

## CONTROLUL STATUSULUI IGIENIC ȘI MICROBIAN LA FAMILIILE DE ALBINE PRIN UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE

Bugneac Veronica

Universitatea Tehnică a Moldovei, or. Chișinău, Republica Moldova,  
e-mail: veronica.bugneac@mail.ru

**Abstract:** Based on the fact that the most critical period for bee families is the winter period, the research aim was to establish the hygienic status of bee families after winter period also the strengthening of the level of physiological resistance and feeding of bee families with the exometabolites of some strains of micromycetes administered together with wheat flour cakes. For the description of the morpho-cultural properties of the isolates with antimicrobial potential, the selected strains of micromycetes were cultivated on different agar media: malt-agar; Czapek; raistrick; starch-ammonia, and the description of the properties was carried out after 4, 7 and 14 days of cultivation. The results of the investigations showed that the level of hygienic behavior of bee families is the main factor that characterizes the state of health of bees, as well as decisively influences the resistance for metabolic, infectious and parasitic diseases. For cultivation of micromycete strains on specific nutrient media, the best cultural properties were obtained in case of using the malt-agar nutrient medium. Also is important to mention that the screening of 21 strains of micromycetes were demonstrated that the strain *P.sp. 91* had a more pronounced increase on the cultured millets. The administration of the micromycetes exometabolites *P.sp. 91* in a volume of 50 ml/kg cake, stimulated the prolificacy of the bee families, having index on the 24-th day after administration with 29% more compared to control lot.

**Keywords:** bees, winter period, bacterial flora, micromycetes, nutrient media, microbial colonies.

### INTRODUCERE

Rolul albinelor în natură și în viața omului este expusă în numeroase publicații la nivel global. Albinele sunt numite și ca făpturi superioare în natură, fiindcă hrana lor este nectarul și polenul florilor. Superioare, fiindcă doar zeii din Olimp, după cum se scrie în legende, se hrăneau cu nectar. Hrana albinelor este păstura, nectarul, polenul și mierea. Ele gustă doar ceea ce e mai pur. Nectarul absorbit pătrunde și se acumulează în gușa albinei. Într-un zbor, albina duce în stup încărcătură până la 70 mg la cel mai intens cules și mai puțin la culesuri slabe, ceea ce reprezintă  $\frac{2}{3}$  din greutatea ei corporală [6; 8; 10].

Procesul de transformare a nectarului în miere constă pe de o parte din procesele biochimice de invertire a zaharurilor ce se desfășoară sub influența invertazei din nectar, iar pe de altă parte din secrețiile albinelor și din eliminarea prisosului de apă existentă în nectar. Polenul, în hrana albinelor este o sursă unică de proteine. El conține albumine, săruri minerale. Pentru recoltarea polenului din flori albina își folosește întreg corpul: perișorii de pe cap, toracele, abdomenul, părțile bucale, toate cele trei perechi de membre [1; 8].

Important este și faptul că agricultura lumii depinde în proporție de peste 70% de albine, putându-se afirma că 70 din 100 de alimentele pe care le consumăm sunt datorate procesului de

polenizare făcut de albine. De asemenea, polenizarea pe care o fac albinele este fundamentală pentru reproducerea plantelor, acestea fiind principala sursă din care se hrănesc milioane de animale, fără de care fauna ar începe treptat să dispară. Unul din factorii care influențează starea de sănătate a familiilor de albine este apa și calitatea acesteia. Corpul albinelor în diferite țesuturi conține 75-80 % apă, iar în hemolină și mai mult. Albinele consumă apă pentru menținerea schimbului de substanțe la nivelul corespunzător, pentru hrana puietului, iar în cursul zilelor de arșiță, pentru reglarea temperaturii din cuib. Consumul maxim de apă și hrană are loc în lunile februarie- septembrie, în perioada depunerii ouălor, iar cel mai scăzut consum de hrană are loc în perioada octombrie-ianuarie după depunerea ouălelor și zborul albinelor. Nutriția albinelor se face în funcție de categorie, matcă, trântor, albină lucrătoare, dar și în funcție de sezon [6, 7, 10].

