

**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**

**UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE ÎN  
PROFILAXIA ȘI COMBATEREA LOCI AMERICANE ȘI  
EUROPENE LA ALBINE**

**431.03 - MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE,  
EPIZOOTOLOGIE, MICOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE  
VETERINARĂ**

Rezumatul tezei de doctor în științe medical-veterinare

**CHIȘINĂU, 2024**

Teza a fost elaborată în cadrul Departamentului Siguranța Alimentelor și Sănătate Publică al facultății de Medicină Veterinară al Universității Tehnice a Moldovei.

**Conducător științific:**

**STARCIUC Nicolae**, doctor habilitat în științe medical-veterinare, profesor universitar, UTM, 431.03 - Microbiologie, virusologie, epizootologie, micologie și imunologie veterinară.

**Consultant științific:**

**SÎRBU Tamara**, doctor în biologie, conferențiar cercetător, UTM, 163.04 – Microbiologie.

**Referenți oficiali:**

**PRISĂCARI Viorel**, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar, membru corespondent AȘM, USMF "Nicolae Testemițanu", 331.01 – Epidemiologie.

**CARAMAN Mariana**, doctor în științe medical veterinară, cercetător științific superior, Institutul Științific Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară, 431.03 - Microbiologie, virusologie, epizootologie, micologie și imunologie veterinară.

**Componența consiliului științific specializat:**

**ENCIU Valeriu**, doctor habilitat în științe medical-veterinare, profesor universitar, UTM, 431.02 – Morfologia, morfopatologia și oncologia animalelor, **președinte**.

**COCIU Valeriu**, doctor în științe medical veterinară, conferențiar universitar, UTM, 431.01 –Terapie, farmacologie și toxicologie veterinară, **secretar științific**.

**MACARI Vasile**, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar, UTM, 165.01 –Fiziologia omului și animalelor.

**BALAN Ion**, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar, UTM, 165.01-Fiziologia omului și animalelor.

**MOSCALIC Roman**, doctor habilitat în științe medical veterinară, academician AII., profesor cercetător, Institutul Științific Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină Veterinară, 431.03 - Microbiologie, virusologie, epizootologie, micologie și imunologie veterinară.

Susținerea va avea loc la data **29 aprilie 2024, ora 14<sup>00</sup>**, în ședința Consiliului științific specializat D 431.03-24-11 din cadrul Universității Tehnice a Moldovei, str. Mircești 52, aula V-1, MD 2049.

Teza de doctor și Rezumatul tezei pot fi consultate la Biblioteca Republicană Științifică a Universității Tehnice a Moldovei, Biblioteca Națională a Republicii Moldova și la pagina web a ANACEC ([www.anacec.md](http://www.anacec.md)) și pe pagina web a UTM (<http://repository.utm.md/>).

Rezumatul tezei a fost expediat la " 27 " martie 2024.

**Secretar științific al Consiliului Științific Specializat:**

doctor în științe medical-veterinare, conferențiar universitar \_\_\_\_\_ **COCIU Valeriu**

**Conducător științific:**

doctor habilitat în științe medical-veterinare, prof. univ. \_\_\_\_\_ **STARCIUC Nicolae**

