 mm.





**Fig. 3.18. Acțiunea exometaboliților tulpinii *Penicillium sp.* 62 asupra patogenului *Aspergillus flavus* în dependență de mediul de cultivare (dreapta – Malț-agar, stînga – Czapek), 1-față, 2 – revers**

Activitatea antimicrobiană a tulpinii *Penicillium sp.* 97, de asemenea, a fost mai înaltă la cultivarea pe mediul malț-agar, comparativ cu mediul Czapek. În rezultatul acțiunii exometaboliților tulpinii *Penicillium sp.* 97, obținute la cultivarea pe mediul Czapek, diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenului *Aspergillus flavus* a constituit 28 mm, iar în rezultatul cultivării tulpinii pe mediul malț-agar diametrul zonei de inhibiție a patogenului menționat a variat în limitele 33,5 mm (Tab. 3.6, Fig. 3.19)

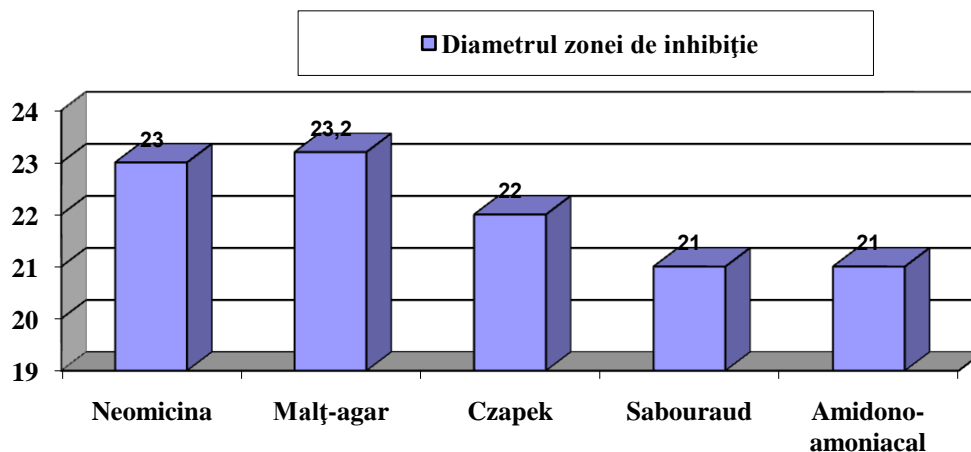


**Figura 3.19. Acțiunea exometaboliților tulpinilor de micromicete asupra patogenului *Aspergillus flavus* în dependență de mediul de cultivare (dreapta – Malț-agar, stînga – Czapek), 1-față, 2 - revers**

Anterior a fost demonstrat că, tulpina *Penicillium sp.* 91 manifestă sensibilitate numai față de bacteriile patogene: *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al locii americane și *Melissococcus plutonius*, agentul patogen al locii europene.

Conform rezultatelor prezentate în Tab. 3.6 activitatea antimicrobiană a micromicetelor depinde direct de mediul de cultivare și dezvoltare a tulpinii testate.

Rezultatele testării activității antibacteriene a tulpinilor *Penicillium sp.* 91, cultivate pe diferite medii nutritive, față de patogenul *Paenibacillus larvae*, sunt prezentate în Figura 3.20



**Fig. 3.20. Activitatea anibacteriană a tulpinii *Penicillium sp.* 91 față de *Paenibacillus larvae* în dependență de mediul de cultivare.**

Diametrul maximal al zonei de inhibiție a patogenului testat a fost înregistrat la utilizarea tulpinii cultivată pe mediul malt-agar și constituie 23,2 mm față de 23,0 mm obținută de către antibioticul neomicina (23mm) ce a servit ca martor. Zona de inhibiție a patogenului la testarea tulpinii *Penicillium sp.* 91 cultivată pe mediul Czapek constituie 22 mm, ce nu diferă substanțial de martor. Cultivarea tulpinii pe mediile Sabouraud, sau amidono-amoniacal a demonstrat o activitate antibacteriană mai slabă, zona de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* fiind de 21,0 mm, față de 23,0 mm, obținută în varianta martor. Astfel, putem constata că, mediul optim pentru cultivarea tulpinii *Penicillium sp.* 91, în scopul obținerii activității antibacteriene maximale, este mediul malt-agar.

În cazul cercetărilor noastre tulpina *Penicillium sp.* 11 a manifestat o sensibilitate nesemnificativă față de patogenul *Aspergillus flavus*, zona de inhibiție, la cultivarea pe mediul malt-agar, constituind 15,5 mm, iat pe mediul Czapek – 14,0mm.

În rezultatul studiului efectuat putem concluziona că, mediul de cultură optim pentru tulpinile *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62, *Penicillium sp.* 91, *Penicillium sp.* 97 este *malt-agar*. Pe acest mediu a fost observată cea mai bună creștere și cea mai intensă sporulare a tulpinilor menționate. Totodată tulpinile cultivate pe acest mediu au manifestat o activitate antimicrobiană mai înaltă față de restul mediilor de cultură testate. Astfel, pentru cercetările ulterioare tulpinile menționate au fost cultivate pe mediul malt-agar [22, 23, 24].



### **3.4. Tehnici de obținere a produselor din micromicete și utilizarea lor ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă, fungicidă și antioxidantă**

**Micromicetele (mușegaiurile)** sunt microorganisme de tip eucariot, monocelulare sau pluricelulare, diferențiate din punct de vedere morfologic și care se reproduc prin spori formați numai pe cale asexuată sau pe cale mixtă (asexuată și sexuată). Acestea sunt o sursă inepuizabilă de potențiali producători de principii bioactive pentru biotehnologie și microbiologie. Un rol important le revine micromicetelor în producerea enzimelor, care sunt utilizate în diverse domenii: diagnostic clinică, industria alimentară, industria chimică, farmacologie, textilă, agricultură, epurarea apelor reziduale, etc. [121, 166, 174, 176].

Biosinteza enzimatică a microorganismelor este influențată atât de componența mediului nutritiv, cât și de alți factori fizici și chimici, astfel încât productivitatea produsului preconizat să fie maximală. Determinarea și aplicarea valorilor optime ale acestor factori permite nu doar intensificarea biosintezei, creșterea randamentului și activității enzimatică, dar face posibilă și programarea compoziției componentelor enzimatică în concordanță cu destinația lor, elaborarea procedurilor efective de realizare a proceselor biotehnologice [134, 135].

Mediile de cultură sunt un amestec de săruri și diverse substanțe de origine organică, care susțin creșterea și metabolismul microorganismelor în condiții de laborator, dar și industrial. Ca resurse potențiale pentru biotehnologia microbiologică pot servi orice compuși organici, care pot fi adaptați la cerințele specifice ale diferitelor tipuri de microorganisme în dependență de scopul propus. Există tipuri diferite de medii de cultură, inclusiv: medii nutritive - conțin o varietate de nutrienți, cum ar fi carbohidrați, proteine și minerale, pentru a susține creșterea microorganismelor; medii selective - conțin substanțe specifice, care inhibă creșterea anumitor tipuri de microorganisme, permițând creșterea doar a anumitor tipuri de microorganisme; medii diferențiale - conțin substanțe, care permit distingerea diferitelor tipuri de microorganisme în funcție de caracteristicile lor de creștere; medii specifice de îmbogățire - conțin substanțe care stimulează creșterea anumitor tipuri de microorganisme [94, 158, 174].

Micromicetele (mușegaiurile) sunt microorganisme ușor adaptabile, deoarece au capacitatea de a forma enzime induse în funcție de natura substratului pe care se află. Sunt microorganisme mezofile, cu temperaturi optime de creștere la 25°C. Un număr restrâns sunt termofile, cele patogene având temperatura optimă la 37°C. Altele sunt adaptate la temperaturi scăzute (0 - 3°C). Microorganismele se dezvoltă într-un domeniu limitat de temperatură minimă și maximă. Dacă se depășește temperatura maximă cu câteva grade se produce moartea celulelor deoarece are loc denaturarea proteinelor din citoplasmă [162, 163, 169].

Tulpinile selectate pe baza activității antimicrobiene și a producției de enzime (*P.sp.11*, *P.sp.19*, *P.sp.62*, *P.sp.91* și *P.sp.97*) au fost cultivate submers pe medii nutritive optime, pentru a obține o cantitate semnificativă de principii bioactive.

Cultivarea s-a efectuat pe agitator cu agitație continuă de 180-200 r/min (Fig.3.21)



**Fig.3.21. Cultivarea submersă a culturilor de micromicete pe agitator și obținerea soluției de exometaboliți**

Studiul nostru și-a propus să identifice potențiali agenți de biocontrol împotriva fitopatogenilor majori *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae*, în condiții in vitro. Astfel, în rezultatul screeningul efectuat din 22 tulpini de micromicete din CNMN au fost selectate 2 tulpini: *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 97* cu potențial antimicrobian semnificativ.

Tulpinile *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 97*, care au demonstrat cea mai bună creștere pe mediul agarizat malț-agar au fost inoculate în mediul lichid malț de bere de 6B și cultivate în baloane Erlenmayer de 500 ml cu câte 100 ml mediu nutritiv, timp de 5 zile, la temperatura de 28-30<sup>0</sup>C, pe agitator cu 180-200 r/min. După cultivare separarea lichidului cultural de biomasă s-a efectuat prin filtrare. Activitatea antibacteriană a soluțiilor obținute a fost testată în laborator asupra patogenilor luați în studiu. Astfel, în godeuri de pe cutiile Petri cu patogeni a fost introdus câte 0,1 ml soluție de exometaboliți ai tulpinilor de *Penicillium*. Rezultatul obținut este prezentat în Tab. 3.7.

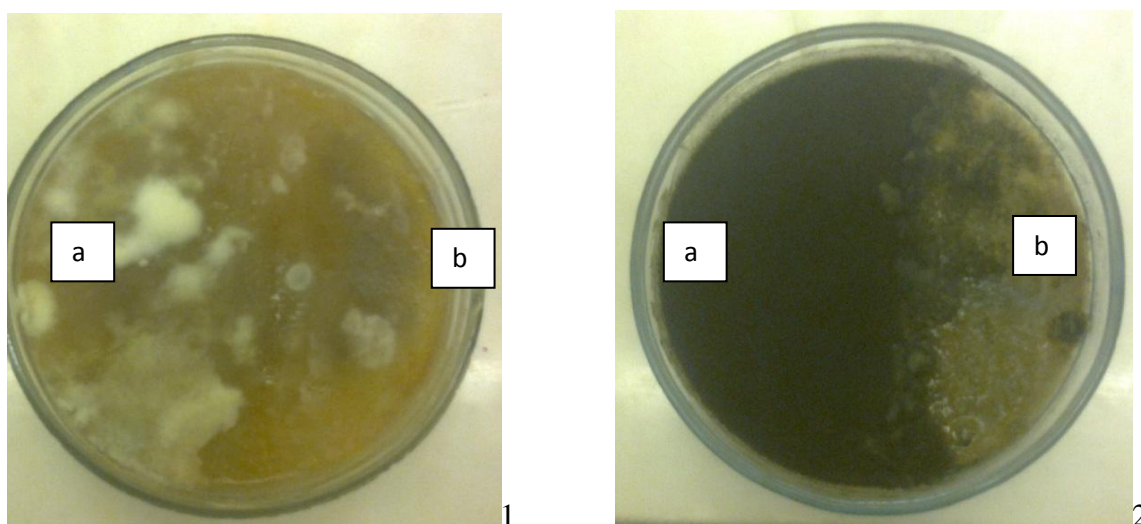
Rezultatele obținute au demonstrat că, cultivate în must de bere de 6B, exometaboliții culturilor *P.sp. 91* și *P.sp. 97*, manifestă o sensibilitate mai pronunțată față de patogenii testați, comparativ cu rezultatele obținute pe medii agarizate.

**Tabelul 3. 7 Diametrul zonelor de inhibiție a fitopatogenilor sub acțiunea exometaboliților tulpinilor *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 97***

№ d/o	Tulpinile testate	Diametrul zonei de inhibiție a test-culturilor (mm)		
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>
1	<i>Penicillium sp. 91</i>	0	0	<b>21,0 ± 1,2</b>
2	<i>Penicillium sp. 97</i>	<b>33,0 ± 2,5</b>	<b>18,0 ± 1,5</b>	16,0 ± 1,0

Rezultatele obținute au demonstrat că, cultivate în must de bere de 6B, exometaboliții culturilor *P.sp. 91* și *P.sp. 97*, manifestă o sensibilitate mai pronunțată față de patogenii testați, comparativ cu rezultatele obținute pe medii agarizate.

Pentru confirmarea acestor rezultate cutiile Petri în care au fost însămânțați patogenii *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger* au fost stropite cu soluție de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium sp. 97* pe jumătate de cutie. Rezultatul acestui test sunt prezentate în Fig. 3.21.



**Fig. 3.22. Acțiunea soluție de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium sp. 97* asupra patogenilor 1- *Aspergillus flavus* și 2 – *Aspergillus niger* (a) – martor (netratat), (b) – tratat cu soluție de exometaboliți) după 5 zile de cultivare.**

Din imaginile prezentate în Fig.3.22 se vede clar efectul exometaboliților tulpinii *Penicillium sp. 97* asupra patogenilor testați. În jumătatea cutii Petri cu patogeni ce a fost tratată cu soluție de exometaboliți creșterea patogenilor este suprimată sau complet inhibată.

Din rezultatele obținute putem concluziona că, tulpinile *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 97* pot fi considerate ca perspectivevi producători de substanțe bioactive cu acțiune antimicrobiană pentru prevenirea și combaterea, *Paenibacillus larvae*, agent patogen al locii americane și *Melissococcus plutonius*, agentul patogen al locii europene, totodată *Penicillium sp. 97* manifestă sensibilitate semnificativă și față de agenții patogeni ai aspergilozei (*A. niger* și *A.flavus*) la familiile de albine.

Conform datelor din literatura de specialitate, pentru profilaxia și combaterea *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al locii americane și *Melissococcus plutonius*, agentul

patogen al locii europene, pot fi utilizate aceleași preparate, deasemenea asupra acestor patogeni acționează ca inhibitor și bacteriile din genul *Bifidobacterium* ce se află în intestinul albinelor [17, 110].

Astfel, am putea presupune că, exometaboliții tulpinilor *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97 ar putea fi utilizați pentru profilaxia și combaterea, atât a tulpinii *Paenibacillus larvae*, agent patogen al locii americane, cât și asupra tulpinii *Melissococcus plutonius*, agentul patogen al locii europene.

Tulpinile selectate *Penicillium sp.* 11 și *Penicillium sp.* 19 sunt depozitate în CNMN ca perspectivi producători de catalază cu cifru *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 și respectiv *Penicillium piceum* CNMN FD 21.

Mediul optim pentru cultivarea submersă a tulpinii *P.sp.*11 (*Penicillium funiculosum* 11) are următoarea componență (%): glucoză - 4,0;  $\text{KNO}_3$  - 0,74;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 0,25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,005;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,005; extract de drojdii - 1,8, pH inițial - 6,6.

Tulpina *Penicillium funiculosum* 11 a fost cultivă în baloane Erlenmayer de 1 litru în care s-au introdus 200 ml mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180- 200 r.p.m) la temperatura de 28...30°C timp de 6 zile. După cultivare, lichidul cultural a fost separat de biomasă prin filtrare. În lichidul cultural a fost determinată activitatea catalazei. Activitatea catalazei tulpinii *Penicillium sp.* 11 pe mediul optim a constituit - 430U/ml.

Tulpina *P. sp.*19 (*Penicillium piceum*) a fost cultivă în baloane Erlenmayer de 1 litru în care se introduc 200 ml mediu nutritiv, în condiții de agitare continuă (180 - 200 r.p.m) la temperatura de 28...30°C timp de 5 zile.

Compoziția mediului nutritiv (%): glucoză - 4,0;  $\text{NaNO}_3$  - 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,005; extract de drojdii -1,5; Tween 20 - 2,0 mM/l; soluție de microelemente 1 ml (compoziția (%):  $\text{MnSO}_4 \cdot x 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,01;  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_4 \cdot x 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,01;  $\text{CuSO}_4$  - 0,01;  $\text{ZnSO}_4$  - 0,02;  $\text{CoCl}_2$  - 0,02); apă distilată până la 1 litru, pH inițial - 6,2. Separarea lichidului cultural de biomasă s-a efectuat prin filtrare.

Activitatea catalazei tulpinii *Penicillium piceum* CNMN FD 21 după 5 zile de cultivare a constituit 600 U/ml.

Tulpina *Penicillium sp.* 62 este depozitată în CNMN cu cifru *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20, perspectiv producător de substanțe bioactive cu potențial antimicrobian.

Mediul optim pentru cultivarea submersă a acestei tulpini are următoare componență (g/l): glucoză - 30,0;  $\text{NaNO}_3$  -1,0;  $\text{CaCO}_3$  - 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0; extract de drojdii -10 ml; apă distilată până la 1 litru; pH inițial - 6,0 - 6,2. După cultivarea pe mediul menționat timp de 5 zile, la temperatura de 28-30°C, cu agitare continuă, lichidul cultural a fost separat de biomasă prin filtrare. Activitatea catalazei a constituit 55,2 U/ml

Activitatea semnificativă a catalazei și activitatea antibacteriană a tulpinilor *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 19 și *Penicillium* sp. 62 au condus la presupunerea că, soluțiile de exometaboliți ai tulpinilor menționate ar putea proteja albinele de aspergiloză, totodată stimulând dezvoltarea acestora. Astfel, soluțiile de exometaboliți ai tulpinilor menționate au fost testate în stupine asupra familiilor de albine.

Soluțiile de exometaboliți obținute în rezultatul cultivării submerse a tulpinilor *Penicillium* sp. 11 (*Penicillium funiculosum* CNMN FD 11), *Penicillium* sp. 19 (*Penicillium piceum* CNMN FD 21) și *Penicillium* sp. 62 (*Penicillium corylophilum* CNMN FD 20) conțin spori viabili (celule formatatoare de colonii - CFC), ce ar putea dăuna organismelor vii (albinelor), nimerind în intestinul acestora. Pentru inactivarea CFC soluțiile de exometaboliți au fost supuse tratamentului termic.

Moartea, inactivarea celulelor microbiene, este dependentă de numeroși factori biologici corelați cu natura microorganismelor. Inactivarea termică este dependentă și de starea fiziologică a celulelor (cele tinere mor mai repede decât cele mature, deoarece conțin mai multă apă). Rezistența termică a micromicetelor (mucegaiurilor) sub formă de hife, sau spori, este mică, majoritatea sunt inactivate la temperaturi de 80°C, cei mai rezistenți spori sunt distruși la 88°C în 10 minute. Temperatura optimă de cultivare a micromicetelor variază în limitele 25-30°C. Depășirea cu 5-10°C a temperaturilor maxime de cultivare poate avea efect letal, deoarece aceasta determină inactivarea metabolismului microbial, ca urmare a denaturării și coagulării proteinelor [180].

Formele vegetative ale bacteriilor, drojdiilor și micromicetelor sunt inactivate dacă se menține timp de 10-30 min temperatura de 60 – 80°C. Ascosporii de drojdie și sporii de micromicete pot să reziste până la 80°C timp de 30 de minute.

Endosporii bacterieni (bacterii în forma sporulată) din genurile *Bacillus*, *Clostridium*, datorită structurii lor specifice și a conținutului scăzut de apă liberă, au rezistența mai mare la temperatura mai mare decât temperatura maximă ( $T > T_M$ ). Pentru inactivarea lor în mediu de vapori saturați (umed) e necesară o temperatură de 120°C, timp de 10-20 minute, iar în mediu uscat necesită temperatura de 160°C circa 2 ore, sau la 180°C circa 45 minute [180, 159].

Pentru inactivarea CFC (celule formatatoare de colonii) din soluțiile de exometaboliți, obținute în rezultatul cultivării submerse a tulpinilor selectate: *Penicillium* sp. 11; (*Penicillium funiculosum* CNMN FD 11), *Penicillium* sp. 19 (*Penicillium piceum* CNMN FD 21) și *Penicillium* sp. 62 (*Penicillium corylophilum* CNMN FD 20), au fost testate trei regimuri de temperatură (60°C, 70°C și 80°C) și 3 durate de tratament (20 min, 40 min, 60 min). După fiecare 20 minute a fost inoculat 1 ml soluție de exometaboliți pe cutii Petri pe mediul agarizat malț-

agar, pentru stabilirea prezenței CFC, de asemenea paralel a fost determinată activitatea catalazei. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tab. 3.8.

Reieșind din rezultatele prezentate în Tab.3.8 la temperatura de 60°C – 70°C lipsa CFC este după o ora de tratare, iar la temperatura de 80°C după 20 minute de tratare.

**Tabelul 3.8 Acțiunea temperaturii asupra CFC în dependență de durata de tratare**

Temperatura (°C)	Durata de tratare, min	Prezența CFC (celulelor formatatoare de colonii)		
		<i>Penicillium funiculosum</i> CNMN FD 11	<i>Penicillium piceum</i> CNMN FD 21	<i>Penicillium corylophilum</i> CNMN FD 20
60°C	20	Gazon	gazon	gazon
	40	multe CFC	multe CFC	multe CFC
	60	lipsa CFC	lipsa CFC	lipsa CFC
70°C	20	Multe	multe	multe
	40	Unice	unice	unice
	60	lipsa CFC	lipsa CFC	lipsa CFC
80°C	20	Unice	unice	unice
	40	lipsa CFC	lipsa CFC	lipsa CFC
	60	lipsa CFC	lipsa CFC	lipsa CFC

Pe parcursul tratării termice activitatea catalazei soluțiilor de exometaboliți s-a modificat semnificativ. Odată cu majorarea temperaturii și a duratei de tratare activitatea catalazei soluțiilor studiate s-a diminuat semnificativ (Tab. 3.9).

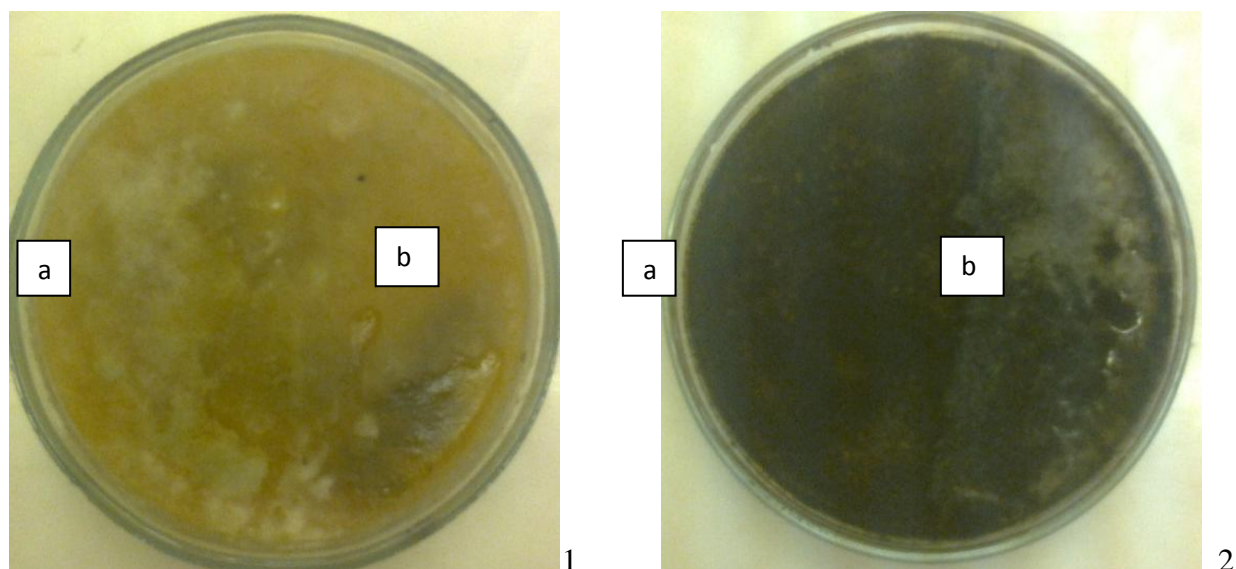
**Tabelul 3.9 Activitatea catalazei soluțiilor de exometaboliți în dependență de temperatura și durata de tratare**

Temperatura (°C)	Durata de tratare, min	Activitatea catalazei, U/ml		
		<i>Penicillium funiculosum</i> CNMN FD 11	<i>Penicillium piceum</i> CNMN FD 21	<i>Penicillium corylophilum</i> CNMN FD 20
60°C	20	430,0 ± 22,6	600,8±25,2	45,8±11,1
	40	403,3 ± 23,6	580,5±20,6	42,4±8,6
	60	393,3 ± 13,1	580,4±19,8	40,8± 8,5
70°C	20	380,5±22,6	580,8±20,3	35,2±6,3
	40	350,3±21,2	550,6±25,3	30,6±4,2
	60	300,8±17,5	500,6±28,3	28,5±2,5
80°C	20	350,4±21,4	396,3±15,7	25,5±2,5
	40	300±22,0	295,5±18,5	20,6±1,8
	60	250,5±16,7	203,8±14,2	10,2±1,0

Mai stabile au fost soluțiile de exometaboliți la tratarea timp de 1 oră la temperatura de 60°C. Activitatea catalazei la acest regim de tratare, în toate soluțiile, s-a diminuat nesemnificativ. Odată cu majorarea temperaturii și duratei de tratare activitatea catalazei diminuează semnificativ. Astfel, pentru obținerea soluțiilor de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11, *Penicillium piceum* CNMN FD 21, *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20 fără CFC este necesar de a trata soluțiile de exometaboliți, obținute în rezultaul cultivării tulpinilor în medii lichide, timp de 1 oră, la temperatura de 60°C.



S-a demonstrat că, tulpina *P.sp. 62* (*Penicillium corylophilum* CNMN FD 20) posedă proprietăți antifungice față de patogenii *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*. Reieșind din faptul că, soluțiile de exometaboliți fără CFC își diminuează din proprietățile biosintetice a fost evaluată acțiunea acestei asupra patogenilor în condiții de laborator. Cutiile Petri inoculate cu patogenii *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus* au fost tratate cu soluția de exometaboliți fără CFC ai tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20. Rezultatele sunt prezentate în Fig. 3.23



**Fig. 3.23. Acțiunea exometaboliților fără CFC ai tulpinii *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20 asupra fitopatogenilor prelevați din stupul de albi (1 – *A. flavus.*, 2 – *A.niger.* a – martor (netratat, b – tratat cu soluție de exometaboliți) după 5 zile de cultivare.**

Efectul soluției de exometaboliți fără CFC ai tulpinii *P. sp. 62* (*Penicillium corylophilum* CNMN FD 20) denotă faptul că, în rezultatul tratării termice soluția dată nu și-a pierdut proprietățile biosintetice, dar atât activitatea enzimatică, cât și antifungică este la un nivel înalt.

Conform rezultatelor prezentate în acest studiu putem concluziona că, pentru obținerea produselor din micromicete și utilizarea lor în biostimularea familiilor de albine este necesar de a cultiva tulpinile *Penicillium sp. 11*, *Penicillium sp. 19*, *Penicillium sp. 62* în medii nutritive optime, iar apoi de a trata soluțiile de exometaboliți obținuți timp de 1 oră, la temperatura de 60°C, pentru distrugerea (inactivarea) CFC.