Obținerea în apicultură a unor producții sporite este strans 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, avînd 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. Apărarea stării de sănătate a familiilor de albine este o preocupare permanentă a medicilor veterinari și apicultorilor, care trebuie să se efectueze în conformitate cu prevederile legislației sanitare veterinară. Respectarea măsurilor de igienă, pentru a preveni contaminarea familiilor de albine și pentru a păstra o bună stare de sănătate a acestora este obligatorie [1, 3, 8, 10].

Starea igienică 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. Niciunul nu se pierde în amănuntele clipei deșarte, prețuind și făcînd util fiecare moment. Menținerea unui status igienic satisfăcător în familiile de albine este prerogativa apicultorilor și respectiv a medicilor veterinari [4, 9].

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, schimbări survenite în sol și numărul în scădere al apicultorilor, precum și prezența și răspîndirea unui număr mare de boli ale albinelor, 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 (pesticidelor) cu impact negativ asupra familiilor de albine, inclusiv asupra produselor apicole consumate de către om [1; 2; 5; 9].

Ca scop al cercetărilor propuse a fost analiza influenței statusului igienic al familiilor de albine și a unor produse din micromicete asupra stării de sănătate a familiilor de albine.

Obiectivele studiului au fost axate pe aprecierea rolului comportamentului igienic la familiile de albine în profilaxia bolilor infecțioase; influența microclimatului și a rezervelor de hrană la viabilitatea familiilor de albine în perioada de iernat; screeningul unor tulpini de micromicete cu acțiune antibacteriană și utilizarea acestora ca supliment nutrițional pentru fortificarea stării de sănătate la familiile de albine.

## **MATERIALE ȘI METODE**

Cercetările au fost îndeplinite în cadrul Departamentului Siguranța Alimentelor și Sănătate Publică a facultății de Medicină Veterinară, Universitatea Tehnică a Moldovei, în gospodăria experimentală de albine a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie și în laboratorul de microbiologie a Colecției Naționale de Microorganisme Neapatogene.

Ca obiect de studiu au servit unele tulpini de izolați de micromicete din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN) și tulpina de bacterii *Paenibacillus larvae*. Tulpinele de micromicete testate au fost izolate din probele de sol colectate din diferite regiuni a zonei centrale a Moldovei.

Pentru procedura de izolare a tulpinelor de micromicete, în calitate de mediu nutritiv a servit mediul malț-agar și mediul Czapek. De regulă, pentru păstrarea micromicetelor în CNMN se folosește mediul de cultură "Malț-agar". Componența mediului nutritiv Malț-agar include (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. Cultivarea tulpinilor de micromicete izolate s-a efectuat în termostat la temperatura de +28°C timp de 14 zile. Culturile au fost examinate vizual după caracterele morfo-culturale, cât și microscopic. În calitate de culturi test a servit bacteria *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al locii americane al albinelor *Apis mellifera*. Tulpinia patogenă *Paenibacillus larvae* a fost izolată din probele prelevate dintr-un stup de albine și este păstrată în condiții de laborator pe mediu agarizat. Pentru izolarea și păstrarea în condiții de laborator a tulpinii de bacterii *Paenibacillus larvae* a fost utilizat mediul Brain Heart Infusion (BHI) agar cu adaos de vitamina B6.

Componența mediului nutritiv Brain Heart Infusion (BHI) (g/l): brain infusion solids – 12,5; beef heart infusion solids – 5,0; peptocomplex – 10,0; glucoză – 2,0; NaCl – 5,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,5; agar – 15,0; tiamină - 0,1%; pH – 7,4. Proprietățile antimicrobiene ale izolațiilor de micromicete au fost studiate conform metodei difuzimetrice, prin utilizarea blocurilor de geloză. Metoda este bazată pe capacitatea de difuziune a metaboliților produși de microorganismele studiate în profunzimea agarului și a acțiunii substanței active din zona de difuzie asupra test – culturilor.