**Consultant științific:**

doctor în biologie, conferențiar cercetător \_\_\_\_\_ **SÎRBU Tamara**

**Autor:**

\_\_\_\_\_ **BUGNEAC Veronica**

## CUPRINS

|   |    |
|---|----|
| <b>REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII</b> .....  | 4  |
| <b>1. IMPORTANȚĂ ECONOMICĂ, RĂSPÂNDIRE, MĂSURI DE PROFILAXIE ȘI<br/>COMBATERE ÎN LOCA AMERICANĂ ȘI EUROPENĂ LA <i>APIS MELIFERA</i> ÎN<br/>REPUBLICA MOLDOVA</b> .....  | 7  |
| <b>2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE</b> .....  | 8  |
| <b>3. IDENTIFICAREA UNOR TULPINI DE MICROMICETE CU POTENȚIAL<br/>ANTIMICROBIAN ȘI ANTIOXIDANT</b> .....   | 9  |
| 3.1. Izolarea patogenilor aspergilozei ( <i>Aspergillus</i> ) și loci americane ( <i>Paenibacillus larvae</i> )<br>din stupinele de albine și caracteristica proprietăților morfo-culturale ale acestora.....     | 9  |
| 3.2. Identificarea tulpinilor de micromicete cu proprietăți enzimatic semnificative și<br>eficacitatea față de agenții patogeni ai locii americane, locii europene și aspergilozei la<br>familiile de albine..... | 11 |
| 3.3. Selectarea mediilor de cultură a micromicetelor cu potențial enzimatic și antimicrobian<br>semnificativ.....   | 13 |
| 3.4. Tehnici de obținere a produselor din micromicete și utilizarea lor ca alternativă a<br>preparatelor cu acțiune bactericidă, fungicidă și antioxidantă.....   | 15 |
| <b>4. UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE ÎN SCOP DE<br/>PROFILAXIE A UNOR BACTERIOZE LA FAMILIILE DE ALBINE</b> .....  | 17 |
| 4.1 Date cu referire la situația epidemiologică a bolilor infecțioase la albine în Republica<br>Moldova.....  | 17 |
| 4.2. Metodica de stabilire a gradului de viabilitate și a statusului de sănătate a familiilor de<br>albinii în perioada activă a anului și în perioada de iernat.....   | 18 |
| 4.3. Metode și mijloace de igienă și de dezinfecție în apicultură.....  | 18 |
| 4.4. Date cu referire la microbiocenoza familiilor de albine înaintea perioadei de iernat și<br>după perioada de iernat.....  | 18 |
| 4.5. Eficacitatea utilizării unor produse din micromicete la familiile de albine în perioada de<br>pregătire pentru iernat.....   | 19 |
| 4.6. Eficacitatea utilizării exometaboliților din micromicete la familiile de albine.....   | 20 |
| <b>CONCLUZII GENERALE</b> .....   | 23 |
| <b>RECOMANDĂRI PRACTICE</b> .....   | 24 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 25 |
| <b>LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI</b> .....  | 28 |
| <b>ADNOTĂRI</b> (română, rusă, engleză).....  | 30 |

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea temei.** Bolile infecțioase sunt comune pentru toate organismele vii, inclusiv pentru albine. Astfel de boli pot produce mortalitatea coloniilor întregi de albine, iar în 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 albinelor, prevenirea și combaterea lor, au o importanță decisivă în apicultură. La momentul actual există programe de monitorizare și supraveghere sanitară 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 [1, 3, 8, 9, 10, 14, 15].

Este cunoscut faptul, că mediul înconjurător joacă un rol major în modelarea microbiomului albinelor. Pentru protejarea coloniilor de albine se recomandă ca stupinele cu albini mai sensibile să fie amplasate în locații mai puțin umede, sau umbrite și respectarea măsurilor de igienă, pentru a preveni contaminarea familiilor de albine [1, 6, 7, 9, 10, 13, 5, 17]. Totodată, ecosistemul în care activează albinele și suplimentele utilizate în hrană depinde diversitatea și compoziția microbiotei intestinale ale acestora [2, 4, 5, 11, 12, 16, 18, 19, 20].

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, 3, 10, 17].

**Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare.**

Incidența bolilor contagioase la familiile de albine rămâne o problemă permanentă pentru apicultori la nivel mondial, iar folosirea antibioticelor pentru controlul acestora este limitată sau interzisă din cauza apariției reziduurilor în produsele apicole.

În lucrarea dată este propusă ca alternativă în folosirea antimicrobienilor utilizarea exometaboliților din micromicete, care pot fi administrați ca supliment alimentar cu acțiune antioxidantă și antimicrobiană contra locii americane, locii europene și aspergilozei, totodată contribuie la stimularea indicilor productivi ai familiilor de albine.