Astfel, soluțiile de exometaboliți, fără CFC, ai tulpinii *Penicillium sp. 91* cu acțiune bactericidă, dar și ai tulpinii *Penicillium sp. 97*, cu acțiune bactericidă și fungicidă, ar putea fi administrate ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă pentru profilaxia stupinelor de albine, sau se pot combina cu alte metode de control al bolilor locale americane și locale europene la albine, atât toamna înainte de iarnă, cât și primăvara timpuriu.

### 3.5 Concluzii la Capitolul 3

1. Din probele prelevate din stupinile de albine au fost izolați și studiați patogenii: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae*.
2. Au fost selectate tulpinile de micromicete: *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62 cu potențial enzimatic semnificativ și tulpinile: *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97 cu proprietăți antimicrobiene față de patogenii familiilor de albine *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Melissococcus plutonius* și *Paenibacillus larvae*.
3. S-a stabilit că mediul optim de cultură pentru tulpinile selectate: *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62, *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97 este mal-agar, care permite o creștere și sporulare intensă.
4. Pentru obținerea produselor din micromicetele *Penicillium funiculosum* CNMN FD 11 (*Penicillium sp.* 11), *Penicillium piceum* CNMN FD 21 (*Penicillium sp.* 19) și *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.* 62), ce urmează a fi testate în stupine, tulpinile se cultivă submers, iar soluțiile de exometaboliți obținute ce tratează termic timp de 1 oră la temperatura de 60°C, pentru distrugerea CFC. În același mod se obțin soluțiile de exometaboliți fără CFC ai tulpinilor *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97, care pot fi utilizate ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă pentru profilaxia familiilor de albine, contra locii americane și locii europene, atât toamna, înainte de iernat, cât și primăvara timpuriu.



## **4. UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE ÎN SCOP DE PROFILAXIE A UNOR BACTERIOZE LA FAMILIILE DE ALBINE.**

### **4.1 Date cu referire la situația epidemiologică a bolilor infecțioase la albine în Republica Moldova.**

Ramura apicolă la nivel de republică are o dezvoltare moderată și cu o creștere treptată a numărului familiilor de albine. Creșterea numărului de familii de albine se datorează cerințelor tot mai mari de produse apicole la nivel național și internațional, precum și datorită investițiilor în domeniul apicol acordat de programele de dezvoltare din partea Uniunii Europene, cât și din partea Guvernului Republicii Moldova sub formă de subsidii.

Dezvoltarea continuă a sectorului apicol cu rezultate semnificative depinde de mulți factori intrinseci și extrinseci. Pe lângă asigurarea condițiilor de întreținere corespunzătoare, asigurarea cu cules, o importanță deosebită o are asigurarea unui vid sanitar benefic, precum și menținerea unei situații epidemiologice satisfăcătoare stabilă a stupinelor de albine. În acest scop, conform planului strategic național, sunt prevăzute acțiuni strategice de monitorizare a bolilor la familiile de albine. Pentru bunăstarea albinelor se atrage atenția la locurile de amplasare a stupinelor. Important este ca în stupină în permanentă să se asigure igiena, ordinea și curățenia. Amplasarea stupinelor să se facă în zone cu o floră bogată și diversificată, iar vetrele permanent vor fi uscate, protejate de vânt, cu expunere la soare în special pe perioada dimineților mai reci și umede – departe de livezi și/sau culturi ce sunt supuse unor tratamente fitosanitare regulate și cu o adăpătoare cu apă potabilă pentru a nu recolta apa contaminată din natură [71].

Prezintă importanță frecventă și corectitudinea inspectărilor sistematice a stupilor, iar în timpul monitorizărilor să se evite introducerea accidentală a unor germeni patogeni, precum și depistarea în fazele precoce a unor boli infecțioase, sau excluderea transmiterii unor germeni patogeni în stupină sau de la un stup la altul.

Cu regularitate se examinează ramele cu faguri din corpuri. Pentru o bună gestionare a stupurilor se recomandă ca în fiecare an să se înlocuiască aproximativ o pătrime, pînă la (30%) din fagurii unui stup, în special, cei proveniți de la ramele de corpuri (fagurii cei mai închiși la culoare). Prin înnoirea regulată a fagurilor se oferă dinamism coloniilor și semnificativ scade presiunea infecțioasă asupra acestora. De ținut cont, că fagurii brun închis spre negru nu se vor folosi în caturi.

Este cunoscut faptul că cele mai periculoase boli sînt considerate cele infecțioase, care pot fi introduse în stupină de către apicultori cu inventarul, cu hrana, hainele, sau de către insectele dăunătoare, albinele hoațe, precum și de către albinele lucrătoare în timpul culesului și contactul cu plantele și florile potențial contaminate de alte albine lucrătoare. Actualmente, la

nivel național sunt elaborate planuri de monitorizare și de contingență în situații de confirmare a bolilor infecțioase și parazitare la familiile de albine. Pentru menținerea situației epidemiologice favorabilă se recomandă controlul periodic pentru identificarea oricărei formă de boală.

Printre bolile albinelor care se supun declarării obligatorii se menționează: *Loca americană*, *Loca europeană*, *Nozemoza*, *Acarapioza*, *gândac de stup - Aethina tumida*, *varrooza* și *acarianul – Tropilaelaps*.

Conform rapoartelor oficiale anuale prezentate de către ANSA și din observațiile proprii se poate de menționat că, situația epidemiologică la familiile de albine din republică este variabilă de la an la an, cu incidența periodică a unor boli infecțioase de origine bacteriană precum: *Loca americană*, *Loca europeană*, *Ascosferoza*, *Aspergiloza*, *Salmoneloza*, iar din bolile de origine parazitare: *Varrooza*, *Nozemoza* și *Acarapidoza*.

Cercetările au fost efectuate în perioada 2013-2017. Analizând datele cu referire la bolile de origine bacteriană monitorizate la 5 stupine:

**Tabelul 4.1. Numărul de stupi la unitățile apicole monitorizate.**

Nr. stupinei	2013	2014	2015	2016	2017
	nr. de stupi	nr. de stupi	nr. de stupi	nr. de stupi	nr. de stupi
I	61	63	67	58	61
II	34	41	38	36	40
III	27	33	22	26	20
IV	36	32	35	29	34
V	38	34	36	28	30
<b>Total</b>	<b>196</b>	<b>203</b>	<b>178</b>	<b>177</b>	<b>185</b>

Pe parcursul perioadei de monitorizare a stării de sănătate a familiilor de albine (2013-2017) sub observație sau aflat 5 stupine cu un număr variabil de familii de albine de la 177 la 203, numărul cărora varia în dependență de condițiile climaterice, posibilitățile apicultorilor, precum și de starea de sănătate, sau starea de viabilitate după perioada de iernat.

În perioada menționată, periodic s-au prelevat probe de albine, de puiet, resturi din stupi după perioada de iernat, precum și probe din stupi în cazul unor suspiciuni de boli, în baza de mortalitate majorată la albinele adulte și la puiet. În Tab. 4.2 sunt prezentate unele din bolile supuse monitorizării și incidența cazurilor de boală în funcție de numărul familiilor de albine aflate sub supraveghere.

Conform datelor monitorizării situației epidemiologice investigațiile clinice și cercetările efectuate la familiile de albine se poate de menționat că incidența bolilor infecțioase au variații de la an la an. Din rezultatele tabelului 2 se menționează că pe parcursul perioadei anilor 2013 - 2017 la familiile de albine monitorizate au fost întâlnite boli infecțioase și parazitare.

**Tabelul 4.2 Incidența cazurilor de boli contagioase la stupinele de albine pe parcursul anilor 2013-2017.**

Denumirea bolii/nr. de cazuri	2013		2014		2015		2016		2017	
	nr. cazuri	%	nr. cazuri	%	nr. cazuri	%	nr. cazuri	%	nr. cazuri	%
<i>Loca americană</i>	8	4,08	9	4,43	7	3,93	5	2,82	6	3,24
<i>Loca europeană</i>	5	2,55	6	2,96	4	2,25	3	1,69	4	2,16
<i>Ascosferoza</i>	4	2,04	3	1,48	2	1,12	1	0,56	2	1,08
<i>Salmoneloza</i>	3	1,53	3	1,48	5	2,81	4	2,26	1	0,54
<i>Aspergiloza</i>	2	1,02	0	0,00	0	0,00	2	2,26	0	0,00
<i>Varooza</i>	16	8,16	18	8,87	13	7,30	15	8,47	9	4,86
<i>Nosemoza</i>	2	1,02	4	1,97	3	1,69	6	3,39	4	2,16

Făcând o analiză a rezultateelor din tabel, observăm că ce-a mai înaltă incidență dintre bolile înregistrate la puietul albinelor a fost înregistrată în *Loca americană*, avînd valori de la 2,82% pînă la 4,43% din numărul total al familiilor de albine aflate sub monitorizare. Incidența cazurilor de *Locă europeană* au avut variații de la 1,69% pînă la 2,96%, iar cazurile de *Ascosferoză* au avut valori de la 0,58% pînă la 2,04%.

La albinele adulte din bolile de origine bacteriană în special a fost înregistrată *Salmoneloza* cu variații de incidență de la 0,54 % la 2,81%, urmată de *Aspergiloză* cu variații de incidență cuprinse între 0% la 2,26%.

Facînd o analiză a datelor cu referire la bolile de origine parazitara, observăm că incidența ce-a mai înaltă a fost înregistrată la *Varooză*, cu o incidență de la 4,85% la 8,87%, urmată de *Nozemoză*, cu o incidență de la 1,02% pînă la 3,39%.

***Unele acțiuni în caz de suspiciune la boli contagioase.***

Important să se cunoască că în situațiile de suspiciune sau confirmare a prezenței unei boli declarabile sau când se stabilește o mortalitate crescută la familiile de albine, cu dificultăți de a stabili cauza, trebuie să se anunțe medicul veterinar oficial, responsabil de supravegherea medical – veterinară din regiunea respectivă. Medicul veterinar de regulă va preleva probe de material patologic și biologic și va trimite în laborator (CRDV) în mod oficial pentru confirmarea bolii.

În cazul când sunt confirmate bolile menționate, se stabilește o zonă de protecție pe o rază de pînă la 5 km. În această zonă de protecție, se interzice vânzarea, comercializarea, transportul, închirierea, împrumutul, se înlătură familiile afectate, mătcile, faguri, de stupii și de ustensilele anexe provenind din focar sau din zona respectivă.

Apicultorii din zona respectivă sunt informați de situație și sunt obligați să aplice măsurile de combatere și de profilaxie recomandate de reprezentanții ANSA, cu aplicarea de măsuri specifice în dependență de boala confirmată de laborator.

### **Unele acțiuni cu referire la tratamentele familiilor de albine în focarele de boli contagioase.**

Pentru a preveni apariția și răspândirea bolilor contagioase la familiile de albine se recomandă controlul sistematic al familiilor de albine pentru identificarea oricărei forme de boală. Asistematic apicultorii trebuie instruiți și informați să aplice strategia de prevenire a bolilor în conformitate cu reglementările la nivel național.

Utilizarea preparatelor medicamentoase pentru profilaxia sau tratamentul bolilor la albine, necesită consultația și prescripția medicului veterinar. Important este și faptul că în caz de utilizare a medicamentelor veterinare se vor folosi doar medicamentele veterinare autorizate și puse pe piață pentru albine, în funcție de modalitățile recomandate în prospectul medicamentului veterinar, respectând modul de administrare. Pentru a exclude apariția rezidurilor de medicamente în miere, sau alte produse apicole, nu se vor trata niciodată familiile de albine în perioada de cules. Se exclud și tratamentele preventive. Nu sunt recomandate antibioticele și sulfamidele pentru tratamentul și combaterea bolilor bacteriene, precum și nozemozei. Acest fapt se explică prin prezența rezidurilor de medicamente în produsele apicole, care prin urmare va fi exclusă din alimentația omului.

### **Activități sanitare veterinare de profilaxie în bolile contagioase.**

Pentru a preveni apariția bolilor contagioase la familiile de albine este necesar de respectat unele cerințe și reguli sanitare veterinare. Stupinele trebuie supravegheate sistematic prin inspectări clinice, patomorfologice a albinelor lucrătoare, trântorilor și puietului căpăcit, în perioada activă a familiilor de albine pe parcursul culesului (martie – octombrie). Obligativ, pentru a cunoaște care ar fi riscurile de apariție a bolilor contagioase se efectuează supravegherea prin examene de laborator. În caz de necesitate se poate recurge și la diagnosticul complet de laborator, care prevede prelevarea probelor de material biologic și patologic, ce constă din albine moarte, albine vii în mărime de 25 g per probă, inclusiv faguri întregi sau porțiuni cu dimensiunile de 20 cm<sup>2</sup> per probă, fagure cu puiet căpăcit de trântor și a albinelor lucrătoare.

O importanță deosebită în profilaxia bolilor sunt respectarea următoarelor cerințe:

- În cadrul stupinelor trebuie întreținute doar familii puternice;
- plasamentul stupinelor trebuie prevăzut pe locuri uscate, cu rezerve bune de polen floral;

- se va evita hrănirea suplimentară cu hrană gluco-proteică pe bază de miere și polen nesterilizate, sau a căror sursă provine din afara stupinei proprii, sau de la familii slabe și cu semne de boală din propria stupină;
- se vor monitoriza permanent familiile de albine pentru a depista în fazele precoce orice suspjecție de boli contagioase;
- de exclus interschimbarea de materiale și echipamente de la stupii suspecți în contaminare cu boli contagioase la stupii sănătoși (fără schimbări, abateri, simptome de boală).

#### **4.2 . Metodica de stabilire a gradului de viabilitate și a statusului de sănătate a familiilor de albi în perioada activă a anului și în perioada de iernat.**

Pentru a păstra familiile de albine într-o stare fiziologică bună, capabilă să fie gata pentru un nou sezon de cules în următorul an, este necesar de pregătit familiile de albine pentru perioada de iernare. De regulă această perioadă cuprinde perioada repaosului de iarnă (perioada de timp de la formarea ghemului de iernare și până la revizia de fond în primăvară), mai cu seamă acesată perioadă cuprinde lunile: octombrie/noiembrie - ianuarie/februarie.

Importantă este și perioada înlocuirii albinelor de iernare și de dezvoltare în primăvară. În dependență de condițiile climaterice, această perioadă de la an la an ar putea varia cu unele diferențe de timp, exprimate prin momentul de debut și durată. Responsabilitatea apicultorilor în această perioadă este foarte mare și prevede luarea în calcul a multor momente și activități pentru ca depășirea perioadei de iarnă să se desfășoare în condiții cât mai bune, cu o mortalitate a albinelor acceptabilă, sau mai cu seamă, în limitele fiziologice normale, atât la nivelul stupinei, cu indici în limitele de la 0 până la maximum 10%, cât și la nivel de familie de albine.

Pentru a afla starea familiilor de albine pe timp de iarnă se examinează foaia de control (pusă pe fundul stupului) și prin controlul auditiv (ascultând zumzetul specific, ce oferă indici despre starea albinelor din stup) efectuat cu ajutorul unui tub de sticlă în interiorul stupului. Primăvara se evaluează mortalitatea albinelor după perioada de iarnă (cantitatea de albine moarte pe fundul stupului), examinându-se tot odată și marimea familiilor de albine, strea lor, prezența mătci și ponteii acesteia, rezervele de hrană, capacitatea de zbor a albinelor, suprafața de puiet, prezența unor semne de boală (infecțiile în stup).

De asemenea în caz de mortalitatea este semnificativă și apicultorul nu poate stabili cauza se trimit probe în laboratoarele autorizate pentru a stabili exact cauza și a stabili diagnoza precisă în caz de infecții a familiilor de albine. În unele cazuri mortalitatea albinelor poate fi stabilită de către apicultori. Unele mortalități pot fi evaluate și de apicultor: ca de exemplu atunci când albinele mor de foame. În acest caz albinele mor de regulă în același timp, toate albinele se găsesc cu capul în interiorul celulei. De aceea pentru a preveni acest lucru este necesar de

efectuat mai multe verificări ale stupinelor de albine începând cu luna martie și în caz de necesitate de a interveni prompt.

Se recomandă efectuarea unui control sumar primăvara, în luna martie, într-o zi însorită, care să permită deschiderea stupului și examinarea minuțioasă a stării familiei de albine. În acest caz se stabilește puterea familie, starea mătci după cantitatea de puiet căpăcit și necăpăcit, rezerva de hrană, starea albinelor lucrătoare după aspectul general al fagurilor (pete de diaree, calitatea ponte), cantitatea de albine moarte, prezența sau lipsa infecțiilor. Astfel, în rezultatului controlului sumar se stabilește starea familiilor de albine după perioada de iernat în rezultatul căruia în caz de necesitate se iau măsurile de rigoare.

**Măsurile luate în perioada de primăvară vizează următorul scop:**

- creșterea cantității corespunzătoare de puiet pentru a asigura populația de albine culegătoare necesară valorificării culesurilor;
- eliminarea albinelor moarte;
- introducerea în stup a unor suplimente nutritive, pentru a menține familiile de albine în stare activă;
- eliminarea albinelor moarte;
- asigurarea spațiului necesar depozitării mierii;
- diminuarea pierderii de albine în cazul roirii naturale;
- stimularea septelului prin roire artificială.



**Figura 4.1. Examinarea clinică a stupinei**

Pentru a avea rezultate bune la primele culesuri în primăvară, important este procedura de înlocuire a albinelor de iernare și o bună dezvoltare timpurie în primăvară. În acest scop este necesar de întreprins următoarele măsuri:

- strâmtorarea cuibului pe necesarul de rame și rezerve cu ajutorul diafragmei, fapt ce ar asigura creșterea rapidă a populației în primăvară;

- de a împacheta (izola) cuiburile și de a asigura o bună ventilație;
- de a alege unele vetre însorite, fără curenți sau vânturi puternice pe perioada de iernarea albinelor, iar poziția stupului se face în așa mod pentru ca să fie maximum cuprins de căldură solară;
- de exclus zgomotul, sunete puternice la stupină;
- de facilitat posibilitatea zborurilor de curățire în zilele călduroase – când temperatura mediului depășește peste 12°C, pentru eliminarea conținutului fecalelor din rect și prevenirea îmbolnăvirilor care se manifestă cu sindrom diareic;
- în cazul iernilor cu multă zăpadă vatra stupinei va fi curățată de zăpadă, de asemenea vor fi curățate și scândurelele de zbor pentru evitarea formării de gheață și de a exclude blocarea ventilației;
- de efectuat controlul iernării - prin foaia de control (pusă pe fundul stupului) și prin control auditiv cu ajutorul unui tub de cauciuc (ascultarea zumzetului specific care oferă indicii despre starea de viabilitate a ghemului de albine, aflate în stupi);
- dacă este insuficiență de hrană, de regulă se administrează deasupra ramelor turte energetice care să stimuleze dezvoltarea familiei de albine, spre sfârșitul lunii februarie, numai după ce s-a realizat un zbor de curățire;
- pentru evaluarea mortalității în primăvară când se notează mărimea familiei de albine, prezența mătcii, suprafața de puiet, rezerve de hrană, numărul de albină moartă pe fundul stupului, prezența semnelor de boală.

Foarte important sunt măsurile de monitorizare a stării de sănătate a familiilor de albine și anume prin prizma examenelor microbiologice, care ar permite de evaluat riscul prezenței bacteriilor cu potențial de contagiozitate și de a provoca boli și mortalitate sporită la familiile de albine în perioada iernatului și care ar putea duce la pierderi foarte mari sau catastrofale pentru stupină. Pentru a exclude așa situații se recomandă de a preleva probe de albine moarte, resturile din stup, porțiuni de faguri, probe de păstură, polen, pentru a efectua investigații de laborator (bacteriologice și bacterioscopice).

Un studiu în cadrul cercetărilor noastre unul din scopuri a fost de a monitoriza starea de sănătate, riscurile prezenței și dezvoltării unor boli contagioase la familiile de albine din cadrul a 2 stupine, de la care au fost prelevate câte 8 probe de material biologic și patologic pentru a stabili starea de sănătate și componența microbiocenozei familiilor de albine. Examinarea clinică a stupinei nr.1 și prelevarea materialului pentru cercetare este prezentată pe Fig. 4.1 și Fig. 4.2.

Probele de material patologic au fost prelevate în pachete de hârtie, în mod aleatoriu, a câte patru loturi de la fiecare stupină. De la nivelul intestinelor albinelor, cu pipeta, a fost prelevat conținutul, care a servit ca material pentru însămânțarea mediilor nutritive.



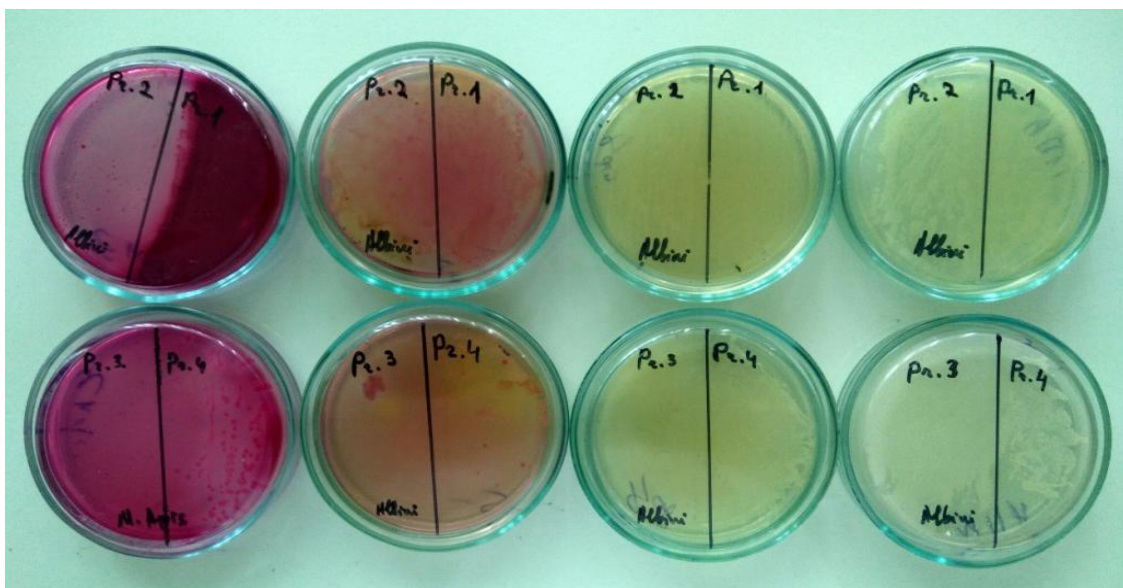
Concomitent, însămînțările au fost efectuate și de la albinele moarte, din resturile stupilor. Au fost folosite mediile nutritive - agarul peptonat, mediul Endo, Salmonella Shigiella Agar, mediul Sabouraud. Interpretarea rezultatelor a fost făcută în funcție de tipul coloniilor de microorganisme, intensitatea de creștere a acestora pe mediile nutritive și structura morfologică a coloniilor microbiene.

Pentru examenul microscopic, din coloniile crescute pe mediile nutritive au fost pregătite frotiuri, care au fost colorate după metoda *Gram* și examinate la microscopul biologic, ob.10x40 și 10x100.



**Figura 4.2. Prelevarea materialului pentru cercetare**

Rezultatele investigațiilor microbiologice au demonstrat că, atât de la stupina nr.1, cât și de la stupina nr.2, s-a observat o creștere semnificativă a coloniilor de microorganisme pe toate tipurile de medii de cultură.



**Figura 4.3. Colonii de microorganisme pe mediile nutritive (probe prelevate de la stupina nr.1)**



Pe Fig. 4.3 sunt prezentate plăcile Petri cu mediile nutritive (de la stînga la dreapta) Endo, Salmonella Shigiella Agar, Agarul peptonat și Sabouraud. Pe mediul Endo, din lavajele probelor 1, 3 și 4 au crescut intensiv colonii microbiene specifice pentru *E. coli*, cu formă sferică sau ovală, de culoare roșu închis și avînd luciul metalic. Mai puține au fost coloniile *E. coli* în plăcile Petri însemnătate din proba nr.2.

Pe mediul Agar *Salmonella Shigiella* se observă o decolorare neuniformă a mediului nutritiv cu creșterea pe toată suprafața plăcii Petri a coloniilor de *Salmonella*, caracterizate cu culoare roz deschis, și cu forme ovale. Pe mediul agarul peptonat se observă o creștere intensivă a coloniilor de *Streptococi* și *Stafilococi* de culoare surie, plasate pe toată suprafața plăcii Petri. Concomitent, pe mediul *Sabouraud* se observă o creștere masivă a coloniilor de fungi microscopici, de culoare alb-surie, cu forma sferică și cu aspect pufos, coloniile fiind concrescute pe suprafața mediului.

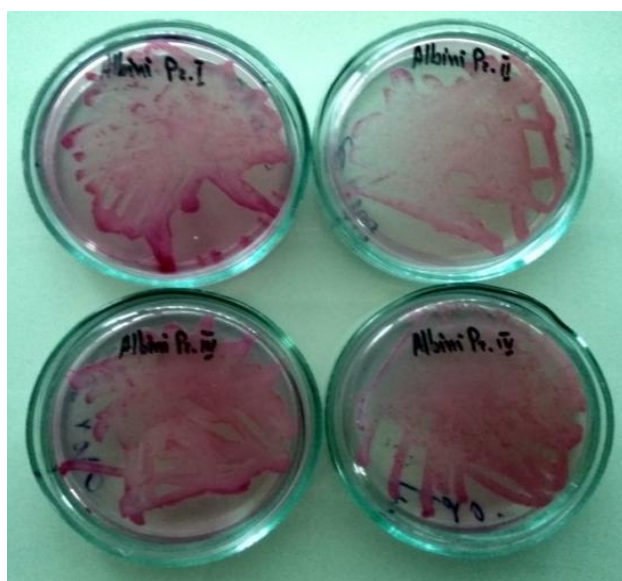


Figura 4.4. Colonii de *E.coli* pe mediul *Endo*

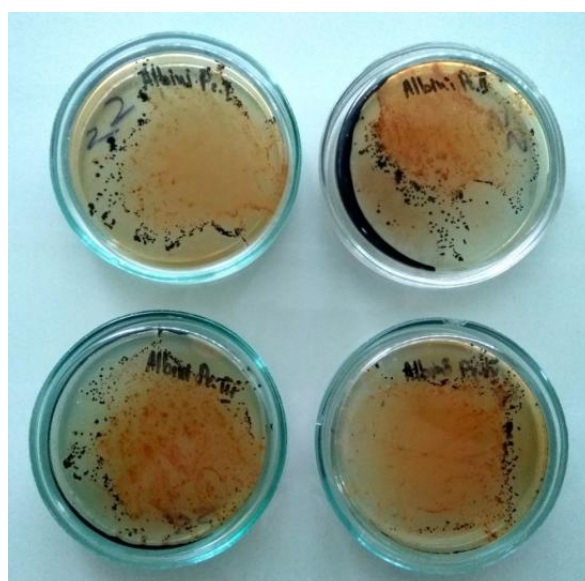
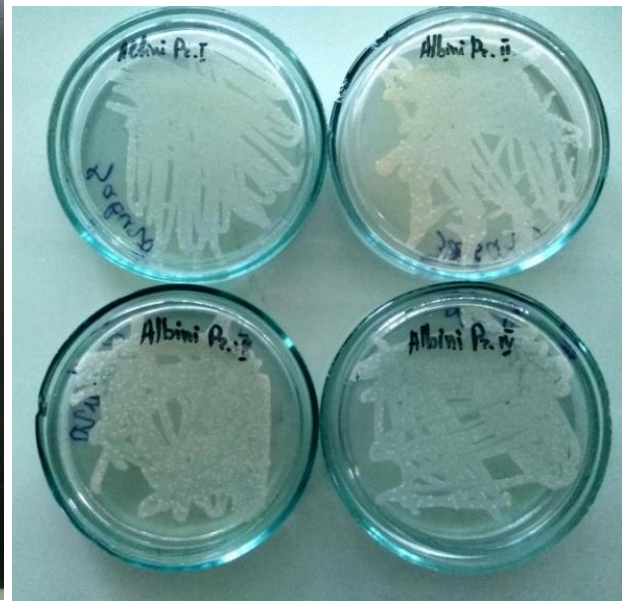


Figura 4.5. Colonii de *Salmonella* și *Enteribacterii* pe mediul *Salmonella*

De la stupina nr. 2, din materialul prelevat au fost efectuate însămânțări pe aceleași medii nutritive. Pe Fig. 4.4 sunt reprezentate coloniile de *E. coli* care au crescut pe mediul *Endo*, avînd culoarea roșu închis și cu luciul metalic, plasate pe toată suprafața plăcii Petri. Pe Fig. 4.5 se observă decolorarea mediului și prezența combinației asociate a coloniilor de *Salmonella*. Acestea au culoarea cafenie închis situate preponderent la periferia plăcilor Petri, reprezentate cu forme sferice, plasate separat pe substratul nutritiv. Concomitent aici se observă și prezența coloniilor de enterobacterii, care sunt de culoare cafeniu deschis, localizate în centrul plăcii Petri.