Descrierea proprietăților morfo-culturale ale izolațiilor de micromicete selectate cu potențial antimicrobian s-a efectuat pe diferite medii agarizate peste 4, 7 și 14 zile de cultivare la temperatura de 28-30°C.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Examinarea familiilor de albine îndată după perioada de iernat este o măsură obligatorie care permite de analizat care este starea de sănătate a familiilor de albine precum și nivelul vidului sanitar pe parcursul perioadei de iernat, în același timp, se monitorizează starea generală a stupilor de albine, a rezervelor de hrană, starea de sănătate după perioada de iernat, aspectul general sanitar, procentul de mortalitate.

Recercările efectuate în teren la familiile de albine sunt prezentate pe figurile 1, 2, 3 și 4 unde sunt prezentate unele acțiuni de monitorizare a stării de sănătate a familiilor de albine după perioada de iernat. Ca acțiune primară în analiza vidului sanitar al stupinei se examinează stupii și împrejurimea lor din exterior, starea ordiniișului, a teritoriului împrejurul stupilor. Se înlătură capacele stupilor și se examinează activitatea albinelor pe rame, numărul acestora, se scot fagurii din stup și la fel se examinează starea lor și anume prezența și numărul albinelor, resturile de hrană (fig.1 și 2), prezența sau lipsa materiilor diareice pe faguri sau pe pereții stupilor (fig. 3). Concomitent se prelevează probe de albine moarte (fig. 4), probe de resturi de la baza stupului, probe de faguri cu dimensiunile 10x10 cm. De menționat faptul că flora condiționat patogenă de origine bacteriană constituie un impact decisiv în apariția unor boli bacteriene la familiile de albine, atât la albinele mature, cât și la puietul acestora. Unii din factorii de bază în menținerea unui status de sănătate satisfăcător al familiilor de albine sunt reflectați prin crearea unui echilibru prioritar de microfloră benefică în cadrul familiilor de albine și menținerea unor condiții sanitare veterinare la un nivel înalt.



**Fig. 1 Examinarea vidului sanitar al familiilor de albine după perioada de iernat**



**Fig. 2 Analiza stării de sănătate a familiilor de albine**



**Fig. 3 Examinarea fagurilor, rezerva de miere și comportamentul albinelor**



**Fig. 4 Prelevarea probelor din stupi pentru cercetare**

Totuși factorul decisiv în menținerea unui mediu sănătos la familiile de albine poate fi controlat prin majorarea rezistenței fiziologice a organismului albinelor folosind diferite adausuri de produse biologic active administrate prin alimentația suplimentară a albinelor.

Investigațiile efectuate au avut ca scop prioritar de a ameliora starea generală (rezistența fiziologică) a familiilor de albine prin adausul suplimentar al exometaboliților unor tulpine de micromicete nepatogene, din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, izolate din solurile Republicii Moldova. De menționat faptul că pentru izolarea și cultivarea micromicetelor au fost utilizate mai multe medii nutritive care permit creșterea multor tipuri de micromicete, dintre care: Malț-agar; Czapek; Sabouraud Glucose Agar; Amidono amoniacal; mediul Waksman ș.a.

Totuși sunt foarte importante componentele care sunt incluse în componența adausurilor nutritive. Componentele mediilor nutritive pentru izolarea micromicetelor sunt reprezentate de peptonele din Sabouraud Glucose Agar care sunt o sursă de factori și 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 ciupercilor (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 ciuperci, dar nu și pentru multe bacterii. Reeșind din cele menționate pentru determinarea mediului optim de cultivare a tulpinilor selectate ce

posedă activitate antimicrobiană față de *Paenibacillus larvae*, acestea au fost cultivate pe 4 medii nutritive medii: Malț-agar, Czapek, Sabouraud, Amidono-amoniacal.