**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** pentru atingerea scopului propus:

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

#### **Metodologia cercetării științifice.**

Pentru realizarea scopului propus și a obiectivelor trasate au fost utilizate metodele de cercetare clasice și moderne de studiu, inclusiv: metoda de izolare a fitopatogenilor din probele prelevate din stupinele de albine și identificarea lor (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*); metoda de selectare a tulpinilor de micromicete cu potențial antimicrobian față de patogenii selectați și enzimatic (catalaza) semnificativ; studiul particularităților morfo-culturale ale tulpinilor de micromicete selectate; metoda de elaborare a tehnicii de obținere a produselor din micromicete cu acțiune bactericidă, fungicidă și antioxidantă; metoda de testare a produselor microbiene obținute în stupine; metode de prelucrare statistică a rezultatelor.

**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 obținute, care contribuie la soluționarea problemei științifice importante în domeniul respectiv.**

Folosirea antibioticelor pentru controlul bolilor contagioase la puietul familiilor de albine este limitată sau interzisă din cauza apariției rezidurilor în produsele apicole. Ca alternativă în

folosirea antibioticelor sunt propuse soluțiile de exometaboliți, obținute în baza micromicetelor din genul *Penicillium*, cu potențial antimicrobian și antioxidant, pentru profilaxia și combaterea unor boli de origine bacteriană și fungică, deasemenea pot fi 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 a lucrării.** Pentru profilaxia și combaterea aspergilozei, locii americane și europene sunt propuse soluțiile de exometaboliți ai tulpinilor *Penicillium* sp. 91 și *Penicillium* 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 la 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).

**Aprobarea rezultatelor științifice.** Rezultatele științifice obținute în lucrare au fost prezentate și discutate 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; Salonul International „Salon of Invention and Innovative Entrepreneurship”, Chișinău, 2023. Salonul UGAL-INVENT, Galați, România, 2023.

**Publicațiile la tema tezei.** Rezultatele studiului au fost reflectate 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 medalii de argint obținute la saloanele de invenții.

**Volumul și structura tezei.** Teza este expusă pe 154 de pagini și cuprinde adnotările, listele tabelor, figurilor, anexelor și abrevierilor, introducere, 4 capitole, concluzii generale și

recomandări, bibliografie, care include 180 de referințe, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului. Teza este ilustrată cu 52 de figuri, 13 de tabele și 11 anexe. Rezultatele cercetării sunt reflectate în 12 lucrări științifice.

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

## CONȚINUTUL TEZEI

În compartimentul **Introducere** se menționează importanța ramurii apicole pentru agricultură, ecosisteme, sănătatea omului și animalelor și starea sectorului apicol la nivel global și național. Concomitent se argumentează problemele cu care se confruntă apicultorii, importanța stării epidemiologice favorabile față de bolile de origine bacteriană la familiile de albine, precum și metodele de combatere în cazul bolilor contagioase. Se accentuează importanța utilizării preparatelor cu acțiune stimulative și bacteriostatică ecologice, care nu formează reziduri în produsele apicole folosite în consumul uman.

### **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 ramurii apicole**

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

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

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

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

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

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

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

Capitolul respectiv cuprinde date cu referire la importanța ramurii apicole în natură și în sectorul agricol, date despre situația epidemiologică față de bolile contagioase la familiile de

albine, în special bolile de origine bacteriană și fungică la puietul albinelor, la nivel național și internațional, metodele de control și de diagnostic actuale al bolilor contagioase la puietul albinelor, precum și metodele de eradicare și asanare a unităților apicole nefavorabile de boli contagioase. Un accent deosebit se pune pe utilizarea unor produse biologice active cu scop de stimulare a familiilor de albine și utilizarea unor preparate cu acțiune antibacteriană și antifungică ca alternativă a antibacterienelor, concomitent inofensive la diferite reziduri de antibiotice în produsele apicole.

Datele prezentate în studiul bibliografic au contribuit la efectuarea unei analize a situației în domeniul de cercetare a patologiei infecțioase în apicultură, precum și la identificarea unor preparate inofensive cu efect stimulator asupra sănătății familiilor de albine și a indicilor de productivitate, prolificitate și de rezistență față de unii patogeni ai puietului albinelor *Apis mellifera*.