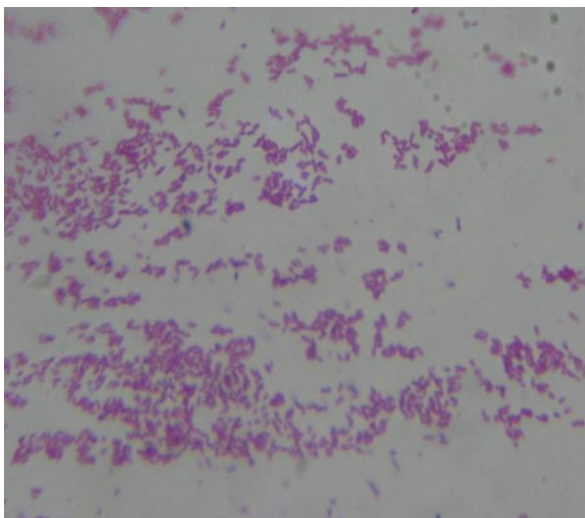


**Figura 4.6. Colonii de *Streptococi* și *Stafilococi* pe agarul peptonat**

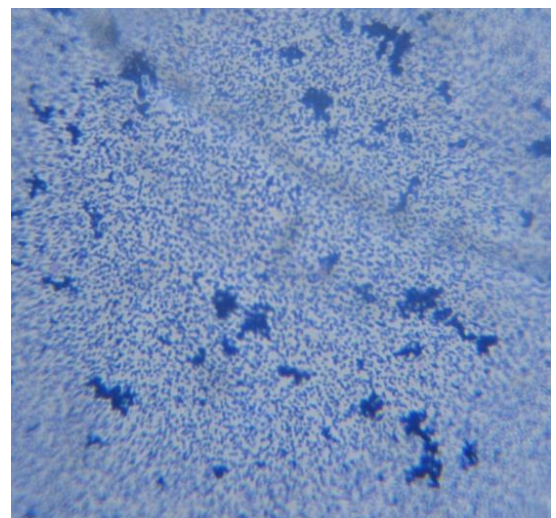


**Figura 4.7. Colonii de fungi microscopici pe mediul Saburo**

Pe Fig. 4.6 sunt prezentate coloniile de *Streptococi* și *Stafilococi* ce s-au dezvoltat pe agarul peptonat. Acestea sunt de culoare surie cu forma sferică, fiind plasate pe toată suprafața plăcilor Petri. Intensitatea de creștere este practic analogică de la toate cele patru probe de cercetare. În cazul când însămânțările au fost efectuate pe mediul Sabouraud (Fig. 4.7) se observă o creștere masivă a coloniilor de fungi microscopici. Coloniile fungilor sunt bine evidențiate, sunt de culoare surie cu aspect pufos și concrescute în stratul superficial al mediului microbial nutritiv.



**Figura 4.8. Colonii de *E.coli*, ob.10x90**



**Figura 4.9. Colonii de *Streptococi* și *Stafilococi*, ob.10x90**

Rezultatele investigațiilor microscopice sunt prezentate pe Fig. 4.8., Fig. 4.9. și Fig. 4.8. sunt reprezentate coloniile *E. coli*, colorate după metoda Gram, care au forma de bastonașe cu marginile ovale, de culoare roz închis, plasate separat și în grămezi, iar pe Fig. 4.9 sunt reprezentați *Streptococii* și *Stafilococii*, care sunt de culoare albastră, cu forma sferică sau ovală, plasați ordinar sau în grămezi.

Rezultatele obținute denotă faptul că, cercetările bacteriologice sunt un element obligator pentru monitorizarea situației epidemiologice față de bolile contagioase la familiile de albine. S-a stabilit că, în această perioadă microbiota familiilor de albine reprezintă o asociere de microorganisme nepatogene, precum și condiționat patogene, fiind reprezentată de *Streptococi*, *Stafilococi*, bacterii din genurile *E. coli*, *Salmonella spp.*, fungi și drojdii. Toate aceste forme de bacterii prezintă un risc major pentru familiile de albine și pot conduce la apariția unor boli contagioase în cazul reducerii rezistenței fiziologice a familiilor de albine, pe fondul unor factori igienici sau alimentari favorizanți.

#### **4.3 Metode și mijloace de igienă și de dezinfecție în apicultură.**

Igiena teritoriului stupinei, a inventarului, echipamentului, transportului, cât și a personalului (apicultorilor) este foarte importantă atât în etapa de producție, dar mai ales în etapa de condiționare a produselor.

Se atrage o atenție deosebită păstrării unei bune igiene personale, care prevede ca îmbrăcămintea trebuie să fie curată și adaptată (bonetă, salopetă cu buzunare închise, încălțăminte, mănuși, mască specială, etc.) pentru a evita contaminarea, sau transmiterea agenților patogeni. Este strict necesar ca personalul, ce se ocupă de familiile de albine, să posede un certificat medical de sănătate anual, în care să fie menționat că nu suferă de o boală contagioasă. De asemenea pentru a exclude riscurile de contaminare a familiilor de albine este interzis lucru persoanelor care suferă de boli cutanate, respiratorii sau intestinale, respectarea regulilor de igienă personală (spălarea, dezinfectarea și uscarea mâinilor pînă și după efectuarea anumitor operațiuni în stup). La prisacă se interzice fumatul, consumul de băuturi alcoolice. Hainele apicultorilor trebuie să fie curate, adaptate lucrului la prisacă cu albinele.

Ca măsuri de prevenire a bolilor contagioase la stupine, indiferent de situația epidemică, este necesar de efectuat dezinfecții periodice și sistematice a teritoriului, inventarului și utilajului apicol.

De regulă, finalul igienizării se află întotdeauna dezinfecția. Dezinfecția este tot atât de importantă ca și combaterea însăși a bolilor contagioase. Dacă se fac greșeli în această privință sau dacă nu se lucrează conștiincios pot apărea boli infecțioase cu consecințele sale pustiitoare. Din acest considerent, este necesară efectuarea examenului sanitar periodic al întregului efectiv

de albine de către medicul veterinar, la toate familiile de albine, în lunile martie - aprilie și august – septembrie. În cazul depistării (confirmării) unor boli contagioase bacteriene (loca americană, loca europeană) se recurge la distrugerea familiilor de albine prin ardere.

De menționat faptul că, familiile de albine cu semne clinice de boli infecto-contagioase nu pot fi deplasate în pastoral decât după îndeplinirea măsurilor de asanare și de lichidare a focarelor de boală la stupină.

Cîteva reguli care sunt obligatorii pentru o stare bună epidemiologică față de bolile contagioase :

- Dezinfecția stupilor se face numai când aceștia se află în stare bună.
- Stupii vechi, deteriorați, ar trebui mai bine să fie arși.
- Dezinfecția se face, de preferință prin flambarea părților de lemn.
- Mai întâi însă, totul trebuie perfect curățat, iar urmele de ceară și propolis răzuite. Prin această metodă nu se pot înlătura absolut toți sporii, dar numărul lor va fi redus substanțial. Puținii spori rămași nu pot reinfecta familia de albine.
- Uneltele, ca dalta apicolă, hrănitorele și centrifuga de miere, dar și stupii din material plastic vor fi spălate cu calcinat de sodiu în concentrație de 3% până la 5 %. În final, acestea trebuie clătite bine cu apă curată.
- Efectuarea tratamentelor la familiile de albine este o activitate foarte responsabilă la momentul actual. Se recomandă eliminarea unor medicamente precum antibioticele, oxitetraciclina și eritromicina, utilizate în controlul bolilor bacteriene la familiile de albine, deoarece acestea lasă reziduuri în miere.

În cazul nerespectării măsurilor de igienă obligatorii și a măsurilor sanitare impuse de lege exporturile de miere și alte produse apicole sunt interzise [43,48, 89].

#### **4.4 Date cu referire la microbiocinoza familiilor de albine înaintea perioadei de iernat și după perioada de iernat.**

Pentru a stabili starea de sănătate la familiile de albine după perioada de iernat a fost efectuat un studiu la stupina de albini a Institutului de Zoologie a Universității de Stat din Moldova. Ca material de cercetare au servit familiile de albine investigate după perioada de iernat, de la examinarea familiilor de albine au fost prelevate trei probe comune constituite din câte 5 stupi, selectate prin metodă aleatorie, probele generale fiind constituite din albine (albine moarte), resturi din interiorul stupilor, câte minimum 50 de albine de la fiecare stup examinat, pentru cercetări bacteriologice, în vederea stabilirii prezenței și diversității florei bacteriene de la albinele moarte în perioada iernatului.



Pentru izolarea formelor bacteriene și fungice de la probele colectate au fost folosite medii de cultură obișnuite, selective și speciale precum: nutrient agar, bulion RVS, agar XLD, Brilliance Salmonella Agar, mediul Endo, mediul Sabouraud. După incubarea mediilor de cultură la termostat, s-au studiat proprietățile morfologice al coloniilor bacteriene ce sau dezvoltat pe mediile nutritive de cultură, iar din coloniile obținute, au fost preparate frotiuri, colorate după metoda Gram pentru cercetări microscopice.

După examinarea studiului clinic al familiilor de albiini pentru a stabili starea lor după perioada de iernat, în mod prioritar, de la familiile cu statutul fiziologic nesatisfăcător (mobilitate redusă a roiului de albine, mortalitatea excesivă a albinelor, materii diareece pe pereții stupilor și pe fagurile stupului), după principiu aleatoriu, s-au prelevat probele de albine pentru investigațiile de laborator (Fig. 4.10 și 4.11) [22].



**Figura 4.10. Prelevarea probelor după iernat**

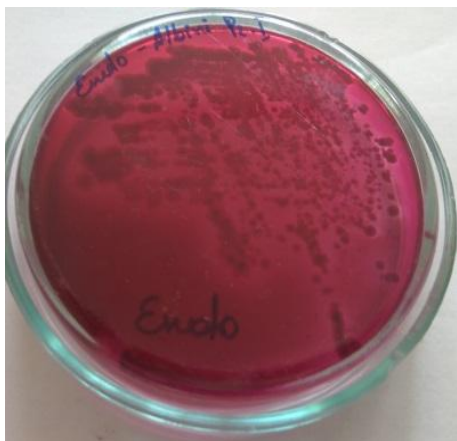


**Figura 4.11. Investigații de laborator**

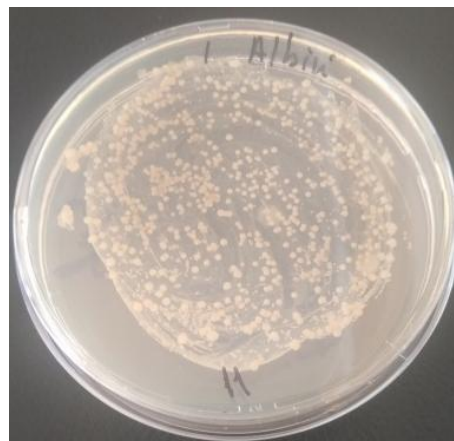
Investigațiile bacteriologice au confirmat că, pe mediile de cultură de ordin general, precum și pe mediile speciale pentru unele forme bacteriene, s-a observat o creștere semnificativă de colonii bacteriene. Ce-a mai intensivă creștere a coloniilor bacteriene s-au înregistrat pe mediul Endo, unde s-au observat colonii microbiene specifice pentru genul de bacterii *E. coli*, caracterizate morfologic cu colonii cu forme sferice și ovale, de culoare roșu-închis, având și un luciu de culoare roșu închis sau bordo cu aspect metalic. Aceste colonii (pe acest mediu) au fost predominante, de ce-a mai mare intensitate de creștere pe mediile de cultură (Fig. 4.12).

În același timp, pe mediul Agarul peptonat se observă o creștere intensivă clar vizibilă de colonii a formelor bacteriene *Streptococi* și *Stafilococi*, caracterizate cu culoare alb-surie și cu forme sferice, plasate uniform pe toată suprafața plăcii Petri (Fig. 4.13).

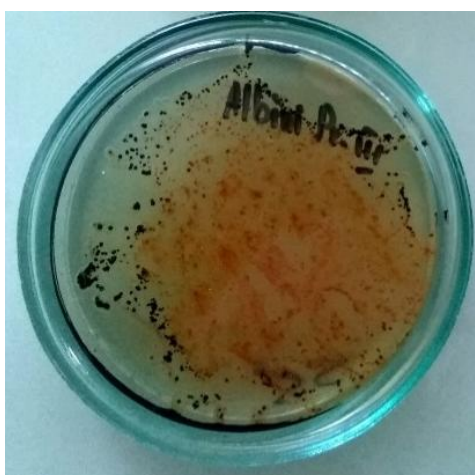
În cazul însămînțărilor efectuate pe mediul *Salmonella Shigiella Agar*, inițial s-a observăm o decolorare neuniformă a mediului nutritiv, iar mai apoi s-a stabilit o dezvoltare moderată a coloniilor de *Salmonella spp.* pe întreaga suprafața a plăcii Petri, iar coloniile aveau culoarea roz-deschis și cu un aspect umed, cu forme ovale ale coloniilor (Fig. 4.14).



**Figura 4.12. Intensitate de creștere pe mediile de cultură**



**Figura 4.13. Colonii bacteriene de Streptococi și Stafilococi**



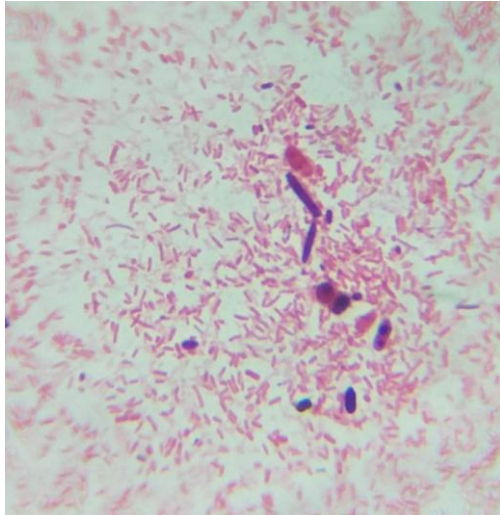
**Figura 4.14. *Salmonella Shigiella* pe mediu Agar**



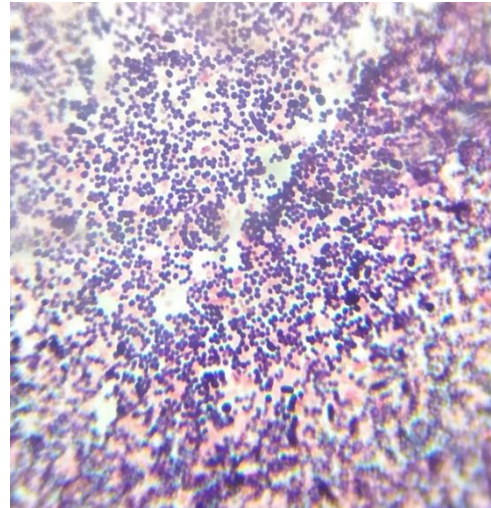
**Figura 4.15. Colonii fungice pe mediu Saburo**

Însămînțările efectuate concomitent pe mediul *Sabouraud* au demonstrat o creștere caracteristică tipic pentru coloniile de fungi microscopici. Coloniile fungice s-au dezvoltat pe toată suprafața plăcii Petri, iar aspectul coloniilor a avut un caracter de dezvoltare intensivă, filamentos-pufos, de culoare alb-surie, cu forme sferice plasate pe suprafața substratului, concrescute în suprafața mediului nutritiv (Fig. 4.15).

Pentru studiul morfologic-microscopic al coloniilor bacteriene dezvoltate pe mediile de cultură, din coloniile microbiene și fungice cu structură morfologică tipică, bine dezvoltate, au fost preparate frotiuri, care au fost colorate după metoda Gram și examinate la microscopul biologic sub imersie, cu dimensiunea 10x100.



**Figura 4.16. Bacteriile coliforme *E. coli* și *Salmonella spp.***



**Figura 4.17. Bacterii din genul *Streptococi* și *Stafilococi* floră bacilară**

Rezultatele studiului microbiologic confirmă că, în familiile de albine după iernat predomină o floră bacteriană asociată. În această combinație de forme bacteriene predomină bacteriile coliforme din genurile precum *E. coli* și *Salmonella spp.* (Fig. 4.16) și o asociere de bacterii din genul *Streptococi*, *Stafilococi* floră bacilară și unele forme de fungi (Fig. 4.17).

Rezultatele investigațiilor microscopice au confirmat prezența bacteriilor din genul *E. coli*, care au reprezentat peste 50% din numărul formelor bacteriene, urmate de *Streptococi* și *Stafilococi* cu o pondere de până la 30%, flora fungică cu o pondere de 15%, și până la 5 % formele de bacterii din genul *Salmonella spp.*

Rezultatele obținute permit de menționat că, una din cele mai riscante perioade de supravețuire a familiilor de albine este perioada rece a anului, sau perioada de iernat. Apicultorii ar trebui să se pregătească fundamental pentru iernatul familiilor de albine. Flora bacteriană cu care trece familia de albini în perioada de iernat este decesivă pentru sănătatea acestora. Un alt factor nu mai puțin important este volumul de hrană și calitatea acesteia (mierea calitativă). De regulă de fiecare dată rezerva de hrană trebuie să fie cu un surplus de 15-20% din necesarul ordinar pentru o familie de albine, deoarece perioada iernatului este de multe ori imprevizibilă ca durată. Totuși, componența microbiocenozei familiilor de albine este indicatorul de bază a familiilor de albine în perioada iernatului. Din acest considerent, corect ar fi ca înaintea perioadei iernatului, să fie prelevate probe de la familiile de albine pentru a analiza riscurile microbiologice, care persistă sau care ar putea să devină factori importanți în procentul de viabilitate a cuibului de albini pe perioada iernatului.

În studiul microbiologic efectuat s-a demonstrat că flora bacteriană la familiile de albine după perioada de iernare este asociată, polimorfă, constituită din forme bacteriene din genurile,

*E. coli*, *Salmonella*, *strepto* și *stafilococi* în combinație cu forme de fungi microscopici. Rezultatele obținute demonstrează că un procent considerabil din albinele moarte, sunt rezultatul prezenței formelor bacteriilor condiționat patogene, care sub acțiunea unor factori favorizanți, devin patogene pentru unele familii de albine, fapt exprimat prin mortalitate crescută cu 25-30% comparativ cu alte familii de albine, unde intensitatea florei bacteriene este foarte redusă. Datele obținute sugerează că, monitorizarea periodică a familiilor de albine conduce la utilizarea unor măsuri sanitare veterinare care ar minimiza incidența factorilor de risc ce favorizează creșterea procentului de mortalitate a albinelor melifere în perioada de iernat.

#### **Acțiuni de monitorizare și de combatere a locii americane și locii europene.**

Loca americană și loca europeană sunt boli de origine bacteriană cu răspândire practic la nivel global. Se consideră ca sunt unele dintre cele mai periculoase boli ale puietului albinelor din rasa *Apis mellifera* și al altor specii. Dacă facem o paralelă diferențială se poate de menționat că *Loca americană* afectează puietul de albine căpăcit, ce ar însemna vârsta larvelor de 5-7 zile, pe când loca europeană afectează puietul necăpăcit, adică cu vârsta de 3-5 zile. Ambele boli se răspândesc cu ușurință de la o stupină la alta sau de la o familie de albine la alta, cu inventarul, cu hrana, prin intermediul albinelor hoațe, trântori, adăpătoare, ectoparaziți etc. *Loca americană*, (agentul patogen –*Paenibacillus larvae*), mai frecvent este manifestată în lunile iulie – august. De regulă această boală nu se vindecă spontan, deci de la sine, se înseamnă că este nevoie de intervenția apicultorului și a medicului veterinar.

Important este de menționat faptul că boala evoluează cu forme subclinice și trebuie de intervenit pentru depistare, doar prin cercetări de laborator. Unele dintre simptomele caracteristice ale bolii sunt: celulele au căpăcele perforate, larvele se descompun într-o masă vâscoasă ce se întinde la atingere cu un bastonaș de sticlă, au culoare maro închis spre negru, care se usucă și aderă la pereții godeurilor. Confirmarea diagnosticului se face prin prelevarea probelor de fagure cu puiet afectat pentru examentul bacteriologic.

În cazul confirmării locii americane se impune distrugerea prin ardere a tuturor familiilor de albine afectate de boală și dezinfecția riguroasă a materialului apicol.

Măsurile de profilaxie constau în: evitarea căilor de contaminare a coloniilor de albine sănătoase; evaluarea tuturor factorilor potențiali de risc. Se îndeplinesc măsuri de dezinfecție riguroasă. De corectitudinea măsurilor în complex cu dezinfecția calitativă depinde posibila apariție a recidivelor. Dezinfecția stupilor se face numai când aceștia se află în stare bună. Se recurge la curățarea mecanică și flambarea părților de lemn. Stupii din material plastic vor fi spălați cu soluție de sodă calcinată în concentrație de 3% până la 5 %, și clătite cu apă curată. Ramele contaminate împreună cu albinele moarte se ard. Mierea va fi folosită numai pentru consumul uman și nu ca hrană pentru albine.



Pentru evitarea riscurilor de apariție a lozii americane și europene se recomandă:

- dezinfectia și menținerea unei igiene corespunzătoare a inventarului stupinei;
- aplicarea legislației sanitar-veterinare privind supravegherea bolilor infecto-contagioase;
- supravegherea sistematică clinică, anatomopatologică și de laborator a puietului, în perioada aprilie - septembrie la 5% din coloniile stupinelor de producție;
- notificarea obligatorie a bolii în conformitate cu prevederile legale.

#### **4.5. Eficacitatea utilizării unor produse din micromicete la familiile de albine în perioada de pregătire pentru iernat.**

##### **Selectarea tulpinilor de micromicete cu potențial antibacterian.**

Agenții antimicrobieni sunt în permanență interferență în procesele specifice esențiale pentru creșterea și diviziunea agenților patogeni: bacterii, fungi, drojdii etc. Ei pot fi grupați în inhibitori ai peretelui celular bacterian și fungic, inhibitori ai funcției membranei citoplasmatică, inhibitori ai sintezei acizilor nucleici și inhibitori ai funcției ribosomale.

Preparatele cu efect antimicrobian pot fi cu acțiune bactericidă (distruge complet formele bacteriene sau fungice) sau pot avea proprietăți bacteriostatice, care se exprimă prin inhibiția procesului de creștere și multiplicare a celulelor bacteriene sau fungice.

Produsele antimicrobiene cu efecte bactericide au o eficacitate mai bună, iar cele bacteriostatice pot fi benefice în unele situații, pentru unele forme bacteriene, deoarece modifică intensitatea metabolismului celular și în final permit mecanismelor de apărare ale gazdei să distrugă agentul patogen.

În studiul propus, au fost selectate și studiate proprietățile antibacteriene ale tulpinilor de micromicete testate din 22 de culturi de micromicete din genul *Penicillium*. Ca cultură de referință pentru stabilirea proprietăților bactericide și bacteriostatice a fost folosite culturile: *Paenibacillus larvae*, agent patogen al lozii americane și *Melissococcus plutonius*, agent patogen al lozii europene. Pentru comparația efectului antimicrobian au fost folosite preparatele: tetraciclina și neomicina. Rezultatele obținute, au demonstrat că, din 22 culturi testate proprietăți antibacteriene față de patogenii testați posedă numai 6 tulpini, notificate după cum urmează: *Penicillium sp.* 52, *Penicillium sp.* 62, *Penicillium sp.* 91, *Penicillium sp.* 97, *Penicillium sp.* 104, *P.sp.* 110. Diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor variază de la  $10,2 \pm 1,1$  mm (*P.sp.* 104) până la 2,6 mm (*Penicillium sp.* 91). Astfel, s-a evidențiat cel mai mult tulpina *Penicillium sp.* 91, care a manifestat o sensibilitate semnificativă atât față de *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al lozii americane, cât și față de *Melissococcus plutonius*, agent patogen al lozii europene. Diametrul zonei de inhibiție a patogenilor sub acțiunea exometaboliților acestei tulpini variind în limitele 23,5 – 24,0 mm.

În scopul menținerii unui status microbial benefic și pentru a stimula rezistența fiziologică a organismului albinelor în perioada de iernat, au fost selectate și multiplicare tulpinele cu acțiune antibacteriană și enzimatică mai pronunțată, din care ulterior a fost obținută soluția de exometaboliți pentru a fi utilizată la familiile de albine împreună cu turtele din făină de grâu, care au servit ca hrană suplimentară și ca preparat în profilaxia bolilor contagioase, precum și ca stimulator de rezistență fiziologică al familiilor de albine.

Din acest considerent, toamna, înainte de iernat au fost introduse în stup turtele de grâu prepaate cu amestecul sirop de zahăr de 50% cu soluții de exometaboliți ai culturilor *Penicillium sp. 11*, *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 62*, în calitate de supliment în hrana albinelor. Au fost testate 3 concentrații de soluții de exometaboliți: 10 ml/l, 25 ml/l și 50 ml/l de sirop de zahăr (Fig. 4.18, Fig. 4.19).



**Figura 4.18. Administrarea turtelor cu supliment toamna**



**Figura 4.19. Examinarea stupinei primăvara**

Primăvara după iernat a fost evaluată acțiunea exometaboliților de micromicete asupra albinelor după indicii de sănătate: % de albine moarte după iernat; cantitatea de miere rămasă din iarnă (%); comportamentul albinelor; activitatea de zbor a albinelor; prezența mucegaiului în stup; modul de căpăcire; rezistența la iernare

Rezultatele obținute primăvara, după iernat sunt prezentate în Tab. 4.3.