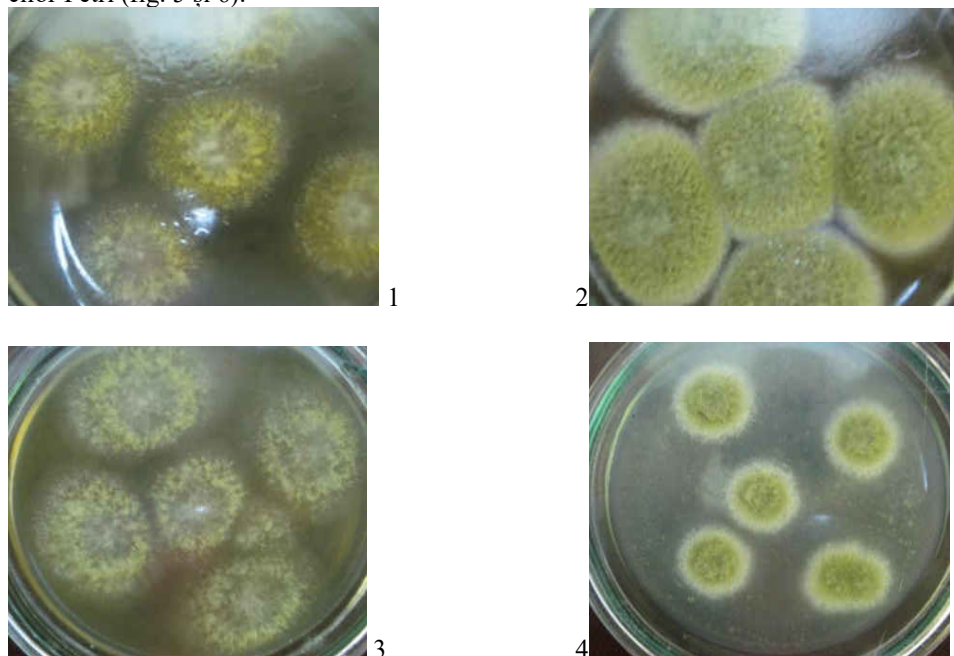
Dintr-un număr de 21 de izolate de micromicete, care au fost examinate și ulterior selectate pentru cercetare și pentru a stabili proprietățile antibacteriene și antifungice, au fost comparate, selectate și utilizate patru medii de cultură, care sunt specificate în tab. 1.

**Tabelul 1. Particularitățile morfo-culturale ale tulpinii P.sp. 91 cultivată pe diferite medii în dependență de perioada de cultivare**

Perioada de cultivare (zile)	Mediul agarizat			
	Malț-agar	Czapek	Sabouraud	Amidono-amoniacal
4	Diametrul coloniei - 3,5- 4,5cm. Culoarea verde-gălbui, forma și marginea rizoidă, foarte sporulentă și rugoasă, profilul convex. Cu o bordură albă de 4-5 mm. Margine cu spori. Riversul – 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 5 mm. Riversul transparent	Diametrul coloniei 3,0-3,5cm, culoarea verde albicioasă, rugoasă, cu spori verzi, forma și marginea rizoidală, profilul convex. Marginea albă cu spori verzi. Riversul galben deschis	Diametrul coloniei- 2,0-2,5 cm, culoarea verde intens, spori galbeni, neregulată, rugoasă. Profilul convex. Bordură albă cu d - 5mm. Marginea dințată, riversul verzui
7	Diametrul coloniei – 4,3-5,0cm. Culoarea verde deschis cu nuanță gălbuie, rugoasă, forma și marginea rizoidală, profilul convex. Riversul cărămiziu	Diametrul coloniei – 2,5-3,0 cm. Culoarea galben-verzui, foarte rugoasă, forma și marginea rizoidă, profilul ombilicat. Foarte sporulentă. Riversul transparent cu nuanțe verzui de la spori	Diametrul coloniei 4,5-5,0 cm, culoarea verde cu hife albe în centru, spori verzi, rugoasă, forma și marginea rizoidă, convexă. La mijloc nu formează spori. Riversul cărămiziu	Diametrul coloniei- 4,0-5,0cm, culoarea verde gălbui, foarte sporulent, sporii re-partizați uniform, nedată, catifelată, forma neregulată, profilul umbonat. Marginea dințată. Riversul verde-suriu
14	Diametrul coloniei – 5,0-6,0 cm, culoarea verde deschis, rugoase și foarte sporulente. Forma și marginea rizoidală, profilul convex. Riversul cărămiziu-închis	Diametrul coloniei - 2,8-3,2 cm, culoarea galben-verde, foarte rugoasă, profilul convex, forma și marginea rizoidă. Foarte sporulentă. Riversul cărămiziu cu nuanțe de roz și o bordură roză spre margine	Diametrul coloniei 5,0–5,5 cm, rugoasă, culoarea verde, la mijloc hife albe fără spori, sporii verzi, forma neregulată. Marginea rizoidă foarte sporulentă. Riversul cărămiziu, pe margine verde de la spori	Diametrul coloniei 5,0 cm, culoarea verde-închis, foarte sporulentă, catifelată, forma neregulată, profilul umbonat, marginea dințată. Riversul verde-suriu