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

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

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

În calitate de obiecte de studiu au fost utilizate: tulpinile *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, 22 tulpini de micromicete din genul *Penicillium* din Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene și stupine cu albine *Apis mellifera*.

Cercetările au fost efectuate în perioada 2013-2017.

**Tabelul 2.1. 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.



Pentru realizarea obiectivelor lucrării au fost utilizate metodele microbiologice: studierea microflorei din probele prelevate din stupinele de albine; studierea proprietăților morfo-culturale ale coloniilor de micromicete crescute pe suprafața plăcilor Petri cu mediu agarizat; identificarea micromicetelor cu proprietăți antimicrobiene și enzimatiche semnificative.

Metode biochimice: determinarea activității enzimatiche – catalaza; metode de identificare a microflorei din stupinele de albine; metodele standardizate conform regulamentelor normative în vigoare de stabilire a indicilor de sănătate a familiilor de albine după iernat.

Metodele de stabilire a indicilor productivi și prolificitatea mătcilor; cantitate de puiet căpăcit; cantitatea de miere la primul cules. Metodele de analiză statistică a datelor.

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

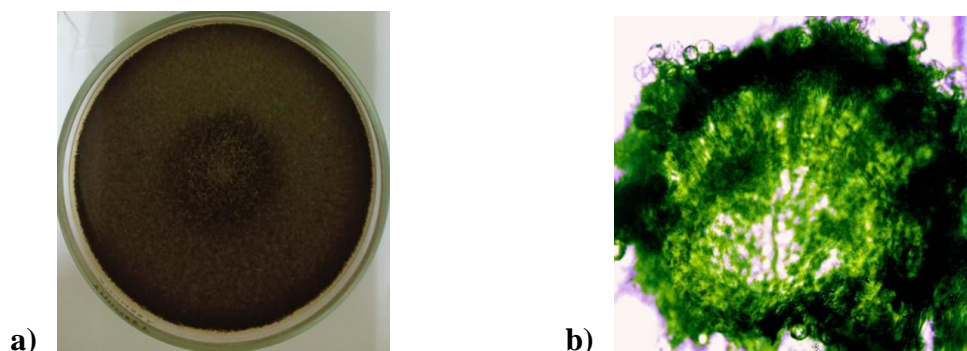
#### **3.1. Izolarea patogenilor aspergilozei (*Aspergillus*) și locii americane (*Paenibacillus larvae*) din stupinele de albine și caracteristica proprietăților morfo-culturale ale acestora.**

În acest compartiment sunt prezentate rezultatele studiilor bacteriologice a probelor prelevate de la stupinele aflate în cercetare cu caracterizarea deosebirilor morfologice a coloniilor de fungi și bacterii, precum și a rezultatelor microscopice a formelor de microorganisme izolate din materialul pentru cercetare.

Pentru detectarea și studierea agenților patogeni ai aspergilozei și locei americane și europene au fost prelevate probe din stupine de albine, probe din stup, cadavrele larvelor și albinelor pentru depistarea agenților aspergilozei (*Aspergillus spp.*). Din godeurile pentru miere și din cele 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. Prelevarea probelor a fost efectuată în lunile martie și mai. Toate probele au fost prelevate în vase sterile și studiate în laborator. După diluții succesive probele au fost inoculate în plăcile 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 vizuale și la microscop au fost depistate tulpini de fungi din genul *Aspergillus*, *Penicillium*, diferite genuri de bacterii.

Au fost selectate tulpinile *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai aspergilozei și *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al locei americane, care au fost minuțios examinate și studiate particularitățile lor morfologice și culturale.