Analizând datele prezentate în acest tabel se poate de relatat că, cel mai înalt indice de examinare au fost obținuți la familiile de albine care au primit exometaboliții de micromicete a tulpinei *Penicillium sp.11*. Cel mai mic procent de albine moarte de  $2 \pm 0,5$  % a fost obținut în cazul concentrației de exometaboliți de 50 ml/kg de turte de grâu, comparativ cu  $18 \pm 0,5$  % la albinele din grupa lot martor. Acest indice a constituit  $4 \pm 0,5$  % la familiile de albine care au primit exometaboliții ai tulpinii *Penicillium sp.91*, fiind urmat de varianta cu exometaboliți ai tulpinii *Penicillium sp.62*, care au constituit  $7 \pm 1,0$  %. La grupul lot martor la care exometaboliții de micromicete au fost înlocuit cu preparate antifungice în doza de 1g/l și 2g/l, procentul de mortalitate în perioada iernatului a constituit  $5,5 \pm 1,5$  și  $4,5 \pm 0,5$  procente respectiv.

**Tabelul 4.3 Unii indicii de sănătate ai familiilor de albine hrănite cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu soluții de exometaboliți din micromicete**

Tulpina	<i>Penicillium sp. 11</i>			<i>Penicillium sp. 91</i>			<i>Penicillium sp. 62</i>			Meliasc (difeconazol)		Martor
	10ml/l	25ml/l	50ml/l	10ml/l	25ml/l	50ml/l	10ml/l	25ml/l	50ml/l	1g/l	2g/l	
<b>% de albine moarte după iernat</b>	7 ± 0,5	7 ± 0,2	2 ± 0,2	8 ± 0,2	6 ± 0,5	4 ± 0,5	8 ± 0,5	11 ± 1,0	7 ± 1,0	5,5 ± 1,5	4,5 ± 0,5	18 ± 0,5
<b>Cantitatea de miere rămasă din iarnă (%)</b>	18 ± 2,0	28 ± 2,5	18 ± 1,0	11 ± 1,5	20 ± 2,5	20 ± 1,0	9 ± 1,5	10 ± 1,0	12 ± 2,0	10 ± 0,5	12 ± 0,6	7 ± 1,0
<b>Comportamentul albinelor</b>	Liniștit +++	Liniștit +++++	Liniștit +++	Agitat +++	Liniștit ++	Liniștit +	Agitat +++	Agitat +++	Agitat ++	Agitat +++	Agitat +++	Agitat ++
<b>Activitatea de zbor a albinelor</b>	+++++	+++++	+++++	+++	+++++	+++++	+++	+++++	+++++	+++	+++	+++
<b>Prezența mucegaiului în stup</b>	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<b>Modul de căpăcire</b>	uscat	uscat	uscat	uscat	uscat	Uscat	uscat	uscat	uscat	uscat	uscat	uscat
<b>Rezistența la iernare (%)</b>	93 ± 0,5	93 ± 0,2	98 ± 0,2	92 ± 0,2	94 ± 0,5	96 ± 0,5	92 ± 0,5	89 ± 1,0	93 ± 1,0	94,5 ± 1,5	95,5 ± 0,5	82 ± 0,5

Indicele cu referire la cantitatea de miere rămasă pe rame, cel mai mare indice -  $28 \pm 2,5 \%$  a fost constatat la familiile de albine, care au primit ca supliment de hrană, exometaboliții din tulpina de micromicete *Penicillium sp. 11* în doză de 25ml/kg de turtele de grâu, comparativ cu indicele  $7 \pm 1,0 \%$  la grupa lot martor. În același timp, la familiile de albine din grupele experimentale, care au primit exometaboliții ai micromicetelor *Penicillium sp.91* și *Penicillium sp. 62*, acest indice a aceeași diluții a constituit  $20 \pm 2,5 \%$  și  $10 \pm 1,0 \%$  respectiv. La grupele lot martor prelucrate cu preparate antifungice (1g/l și 2g/l) acest indice a constituit respectiv  $10 \pm 0,5 \%$  și  $12 \pm 0,6 \%$ .

Ce se referă la indicatorul comportamentului albinelor, se poate de menționat că, albinele care au primit în hrana suplimentară adăus de exometaboliți ai tulpinei de micromicete *Penicillium sp. 11* la diluțiile 25 ml/kg și 50 ml/kg de turte de grâu, au avut un comportament liniștit apreciat cu 4 și 3 de +, comparativ cu comportamentul semnificativ agitat apreciat cu 2 de +, iar la familiile de albine ce au primit exometaboliții tulpinelor *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 62*, acest indicator a fost apreciat de la 1 la 3 de +. La grupele lot martor, care au primit preparate antifungice în loc de exometaboliți, acest indice a fost apreciat ca moderat agitat cu 3 de +.

Indicatorul activității de zbor a avut parametrii mai buni, apreciat cu 4 de +, tot la familiile de albine, care au primit ca supliment în hrană exometaboliții tulpinii *Penicillium sp.11*, comparativ cu aprecierea a 3 de +, practic la celelalte grupe experimentale, ca și la familiile de albine din grupele lot martor (3 de +).

Referitor la prezența mucegaiului în stup, se poate de menționat că a fost stabilit doar în stupii familiilor de albine care au primit ca supliment în hrană, exometaboliții tulpinei de micromicete *Penicillium sp. 91*, nivelul mucegaiului fiind apreciat cu 3 de +. Spre deosebire de tulpinile *Penicillium sp. 11* și *Penicillium sp. 62*, tulpina *Penicillium sp. 91* prezintă numai activitate antibacteriană, cea ce explică apariția mucegaiului în stup.

Atât la albinele din loturile experimentale, cât și la cele din lotul martor, modul de căpăcire a fost uscat.

Importante au fost și datele obținute cu referire la nivelul de rezistență la iernat. Cel mai înalt indice -  $98 \pm 0,2\%$ , a fost stabilit la familiile de albine care au fost alimentate cu supliment de hrană cu adăus de exometaboliți ai tulpinei *Penicillium sp. 11*, în diluția de 50 ml/kg de rute din făină de grâu, comparativ cu grupa lot martor -  $82 \pm 0,5 \%$ . La familiile de albine care au primit ca supliment în hrană exometaboliții ai tulpinii *Penicillium sp.91*, acest indice a constituit  $96,0 \pm 0,5\%$ , iar la grupa de albine ce au primit în hrană suplimentară exometaboliții tulpinii de micromicete *Penicillium sp. 62* indicele a avut valori de  $93 \pm 1,0\%$ . La familiile de albine ce au

fost tratate cu preparate antifungice (1g/l și 2g/l) acest indice a constituit respectiv  $94,5 \pm 1,5 \%$  și  $95,5 \pm 0,5 \%$ .

Luând în calcul că în cazul cercetărilor efectuate în perioada de toamnă în care au fost utilizați exometaboliți ai tulpinii *Penicillium sp.* 91 în stupii familiilor de albine, primăvara a fost depistat mucegai în cele 3 variante testate, primăvara au fost testate tulpinile *Penicillium sp.* 11, *Penicilliu sp.* 19 și *Penicilliu sp.* 62, pentru a evita apariția mucegaiului în stup. Aceste tușpini posedă atât activitate antimicrobiană, cât și antioxidantă (catalazică) semnificativă.

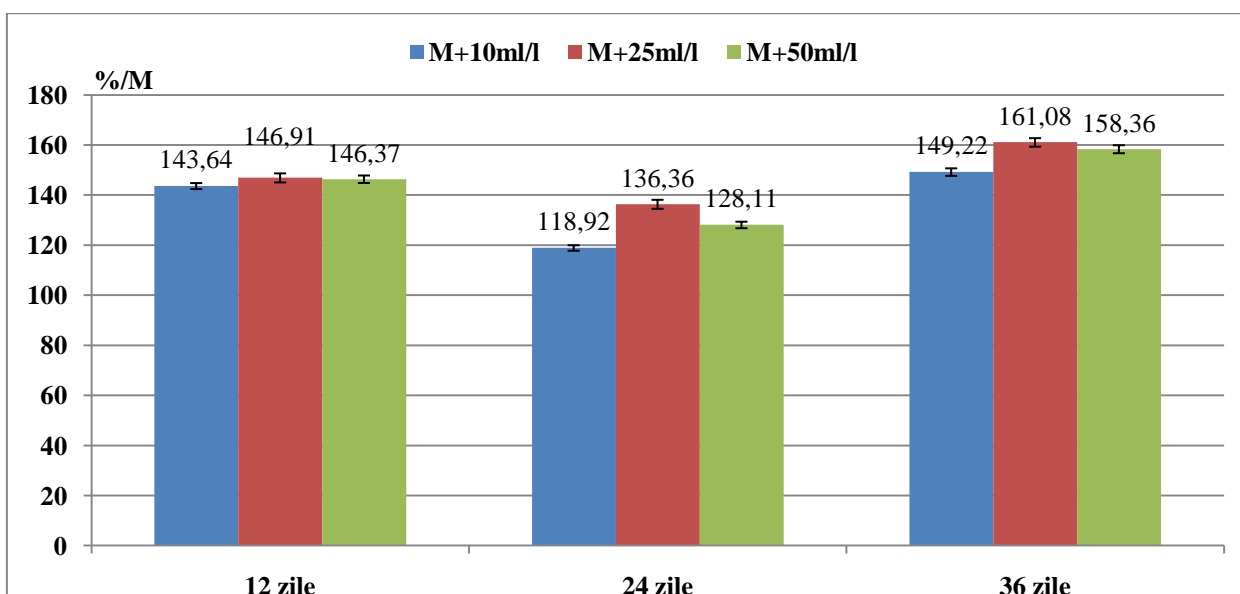
#### **4.6 Eficacitatea utilizării exometaboliților din micromicete la familiile de albine.**

După examinarea stării fiziologice a familiilor de albine după perioada de iernat (primăvara) au fost selectate și testate în calitate de supliment în hrana albinelor soluțiile de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19 și *Penicillium sp.* 62 în trei concentrații (mg/l): 10 ml/l, 25 ml/l, 50 ml/l de sirop din zahăr.

Pentru estimarea eficienței procedurii de hrănire a albinelor cu suplimentele nutritive sus-nominalizate, au fost desfășurate experiențe de testare comparativă a acestora pe familii de albine formate în patru loturi, a câte 3 familii în fiecare lot: lotul I – martor (albinele cărui au fost hrănite numai cu sirop de zahăr de 50 %) lotul II - sirop de zahăr de 50 % + soluție de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium sp.* 11 în concentrație de 10 ml/l; 25 ml/l și 50 ml/l; lotul III - sirop de zahăr de 50 % + soluție de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium sp.* 19, în concentrație de 10 ml/l; 25 ml/l și 50 ml/l, lotul IV - sirop de zahăr de 50 % + soluție de exometaboliți ai tulpinii *Penicilliu sp.* 62, în concentrație de 10 ml/l; 25 ml/l și 50 ml/l. Hrănirea albinelor s-a efectuat o singură dată în cantitate de 200 ml de amestec la fiecare ramă cu albine.

Rezultatul influenței exometaboliților tulpinii *Penicillium funiculosum (P.sp.11)* asupra procesului de formare a pătratelor de puiet căpăcit au fost examinate după 12, 24 și 36 zile de la administrarea siropului de zahăr cu adaus de exometaboliți, este prezentat pe Fig. 4.20.

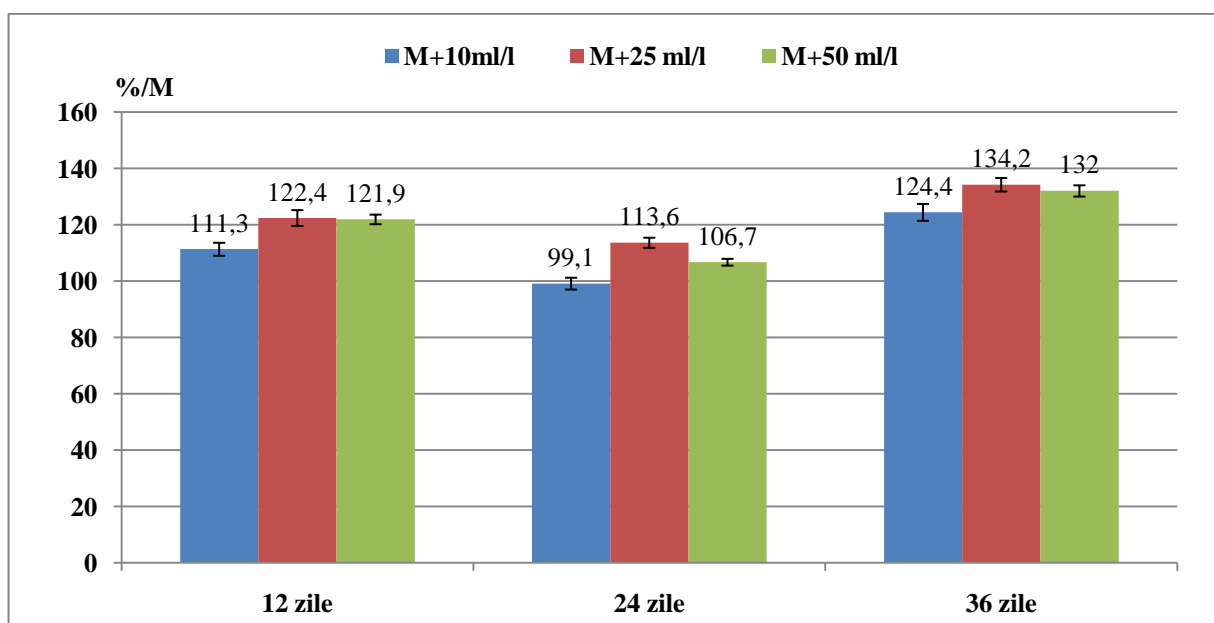
Analizând aceste date, observăm că la a 12 zi după administrarea exometaboliților din micromicete, numărul pătratelor cu puiet căpăcit a avut variații de la 143, 64 pătrate (în diluția 10 ml/l) până la 146,91 pătrate (în diluția 50 ml/l), comparativ cu familiile de albine din grupa lot martor (indicator constant - 100 pătrate de puiet căpăcit). Cel mai înalt indice cu variații de la 149,22 până la 161,08 pătrate de puiet căpăcit, a fost obținut la 36 zile de la administrarea exometaboliților din tulpina *Penicillium sp.*11.



Nota: P<0,01.

**Figura 4.20** Numărul de pătrate cu puieț căpăcit, % față de lot martor (100%) în varianta cu exometaboliți ai micromicetei *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp. 11*)

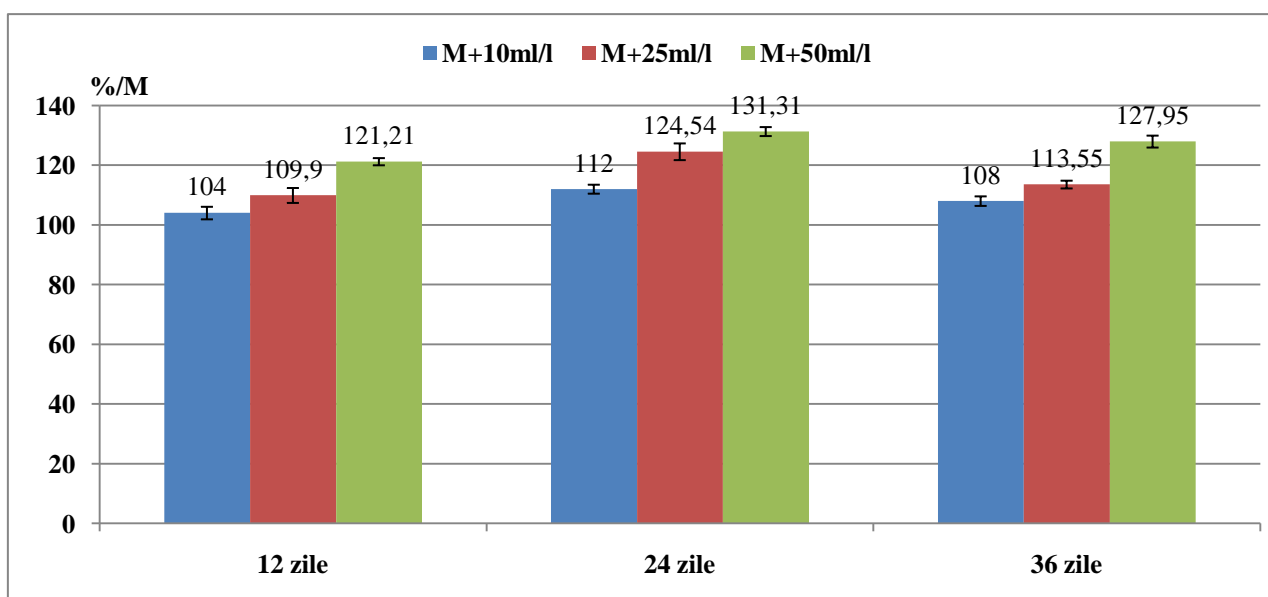
Un alt indicator aflat în studiu, a fost axat pe stabilirea procentului de prolificitate mătcilor de albine, în cazul utilizării în hrăna albinelor a siropului de zahăr suplimentat cu soluția de exometaboliți ai tulpinii de micromicete *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.11*). Rezultatul acestui studiu este reprezentat pe Fig. 4.21, de unde observăm, că cel mai înalt indicator al prolificității mătcilor de albine a avut semnificații de 134,2 % la 36 zile după administrarea soluției de exometaboliți în diluția de 25 ml/l sirop, fiind cu 34,2% mai mare comparativ cu indicele prolificității albinelor din grupa lot martor.



Nota: P<0,01

**Fig. 4.21** Prolificitatea mătcilor de albine, % față de lotul martor (M=100%) sub acțiunea EM tulpinii *Penicillium funiculosum* (*Penicilliu sp. 11*).

Următorul indice aflat sub monitorizare a fost axat pe stabilirea cantității de miere colectată pe rame, în dinamică, la 12, 24 și 36 de zile după hrănirea albinelor cu adaos de sirop în combinație cu soluția de exometaboliți ai tulpinei de micromicete *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.11*) (Fig. 4.22)



Nota: P<0,05

**Figura 4.22.** Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor (M = 100%), obținute în varianta cu utilizarea EM de *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp. 11*).

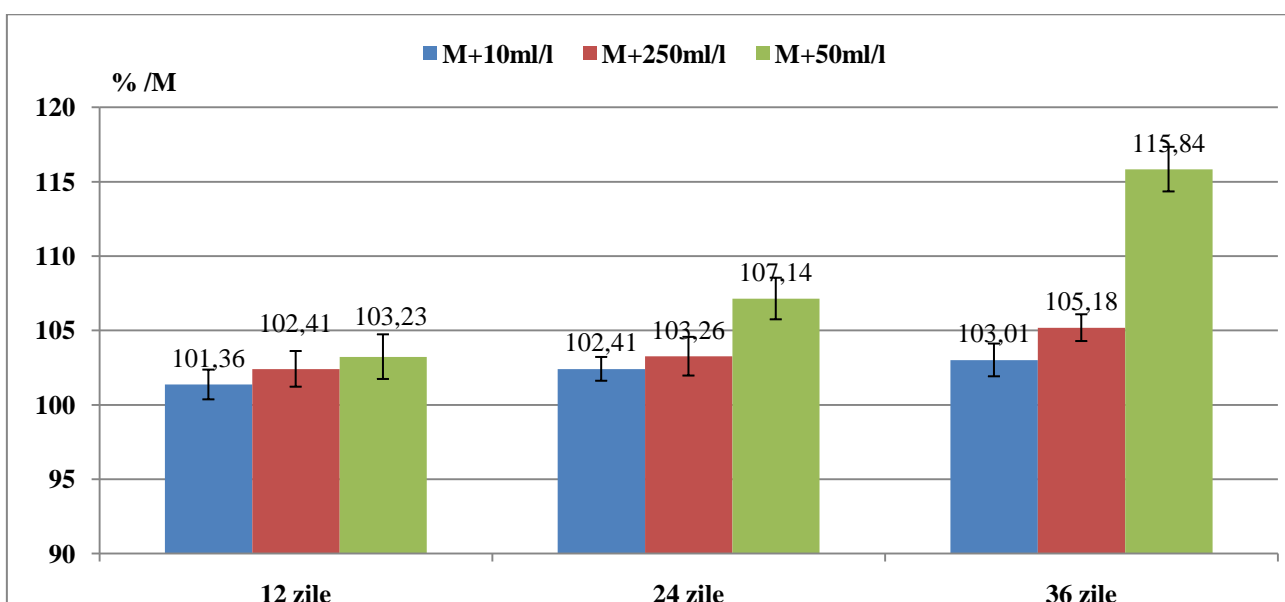
Rezultatul acestui studiu este prezentat pe Fig. 4.22, de unde observăm, că cel mai înalt procent de colectare a cantității de miere a fost stabilit la 24 de zile după alimentarea cu supliment al albinelor cu concentrația de exometaboliți în concentrația de 50ml/l de sirop, având valori de 131,31%, deci mai mult cu 31,31% comparativ cu familiile de albine din lotul martor, iar la 36 zile de la hrănirea albinelor, cu un mic decalaj, acest indicator a constituit 127,95%, sau cu 27,95% mai mare comparativ cu indicatorul albinelor din grupa lot martor.

Un alt indice este puterea familiei. Reieșind din datele obținute s-a constata că puterea familiei după 36 de zile, în cazul suplimentării hranei de albine cu exometaboliți ai tulpinii *Penicillium funiculosum*, constituie: în varianta martor 2,75 kg de albină ; în varianta M+10 ml/l EM – 4,0 kg de albină, În varianta M+25 ml/l EM – 4,31 kg de albină, și în varianta M+50ml/l EM – 4,24 kg de albină. Din datele prezentate se poate observa că, cele mai bune rezultate au fost obținute în varianta în care, în calitate de supliment în hrana albinelor, au fost utilizate 25 ml soluție de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium funiculosum* la 1 litru de soluție de zahăr de 50% și constituie 156,7% față de varianta martor (P < 0,05).

Astfel, s-a constatat că substanțele biologice active din soluția de metaboliți ai tulpinii *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp. 11*) au indirect un impact stimulator asupra funcțiilor

ovogeneze ale mătcii, contribuind la creșterea cantității de puiet căpăcit în cuib, prolificității mătcilor din familiile de albine, puterii familiilor și cantității de miere obținute [132].

O altă tulpină de micromicete, care a fost testată pe familiile de albine, a fost tulpina *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19). Exometaboliții acestei tulpini au fost administrați în aceleași doze: 10, 25 și 50 ml/l de sirop de zahăr de 50%, iar efectul produsului a fost examinat la 12, 24 și 36 zile după hrănirea familiilor de albine. Rezultatul acestui studiu este prezentat pe Fig. 4.23, 4.24 și 4.25. Pe Fig. 4.23 este reprezentat numărul de pătrate de puiet căpăcit a familiilor de albine, care au fost hrănite cu sirop de zahăr de 50 % în combinație cu exometaboliții de micromicete în cantitate de 10, 25 și 50 ml/l de sirop de zahăr. Rezultatele obținute demonstrează că, numărul cel mai înalt de pătrate de puiet căpăcit a fost obținut la 36 zile după administrarea exometaboliților de micromicete din tulpina *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.*19), în diluția 50 ml/l de sirop de zahăr, având valorile de 115,84 %, fiind cu 15,84 % mai mult comparativ cu familiile de albine din grupa lot martor. La 24 de zile după administrare, acest indice (în aceeași concentrație) a constituit 107,14%, cu 7,14% mai mare comparativ cu grupa lot martor. De menționat faptul că și la 12 zile după administrarea exometaboliților, deja a fost constatată o creștere a numărului de pătrate cu puiet căpăcit, constituind 103,23 %, fiind cu 3,13% mai mare comparativ cu grupa lot martor. În cazul administrării exometaboliților în concentrațiile de 10 și 25 ml/l sirop de zahăr, indicele numărului de pătrate de puiet căpăcit a avut variații de la 102,41 % până la 105,18 %, cu 2,41-5,18 % mai mult, comparativ cu familiile de albine din grupa lot martor.

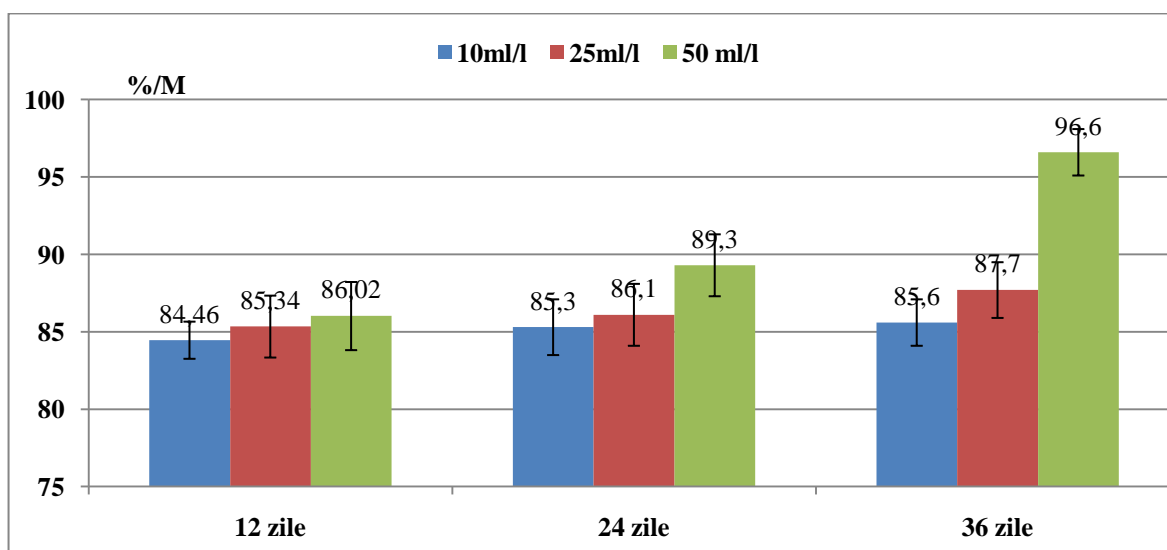


Nota: P<0,01

**Figura 4.23** Numărul de pătrate a puietului căpăcit, % față de lot martor (M=100%) tulpina *Penicillium piceum* (*P. sp.* 19)



Datele cu referire la prolificitatea mătcilor de albine, sunt prezentate pe Fig. 4.24, de unde observăm că, acest indice a avut cele mai mari valori la grupa experimentală de albine, în care albinele au fost alimentate cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu soluția de EM ai tulpinii de micromicete *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19), în doză de 50 ml/l, constituind la 36 zile de la hrănirea familiilor 96,6 %. La perioadele de examinare 12 și 24 de zile, după hrănirea familiilor de albine, în aceeași doză de 50 ml/l soluție de EM în siropul de zahăr, acest indice a constituit respectiv 86,02 % și 89,3 %. Administrarea exometaboliților în concentrații de 10 ml/l și 25 ml/l soluție de EM în siropul de zahăr au avut valori de la 84,46 % până la 85,6 %, fiind cu 12,14 % mai mică comparativ cu varianta în care doza de EM a constituit 50 ml/l în siropul de zahăr.