Rezultatele prezentate în tabelul 1 relatează modul și intensitatea de creștere a tulpinei de micromicetă P.sp. 91, iar pe figurile 5 și 6 se observă deosebiri și modul de dezvoltare în dinamică, precum și intensitatea de creștere pe mediile de cultură de pe suprafața plăcilor Petri, a tulpinei P.sp. 91. Din imaginile prezentate observăm că această tulpină crește și se dezvoltă relativ optimal pe toate mediile testate. Totuși, se observă că mediul optim pentru cultivarea tulpinei de micromicetă P.sp. 91, conform diametrului maxim al coloniilor (5,5 - 6,0 cm) și gradului de sporulare (foarte sporulente), este reprezentat pe mediul Malț-agar.

Pe acest mediu tulpina respectivă de micromicete se dezvoltă mai rapid și mai intens, pe când pe celelalte medii, creșterea și dezvoltarea tulpinii este mult mai lentă. În dinamică s-a stabilit, că cea mai intensivă creștere a coloniilor de micromicete a fost observată la a 7-a zi de incubare, unde s-a observat extinderea micromicetelor pe suprafața plăcilor Petri (fig. 5 și 6).



**Fig. 5 Aspectul coloniilor tulpinii P.sp. 91 după 7 zile de cultivare pe diferite medii agarizate: 1 - Czapek; 2- Malț-agar; 3 - Sabouraud; 4 - Amidono-amoniacal**



**Fig. 6. Aspectul coloniilor tulpinii P.sp. 91 după 14 zile de cultivare pe diferite medii agarizate: 1 – aspect din față; 2 – aspect rivers**

Pentru fortificarea și stimularea rezistenței fiziologice la familiile de albine, după perioada iernatului, a fost preparat un produs cu exometaboliți din tulpina P.sp. 91 de micromicete, care a fost administrat în raport de 50 ml la 1 kg de turte din făină de grâu, fiind minuțios omogenizată. De regulă, turtele cu adaosul de exometaboliți au fost plasate de asupra fagurilor, pentru a fi consumate de către albinele din stup.



**Fig. 7 Analiza familiei de albine și aprecierea dozei de supliment de hrană**



**Fig. 8 Aplicarea turtelor cu supliment de exometaboliți din tulpina P.sp. 91. în stup**

După administrarea adaosului de hrană cu exometaboliți din tulpina P.sp. 91 de micromicete, la 24 de zile de la administrare a fost analizată starea de prolificitate la familiile de albine. Rezultatele investigațiilor au constatat că administrarea exometaboliților de micromicete, după metoda menționată, a stimulat o prolificitate sporită la familiile de albine care au primit acest supliment, cu o diferență de 29 %, comparativ cu familiile de albine din lotul martor.

## CONCLUZII

1. Nivelul compotamentului igienic al familiilor de albine este factorul principal ce caracterizează stare de sănătate a albinelor, potențialul de colectare a polenului și rezistența la bolile de origine infecțioasă, metabolică și parazitară.

2. Cultivarea tulpinilor de micromicete pe mediile nutritive specifice precum Maț-agar, Czapek, Sabouraud și Amidono-amoniacal, a demonstrat, că cele mai bune proprietăți culturale au fost obținute în cazul folosirii mediului Maț-agar.