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, reversul cărămiziu. Înălțimea coloniilor 1,0-2,0 mm, creșterea liniară 0,25-0,3 cm/zi. Măciuliile conidiale de culoare neagră, inițial au forma rotundă, iar apoi se dezvoltă radial, la maturizare se dispersează. 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. (3.1)

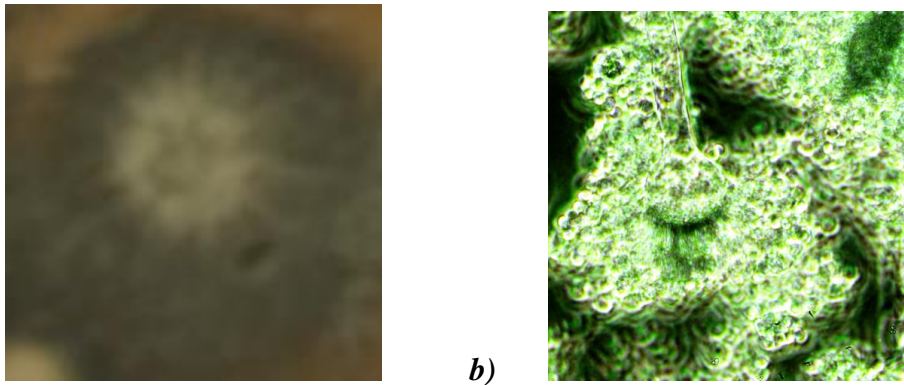


**Fig. 3.1. Aspectul tulpinii *Aspergillus niger*: a) aspect macroscopic, b) aspect microscopic X100**

Pe mediul agarizat Czapek 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, inițial 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, 45  $\mu$ m în diametru, cafenii, cu înveliș bine evidențiat, rugos. Reversum incolor.

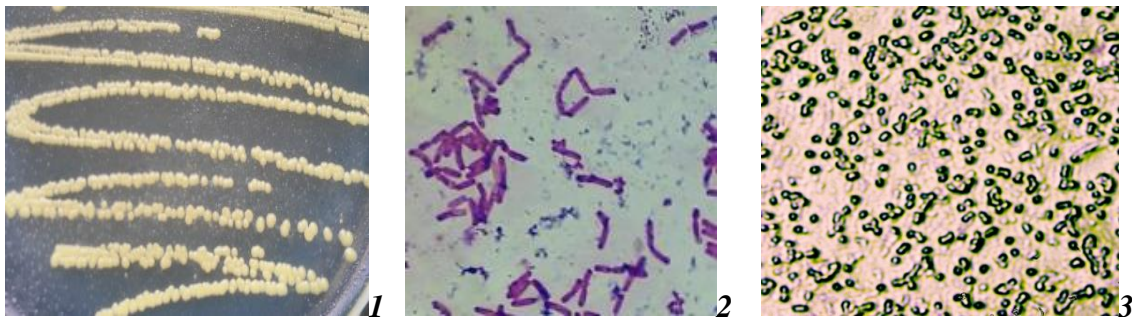
Tulpina *Aspergillus flavus* cultivată pe mediul malț-agar formează colonii cu diametrul de 3 - 4 cm, pufoase, catifelate, la mijloc miceliul mai înalt, culoarea inițial galbenă sau cafeniu deschis în centru cu nuanțe verzui, apoi verde, foarte sporulente, reversul cărămiziu. Conidioforii sunt incolori 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. 3.2).

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, sporulate, reversul cărămiziu. Conidioforii incolori, fialide în două rânduri, sporii rotunzi, netezi sau slab rușoși, verzui, dimensiune de 3 - 6  $\mu$ m.



**Fig. 3.2. Aspectul tulpinii *Aspergillus flavus* a) aspect macroscopic, b) aspect microscopic X100**

*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. 3.3 (1)), marginea netedă, profilul ușor convex, consistența vâscoasă, gradul de transparență opac, aspectul coloniei – netedă lucioasă. La examinarea microscopică s-a constatat că: celulele au formă de bacili groși solitari sau câte 2, după o perioadă îndelungată de timp pe mediul agarizat baciliii se îngroașă, mai mult solitari, formează spori (Fig. 3.3 (2)).



**Fig. 3.3. 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, de asemenea a fost testată și tulpina *Melissococcus plutonius* agentul patogen al locei europene.

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

A fost efectuat screeningul din 22 tulpini de micromicete din CNMN, ce aparțin genului *Penicillium*, pentru a selecta tulpini cu potențial antimicrobian semnificativ.