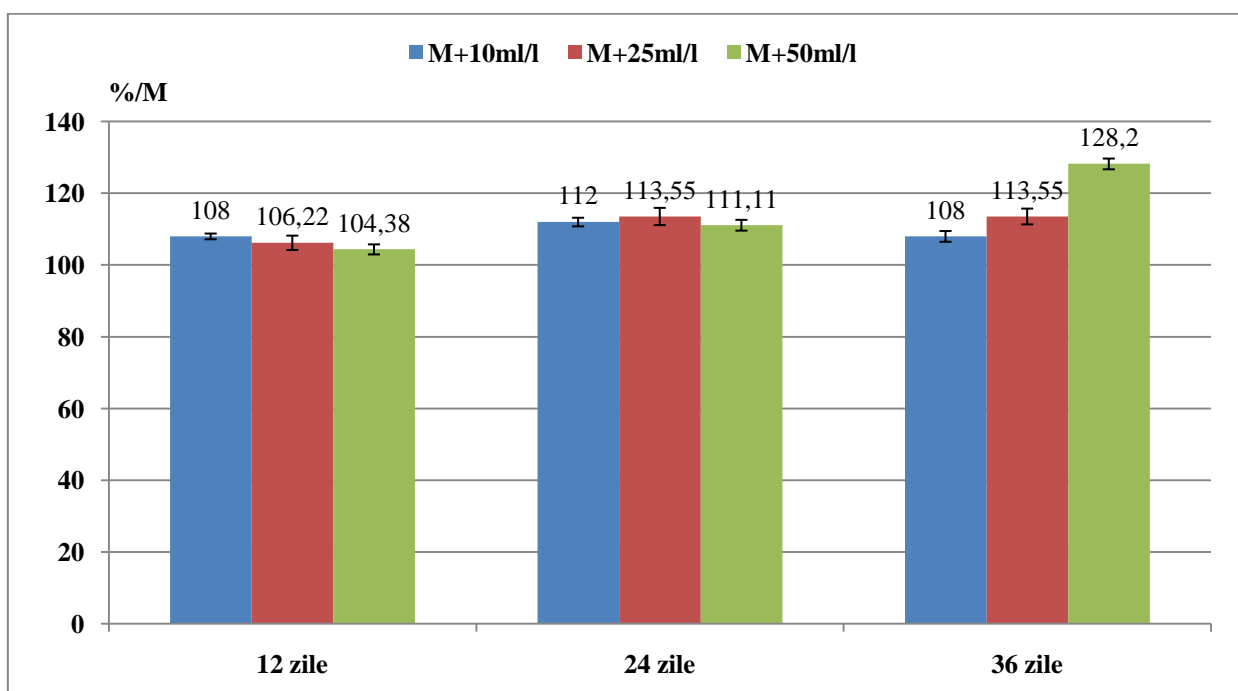
Nota:  $P < 0,01$

**Fig. 4.24 Prolificitatea, % față de lot martor (M =100%), în varianta cu soluție de EM ai tulpinii *Penicillium piceum* (*P. sp.* 19)**

Următorul indice stabilit a fost axat pe potențialul de colectare a culesului și respectiv, cantitatea de miere colectată de familiile de albine, care au fost hrănite suplimentar cu sirop de zahăr în combinație cu soluția de exometaboliți din tulpina *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19) (Fig. 4.25).

Rezultatele acestui studiu, prezentate pe Fig. 4.25, relatează că, cea mai mare cantitate de miere a fost obținută la familiile de albine care au fost hrănite cu supliment alimentar din exometaboliți ai tulpinei de micromicete *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19) în sirop de zahăr, în doză de 50 ml/l de sirop, la 36 zile de la administrarea suplimentului, indicele constituind 128,2 %, deci, cu 28,2 % mai mult comparativ cu familiile de albine din grupa lot martor. La intervalul de 12 și 24 zile de la administrare a suplimentului alimentar în aceeași doză (50 ml/l de sirop), cantitatea de miere colectată a avut indicii de la 104,34 % până la 111,11 %,

respectiv fiind cu 4,34 și 11,11 % mai mult, comparativ cu cantitatea de miere colectată de la familiile de albine din grupa lot martor.



Nota:  $P < 0,05$

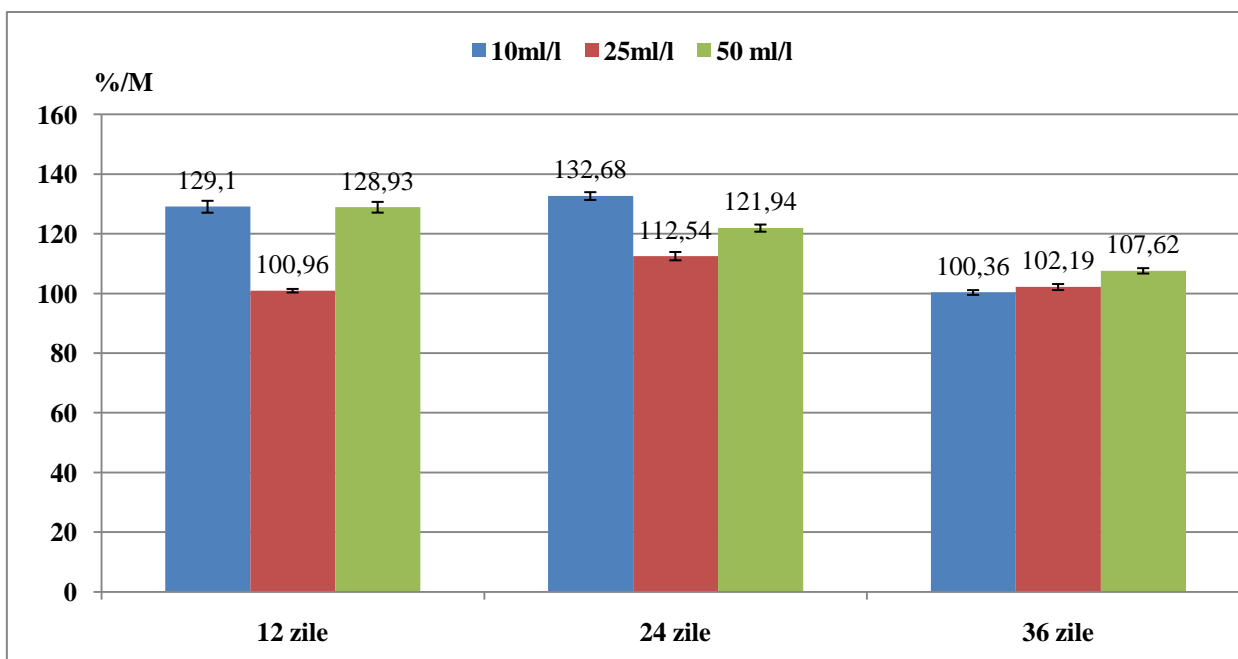
**Fig. 4.25** Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor ( $M=100\%$ ) în varianta în care hrana albinilor a fost suplimentată cu soluție de EM ai tulpinii *Penicillium piceum* (*Penicillium sp. 19*)

Conform rezultatelor obținute la familiile de albine în variantele cu utilizarea exometaboliților tulpinii *Penicillium piceum* (*Penicillium sp. 19*), în calitate de supliment în hrana albinelor, s-a constatat că, puterea familiei în varianta lot martor este de – 2,75 kg de albină; în varianta cu utilizarea soluției de EM în concentrație de 10 ml/l soluție de zahăr – 2,78 kg de albină; în varianta  $M + 25\text{ml/l}$  – 2,88 kg de albină și în varianta  $M+50\text{ ml/l}$  – 3,0 kg de albină. Astfel, rezultatele obținute în variantele cu utilizarea soluției de exometaboliți în concentrație de 10 ml/l sau 25 ml/l au fost ne semnificative, ce depășesc varianta martor cu 1,1% și 4,7% respectiv, iar în varianta în care concentrația soluției de exometaboliți a constituit 50 ml/l acest indice a constituit 112,7% , cu 12,7 % mai mult decât lotul martor ( $P < 0,05$ ).

Pe Fig. 4.26, Fig. 4.27 și Fig. 4.28 sunt prezentate rezultatele unor indici ai productivității familiilor de albine, care au fost hrănite cu sirop de zahăr în combinație cu soluția de exometaboliți ai tulpinii de micromicete *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp. 62*). Rezultatele au fost analizate la 12, 24 și 36 zile după administrarea hranei suplimentare.

Pe Fig. 4.26 este prezentat indicele cu referire la numărul de pătrate cu puiet căpăcit la 12, 24 și 36 zile după administrarea soluției de EM ai micromicetei *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.62*) în concentrațiile de 10, 25 și 50 ml/l de sirop de zahăr de 50 %. Datele prezentate relatează că cel mai mare număr de pătrate cu puiet căpăcit a fost înregistrat la

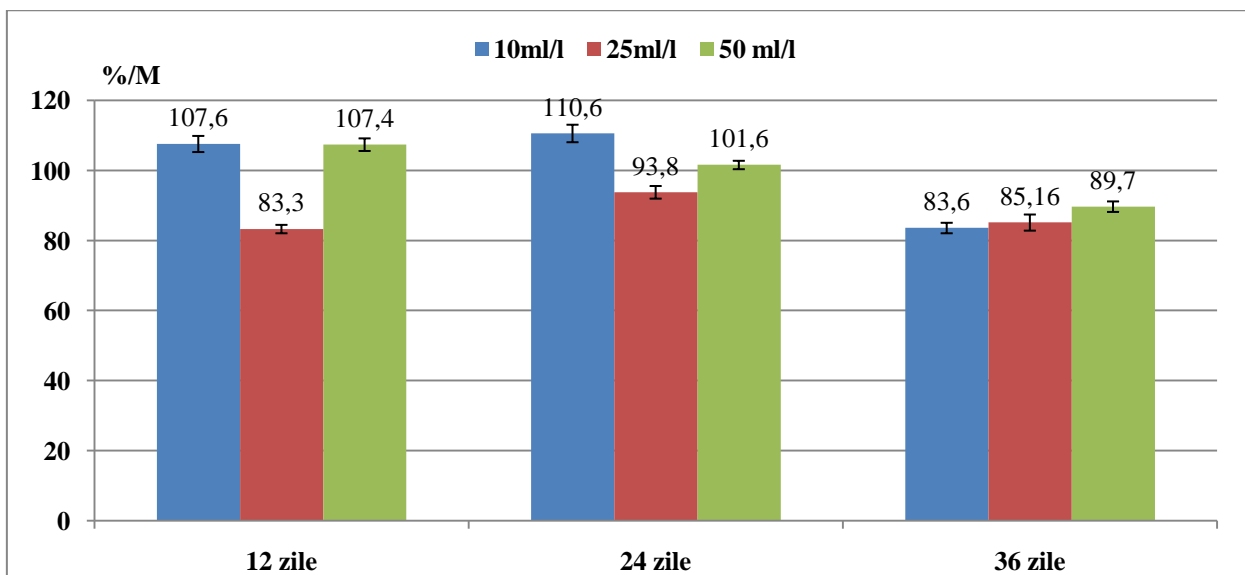
famiiliile de albine care au primit exometaboliții de micromicete din tulpina *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.* 62), la 24 de zile de la aplicarea hranei și în cazul când concentrația de exometaboliți a fost de 10 ml/l de sirop din zahăr, acest indice a constituit 132,69%, ce este cu 32,68 % mai mare comparativ cu indicile obținut la famiiliile de albine din grupa lot martor. Totuși acest indice, la famiiliile de albine, care au primit exometaboliții de micromicete în doza de 50 ml/l de sirop din zahăr, la 36 zile de la administrare a produsului, a avut valori de 100,36 %, o diferență nesemnificativă (0.36 %), comparativ cu indicele numărului de pătrate de puiet căpăcit la famiiliile de albine din grupa lot martor.



Nota:  $P < 0,01$

**Figura 4.26.** Numărul de pătrate cu puiet căpăcit, % față de lot martor ( $M=100\%$ ) în varianta cu EM ai tulpinii *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.* 62) ( $P < 0,05$ ).

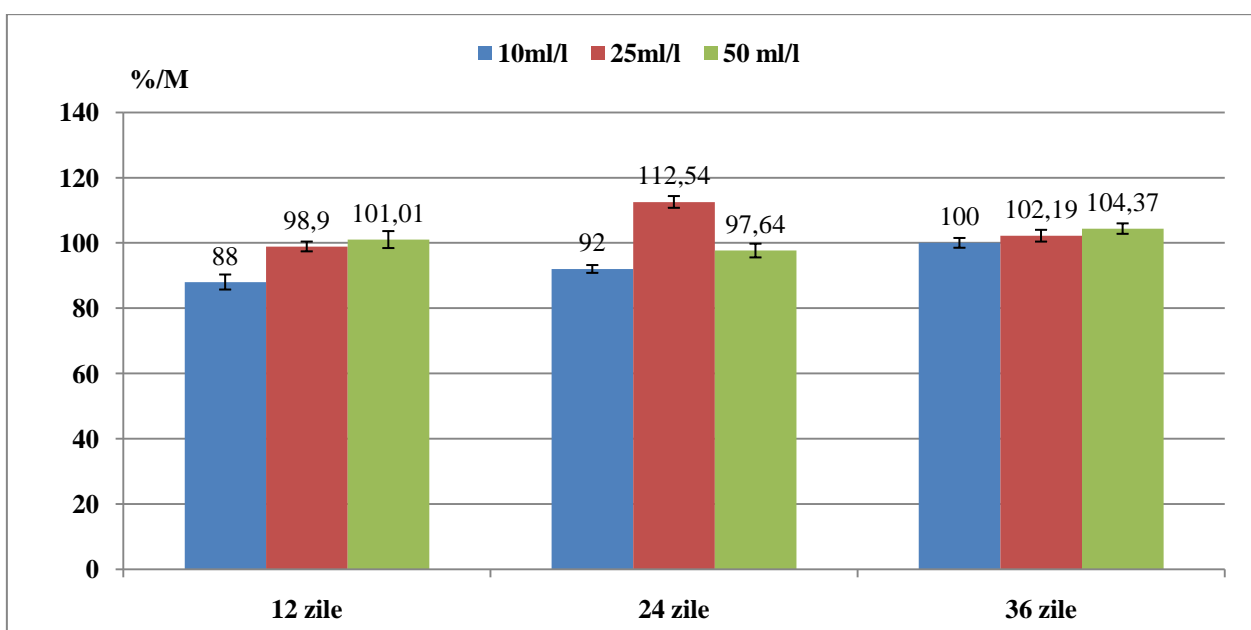
Analizând rezultatele cu referire la indicele de prolificitate mătcilor de albine după administrarea în hrana suplimentară a exometaboliților de micromicete din tulpina *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.*62) (Fig. 4.27) se poate de menționat că, cel mai înalt indice de prolificitate (110,6 %) a fost înregistrat la famiiliile de albine la 24 de zile de la administrare în hrană a exometaboliților din micromicete în doză de 25 ml/l de sirop de zahăr. Acest indice a fost cu 10,6 % mai mare comparativ cu famiiliile de albine din grupa lot martor. În același timp s-a observat o dinamică în creștere a acestui indice (107,6%) începând cu intervalul de 12 zile după administrarea suplimentului alimentar. Însă acest indice a fost relativ mai mic la 36 de zile de la administrarea suplimentului, având valori numai de 83,6%.



Nota: P<0,01

**Fig. 4.27. Prolificatarea mătcilor de albine, % față de lot martor (M=100%) la administrarea soluției de EM ai tulpinii *Penicillium corylophilum* (*P. sp. 62*)**

Cu referire la indicele cantității de miere pe ramă (Fig. 4.28), la grupele familiilor de albine, care au primit exometaboliții tulpinii de micromicete *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp. 62*), se poate de menționat că, cel mai mare cules (miere pe fagurile din stup) au fost înregistrate la 24 de zile de la hrănirea albinelor cu exometaboliți în doza de 25 ml/l de sirop de zahăr. Acest indice a avut valori de 112,54 %, ce a constituit cu 12,54 % mai mult comparativ cu albinele din grupa lot martor.



Nota: P<0,05

**Fig. 4.28. Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor, tulpina *Penicillium corylophilum* (*P. sp. 62*).**

Nu s-a observat o diferență semnificativă a acestui indice la 12 și 36 de zile de la administrarea suplimentului de hrană în aceeași concentrație, având o diferență de doar 3,29 %. Astfel, putem concluziona că administrarea în calitate de supliment în hrana albinelor a soluției de EM ai tulpinii *Penicillium corylophilum* nu influențează practic asupra cantității de miere a familiei de albine. Valorile obținute în acest caz în majoritatea cazurilor au variat în limitele variantei lot martor.

Indicele puterea familiei în cazul hrănirii albinelor cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu soluție de EM ai tulpinii *Penicillium corylophilum* (*Penicillium* sp. 62) a constituit în variant martor – 2,75 kg de albină, în varianta M + 10 ml/l soluție de EM - 2,7575 kg de albină ( $P < 0,05$ ).; în variant M + 25 ml/l soluție de EM – 2,92 kg de albină și în varianta M + 50 ml/l soluție de EM – 3,2 kg de albină. Astfel, conform rezultatelor obținute acțiunea soluției de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium corylophilum*, suplimentată în hrana albinelor, influențează nesemnificativ asupra familiilor de abbine. Cele mai bune rezultate – 116,4% față de matror ( $P < 0,05$ ) au fost înregistrate în varianta în care concentrația soluției de exometaboliți a constituit 50ml/l.

#### **4.7. Măsuri sanitare veterinare la stupinele contaminate cu boli contagioase.**

De regulă tratamentele medicamentoase de combatere a bolilor sau de fortificare a familiilor de albine din unitățile contaminate sunt însoțite obligatoriu de mijloace de dezinfecție și de următoarele măsuri:

- elaborarea examenului sanitar periodic al întregului efectiv de către medicul veterinar la toate familiile de albine în lunile martie - aprilie și august - septembrie;
- îndeplinirea tratamentelor de control pentru ectoparaziți;
- de întreprins măsuri de tratament a familiilor bolnave și de prevenire a răspândirii bolilor la celelalte familii de albine din stupină, în conformitate cu legea sanitar-veterinară;
- inițierea procedurii de iradicarea familiilor de albine prin ardere, afectate de boli bacteriene (loca americană, loca europeană);
- de menționat că, familiile de albine cu semne clinice de boli infecto-contagioase nu pot fi deplasate la pastoral decât după vindecarea lor;
- ca măsuri obligatorii sunt și restricțiile cu referire la stupinele infectate cu boli infectocontagioase și parazitare supuse declarației obligatorii să nu practice stupăritul pastoral;
- de interzis comercializarea materialului biologic infectat sau parazitat;
- amplasarea stupilor să se facă astfel încât albinele să aibă suficiente puncte de reper, pentru a preveni rătăcirea lor (nu se amplasează lângă antene GSM sau linii de înaltă tensiune, transformatoare electrice);

- de împiedica furțișagul prin evitarea lucrului în familia de albine pe timpul zilei;
- de fiecare dată, aplicarea tratamentelor medicamentoase și a măsurilor de igienă stabilite se face asociat cu complexul de măsuri biologice privind păstrarea sănătății albinelor;
- perspectivele și tendința actuală se referă la folosirea plantelor medicinale în combaterea bolilor la albine, întărirea rezistenței naturale a familiei de albine și restrângerea folosirii mijloacelor medicamentoase în combaterea agenților etiologici;
- mijlocele de prevenire a intoxicațiilor la albine se face prin măsuri pentru protecția familiilor de albine împotriva intoxicațiilor cu pesticide.
- contribuția la menținerea stării de sănătate a familiilor de albine prin efectuarea controalelor sanitare veterinare periodice prin examene de laborator pentru bolile cu notificare internă;
- o recomandare specifică se atribuie pentru stupinile de selecție și vânzarea de material biologic (roiuri, mătcă), cărora li se recomandă verificarea sanitar - veterinară a materialului biologic comercializat și a parametrilor reproductivi (stupini de selecție);
- fiecare stupină este obligatoriu să fie înregistrată, să se ducă evidența registrului de evaluare al stupinei (carnet de stupina) și în care să se consemneze etapele tehnologice și tratamentele efectuate.

#### **4.8. Concluzii la compartimentul 4.**

1. Cercetările bacteriologice efectuate la familiile de albine după perioada iernatului au demonstrat că, în stupine există o combinație de forme bacteriene din genurile precum *E. coli*, care au reprezentat peste 50%, o asociere de bacterii din genul *Streptococi*, *Stafilococi* cu o pondere de până la 30%, până la 5 % formele de bacterii din genul *Salmonella spp.* și unele forme de fungi cu o pondere de 15%.
2. Evaluarea indicilor de sănătate ai familiilor de albine primăvara (% albinelor moarte, cantitatea de miere rămasă, comportamentul albinelor, activitatea de zbor, prezența mușgaiului, modul de căpăcire, rezistența la iernat), care au fost hrănite cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu soluții de exometaboliți ai micromicetelor *Penicillium sp. 11*, *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 62* au demonstrat o îmbunătățire a tuturor indicilor comparativ cu varianta martor.
3. Cantitatea optimă de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium sp. 11*, *Penicillium sp. 62* și *Penicillium sp. 91*, suplimentată în hrana albinelor toamna pentru îmbunătățirea indicilor de sănătate a albinelor pe perioada iernării, este de 25-50 ml/l soluție de zahăr de 50%.
4. Monitorizarea în dinamică (12, 24, 36 zile) a indicilor la familiile de albine: numărul de pătrate cu puiet căpăcit, prolificitatea, cantitatea de miere pe ramă, puterea familiei, în

variantele montate (lot matror și variantele cu utilizarea ca supliment în hrana albinelor primăvara devreme a soluției de EM a tulpinii *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.* 11) a demonstrat o stimulare a tuturor indicilor indiferent de concentrația testată (10, 25, 50 ml/l), maximul fiind înregistrat la concentrația de 25 ml/l și variază în limitele 124 - 161%, comparativ cu varianta martor.

5. Suplimentarea în hrana albinelor primăvara a soluțiilor de exometaboliții ai tulpinilor *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19) sau *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.* 62), au influențat nesemnificativ asupra indicilor productivi ai familiilor de albine indiferent de concentrația utilizată, durata 36 zile de monitorizare.

## CONCLUZII GENERALE

1. Au fost identificate 2 tulpini de micromicete: *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97 cu potențial antimicrobian față de bacteria *Paenibacillus larvae*, agent patogen al lozii americane și *Melissococcus plutonius*, agent patogen al lozii europene. Zonele de inhibiție a patogenilor menționați sub acțiunea exometaboliților acestor tulpini variază în limitele 15,5 - 34,0 mm.
2. Au fost determinate tulpinile *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20 (*Penicillium sp.* 62) și *Penicillium sp.* 97, care manifestă o sensibilitate semnificativă față de fitopatogenii *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*, agenți patogeni ai aspergilozei cu zone de inhibiție de 29 mm, 28,5 mm și respectiv 33,5 mm și 15,5 mm.
3. S-a demonstrat că, exometaboliții tulpinile *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.* 11) și *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19), posedă o înaltă activitate a catalazei de 430 U/ml și 600 U/ml respectiv, pot fi utilizate ca supliment în hrana albinelor în calitate de antioxidanți.
4. A fost stabilită tehnica de obținere a unor produse antimicrobiene și antioxidante pe baza micromicetelor: *Penicillium sp.* 91, *Penicillium sp.* 97, *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62 pentru aplicarea în apicultură. Aceasta constă în cultivarea submersă a tulpinilor de micromicete cu ulterioara tratare termică a soluțiilor de exometaboliți obținute la temperatura de 60°C, timp de 1 oră.
5. S-a constatat că, după perioada iernatului în stupinele de albime există o combinație de forme bacteriene din genurile: *E. coli*, care reprezintă peste 50%, o asociere de bacterii din genul *Streptococi*, *Stafilococi* cu o pondere de până la 30%, până la 5 % formele de bacterii din genul *Salmonella spp.* și unele forme de fungi cu o pondere de 15%.
6. A fost demonstrat că, utilizarea soluțiilor de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.* 11.), *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp.* 62) și *Penicillium sp.* 91 în concentrație de 25 ml/l - 50 ml/l, înainte de iernat, contribuie la îmbunătățirea indicilor de sănătate a albinelor: % de albime moarte după iernat, cantitatea de miere rămasă din iarnă (%), rezistența la iernare, modul de căpăcire, comportamentul albinelor și activitatea de zbor, după iernare.
7. S - a demonstrat că, soluția de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.* 11), suplimentată în hrana albinelor în concentrație de 25 ml/l soluție de zahăr de 50%, primăvara timpuriu, contribuie la majorarea indicilor de productivitate față de matror: numărului de larve căpăcite cu 61%, prolificitate cu 34,2%, cantitatea de miere pe ramă 13%, puterea familie de albime cu 56,7%.



**Aportul personal.** Rezultatele obținute și analiza acestora, concluziile conform temei abordate aparțin integral autorului. În comun cu colegii din cadrul Siguranța Alimentelor și Sănătate Publică a facultății de Medicină Veterinară UTM și Colecției Naționale de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie a fost obținut o cerere de brevete de invenție, astfel autorului îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor

**Noutatea și originalitatea științifică.** Au fost identificate tulpini de micromicete din genul *Penicillium*, ca producători de substanțe bioactive care pot fi utilizate pentru profilaxia și combaterea bacteriei locei americane (*Paenibacillus larvae*) și europene (*Melissococcus plutonius*) și a aspergilozei la familiile de albine *Apis mellifera*. Au fost obținute produse pe baza micromicetelor identificate cu acțiune antioxidantă, bactericidă, fungicidă și de stimulare a creșterii familiilor de albine. A fost stabilită componența bacteriologică a microflorei din stupinele de albine. A fost demonstrată acțiunea pozitivă a hranei suplimentată cu exometaboliți din micromicete *Penicillium funiculosum* și *Penicillium corylophilum* asupra indicilor de sănătate a albinelor în perioada de după iernare și efectul pozitiv asupra stimulării indicilor productivi ai familiilor de albine.

**Rezultatele științifice principale, care au contribuit la soluționarea problemei științifice importante.**

Folosirea antibioticelor pentru controlul bolilor contagioase la puietul familiilor de albine este limitată sau interzisă din cauza apariției reziduurilor în produsele apicole. Ca alternativă a antibioticelor sunt propuse soluțiile de exometaboliți, obținute în baza micromicetelor din genul *Penicillium*, cu potențial antimicrobian și anti oxidativ pentru profilaxia și combaterea unor boli bacteriene și fungice, de asemenea sunt recomandate pentru utilizare ca supliment alimentar în hrana albinelor pentru stimularea indicilor de sănătate și productivi ai familiilor de albine.

**Semnificația teoretică.** Datele obținute prezintă interes teoretic pentru domeniul apicol ca produse alternative ecologice pentru înlocuirea antibioticelor, dar și ca material pentru studiul de perspectivă.

**Valoarea aplicativă.** Pentru profilaxia și combaterea aspergilozei, locei americane și europene sunt propuse soluțiile de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium* sp. 91 și *Penicilium* sp. 97, iar soluția de exometaboliți ai micromicetei *Penicillium funiculosum* în calitate de supliment alimentar în hrana albinelor pentru stimularea indicilor de sănătate înainte de iernat și după iernat, pentru stimularea indicilor productivi ai familiilor de albine *Apis mellifera*.

**Implementarea rezultatelor științifice.** Rezultatele obținute au fost implimentate la stupinile de albine a 2 gospodării țărănești (2 acte de implementare), vor fi utilizate ca material teoretic și practic pentru apicultorii din republică în scopul controlului bolilor contagioase la puietul

famiiliilor de albine, sunt folosite ca material didactic în procesul de instruire a studenților la Facultatea de Medicină Veterinară a UTM (act de impilentare).