3. Ca rezultat al scriningului efectuat, din 21 de tulpini de micromicete a fost selectată tulpina P.sp. 91 cu o creștere mai pronunțată pe mediile de cultură folosite, dar și cu un potențial antimicrobian și cu acțiuni benefice asupra stării fiziologice de sănătate a familiilor de albine.

4. Administrarea de exometaboliți din tulpina P.sp. 91 de micromicete în volum de 50 ml/kg turte a stimulat prolificitatea familiilor de albine având indicele respectiv la 24 zi de la administrare cu 29% mai mult comparativ cu albinele din lotul martor.

## BIBLIOGRAFIE

1. ABOU-SREEA, A., AZZAM, C.R., AL-TAWEEL, S.K., ABDEL-AZIZ, R.M., BELAL, H., RADY, M.M., ABDEL-KADER, A., MAJRASHI, A., KHALED, K. Natural Biostimulant Attenuates Salinity Stress Effects in Chili Pepper by Remodeling Antioxidant, Ion, and Phytohormone Balances, and Augments Gene Expression. In: Jurnal Plants (Basel). 2021 Oct 27;10(11):2316. doi: 10.3390; PMID: 34834678.
2. ALGHAMDI, S.A., ALHARBY, H.F., BAMAGOOS, A.A., ZAKI, S.S., ABU EL-HASSAN, A., DESOKY, E.M., MOHAMED, I., RADY, M. Rebalancing Nutrients, Reinforcing Antioxidant

- and Osmoregulatory Capacity, and Improving Yield Quality in Drought-Stressed *Phaseolus vulgaris* by Foliar Application of a Bee-Honey Solution. In: *Jurnal Plants (Basel)*. 2022 Dec 22;12(1):63. doi: 10.3390; PMID: 36616192.
3. 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: *Jurnal of Economic Entomology*. 2023 Jun 13;116(3):686-696. doi: 10.1093.
  4. DÉMARES, F.J., SCHMEHL, D., BLOOMQUIST, J.R., CABRERA, A.R., HUANG, Z.Y., LAU, P., RANGEL, J., SULLIVAN, J., XIE, X., ELLIS, J.D. Honey Bee (*Apis mellifera*) Exposure to Pesticide Residues in Nectar and Pollen in Urban and Suburban Environments from Four Regions of the United States. *Jurnal Environmental Toxicology and Chemistry*. 2022 Apr;41(4):991-1003. doi: 10.100; PMID: 35262221.
  5. EL AGREBI, N., STEINHAUER, N., TOSI, S., LEINARTZ, L., DE GRAAF, D.C., SAEGERMAN, C. Risk and protective indicators of beekeeping management practices. In: *Jurnal Science of the Total Environment*. 2021 Dec 10;799:149381. doi: 10.1016; MID: 34358747.
  6. EREMIA, N. *Apicultura*. Ch.: IEFS, 2009. - 332 p. ISBN 978-9975-9823-6-8.
  7. 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: *Jurnal Scientific Reports -Nature*. 2018 Aug 16;8(1):12263. doi: 10.1038; PMID: 30116056.
  8. PIERRE, L., VAUGHN, B., JAMES, E., ZACHARY, H., JOSEPH, S., DANIEL, R., SCHMEHL, A., CABRERA, J. Seasonal variation of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera*) in developed areas across four regions in the United States. In: *Journal PLoS One*. 2019 Jun 12;14(6):e0217294. doi: 0.1371.
  9. STEINHAUER, N., VANENGELSDORP, D., SAEGERMAN, C. Prioritizing changes in management practices associated with reduced winter honey bee colony losses for US beekeepers. In: *Jurnal Science of the Total Environment*. 2021, Jan 20; 753:141629; doi: 10.1016,PMID: 33207479.
  10. WRIGHT, G.A., NICOLSON, S.W., SHAFIR, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Jurnal Annual Review of Entomology*. 2018 Jan 7; 63:327-344. doi: 10.1146; PMID: 29029590.