Ca agenți patogeni au fost testate micromicetele *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și bacteriile *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius*.

Ca martor au fost testate antibioticele Furazolidon, Tetraciclina și Neomicina (Tabelul 3.1).

**Tabelul 3.1. Activitatea antimicrobiană a tulpinilor de micromicete față de agenții patogeni al aspergilozei, loei americane și loei 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>                |
| Martor,<br>antibiotice | 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 15,5 mm. 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. Preparatul testat furazolidon, ce posedă proprietăți antifungice nu a manifestat activitate față de patogenii de aspergiloză *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*.

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).

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). 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.

A fost efectuat screeningul tulpinilor de micromicete după criteriul activității catalazei.

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

| № d/o | Tulpinile testate         | Activitatea catalazei, U/ml | № d/o | Tulpinile testate          | Activitatea catalazei, U/ml |
|-------|---------------------------|-----------------------------|-------|----------------------------|-----------------------------|
| 1     | <i>Penicillium sp.</i> 11 | 231,1±10,0                  | 12    | <i>Penicillium sp.</i> 93  | 8,3±0,2                     |
| 2     | <i>Penicillium sp.</i> 19 | 116,6±4,5                   | 13    | <i>Penicillium sp.</i> 91  | 0                           |
| 3     | <i>Penicillium sp.</i> 32 | 0                           | 14    | <i>Penicillium sp.</i> 97  | 0                           |
| 4     | <i>Penicillium sp.</i> 52 | 9,5±0,5                     | 15    | <i>Penicillium sp.</i> 100 | 3,0                         |
| 5     | <i>Penicillium sp.</i> 62 | 28,0±0,5                    | 16    | <i>Penicillium sp.</i> 101 | 0                           |
| 6     | <i>Penicillium sp.</i> 78 | 8,0±0,2                     | 17    | <i>Penicillium sp.</i> 102 | 9,7±0,3                     |
| 7     | <i>Penicillium sp.</i> 79 | 10,2±±0,3                   | 18    | <i>Penicillium sp.</i> 103 | 7,3±0,2                     |
| 8     | <i>Penicillium sp.</i> 80 | 7,2±0,2                     | 19    | <i>Penicillium sp.</i> 104 | 10,0±0,5                    |
| 9     | <i>Penicillium sp.</i> 81 | 1,7±0,1                     | 20    | <i>Penicillium sp.</i> 106 | 7,3±-.2                     |
| 10    | <i>Penicillium sp.</i> 83 | 8,8±0,2                     | 21    | <i>Penicillium sp.</i> 109 | 5,7±0,2                     |
| 11    | <i>Penicillium sp.</i> 88 | 21,6±0.4                    | 22    | <i>Penicillium sp.</i> 110 | 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 - 116,6 U/ml), s-a evidențiat și tulpina *Penicillium sp.* 62, la care activitatea catalazei a constituit 28,8 U/ml. La restul tulpinilor, luate în studiu, activitatea catalaze în lichidul cultural a variat în limitele 1,7 - 21,6 U/ml.

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

Pentru identificarea 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.

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 mediul malț-agar, comparativ cu restul mediilor testate, la toate tulpinile studiate, miceliul aerian a fost mai bine dezvoltat și sporularea mai intensă. Bine au crescut 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 (Tab. 3.3).