**Rezultatele științifice obținute în lucrare au fost aprobate la următoarele foruri științifice naționale și internaționale:** Al III Simpozion național cu participare internațională. Micromicete – perspectivi producători de substanțe bioactive. Biotehnologii avansate – realizări și perspective. Chișinău, 2013; *Scientific international conference on microbial biotechnology (2nd edition)*, Chișinău, 2014; 82 International scientific conference of young scientist and students "Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution", Kyiv, 2016; Conferința științifico-practică cu participare internațională, cu genericul „Gestionarea fondului genetic animalier – probleme, soluții, perspective”, Chișinău, 2023; „Salon of Invention and Innovative Entrepreneurship”, Chișinău, 2023. Salonul internațional UGAL-INVENT, .2023, Galați, România.

**Rezultatele științifice** obținute în lucrare sunt publicate în 12 lucrări științifice, dintre care: 6 articole în reviste din străinătate recunoscute; 3 articole în culegeri științifice, 3 teze în culegeri științifice; 1 cerere de brevet de invenție și 2 materiale la saloanele de invenții.

#### **RECOMANDĂRI PRACTICE**

1. Se propune utilizarea soluțiilor de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97, ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă pentru profilaxia stupinelor de albine, contra locii americane și locii europene.
2. Pentru profilaxia și combaterea fungilor *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai aspergilozei la albine se recomandă utilizarea exometaboliților micromicetei *Penicillium sp.* 97 și *Penicillium sp.* 11.
3. Pentru profilaxia infecțiilor bacteriene și fungice, dar și stimularea famiiliilor de albine se recomandă ca supliment în hrană soluția de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium funiculosum* în concentrație de 25 ml/l de sirop de zahăr de 50%, câte 200 ml de amestec la ramă.

## BIBLIOGRAFIE

1. ABOU-SREEA A.I.B., CLARA R. AZZAM C.R., AL-TAWEEL S.K., ABDEL –AZIZ R.M., BELAL H.E.E., RADY M.M., ABDEL-KADER A.A.S., MAJRASHI A. AND KHALED K.A.M. Natural biostimulant attenuates salinity stress effects in chili pepper by remodeling antioxidant, ion, and phytohormone balances, and augments gene expression. In: *Plants* [online]. 2021, 10, 2316 [citat 20.07.2023]. ISSN: 2223-7747. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/plants10112316>.
2. AJELLO, L., GEORG, L.K., KAPLAN, W., KAUFMAN, L. *CDC laboratory manual for medical mycology*. PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1963.
3. ALAUX, C. LE CONTE, Y., DECOURTYE, A. Pitting wild bees against managed honey bees in their native range, a losing strategy for the conservation of honey bee biodiversity. In: *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2019, Vol. 7. ISSN 2296-701X. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00060>
4. ALBERONI, D. *Beneficial microorganisms for honey bees health*: PhD thesis in biology. Bologna, 2018, 160 p.
5. ALBERONI, D., BAFFONI, L., GAGGIÀ, F., RYAN, P.M., MURPHY, K., ROSS, P.R., et al. Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. In: *Beneficial Microbes* [online]. 2018, nr. 2 (9), pp. 269–278 [citat 20.07.2023]. ISSN 1876-2891. Disponibil: <http://doi.org/10.3920/bm2017.006>.
6. ALGHAMDI A.G., EL-SAEID M.H., ALZHRANI A.J., IBRAHIM H.M. Heavy metal pollution and associated health risk assessment of urban dust in Riyadh, Saudi Arabia. In: *PLoS ONE* 17(1): e0261957 [online]. 2022. [citat 23.07.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0261957>
7. ALLEN, M.F., BALL, B.V. The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. In: *Journal of Apicultural Research*. 1993, nr. 2 (32), pp. 80–88. ISSN 0021-8839.
8. ANDERSON, K.E., SHEEHAN, T.H., MOTT, B.M., MAES, P., SNYDER, L., SCHWAN, M.R., et al. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). In: *PLoS ONE* [online]. 2013, nr. 8 (12) [citat 23.07.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI:10.1371/journal.pone.0083125.
9. ARONSTEIN, K.A., MURRAY, K.D. Chalkbrood disease in honey bees. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010, 103, pp. 20–29. ISSN 0022-2011 (print).

10. ASIMINEI, S.V. *Patologia albinei melifere*. Iași: Ion Ionescu de la Brad, 2016. 409 p. ISBN 978-973-147-224-9.
11. AUDISIO, M.C. Gram-positive bacteria with probiotic potential for the *Apis mellifera* L. Honey bee: the experience in the Northwest of Argentina. In: *Probiotics Antimicrobial Proteins* [online]. 2017, nr. 1 (9), pp. 22–31 [citată 02.06.2021]. . ISSN 1867-1306. Disponibil: DOI: 10.1007/s12602-016-9231-0.
12. AUDISIO, M.C., TORRES, M.J., SABATÉ, D.C., IBARGUREN, C., APELLA, M.C. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. In: *Microbiological Research*. [online]. 2011, nr. 1 (166), pp. 1–13 [citată 23.06.2023]. ISSN 0944-5013. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003>.
13. BAFFONI, L., GAGGIÀ, F., ALBERONI, D., CABBRI, R., NANETTI, A., BIAVATI, B. Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. In: *Beneficial Microbes* [online]. 2016, nr. 1 (7), pp. 45–51 [citată 05.06.2022]. . ISSN 1876-2891. Disponibil: DOI: 10.3920/BM2015.0085
14. BAILEY, L., COLLINS, M.D. Reclassification of ‘*Streptococcus pluton*’ (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. In: *Journal of Applied Bacteriology*. 1982, nr. 2 (53), pp. 215–217. ISSN 1364-5072.
15. BÂRZOI, D., APOSTU, S. *Microbiologia produselor alimentare*. Editura Risoprint, Cluj-Napoca, 2003. 592 p.
16. BECCHIMANZI, A., NICOLETTI R. *Aspergillus*-bees: A dynamic symbiotic association. In: *Frontiers in Microbiology*. 2022, nr. 13. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2022.968963.
17. BIELIK, B., MOLNAR, L., VRABEC, V., ANDRAŠIOVA, R., MARUŠČAKOVA, I.C., NEMCOVA, R., et al. Biofilm-forming lactic acid bacteria of honey bee origin intended for potential probiotic use. In: *Acta Veterinaria Hungarica* [online]. 2021, nr. 4 (68), pp. 345–353 [citată 23.06.2023]. ISSN 1588-2705. Disponibil: <https://doi.org/10.1556/004.2020.00057>.
18. BIGIO, G., SCHÜRCH, R., RATNIEKS, F.L.W. Hygienic behavior in honey bees (*Hymenoptera: Apidae*): effects of brood, food, and time of the year. In: *Journal of Economic Entomology* [online]. 2013, nr. 6 (106), pp. 2280–2285 [citată 25.06.2019]. ISSN 1938-291X . Disponibil: <https://doi.org/10.1603/EC13076>.
19. BIXBY, M., SCARLETT, R., HOOVER, S.E. Winter mortality, diversification, and self-sufficiency affect honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colony profit in Canada: a model of commercial Alberta beekeepers. In: *Journal of Economic Entomology* [online]. 2023, nr. 3 (116), pp. 686–696 [citată 03.08.2023]. ISSN 1938-291X. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/jee/toad056>

20. BRODSCHNEIDER, R., GRAY, A., ADJLANE, N., BALLIS, A., BRUSBARDIS, V., CHARRIÈRE, J.-D., et al. Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. In: *Journal of Apicultural Research* [online]. 2018, nr. 3 (57), pp. 452–457 [citat 27.05.2020]. ISSN 0021-8839. Disponibi: DOI:10.1080/00218839.2018.1460911.
21. BRODSCHNEIDER, R., SCHLAGBAUER, J., ARAKELYAN, I., BALLIS, A., BRUS, J., BRUSBARDIS, V., et al. Spatial clusters of *Varroa destructor* control strategies in Europe. In: *Journal of Pest Science* [online]. 2022, 96, pp. 759–783 [citat 21.06.2023]. ISSN 1612-4766. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01523-2>.
22. BUGNEAC V. Controlul statusului igienic și microbial la familiile de albine prin utilizarea unor produse din micromicete. Conferința științifică – practică cu participare internațională „Gestionarea fondului genetic animalier – probleme, soluții, perspective”. Culegeri de lucrări. Maximovca 2023, p. 361—368. ISBN 978-9975-175-38-8.
23. BUGNEAC V. Tulpini de micromicete - sursă potențială de principii bioactive cu aplicare în apicultură. Conferința științifică – practică cu participare internațională „Gestionarea fondului genetic animalier – probleme, soluții, perspective”. Culegeri de lucrări. Maximovca 2023, p. 471 - 475. ISBN 978-9975-175-38-8.
24. BUGNEAC V., SÎRBU T., STARCIUC N. Studiul proprietăților morfo-culturale și biosintetice ale micromicetelor în dependență de mediul de cultură. *Intellectus*, nr. 2, 2023, pp. 123-130. ISSN 1810-7087. <https://agepi.gov.md/ro/intellectus/intellectus>.
25. BULIMAGA, Valentina, RUDIC, Valeriu, DERJANSCHII, Valeriu, TODERAȘ, Lidia, BOGDAN, Valeriu. *Procedeu de obținere a suplimentelor pentru hrănirea albinelor și procedee de hrănire a familiilor de albine*. Brevet de invenție 3158 (13) G 2, A01K 59/00 (2006.01), A23K 1/18 (2006.01). Nr. depozit a 2005 0162. Data depozit 09.06.2005. Publicat 31.10.2006. In: BOPI. 2006, nr. 10, p. 22.
26. BURȚEVA, S., DERJANSCHII, V., POSTOLACHI, O., RASTIMEȘINA, I., RUDIC, V. *Metodă de profilaxie și tratament al locei americane a albinelor*. Brevet de invenție 20 (13) Z, A01K 53/00 (2006.01); A01K 51/00 (2006.01); A23K 1/17 (2006.01); A61K 35/66 (2006.01); C12N 1/14 (2006.01); C12R 1/465 (2006.01). Nr. depozit s 2008 0038. Data depozit 18.12.2008. Publicat 31.05.2009. In: BOPI. 2009, nr. 5, p. 42.
27. BUTLER E, ALSTERFJORD M, OLOFSSON TC, KARLSSON C, MALMSTRÖM J, VÁSQUEZ A. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress [online]. In: *BMC Microbiol* 2013;13:235. Published online 2013 Oct 22 [citat 09.08.2023]. ISSN 1471-2180 Disponibil: DOI: 10.1186/1471-2180-13-235

28. BUTLER, E., OIEN, R.F., LINDHOLM, C., OLOFSSON, T.C., NILSON, B., VÁSQUEZ, A. A pilot study investigating lactic acid bacterial symbionts from the honeybee in inhibiting human chronic wound pathogens. In: *International Wound Journal* [online]. 2016, nr. 5 (13), pp. 729–737 [citat 09.06.2019]. ISSN 1742-4801. Disponibil: DOI: 10.1111/iwj.12360.
29. CARR-MARKELL, M.K., DEMLER, C.M., COUVILLON, M.J., SCHÜRCH, R., SPIVAK, M. Do honey bee (*Apis mellifera*) foragers recruit their nestmates to native forbs in reconstructed prairie habitats? In: *PLoS One*. 2021 [online]. nr. 11 (16) [citat 19.08.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0259603.
30. CASANELLES-ABELLA, J., FONTANA, S., FOURNIER, B., FREY, D., MORETTI, M. Low resource availability drives feeding niche partitioning between wild bees and honeybees in a European city. In: *Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America* [online]. 2023, nr. 1 (33) [citat 11.06.2023]. ISSN 1939-5582. Disponibil: DOI: 10.1002/eap.2727.
31. CILIA, G., FRATINI, F., TAFI, E., TURCHI, B., MANCINI, S., SAGONA, S., et al. Microbial profile of the ventriculum of honey bee (*Apis mellifera ligustica* Spinola, 1806) fed with veterinary drugs, dietary supplements and non-protein amino acids. In: *Veterinary Sciences* [online]. 2020, nr. 2 (7), [citat 20.07.2023]. ISSN 2306-7381. Disponibil: DOI: 10.3390/vetsci7020076.
32. CLAIR, A.L.S., BEACH, N.J., DOLEZAL, A.G. Honey bee hive covers reduce food consumption and colony mortality during overwintering. In: *PLoS ONE* [online]. 2022, nr. 4 (17), [citat 19.05.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0266219.
33. CLARK, T.B. Honey bee spiroplasmiasis, a new problem for beekeepers. In: *American Bee Journal* [online]. 1978, nr. 118, pp. 18–19 [citat 19.05.2023]. ISSN 0002-7626. Disponibil: DOI: 10.1002/mbo3.172
34. CORBY-HARRIS, V., SNYDER, L., MEADOR, C.A.D., NALDO, R., MOTT, B., ANDERSON, K.E. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. In: *Journal of Economic Entomology* [online]. 2016, nr. 2 (109), pp. 537–543 [citat 05.04.2023]. ISSN 1938-291X. Disponibil: DOI: 10.1093/jee/tow012.
35. CROTTI, E., SANSONNO, L., PROSDOCIMI, E.M., VACCHINI, V., HAMDI, C., CHERIF, A., et al. Microbial symbionts of honeybees: A promising tool to improve honeybee health. In: *New Biotechnology* [online]. 2013, nr. 6 (30), pp. 716–722 [citat 17.06.2021]. ISSN 1876-4347. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.05.004>
36. DAGENAIS, T.R.T., KELLER, N.P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. In: *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2009, nr. 3 (22), pp. 447–465 [citat 17.06.2021]. ISSN 1098-6618. Disponibil: DOI: 10.1128/CMR.00055-08.

37. DE PIANO, F.G., MAGGI, M.D., MEROI ARCEITTO, F.R., AUDISIO, M.C., EGUARAS, M., RUFFINENGO, S.R. Effects of bacterial cell-free supernatant on nutritional parameters of *Apis mellifera* and their toxicity against *Varroa destructor*. In: *Journal of Apicultural Science* [online]. 2020, nr. 1 (64), pp. 55–66 [citat 11.06.2023]. ISSN 2299-4831. Disponibi: <https://doi.org/10.2478/jas-2020-0009>
38. DEBELEAC, L., POPESCU-DRÂNDA, M.C. *Microbiologie*. București: Ed. Amaltea, 1994. 340 p. ISBN 973-96286-0-5.
39. DEGRANDI-HOFFMAN, G., CORBY-HARRIS, V., DEJONG, E.W., CHAMBERS, M., HIDALGO, G. Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. In: *Apidologie* [online]. 2017, nr. 48, pp. 340–352 [citat 11.06.2023]. ISSN 1297-9678. Disponibil: DOI:10.1007/s13592-016-0478-y
40. DÉMARES, F.J., SCHMEHL, D., BLOOMQUIST, J.R., CABRERA, A.R., HUANG, Z.Y., LAU, P., et al. Honey bee (*Apis mellifera*) exposure to pesticide residues in nectar and pollen in urban and suburban environments from four regions of the United States. In: *Journal Environmental Toxicology and Chemistry*. 2022, nr. 4 (41), pp. 991–1003. ISSN 1552-8618.
41. DHARAMPAL, P.S., CARLSON, C., CURRIE, C.R., STEFFAN, S.A. Pollen-borne microbes shape bee fitness. In: *Proceedings: Biological Sciences* [online]. 2019, nr. 1904 (286) [citat 05.08.2023]. ISSN 1471-2954. Disponibil: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2894>.
42. DICKEL, F., BOS, N.M.P., HUGHES, H., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M., KLEISER, A., et al. The oral vaccination with *Paenibacillus larvae* bacterin can decrease susceptibility to American Foulbrood infection in honey bees - A safety and efficacy study. In: *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2022, nr. 9 [citat 02.07.2023]. ISSN 2297-1769. Disponibil: DOI: 10.3389/fvets.2022.946237.
43. DOLIS, M. *Apicultura practică*. Iași: Alfa, 2004. 268 p. ISBN 973-8278-44-9.
44. DONG, S., LIN, T., NIEH, J.C., TAN, K. Social signal learning of the waggle dance in honey bees. In: *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2023, nr. 6636 (379), pp. 1015–1018 [citat 15.08.2023]. ISSN 0036-8075. Disponibil: doi: 10.1126/science.ade1702.
45. EBELING, J., REINECKE, A., SIBUM, N., FÜNFFHAUS, A., PAUMEIER, P., OTTEN, C., et al. A comparison of different matrices for the laboratory diagnosis of the epizootic American foulbrood of honey bees. In: *Veterinary Sciences* [online]. 2023, nr. 2 (10) [citat 12.09.2023]. ISSN 2306-7381. Disponibil: DOI: 10.3390/vetsci10020103.
46. EGERER, M., KOWARIK, I. Confronting the modern gordian knot of urban beekeeping. In: *Trends in Ecology and Evolution* [online]. 2020, nr. 11 (35), pp. 956–959 [citat 23.09.2023]. ISSN 1872-8383. Disponibil: DOI: 10.1016/j.tree.2020.07.012.

47. EL AGREBI, N., STEINHAEUER, N., TOSI, S., LEINARTZ, L., DE GRAAF, D.C., SAEGERMAN, C. Risk and protective indicators of beekeeping management practices. In: *Journal Science of the Total Environment* [online]. 2021, nr. 799 [citată 07.05.2023]. ISSN 0048-9697. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149381>
48. EREMIA, N. *Apicultura*. Ch.: IEFS, 2009. 332 p. ISBN 978-9975-9823-6-8.
49. EREMIA, Nicolae, CRASOCICO, Petru, ZAGAREANU, Andrei, BAHCIIVANJI, Mihail, CAISÎN, Larisa, COVALENCO, Alexei, EREMIA, Nina. *Procedeu de creștere a familiilor de albine*. Brevet de invenție de scurtă durată, 538 (13) Z, A01K 53/00 (2006.01); A23K 1/16 (2006.01). Data depozit 30.01.2012. Publicat 31.08.2012. In: BOPI. 2012, nr. 8, pp. 23-24.
50. EREMIA, Nicolae, MODVALA, Susana, ZAGAREANU, Andrei, CAISÎN, Larisa, NARAEVSCAIA, Ina. *Procedeu de hrănire a albinelor*. Brevet de invenție, 812 (13) Z, A01K 53/00 (2006.01); A01K 59/00 (2006.01); A23K 1/16 (2006.01). Data depozit 06.02.2014. Publicat 30.09.2014. In: BOPI. 2014, nr. 9, p. 29.
51. ERLER, S., LEWKOWSKI, O., POEHLEIN, A., FORSGREN, E. The curious case of *Achromobacter eurydice*, a Gram-variable pleomorphic bacterium associated with European foulbrood disease in honeybees. In: *Microbial Ecology* [online]. 2018, nr. 1 (75), pp. 1–6 [citată 19.08.2022]. ISSN 1432-184X. Disponibil: DOI: 10.1007/s00248-017-1007-x.
52. EVANS, J.D., LOPEZ, D.L. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). In: *Journal of Economic Entomology* [online]. 2004, nr. 3 (97): pp. 752–756 [citată 04.05.2023]. ISSN 1938-291X. Disponibil: [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2004\)097\[0752:bpiair\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2004)097[0752:bpiair]2.0.co;2).
53. EVANS, J.D., SCHWARZ, R.S. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. In: *Trends in Microbiology* [online]. 2011, nr. 12 (19), pp. 614–620 [citată 04.05.2023]. ISSN 1878-4380. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003>.
54. EVISON, S.E.F., FAZIO, G., CHAPPELL, P., FOLEY, K., JENSEN, A. B., HUGHES, W.O.H. Innate expression of antimicrobial peptides does not explain genotypic diversity in resistance to fungal brood parasites in the honey bee. In: *Apidologie* [online]. 2016, nr. 47, pp. 206–215 [citată 07.11.2022]. ISSN: 1297-9678. Disponibil: DOI: 10.1007/s13592-015-0388-4
55. FILANNINO, P., DI CAGNO, R., TLAIS, A.Z.A., CANTATORE, V., GOBBETTI, M. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic Species. In: *Critical Reviews in Microbiology*. 2019, nr. 1 (45), pp. 65–81. ISSN 1549-7828.
56. FOLEY, K., FAZIO, G., JENSEN, A.B., HUGHES, W.O.H. Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012, nr. 1 (111), pp. 68–73. ISSN 0022-2011.



57. FOLEY, K., FAZIO, G., JENSEN, A.B., HUGHES, W.O.H. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. In: *Veterinary Microbiology* [online]. 2014, nr. 3-4 (169), pp. 203–210 [citat 21.10.2022]. ISSN 1873-2542. Disponibil: DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.11.029.
58. GANESHPRASAD, D.N., LONE, J.K., JANI, K., SHOUCHE, Y.S., KHAN, K.A., SAYED, S., et al. Gut bacterial flora of open nested honeybee, *Apis florea*. In: *Frontiers in Ecology and Evolution* [online]. 2022, nr. 10 [citat 01.05.2023]. ISSN 2296-701X. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.837381>
59. GARIBALDI, L.A., CARELLA, D.S.G., JODAR, D.N.N., SMITH, M.R., TIMBERLAKE, T.P., MYERS, S.S. Exploring connections between pollinator health and human health. In: *Royal Society. Biological sciences* [online]. 2022, nr. 1853 (377) [citat 01.05.2023]. ISSN 1471-2970. Disponibil: DOI: 10.1098/rstb.2021.0158.
60. GILLARD, M., CHARRIERE, J.D., BELLOY, L. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. In: *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2008, nr. 1 (99), pp. 92–95 [citat 10.03.2023]. ISSN 0022-2011. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jip.2008.05.010.
61. GLORIEUX, C., CALDERON, P.B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. In: *Biological Chemistry* [online]. 2017, nr. 10 (398), pp. 1095–1108 [citat 15.03.2023]. ISSN 0021-9258. Disponibil: DOI: 10.1515/hsz-2017-0131
62. GORLENCO, M.V. *Curs de plante inferioare*. Chişinău, 1990. 463 p.
63. GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTÍAS, C., ROTHERAY, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. In: *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2015, nr. 6229 (347). ISSN 0036-8075. Disponibil: DOI: 10.1126/science.1255957.
64. GOVAN, V.A., BROZEL, V., ALLSOPP, M.H., DAVISON, S. A PCR method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. In: *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1998, nr. 5 (64), pp. 1983–1985 [citat 08.04.2023]. ISSN 1098-5336. Disponibil: DOI: 10.1128/aem.64.5.1983-1985.1998
65. GROSSAR, D., KILCHENMANN, V., FORSGREN, E., CHARRIÈRE, J.-D., GAUTHIER, L., CHAPUISAT, M., et al. Putative determinants of virulence in *Melissococcus plutonius*, the bacterial agent causing European foulbrood in honey bees. In: *Virulence* [online]. 2020, nr. 1 (11), pp. 554–567 [citat 15.04.2023]. ISSN 2150-5608. Disponibil: DOI: 10.1080/21505594.2020.1768338.

66. HALEY, L.D., TRANDEL, J., COYLE, M.B. *Cumitech 11, Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiology laboratory*. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C.,1980.
67. HAYNES, W.C. The catalase test: an aid in the identification of *Bacillus larvae*. In: *American Bee Journal* [online]. 1972, nr. 112, pp. 130–131 [citat 15.04.2023]. ISSN 0002-7626. Disponibil: DOI: 10.1128/am.24.1.58-61.1972
68. HOLST, E.C. A single field test for American foulbrood. In: *American Bee Journal*. 1946. nr. 86, pp. 14–34. ISSN 0002-7626 .
69. HRONCOVA, Z., KILLER, J., HAKL, J., TITERA, D., HAVLIK, J. In-hive variation of the gut microbial composition of honey bee larvae and pupae from the same oviposition time. In: *BMC Microbiology* HOLST, E.C. A single field test for American foulbrood. In: *American Bee Journal*. [online] 1946, nr. 86, pp. 2019, nr. 110 (19) [citat 07.05.2023]. ISSN 1471-2180. Disponibil: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1490-y>.
70. <http://med-study.ru/p.primery-kantserogennogo-deistviya-productov>.
71. [https://blacksea-cbc.net/wp-content/uploads/2021/03/BSB136\\_ITM-BEE-BSB\\_Beekeeping-Good-Practice-Guide\\_RO.pdf](https://blacksea-cbc.net/wp-content/uploads/2021/03/BSB136_ITM-BEE-BSB_Beekeeping-Good-Practice-Guide_RO.pdf)
72. <http://www.curademiere.ro/bolile-albinelor-aspergiloza-puietul-pietrificat>.
73. <https://probioticeagricultura.ro/produs/em-probiotic-pentru-albine/>
74. [https://www.legis.md/cautare/getResults?doc\\_id=114328&lang=ro](https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=114328&lang=ro)
75. HU, Y.T., WU, T.-C., YANG, E.-C., WU, P.-C., LIN, P.-T., WU, Y.-L. Regulation of genes related to immune signaling and detoxification in *Apis mellifera* by an inhibitor of histone deacetylation. In: *Scientific Reports*. [online] 2017, nr. 7 [citat 17.05.2022]. ISSN 2045-2322. Disponibil: DOI: 10.1038/srep41255
76. HUANG, Z. Feeding honey bees. In: *Extension Bulletin E-3369. Michigan State University*. [online] 2018. [citat 10.02.2021]. Available. Disponibil: [https://pollinators.msu.edu/sites/\\_pollinators/assets/File/FeedingHoneyBees-Final.pdf](https://pollinators.msu.edu/sites/_pollinators/assets/File/FeedingHoneyBees-Final.pdf)
77. IONESCU, A., APRODU, I.U., ALEXE, P. *Tehnologii generale – Tehnologie și control în industria cărnii. București*. 2009. 126 p.
78. IORIZZO, M., PANNELLA, G., LOMBARDI, S.J., GANASSI, S., TESTA, B., SUCCI, M., et al. Inter- and intra-species diversity of lactic acid bacteria in *Apis mellifera ligustica* colonies. In: *Microorganisms*. [online] 2020. nr. 10 (8). [citat 10.02.2021]. ISSN 2076-2607. Disponibil: DOI: 10.3390/microorganisms8101578.
79. KABLAU, A., ERLER, S., ECKERT, J.H., PISTORIUS, J., SHARBATI, S., EINSPANIER, R. Effects of flupyradifurone and two reference insecticides commonly used in toxicological studies

- on the larval proteome of the honey bee *Apis mellifera*. In: *Insects*. [online] 2023, nr. 1 (14), p. 77 [citată 21.07.2023]. ISSN 2075-4450. Disponibil: DOI:10.3390/insects14010077.
80. KAKUMANU, M.L., REEVES, A.M., ANDERSON, T.D., RODRIGUES, R.R., WILLIAMS, M.A. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. In: *Frontiers in Microbiology*. [online] 2016, nr. 7 [citată 10.02.2021]. ISSN 1664-302X. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01255>
81. KIEPŚ, J., DEMBCZYŃSKI, R. Current trends in the production of probiotic formulations. In: *Foods*. [online] 2022, nr. 15 (11) [citată 18.05.2023]. ISSN 2304-8158. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/foods11152330>
82. KRONGDANG, S., EVANS, J.D., CHEN, Y., MOOKHPLOY, W., CHANTAWANNAKUL, P. Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*. In: *Insect Science*. [online] 2019, nr. 5 (26), pp. 831–842 [citată 10.02.2021]. ISSN 1744-7917. Disponibil: DOI: 10.1111/1744-7917.12593.
83. KUCHLING, S., KOPACKA, I., KALCHER-SOMMERSGUTER, E., SCHWARZ, M., CRAILSHEIM, K., BRODSCHNEIDER, R. Investigating the role of landscape composition on honey bee colony winter mortality: A long-term analysis. In: *Scientific Reports - Nature*. 2018, nr. 1 (8). ISSN 2045-2322.
84. KUMARI I., HAJAM Y.A., THIYAGARAJAN K., ARUP GIRI A., KUMAR R. Evaluation of antioxidant and antibacterial potential of honey produced from stimulative diet fed bee colonies. In: *Discover Sustainability* [online] 2023, 4:21 [citată 11.06.2022]. ISSN 2662-9984. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s43621-023-00135-9>.
85. KWON-CHUNG, K.J. AND BENNETT, J.E. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E., Eds., *Medical Mycology*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1992, 397-446.
86. KWONG, W.K., MORAN, N.A. Gut microbial communities of social bees. In: *Nature Reviews Microbiology*. [online] 2016, nr. 6 (14), pp. 374–384 [citată 11.06.2023]. ISSN 1740-1534. Disponibil: DOI: 10.1038/nrmicro.2016.43.
87. LARONE, D.H. *Medically important fungi: a guide to identification*. 4<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2002. ISBN 978-1555-8117-2-3.
88. LAU, P., BRYANT, V., ELLIS, J.D., HUANG, Z.Y., SULLIVAN, J., SCHMEL, D.R., et al. Seasonal variation of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera*) in developed areas across four regions in the United States. In: *PLoS One*. [online] 2019, nr. 6 (14) [citată 11.06.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0217294.
89. LAZĂR, Ș., VORNICU, O.C. *Apicultura*. Iași: Alfa, 2007. 658 p. ISBN 978-973-8953-37-6.