**Tabelul 3.3. 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 sp. 11</i> | Malț-agar         | 15,5 ± 2,5  | 0                        | 0                           | 0                              |
|       |                           | Czapek            | 14,0 ± 1,5  | 0                        | 0                           | 0                              |
| 2     | <i>Penicillium sp. 19</i> | Malț-agar         | 0   | 0                        | 0                           | 0                              |
|       |                           | Czapek            | 0   | 0                        | 0                           | 0                              |
| 3     | <i>Penicillium sp. 62</i> | 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 sp. 91</i> | Malț-agar         |   |                          | <b>23,5 ± 1,5</b>           | <b>24,0 ± 1,5</b>              |
|       |                           | Czapek            |   |                          | <b>22,0 ± 1,6</b>           | <b>22,0 ± 2,0</b>              |
| 5     | <i>Penicillium sp. 97</i> | 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, activitatea antimicrobiană la toate tulpinile studiate, cultivate pe mediul de cultură malț-agar a fost mai mare comparativ cu mediul Czapek. La cultivarea tulpinii *Penicillium sp. 62* pe mediul malț-agar zona de inhibiție a patogenului *Aspergillus flavus* a fost de 29 mm, iar în rezultatul cultivării pe mediul Czapek de 25,5 mm. De asemenea sensibilitatea față de patogenii *Aspergillus niger*, *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius* a fost mai pronunțată la cultivarea tulpinii pe mediul malț-agar, comparativ cu mediul Czapek. 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 tulpini cultivate pe mediul malț-agar este de 15,5 – 16,0 mm, iar cultivată pe mediul Czapek de 14,5 -15,0 mm. Zona de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* și *Melissococcus plutonius* la testarea tulpinii

*Penicillium sp.* 91 cultivată pe mediul Czapek a constituit 22 mm, față de 23,5 mm și respectiv 24,0 mm cultivată pe mediul malț agar. Astfel, s-a stabilit că, mediul de cultură optim pentru tulpinile *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62, *Penicillium sp.* 91, *Penicillium sp.* 97 a fost malț-agar.

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

Au fost identificați potențialii agenți de biocontrol împotriva fitopatogenilor majori: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae*, în condiții *in vitro*.

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°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. În godeuri de pe cutiile Petri cu patogeni a fost introdus câte 0,1 ml soluție de exometaboliți ai tulpinilor de *Penicillium* (Tab. 3.4).

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. Deci putem 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 locei europene.

**Tabelul 3. 4. 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.</i> 91 | 0   | 0                        | <b>21,0 ± 1,2</b>           |
| 2     | <i>Penicillium sp.</i> 97 | <b>33,0 ± 2,5</b>                                   | <b>18,0 ± 1,5</b>        | 16,0 ± 1,0                  |

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, paralel a fost determinată activitatea catalazei (Tab.

3.5). Reieșind din rezultatele prezentate în Tab. 3.5. 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 3.5. 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. 3.6).

**Tabelul 3.6. 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 *Penicillium.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 î-și diminuează din proprietățile biosintetice a fost evaluată acțiunea acestei asupra patogenilor în condiții de laborator.

Astfel, soluțiile de exometaboliții, fără CFC, ai tulpinii *Penicillium sp.* 91 cu acțiune bactericidă, dar și ai tulpinii *Penicillium sp.* 97, cu acțiune bactericidă și fungicidă, se recomandă a fi administrate ca alternativă a preparatelor cu acțiune bactericidă și fungicidă pentru profilaxia stupinelor de albine, sau pot fi combinate cu alte metode de control al bolilor loca americană și loca europeană la albine, 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

În acest capitol sunt prezentate rezultatele cu referire la situația epidemiologică față de bolile contagioase la familiile de albine în Republica Moldova; eficiența utilizării exametaboliților din micromicete la unii indici de sănătate și productivi ai albinelor, precum și efectul acestora în prevenirea bolilor bacteriene și fungice la familiile de albine *Apis mellifera*.

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

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 Tab. 4.1 se observă că pe parcursul perioadei anilor 2013-2017 la familiile de albine monitorizate au fost întâlnite boli infecțioase și parazitare.

**Tabelul 4.1. 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 rezultatelor din tabel, s-a stabilit că ce-a mai înaltă incidență dintre bolile înregistrate la puietul albinelor a prezentat-o *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 dintre 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 parazitară, 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%.

#### **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.**

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. Foarte important sunt măsurile de monitorizare a stării de sănătate a familiilor de albine și anume prin prisma 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. Rezultatele obținute în studiul microbiologic denotă faptul 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 drojzii. 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 fonul 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.

În acest subpunct sunt prezentate unele recomandări de ordin sanitar-veterinar care conduc la insecuritatea familiilor de albine, precum și diminuarea riscului de dezvoltare a unor focare de boli contagioase în cadrul stupinelor.