90. LEWKOWSKI, O., ERLER, S. Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee. In: *MicrobiologyOpen*. [online] 2019, nr. 3 (8) [citată 15.06.2022]. ISSN 2045-8827. Disponibil: DOI: 10.1002/mbo3.649.
91. LEWKOWSKI, O., POEHLEIN, A., DANIEL, R., ERLER, S. In the battle of the disease: a transcriptomic analysis of European foulbrood-diseased larvae of the Western honey bee (*Apis mellifera*). In: *BMC Genomics*. [online] 2022, nr. 1 (23) [citată 11.06.2023]. ISSN 1471-2164. Disponibil: DOI: 10.1186/s12864-022-09075-6.
92. LI, S., YANG, X., YANG, S., ZHU, M., WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal*. [online] 2012, nr. 2 [citată 02.07.2023]. ISSN 2001-0370. Disponibil: DOI: 10.5936/csbj.201209017
93. LI, Y., LEONARD, S.P., POWELL, J.E., MORAN, N.A. Species divergence in gut-restricted bacteria of social bees. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [online] 2022, nr. 18 (119) [citată 10.07.2023]. ISSN 0027-8424. Disponibil: <https://doi.org/10.1073/pnas.2115013119>
94. LICKER, M., HOGEA, E., CRĂCIUNESCU, M., HORHAT, F., BERCEANU VĂDUVA, D., DUGĂEȘESCU, D. *Microbiologie generală. Îndreptar de lucrări practice*. Timișoara, 2019. 96 p. ISBN 978-606-8456-43-0.
95. LINDSTRÖM, A., KORPELA, S., FRIES, I. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. [online] 2008, nr. 1 (99), pp. 82–86 [citată 12.07.2023]. ISSN 0022-2011. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jip.2008.06.010.
96. LIU, H., HALL, M.A., BRETTELL, L.E., HALCROFT, M., WANG, J., NACKO, S., et al. Gut microbial diversity in stingless bees is linked to host wing size and is influenced by geography. In: *bioRxiv*. [online] 2021. pp. 1–38 [citată 10.07.2023]. ISSN 2692-8205. Disponibil: <https://doi.org/10.1101/2021.07.04.451070>
97. LOCHHEAD, A.G. The nitrate reduction test and its significance in the detection of *Bacillus larvae*. In: *Canadian Journal of Research*. 1937, nr. 15, pp. 79–86. ISSN 0366-6581.
98. LOCKE, B., LOW, M., FORSGREN, E. An integrated management strategy to prevent outbreaks and eliminate infection pressure of American foulbrood disease in a commercial beekeeping operation. In: *Preventive Veterinary Medicine*. [online] 2019, nr. 167, pp. 48–52 [citată 14.07.2023]. ISSN 0167-5877. Disponibil: DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.03.023.
99. MACFADDIN, J.F. *Media for isolation-cultivation – identification-maintenance of medical bacteria. Vol. I*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1985. ISBN: 0-683-05316-7.

100. MAIKES, A., KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. In: *Annual Review of Phytopathology*. [online] 2011, 49, pp. 107–133. [citat 05.07.2023]. ISSN 1545-2107. Disponibil: DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095221.
101. MILLER, D.L., SMITH, E.A., NEWTON, I.L.G. A bacterial symbiont protects honey bees from fungal disease. In: *mBio*. [online] 2021, nr. 3 (12). [citat 14.07.2023]. ISSN: 2150-7511. Disponibil: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34101488/>
102. MOHAMED, M.I., EL-KHADEM, M. *Aspergillus flavus* link als neuer Parasit auf *Tetralonia lanuginosa* Klug *Aspergillus flavus*. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*. [online] 1976, nr. 3 (131), pp. 569–570 [citat 14.07.2020]. ISSN 0044-4057. Disponibil: doi: 10.1016/s0044-4057(76)80049-4.
103. MOHARRAMI, M., MOJGANI, N., BAGHERI, M., TOUTIAEE, S. Role of honey bee gut microbiota in the control of American foulbrood and European foulbrood diseases. In: *Archives of Razi Institute*. [online] 2022, nr. 4 (77), pp. 1331–1339 [citat 14.07.2023]. ISSN (2008-9872). Disponibil: DOI: 10.22092/ARI.2022.358073.2146.
104. MORAN, N.A. Genomics of the honey bee microbiome. In: *Current Opinion in Insect Science*. 2015 [online], nr. 10, pp. 22–28 [citat 14.07.2023]. ISSN 2214-5753.
105. MOTTA, E.V.S., GAGE, A., SMITH, T.E., BLAKE, K.J., KWONG, W.K., RIDDINGTON, I.M., et al. Host-microbiome metabolism of a plant toxin in bees. In: *eLife*. [online] 2022, nr. 11 [citat 17.05.2023]. ISSN 2050-084X. Disponibil: <https://doi.org/10.7554/eLife.82595>.
106. MUÑOZ-COLMENERO, M., BAROJA-CAREAGA, I., KOVAČIĆ, M., FILIP, J., PUŠKADIJA, Z., KEZIĆ, N., ESTONBA, A., BÜCHLER, R., ZARRAONAINDIA, I. Differences in honey bee bacterial diversity and composition in agricultural and pristine environments – a field study. In: *Apidologie*. [online] 2020, nr. 51, pp. 1018–1037 [citat 03.04.2023]. ISSN 1297-9678. Disponibil: DOI: 10.1007/s13592-020-00779-w.
107. MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSON, J.H., PFALLER, M.A., YOLKEN, R.H. *Manual of clinical microbiology 8th edition*. ASM Press, 2003 [online]. 2113 p [citat 18.03.2023]. ISBN: 1-555810255-4. Disponibil: doi: 10.1016/S0732-8893(03)00160-3
108. NANDI, A., YAN, L.-J., JANA, C.K., DAS, N. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. [online] 2019, nr. 2019 [citat 22.05.2023]. ISSN 1942-0994. Disponibil: DOI: 10.1155/2019/9613090.
109. NICHOLS, B.J., RICIGLIANO, V.A. Uses and benefits of algae as a nutritional supplement for honey bees. In: *Frontiers in Sustainable Food Systems*. [online] 2022, nr. 6 [citat 05.07.2023]. ISSN 2571-581X. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1005058>

110. OLOFSSON, T.C., BUTLER, E., MARKOWICZ, P., LINDHOLM, C., LARSSON, L., VASQUEZ, A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees — an unknown key to honey’s antimicrobial and therapeutic activities. In: *International Wound Journal*. [online] 2014, nr. 5 (13), pp. 669–679 . ISSN 1742-4801. Disponibil: DOI: 10.1111/iwj.12345.
111. PAPP, M., BÉKÉSI, L., FARKAS, R., MAKRAI, L. Natural diversity of the honey bee (*Apis mellifera*) gut bacteriome in various climatic and seasonal states. In: *PLoS One*. [online] 2022, nr. 9 (17) [citat 14.07.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0273844.
112. PARAY, B.A., KUMARI, I., HAJAM, Y.A., SHARMA, B., KUMAR, R., ALBESHRI M.F., et al. Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. In: *Saudi Journal of Biological Sciences*. [online] 2021, nr. 1 (28), pp. 1167–1176 [citat 05.07.2023]. ISSN 1319-562X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.053.
113. PAȘCALĂU, I. *Cercetări privind influența unor suplimente nutritive asupra producției la albine*: tz de doct. Cluj-Napoca, 2009, 221 p.
114. PĂTRUICĂ, S., HUȚU, I. Economic benefits of using prebiotic and probiotic products as supplements in stimulation feeds administered to bee colonies. In: *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 2013, nr. 3 (37), pp. 259–263. ISSN 1303-6181.
115. PAXTON, R.J. Does infection by *Nosema ceranae* cause “colony collapse disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? In: *Journal of Apicultural Research*. 2010 [online], nr. 1 (49), pp. 80–84 [citat 11.07.2023]. ISSN 0021-8839. Disponibil: DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.11.
116. PERNAL, S.F. The social life of honey bees. In: *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. [online] 2021, nr. 3 (37), pp. 387–400 [citat 02.03.2022]. ISSN 0749-0720. Disponibil: DOI: 10.1016/j.cvfa.2021.06.012.
117. PIETROPAOLI, M., RIBARITS, A., MOOSBECKHOFER, R., KÖGLBERGER, H., ALBER, O., GREGORC, A., et al. Biosecurity measures in European beekeeping. In: *Revue Scientifique et Technique*. 2020 [online], nr. 3 (39), pp. 725–735 [citat 11.05.2022]. ISSN 1608-0637. Disponibil: DOI: 10.20506/rst.39.3.3174.
118. PIWOWAR, A., HARASYM, J. The importance and prospects of the use of algae in agribusiness. In: *Sustainability*. [online] 2020, nr. 14 (12), [citat 11.07.2022]. ISSN: 2071-1050. Disponibil: DOI: 10.3390/su12145669.
119. POP, I.M., HALGA, P., AVARVAREI, T. *Nutriția și alimentația animalelor*. Vol. I-III. Ed. Tipo Moldova, Iași-România, 2006. 828 p. ISBN 978-973-8900-28-8.
120. POSTOLACHI, O. *Modificarea caracterelor cultural și bichimice ale unor tulpini de streptomicete după păstrarea îndelungată*: rezumatul tz. de doct. în șt. biologice. Chișinău, 2009, 28 p.

121. PRICOP, F., POPESCU, A., SCARLAT, R. Impactul tehnologic de finisare textilă ecologică asupra calității apelor reziduale. În: *Buletinul AGIR, Supliment*. 2012, nr. 2, pp.121–127. ISSN 1224-7928.
122. RAYMANN, K., MORAN, N.A. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. In: *Current Opinion in Insect Science*. 2018, nr. 26, pp. 97–104. ISSN 2214-5745.
123. REGASSA L.B., GASPARICH, G.E. Spiroplasmas: Evolutionary relationships and biodiversity. In: *Frontiers in Bioscience* 11(1), 2006 [online], p. 2983-3002 [citat 11.05.2022].. ISSN 1945-0508. Disponibil: DOI:10.2741/2027
124. REIS, J., PAULA, A., CASAROTTI, S., PENNA, A. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. In: *Food Engineering Reviews*. ISSN 1866-7910. 2012, nr. 4, pp. 124–140.
125. REQUIER, F., GARNERY, L., KOHL, P.L., NJOVU, H.K., PIRK, C.W.W., CREWE, R.M., et al. The conservation of native honey bees is crucial. In: *Trends in Ecology and Evolution*. 2019 [online], nr. 9 (34), pp. 789–798 [citat 10.07.2023]. ISSN 1872-8383. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.04.008>.
126. RICIGLIANO, V.A. Microalgae as a promising and sustainable nutrition source for managed honey bees. In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* [online]. 2020, nr. 1 (104) [citat 06.04.2023]. ISSN 0739-4462. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/arch.21658>
127. RICIGLIANO, V.A., CANK, K.B., TODD, D.A., KNOWLES, S.L., OBERLIES, N.H. Metabolomics-guided comparison of pollen and microalgae-based artificial diets in honey bees. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [online] 2022, nr. 31 (70), pp. 9790–9801 [citat 11.03.2023]. ISSN 1520-5118. Disponibil: DOI: 10.1021/acs.jafc.2c02583
128. ROKOP, Z.P., HORTON, M.A., NEWTON, I.L.G. Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. In: *Applied and Environmental Microbiology*. [online] 2015, nr. 20 (81), pp. 7261–7270 [citat 11.05.2022]. ISSN 1098-5336. Disponibil: DOI: 10.1128/AEM.01259-15.
129. RUDIC, V., DENCICOV, L. *Microbiologie generală*. Chișinău, 2007. 66 p.
130. SAMMATARO, D., WEISS, M. Comparison of productivity of colonies of honey bees, *Apis mellifera*, supplemented with sucrose or high fructose corn syrup. In: *Journal of Insect Science*. 2013 [online], nr. 13 [citat 25.04.2023]. ISSN 1536-2442. Disponibil: DOI: 10.1673/031.013.1901.
131. SIMON-DELISO, N., SAN MARTIN, G., BRUNEAU, E., MINSART, L-A., MOURET, C., HAUTIER, L. Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. In:



- PloS ONE*. [online] 2014, nr. 7 (9) [citat 07.05.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0103073.
132. SÎRBU T., BUGNEAC V., STARCIUC N. Procedeu de hrănire a familiilor de albine. Cerere de brevet de invenție. Data depozit: 2023.08.24, Nr. depozit: s 2023 0072
133. SÎRBU T., BURȚEVA S., STARCIUC N., BUGNEAC V., POSTOLACHI O. Micromicete – perspectivi producători de substanțe bioactive. In: *Biotehnologii avansate – realizări și perspective. Al III Simpozion național cu participare internațională, Chișinău, 2013*. p. 64. ISBN 978-9975-56-111-2.
134. SIRBU, T. Optimizarea mediului nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Penicillium funiculosum* – sursă de catalază. In: *Studia Universitatis Moldaviae (Seria Științe Reale și ale Naturii)*. 2018, nr.1 (111), pp. 86–91. ISSN 1857-498X (online).
135. SIRBU, T. The searching of active catalase producers among the microscopic fungi. In: *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie*. 2011, nr. 2 (23), pp. 164–167. ISSN 1844-7589 (online).
136. SÎRBU, T., STARCIUC N., BUDNEAC, V. Environmental influence of solid composition of growing on growth and character of antagonist fungal strains. In: *Scientific international conference on microbial biotechnology (2nd edition), Chișinău 2014*. p. 177. ISBN 978-9975-4432-8-9.
137. SORRENTINO, E., TREMONTE, P., SUCCI, M., IORIZZO, M., PANNELLA, G., LOMBARDI, S.J. et al. Detection of antilisterial activity of 3-phenyllactic acid using *Listeria innocua* as a model. In: *Frontiers in Microbiology*. 2018 [online], nr. 9. ISSN 1664-302X. Disponibil: DOI: 10.3389/fmicb.2018.01373.
138. STARCIUC, N., SÎRBU, T., BUGNEAC, V., BURȚEVA, S., POSTOLACHI, O., CEBOTARI, V. Soil micromicetes antagonism against some pathogens of *A. mellifera*. In: *12th International Symposium Prospects for the 3rd Millennium Agriculture, Romania, 26-28 sept. 2013: book of abstract, Cluj-Napoca, 2013*. p. 246.
139. STEINHAEUER, N., VANENGELSDORP, D., SAEGERMAN, C. Prioritizing changes in management practices associated with reduced winter honey bee colony losses for US beekeepers. In: *Journal Science of the Total Environment* [online]. 2021, nr. 753 [citat 06.04.2023]. ISSN 1879-1026. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141629>.
140. TODERAȘ I., CEBOTARI V., UNGUREANU L., BUZU I., GHEORGHÎȚĂ C. Procedeu de hrănire a familiilor de albine *Apis mellifera*. Brevet de invenție . 1061. 2017. Data publicării 2016.08.31, Data eliberării 2017.03.31.

141. TODERAȘ, I., RUDIC, V., GULEA, A., CEBOTARI, V., BUZU, I. Influența remediilor organice bioactive de generație nouă asupra activității vitale a familiilor de albine *Apis mellifera*. În: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. [online] 2014, nr. 3 (324), pp. 4–15. ISSN 1857-064X.
142. TODERAȘ, Ion, CEBOTARI, Valentina, UNGUREANU, Laurenția, BUZU, Ion, GHEORGHITĂ, Cristina. *Procedeu de hrănire a familiilor de albine Apis mellifera*. Brevet de invenție 1062 (13) Z, A23K 50/90 (2016.01); A23K 10/18 (2016.01); A23K 20/163 (2016.01); C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/89 (2006.01); A01K 53/00 (2006.01). Data depozit 17.04.2015. Publicat 31.08.2016. In: BOPI. 2016, nr. 8, pp. 34.
143. TODERAȘ, Ion, RUDIC, Valeriu, CEBOTARI, Valentina, BOGDAN, Valeriu, GULEA Aurelian, BULIMAGA, Valentina, BUZU, Ion, CHIRIAC, Tatiana, ARCAN, Elena. *Procedeu de hrănire a familiilor de albine Apis mellifera*. Brevet de invenție 475 (13) Z, A01K 59/00 (2006.01); A23K 1/18 (2006.01); C07F 3/06 (2006.01); C07C 53/16 (2006.01). Data depozit 01.06.2011. Publicat 29.02.2012. In: BOPI. 2012, nr. 2, p. 28.
144. TODERAȘ, Ion, RUDIC, Valeriu, CEBOTARI, Valentina, BOGDAN, Valeriu, GULEA, Aurelian, BULIMAGA, Valentina, BUZU, Ion, CHIRIAC, Tatiana, SILITRARI, Andrei. *Procedeu de hrănire a familiilor de albine Apis mellifera*. Brevet de invenție 477 (13) Z, A01K 59/00 (2006.01); A23K 1/16 (2006.01); C01G 49/00 (2006.01); C01B 19/00 (2006.01). Data depozit 01.06.2011. Publicat 29.02.2012. In: BOPI. 2012, nr. 2, pp. 29-30.
145. TODERAȘ, Ion, RUDIC, Valeriu, CEBOTARI, Valentina, BOGDAN, Valeriu, GULEA, Aurelian, BULIMAGA, Valentina, BUZU, Ion, CHIRIAC, Tatiana, RAILEAN, Nadejda. *Procedeu de hrănire a familiilor de albine Apis mellifera*. Brevet de invenție 476 (13) Z, A01K 59/00 (2006.01); A23K 1/16 (2006.01); C01G 37/00 (2006.01); C01D 5/00 (2006.01). Data depozit 01.06.2011. Publicat 29.02.2012. In: BOPI. 2012, nr. 2, pp. 28-29.
146. TOPAL, E., MĂRGĂOAN, R., BAY, V., TAKMA, Ç., YÜCEL, B., OSKAY, D., et al. The effect of supplementary feeding with different pollens in autumn on colony development under natural environment and *in vitro* lifespan of honey bees. In: *Insects*. [online] 2022, nr. 7 (13) [citată 25.04.2023]. ISSN 2075-4450. Disponibil: DOI: 10.3390/insects13070588.
147. TOSCHKOV, A., VALLERIANOV, T., TOMOV A. Die immunfluoreszenzmethode und die schnelle und spezifische diagnostik der Amerikanischen faulbrut bei der bienenbrut. In: *Bulletin Apicole de Documentation et d'Information*. 1970, nr. 13, pp. 13–18. ISSN 0521-6761.
148. TSOURKAS P.K. *Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future. In: *Microbial Genomics*. [online] 2020. nr. 2 (6), [citată 21.07.2023]. ISSN 2057-5858. Disponibil: DOI: 10.1099/mgen.0.000329.


149. TUKTAROV, V., KUZNETOVA, V., MUSHUKOVSKAIA, G. et. al. *Preparation for stimulation of physiological functions in bees and their protection against infections diseases*. R.F. Baskartostan, Ufa, 2010. RU 2380406 C2 2010.01.27.
150. VANENGELSDORP, D., MEIXNER, M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. [online] 2010, nr. 103, pp. 80–95 [citat 23.05.2023]. ISSN 0022-2011. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011.
151. VASQUEZ, A., FORSGREN, E., FRIES, I., PAXTON, R.J., FLABERG, E., SZEKELY, L., et al. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. In: *PLoS ONE*. [online] 2012, nr. 3 (7) [citat 05.07.2023] . ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI: 10.1371/journal.pone.0033188
152. VOJVODIC, S., JENSEN, A.B., JAMES, R.R., BOOMSMA, J.J., EILENBERG, J. Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. In: *Veterinary Microbiology*. [online] 2011, nr. 1-2 (149), pp. 200–205 [citat 26.06.2022]. ISSN 0378-1135. Disponibil: DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.001.
153. WRIGHT, G.A., NICOLSON, S.W., SHAFIR, S. Nutritional physiology and ecology of honey bees. In: *Journal Annual Review of Entomology*. [online] 2018, nr. 63, pp. 327–344 [citat 03.02.2021]. ISSN 1545-4487. Disponibil: DOI: 10.1146/annurev-ento-020117-043423.
154. YE, M., LI, X., YANG, F., ZHOU, B. Beneficial bacteria as biocontrol agents for American foulbrood disease in honey bees (*Apis mellifera*). In: *Journal of Insect Science*. ISSN 1536-2442. [online] 2023, nr. 2 (23). [citat 25.04.2023]. Disponibil: DOI: 10.1093/jisesa/iead013.
155. YEFIMENKO, T., ODNOSUM, H. (2020). The effect of feeding a suspension of *Chlorella vulgaris* (strain IFR No C-111) on the life span of bees. In: *Sci. Prod. J. Beekeep. Ukraine*, [online] 2020, 1, 13–18 [citat 20.08.2022] . ISSN 2708-4078. Disponibil: <https://doi.org/10.46913/beekeepingjournal.2020.4.02>.
156. YOSHIYAMA, M., WU, M., SUGIMURA, Y., TAKAYA, N., KIMOTO-NIRA, H., SUZUKI, C. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. In: *Journal of Invertebrate Pathology*. [online] 2013, nr. 1 (112), pp. 62–67 [citat 15.08.2022]. ISSN 0022-2011. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jip.2012.09.002.
157. ZABRODSKI, M.W., DEBRUYNE, J.E., WILSON, G., MOSHYNKYI, I., SHARAFI, M., WOOD, S.C., et al. Comparison of individual hive and apiary-level sample types for spores of *Paenibacillus larvae* in Saskatchewan honey bee operations. In: *PLoS One*. [online] 2022, nr. 2 (17) [citat 25.04.2023] . ISSN 1932-6203. Disponibil: DOI:10.1371/journal.pone.0263602.


158. ZARNEA, G. *Tratat de Microbiologie Generală – volumul III*. Editura Academiei R.S.R., 1986. 620 p.
159. ZARNEA, G., MIHĂESCU, G., VELEHORSCHI, V. *Principii și tehnici de microbiologie generală*. București. 1991. 330 p.
160. ZHANG, Z., MU, X., CAO, Q., SHI, Y., HU, X., ZHENG, H. Honeybee gut *Lactobacillus* modulates host learning and memory behaviors via regulating tryptophan metabolism. In: *Nature Communications*. [online] 2022, nr.1 (13) [citat 25.08.2023]. ISSN 2041-1723. Disponibil: DOI: 10.1038/s41467-022-29760-0.
161. ZUGRAVU A. *Ghid privind potențialul melifer, condițiile climatice, calitatea aerului și solului în regiunea bazinului Mării Negre*. Cahul: Tipogr. „Bons Offices”, 2021. 66 p. ISBN 978-9975-128-28-5.
162. БИЛАЙ, В.И. *Пенициллы*. Киев Наукова Думка, 1990. 150 с.
163. БИЛАЙ, В.И. *Справочник. Методы экспериментальной микологии*. Киев Наукова Думка, 1982. 550 с.
164. БИЛАЙ, В.И., КОВАЛЬ, Э.З. *Аспергиллы*. Киев Наукова Думка, 1988. 204 с. ISBN 5-12-000853-4.
165. БЛАГОВЕЩЕНСКАЯ, Е.Ю. *Фитопатогенные микромицеты. Учебный определитель*. Ленанд М, 2015. 240 с. ISBN: 978-5-9710-1653-3.
166. БЛИНКОВА, Л.П., ГОРОБЕЦ, О.Б. Оценка качества микологических и бактериологических питательных сред на основе принципа конгруэнтности. В: *Успехи медицинской микологии*. 2007, нр. 10, с. 78–79.
167. БУГНЯК, В., СЫРБУ, Т. Эффективность экзометаболитов микромицетов в профилактике и борьбе с аспергиллёзом пчел. In: *82 International scientific conference of young scientist and students "Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution, April 13-14, 2016*. Part 1, Kyiv, NUFT, 2016. p. 394.
168. ГАРИБОВА, Л.В., ЛЕКОМЦЕВА, С.Н. *Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов*. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 220 с. ISBN 5-87317-265-X.
169. ГУСЕВ, М., МИНЕЕВА, Л. *Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей*. Москва: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с. ISBN 5-7695-1403-5.
170. ЕГОРОВ, Н.С. *Основы учения об антибиотиках*. М. Изд-во МГУ „Наука”, 2004. с. 5-7. ISBN 5-02-033595-9.
171. КИРИЛЕНКО, Т.С. *Атлас родов почвенных грибов*. Киев: Наукова Думка, 1977. 128 с.

172. ЛИТВИНОВ, М.А. *Определитель микроскопических почвенных грибов*. Ленинград, 1967. 318 с.
173. ЛЫСЕНКО, Ю.А., МУРТАЗАЕВ, К.Н., ЛЕВЧЕНКО, П.В. Лактофлора кишечника пчел и продуктов пчеловодства. В: *Актуальные вопросы развития отраслей сельского хозяйства: теория и практика. Материалы Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции молодых ученых АПК*, [online] 2020, Ростов-на-Дону – Таганрог. Издательство: Издательство Южного федерального университета. с. 177–179. [citat 05.08.2022] Disponibil: DOI: 10.34924/FRARC.2020.1.63930
174. МИХАЙЛОВА, Р.В. *Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии*. Минск: Белорусская наука, 2007. 408 с. ISBN 978-985-08-53-0.
175. ПОЛЯК, М.С., СУХАРЕВИЧ, В.И., СУХАРЕВИЧ, М.Э. *Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии*. Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2008. 352 с. ISBN 978-5-93979-194-6.
176. ПУСЕНКОВА, Л.И., ИЛЬЯСОВА, Е.Ю., МАКСИМОВ, И.В., ЛАСТОЧКИНА, О.В. Повышение адаптивного потенциала посевов сахарной свеклы микробными биопрепаратами в условиях биотических и абиотических стрессов. В: *Сельскохозяйственная биология*. [online] 2015, нр. 1 (50), с. 115–123. ISSN 2313-4836. Disponibil: doi: 10.15389/agrobiology.2015.1.115rus.
177. СЕМЁНОВ, С.М. Справочник. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. «Агропромиздат», 1990. 240 с. ISBN 9-785-10001999-2.
178. СЭГИ, И. *Методы почвенной микробиологии*. Москва: Колос, 1983. 296 с.
179. ХОУЛТА, Д., КРИГА, Н., СНИТА, П., СТЕЙЛИ, Д., УИЛЬЯМСА, С. *Определитель бактерий Берджи. Изд. 9, Том 1-2*. Москва «Мир», 1997. 800 с.
180. ШЛЕГЕЛЬ, Г. *Общая микробиология*. М: «Мир», 1987. 567 с.

## **ANEXE**

**Anexa:1. Buletin de analiza de la CRDV cu confirmarea diagnosticului "Loca europeană"**

  
**AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR**  
**CENTRUL REPUBLICAN DE DIAGNOSTIC VETERINAR**  
**LABORATORUL DIAGNOSTIC SĂNĂȚATE ANIMALĂ**  
**SECȚIA BACTERIOLOGIE**  
 Adresa : MD 2051, mun. Chișinău, str. Murelor 3, tel. 74-23-00, 74-23-11, 92-56-67.

Către *DESA Dubăsari monitoring*  
  
 DIRECTOR I.P. CRDV  
**Radu Musteața**

**RAPORT DE ÎNCERCĂRI** *1500-1602*



din 04.07.2018

<b>Codul probei:</b>	<b>III4</b>
Felul probei, specia, vârstă:	4 pr. făguri de ceață p/le albiși
Data ora prelevării, temperatura:	25.06.2018 14:00
Data ora recepționării, temperatura:	26.06.2018 09:25
Data,ora primirii probei în secție, temperatura:	26.06.2018 09:30
Examenul solicitat:	Loca Americană, Loca Europeană
Data introducerii în lucru:	26.06.2018
Data finalizării:	01.07.2018
Conformitatea DN :	-
Metoda :	OFF 2014

**REZULTATELE ANALIZELOR:**

Examenul bacteriologic: Proba este pozitivă pentru germeni patogeni speciei ci ai *Loca europeană* *M.plutonius*. Agentul patogen este sensibil la următorii antibiotici: enrofloxacină, cefazolan, ampicilină.

Informație suplimentară:

<p><b>ȘEF SECȚIE</b></p> <p><b>Dr. Nicolai Josan</b> </p>	<p><b>SPECIALIST,</b></p> <p><b>Dr. Vasile Bulgaru</b></p> <p><b>Dr. Tatiana Gurdîș</b> </p> <p><b>Dr. Pavel Bondarenco</b></p>
--	--

Încălzirea este necesară pentru a evita dezvoltarea ciupercilor. Eticheta este plasată în ambalajul de distribuție și este necesar să se păstreze eticheta în condiții de siguranță până la momentul de livrare. Nu trebuie să se utilizeze părțile sau conținutul ambalajului din CRDV pentru alte scopuri decât cele pentru care este conceput. Dacă este necesar, se poate utiliza pentru alte scopuri decât cele pentru care este conceput. Dacă este necesar, se poate utiliza pentru alte scopuri decât cele pentru care este conceput. Dacă este necesar, se poate utiliza pentru alte scopuri decât cele pentru care este conceput.

Proba este:

Aparatul este în stare în 2 exemplare, din care se distribuie:

<input type="checkbox"/> Agenția noastră	<input type="checkbox"/> Secția bacteriologie și parazitologie
<input type="checkbox"/> Agenția Sanitară - Veterinară	<input checked="" type="checkbox"/> Secția Virus-probleme
<input type="checkbox"/> Direcția Națională de Informații Sanitare - Veterinară	<input checked="" type="checkbox"/> Secția Bacteriologie

Page 1 din 1

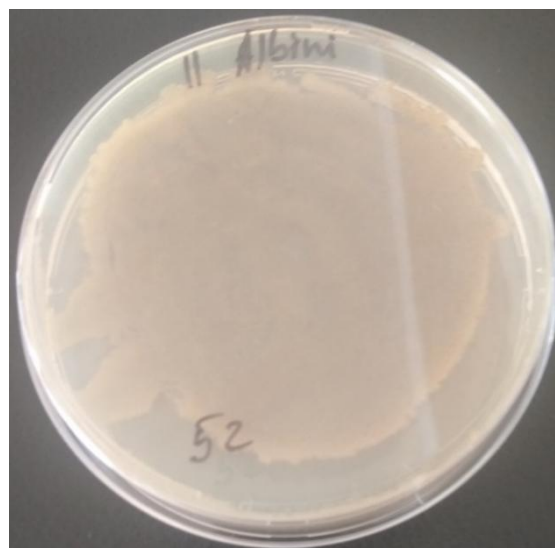
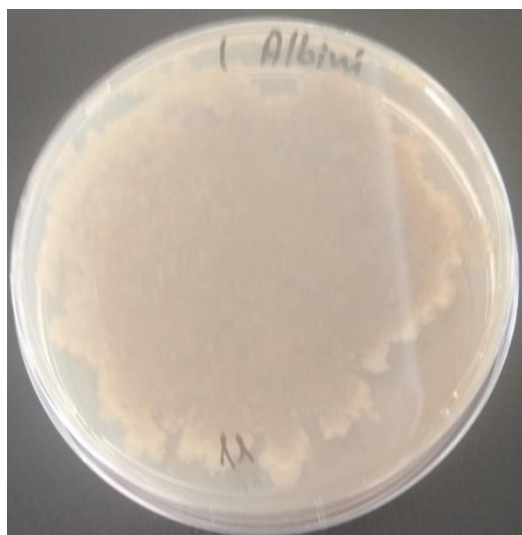
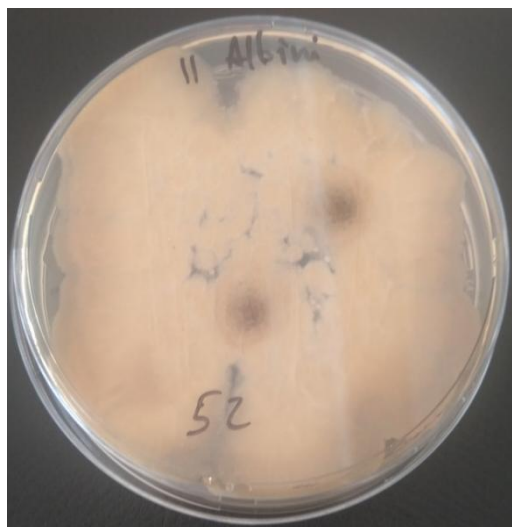


**Anexa: 2. Prelevarea materialului patologic pentru cercetări de laborator de la stupina 1, suspectă în contaminare cu Loca Europeană.**

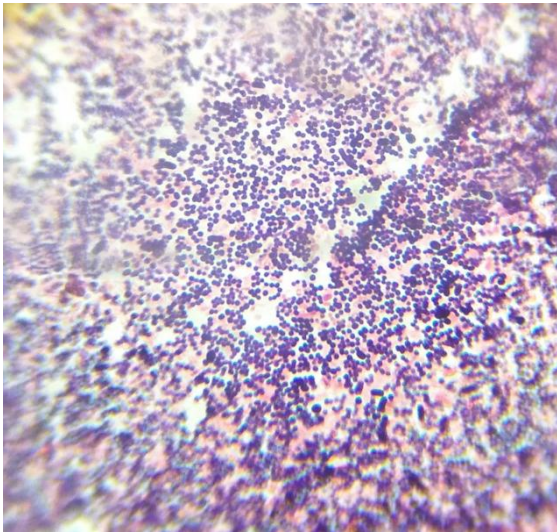




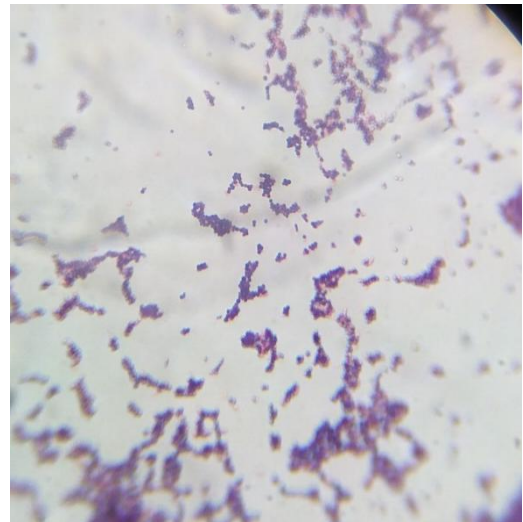
**Anexa: 3. Colonii de fungi izolate de la familiile de albine, stupina 2.**



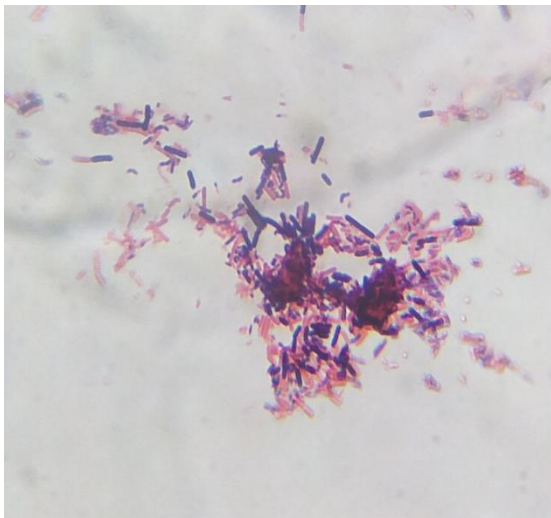
**Anexa: 4. Forme bacteriene izolate din probe pentru cercetare de la puietul de albine afectat. a) Streptococi; b) Stafilococi; c) asociere de bacterii coliforme; d) colonii de *Salmonella spp.*.**



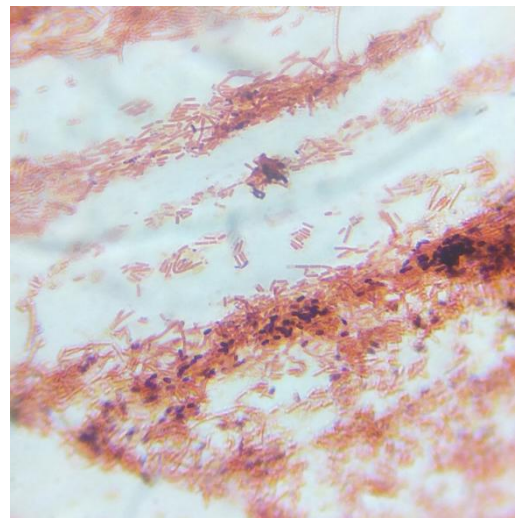
a)



b)






c)



d)

## Anexa 5: Cerere de Brevet de Invenție

06/00 AGENȚIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELLECTUALĂ A REPUBLICII MOLDOVA	 <b>AGEPI</b> IDNO: 901560100112	F-01-BI-046-1-06-0327 STATE AGENCY ON INTELLECTUAL PROPERTY OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA
DIRECȚIA BREVETE		PATENTS DIRECTION
<small>Pachetele bancare (MOL): Beneficiar: ME - Troreria de Stat, Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală, Contul Bancajului MEDISTOPAAH4209AYAS LNA, Contul bancar: 20114001, Banca Beneficiară Internațională Finajpco - Troreria de Stat, Contul bancar: TR226020</small>		
nr. <b>11057</b> <b>2023.09.04</b> din _____	<b>SÎRBU Tamara, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie</b> <b>str. Academiei 1, MD-2028, Chișinău,</b> <b>Republica Moldova</b> <b>tfirbu@gmail.com</b>	
<p>Ca rezultat al examinării cererii de brevet de invenție de scurtă durată cu: Nr. intrare: 2462 Data intrare: 2023.08.24 Titlu: <b>Procedeu de hrănire a familiilor de albine</b></p>		
<p>Secția Gestionare Documente a stabilit: materialele cererii corespund prevederilor art. 34 din Legea nr. 50/2008 privind protecția invențiilor (în continuare Lege) și cererea este înscrisă în Registrul național de cereri de brevet de invenție de scurtă durată cu: (21) Nr. depozit: s 2023 0072 (22) Data depozit: 2023.08.24 (71) Solicitant(i): UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD (72) Inventator(i): SÎRBU Tamara, MD; BUGNEAC Veronica, MD; STARCIUC Nicolae, MD</p>		
<p>Vă rugăm să prezentați materialele cererii (descriere, revendicări, rezumat) în format electronic la adresa <a href="mailto:brevete@agepi.gov.md">brevete@agepi.gov.md</a>.</p>		
<p>Vă informăm că procura prezentată la AGEPI nu conține data semnării dar conform reg. 23 din Regulamentul privind procedura de depunere și examinare a cererii de brevet de invenție și de eliberare a brevetului, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 528 din 01.09.2009 cu modificările ulterioare, urmează să introduceți această data sau prezentați la AGEPI o procură corectată.</p>		
<p>Vă informăm că în conformitate cu art. 31 din Lege puteți să brevetăți invenția revendicată în strălinitate prin depunerea unei cereri internaționale conform Tratatului de Cooperare în domeniul Brevetelor (PCT).</p>		
<p>Cererea internațională trebuie să fie depusă la AGEPI în termen de 12 luni de la data de depozit sau de prioritate a cererii.</p>		
<p>Informații mai detaliate puteți găsi la adresele: <a href="http://www.wipo.int/pct/en/">http://www.wipo.int/pct/en/</a> și <a href="http://agepi.gov.md/rs/inventions/international">http://agepi.gov.md/rs/inventions/international</a>.</p>		
Șefii Secției, Secția Gestionare documente tel.: +(373 22) 188 520	<p>Document semnat</p>  <p>Digitally signed by Olgă Ciocinov Date: 2023.09.04 14:48:49 +0300 Reason: MoldSign Signature Location: Moldova</p>	 <b>Olgă Ciocinov</b>
<small>Str. Andrei Doga nr. 24/1, MD-2024, Chișinău, Republic of Moldova Tel: (+373-22) 188-648, (+373-22) 188-513 <a href="http://www.agepi.gov.md">www.agepi.gov.md</a>, e-mail: <a href="mailto:office@agepi.gov.md">office@agepi.gov.md</a></small>		<small>24/1 Andrei Doga str., MD-2024, Chișinău, Republic of Moldova Tel: (+373-22) 188-648, (+373-22) 188-513 <a href="http://www.agepi.gov.md">www.agepi.gov.md</a>, e-mail: <a href="mailto:office@agepi.gov.md">office@agepi.gov.md</a></small>
F-01-BI-046-1-06-0327		



## Anexa 6: Act de implementare Nr.1



APROB

Directorul G.Ț. "Maican Ion s. Petrunea"

*[Signature]* "26" octombrie 2017

### ACT DE IMPLEMENTARE Nr.1

a elaborării propunerii de hrănire a familiilor de albine cu exometaboliți din micromicete înainte și după perioada de iernat în scop profilactic față de bolile contagioase,  
din 26.10.2017

#### **Activitatea efectuată.**

*Hrănirea familiilor de albine cu supliment nutrițional din sirop de zahăr și turte de grâu cu adaus de exometaboliți din micromicete.*

Cercetările au fost efectuate în perioada 15 octombrie 2013 – 26.10.2017 la stupina deținută de G.Ț. "Maican Ion s. Petrunea" pe adresa r-nul Glodeni satul Petrunea, cu un număr de 90 familii de albine. Pentru fortificarea rezistenței fiziologice a familiilor de albine și minimizarea riscului de apariție a bolilor de origine bacteriană (loca americană și europeană) și față de unele boli de origine micotică (ascosferoză și aspergiloză, care reprezintă un pericol pentru puietul albinelor, precum și pentru albinele adulte. La stupină a fost testată acțiunea exometaboliților (EM) din micromicetele *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 91 și *Penicillium* sp.62, în doze de 10ml/l, 25ml/l și 50ml/l sirop de zahăr, utilizat la pregătirea turtelor din grâu în raport de 50 ml la 1kg/turte. Această hrănire s-a efectuat toamna, înainte de iernat. Au fost montate 3 grupe cu EM, a câte 5 stupi în fiecare grupă, fiind comparată cu grupa lot martor, la care hrănirea suplimentară s-a efectuat numai cu sirop de zahăr și turte de grâu.

Evaluarea indicilor de sănătate a familiilor de albine după perioada de iernat a demonstrat o stare generală mult mai bună a familiilor de albine comparativ cu lotul martor.

A doua hrănire cu sirop de zahăr de 50% suplimentată cu EM de micromicete a fost efectuată după perioada de iernat, în a doua jumătate a lunii martie. Au fost testați EM tulpinilor *Penicillium* sp. 11, *Penicillium* sp. 19 și *Penicillium* sp. 62, câte 200 ml de amestec la ramă.

După hrănirea de primăvară s-a constatat o stimulare a indicilor de productivitate, comparativ cu lotul martor. Cele mai bune rezultate au fost obținute în varianta, în care hrana a fost suplimentată cu EM ai micromicetei *Penicillium* sp. 11 în concentrație de 25 ml/l. Indicii evaluați după 36 de zile: numărul de pătrate cu puiet căpăcit, prolificitatea, puterea familiei și cantitatea de miere de la o ramă au depășit varianta martor cu 24-61%.

#### **Rezultate implementării:**

**În concluzie** putem confirma că hrănirea familiilor de albine cu hrană suplimentară din sirop de zahăr și soluție de EM din micromicete, a contribuit la fortificarea semnificativă a nivelului de sănătate și la prevenirea bolilor contagioase la albine și la puietul de albine, totodată a stimulat și indicii productivi la familiile de albine.

*Responsabili pentru implementare:*

Administrator  
G.Ț. "Maican Ion s. Petrunea"

Doctorand, UTM

Dr. hab., prof. univ., UTM

*[Signature]*  
*[Signature]*



Veronica BUGNEAC

Nicolae STARCIUC

## Anexa 7: Act de implementare Nr.2



APROB

Directorul G.Ț. "Usatii Maxim"

15 octombrie 2022

### ACT DE IMPLEMENTARE Nr.2

a elaborării propunerii de hrănire a familiilor de albine cu exometaboliți din micromicete înainte și după perioada de iernat în scop profilactic față de bolile contagioase, din 15.10.2022

#### **Activitatea efectuată.**

*Hrănirea familiilor de albine cu supliment nutrițional din sirop de zahăr și turte de grâu cu adaus de exometaboliți din micromicete.*

Cercetările au fost efectuate în perioada 10 septembrie 2021 – 15.10.2022 la stupina ce aparține G.Ț. "Usatii Maxim" cu un număr de 95 familii de albine. Pentru fortificarea rezistenței fiziologice a familiilor de albine și minimizarea riscului de apariție a bolilor de origine bacteriană (loca americană și europeană) și față de unele boli de origine micotică (ascosferoză și aspergiloză. Au fost efectuate 2 hrăniri.

Prima hrănire s-a efectuat toamna înainte de iernat. Au fost pregătite turme de grâu pe baza amestecului de sirop de zahăr cu soluție de exometaboliți (EM) din micromicete (P. sp.11, P. sp 91, P. sp.62), câte 50 ml la 1kg/turte, iar primăvara au fost evaluați indicii de sănătate. S-a constatat că, toți indicii de sănătate: % de albine moarte după iernat, cantitatea de miere rămasă din iarnă (%), comportamentul albinelor; activitatea de zbor a albinelor; prezența mucegaiului în stup; modul de căpăcire; rezistența la iernare (%), sunt mai buni în variantele experimentale, decât în varianta martor.

A doua hrănire s-a făcut primăvara timpuriu, cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu soluție de EM, câte 200 ml amestec la ramă. Au fost testate 3 concentrații de EM: 10ml/l, 25ml/l și 50ml/l sirop de zahăr. Familiile de albine au fost monitorizate după 12 zile, 24 zile și 36 zile.

Cele mai bune rezultate a indicilor de productivitate: numărul de patrare cu puiet căpăcit, prolificitate, puterea familiei și cantitatea de miere pe ramă au fost obținute în varianta, în care familiile de albine au fost hrănite cu sirop de zahăr de 50% suplimentat cu 25ml/l soluție de EM ai tulpinii *Penicillium* sp. 11. Acești indici au depășit varianta martor cu 20-56%

#### **Rezultate implementării:**

**În concluzie** putem confirma că, metoda de hrănire a familiilor de albine cu hrană suplimentară din sirop de zahăr și turte din grâu, cu adaus de exometaboliți din micromicete din tulpinile P. sp. 11, P. sp. 91 și P. sp. 62., a contribuit la fortificarea semnificativă a nivelului de sănătate și la prevenirea bolilor contagioase la puietul familiilor de albine, stimulând și indicii productivi.

#### **Responsabili pentru implementare:**

Administrator  
G.Ț. "Usatii Maxim"

Doctorand, UTM

dr. hab., prof. univ., UTM



Veronica BUGNEAC

Nicolae STARCIUC



## Anexa 8: Act de implementare Nr.3

APROB



Decanul Facultății de Medicină Veterinară  
Universitatea Tehnică a Moldovei  
dr. conf., universitar  
POPOVICI Mihail

„08” septembrie 2023

### ACT DE IMPLEMENTARE Nr.3

de introducere a rezultatelor obținute cu referire la studiul utilizării exometaboliților din micromicete ca supliment în hrana albinelor pentru profilaxia bolilor contagioase, în procesul de studiu la disciplina "Boli infecțioase", la facultatea de Medicină Veterinară a UTM, din 05.09.2023

#### *Volumul lucrării efectuate.*

Scopul cercetărilor propuse de către doctoranda Veronica BUGNEAC în teza de doctor în științe medical veterinară, cu titlul "**Utilizarea unor produse de micromicete în profilaxia și combaterea locei americane și europene la albine**", a fost axat pe utilizarea exometaboliților din unele tulpini din micromicete (P. sp. 11, P.sp.19 și P.sp.62) în profilaxia bolilor contagioase la puietul familiilor de albine, care au fost administrați în componența suplimentului de hrană din siropul de zahăr și turtele din făină de grâu.

Rezultatele obținute au demonstrat că exometaboliții din micromicete au fortificat indicii fiziologici și productivi ai familiilor de albine, fiind exprimați prin majorarea volumului de cules și a pătratelor de puiet cârpăcit comparativ cu albinele lotului martor, precum și o acțiune antimicrobiană și antimitotică a tulpinilor de micromicete specificate, fapt ce au asigurat și prevenirea unor boli contagioase la puietul familiilor de albine.

Datele obținute au demonstrat ca exometaboliții extrași din micromicete pot fi utilizate ca alternativă a antibioticilor în scop profilactic al bolilor contagioase la familiile de albine, dar și ca stimulator al indicilor productivi la familiile de albine.

Materialul, figurile și tabelele prezentate în teză de doctorat a doctorandei BUGNEAC Veronica se utilizează în procesul didactic la disciplina "Boli infecțioase ale păsărilor, animalelor de blană, peștilor și albinelor", prezentată pentru studenții anului IV a facultății de Medicină Veterinară.

*Implementarea rezultatelor este efectuată de către titularii disciplinei menționate.  
Persoanele responsabile de prezentarea materialului:*

Doctoranda, UTM

dr. hab., prof. univ., UTM

Veronica BUGNEAC

Nicolae STARCIUC



USV 1842

“ION IONESCU DE LA BRAD” IASI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES (IULS)  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



# CERTIFICAT OF ATTENDANCE

*This is to certify that*

**PhD Student BUGNEAC Veronica**

TECHNICAL UNIVERSITY OF MOLDOVA  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

*has participated in the activities of the Conference for Veterinary Medicine organised  
by Faculty of Veterinary Medicine within the 10<sup>th</sup> International Scientific Congress  
„Life Sciences Today for Tomorrow”.*

Dean,  
PhD, Prof. Mihai MAREȘ

Vice-dean for scientific research activities,  
PhD, Assoc. Prof. Dragoș-Constantin ANIȚĂ

INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONGRESS  
October 19-20, 2023 Iasi, Romania



19-20 October 2023









**“ION CREANGA” STATE  
PEDAGOGICAL UNIVERSITY**

# SILVER MEDAL

*is awarded to Mrs/Mr*

**SÎRBU Tamara, BUGNEAC Veronica,  
STARCIUC Nicolai**

*Institution: Technical University of Moldova, Institute of  
Microbiology and Biotechnology, Faculty of Veterinary  
Medicine for participation in the **International Salon of  
Invention and Innovative Entreprenurship** with the  
paper **FEEDING PROCESS OF BEE FAMILIES***

**COROPCEANU Eduard**  
President of ISIIE



**BARBĂNEAGĂ Alexandra**  
Rector

**12-13 October 2023, Chişinău**

## DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatele propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Bugneac Veronica

Semnătura \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

	
<p align="center"><b>Curriculum vitae Europass</b></p>	
<p align="center"><b>Informații personale</b></p>	
<p>Nume / Prenume</p>	<p><b>Bugneac Veronica</b></p>
<p>Adresă(e)</p>	<p><i>Domiciliu:</i> bd. Dacia 25 , MD – 2060 Chișinău Republica Moldova, <i>Serviciu:</i> str.Petricani 198, Chișinău, SA Farmavet</p>
<p>Telefon(oane)</p>	<p>373. 22. 52.70.00. Mob. 781 42 373</p>
<p>E-mail(uri)</p>	<p>veronica.bugneac@gmail.com</p>
<p>Cetățenie</p>	<p>R. Moldova</p>
<p>Data nașterii</p>	<p>07 septembrie 1987</p>
<p>Sex</p>	<p>feminin</p>
<p><b>Locul de muncă vizat</b></p>	<p>SA Farmavet</p>
<p>Domeniul ocupațional</p>	<p>Specialist calitatea produselor farmaceutice.</p>
<p><b>Experiența profesională</b></p>	<p>2012-2015 tehnic farmacist SA Farmavet . 2015-2023 specialist calitatea produselor farmaceutice SA Farmavet.</p>

<b>Educație și formare</b>	<p>2022 - 2023 am absolvit Programul Educațional " Chinolog", or. Chișinău.</p> <p>2012-2015 școala doctorală frecvența la zi.</p> <p>2005-2012 Universitatea Agrară de Stat din Moldova, facultatea de medicină veterinară .</p> <p>Diplomă de master în medicină veterinară</p> <p>1994-2005 Liceu Teoretic satul Petrunca</p>
<b>Limba maternă</b>	română
<b>Limbi straine cunoscute</b>	Rusă – mediu, Franceză - curent, Engleză – cu dicționarul.
<b>Participări la foruri științifice</b>	<p>2019 ( 15 aprilie) – Conferința științifico –practică cu genericul "Metode noi și perspective în tratamentul animalelor".</p> <p>2019(12-14 noiembrie)– Seminar științifico – practic cu genericul "Managementul producerii de lapte și a patologiei metabolice și nutriționale la bovine".</p> <p>2020 ( 20 noiembrie ) – Conferința cu genericul "Antibiorezistența și utilizarea prudent antibioticelor/ controlul de abator și siguranța produselor alimentare".</p> <p>2021 (14 mai) – Conferința cu tema:" Prevenirea și atenuarea rezistenței la antibiotice, stabilirea reacțiilor adverse ".</p>
<b>Competențe și aptitudini de utilizare a calculatorului</b>	Word, Excel, Power Point, 1C.
<b>Licență de conducere</b>	Categorii: B.
<b>Hoby</b>	Patiserie, muzică, sport, citit.