#### **4.4. Date cu referire la microbiocenoza 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, selectate prin metodă aleatorie, pentru cercetări bacteriologice.

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.* 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.

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

În scopul menținerii unui status microbial benefic și pentru a stimula rezistența fiziologică a organismului albinelor în perioada de iernat, 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 preparate 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 exometaboliți: 10 ml/l, 25 ml/l și 50 ml/l de sirop de zahăr.

Primăvara, după iernat a fost evaluată acțiunea exometaboliților de micromicete asupra albinelor după indicii de sănătate: procentul 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.

În rezultatul acestor cercetări s-a stabilit că 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 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.

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 25 ml/kg de turtele de grâu, comparativ cu indicele  $7 \pm 1,0$  % la grupa lot martor.

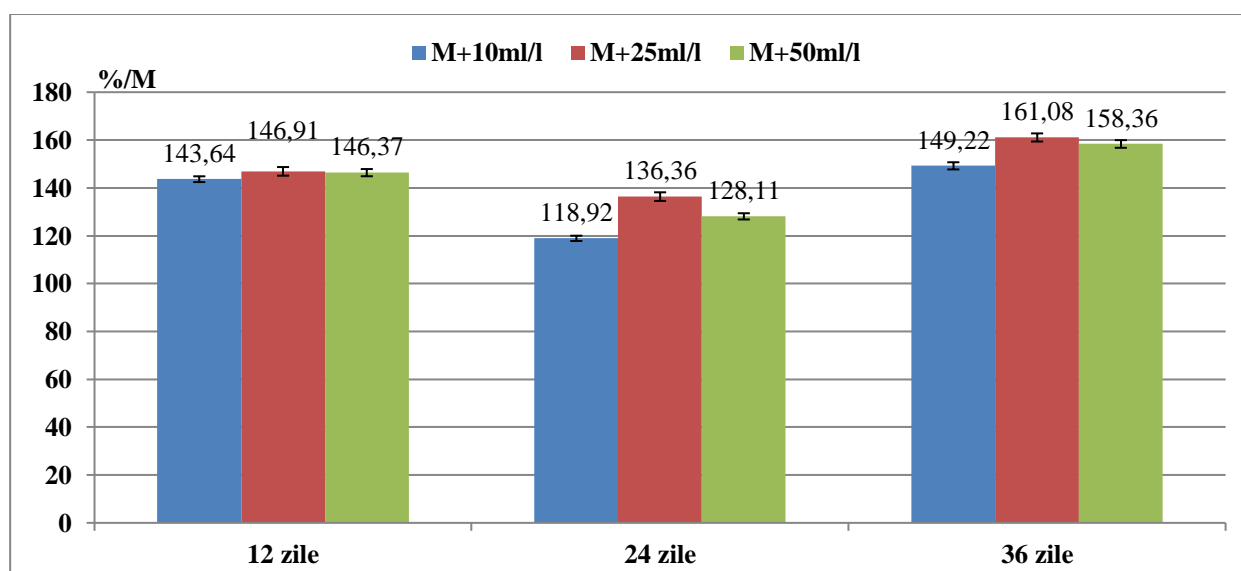
Cel mai înalt indice a rezistenței la iernat –  $98 \pm 0,2\%$ , a fost stabilit la familiile de albine care au fost alimentate cu supliment de hrană cu adaus de exometaboliți ai tulpinei *Penicillium sp.11*, în diluția de 50 ml/kg de rute din făină de grâu, comparativ cu grupa lot martor –  $82 \pm 0,5\%$ . La familiile de albine care au primit ca supliment în hrană exometaboliți 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 (1 g/l și 2 g/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.

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

După perioada de iernat (primăvara), au fost 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.

Au fost monitorizați indicii: numărul de pătrate cu puiet căpăcit; prolificitatea familiei de albine; cantitatea de miere pe ramă; puterea familiei. Cele mi bune rezultate au fost obținute la utilizarea exometaboliților tulpinii *Penicillium sp. 11* (*Penicillium funiculosum*)



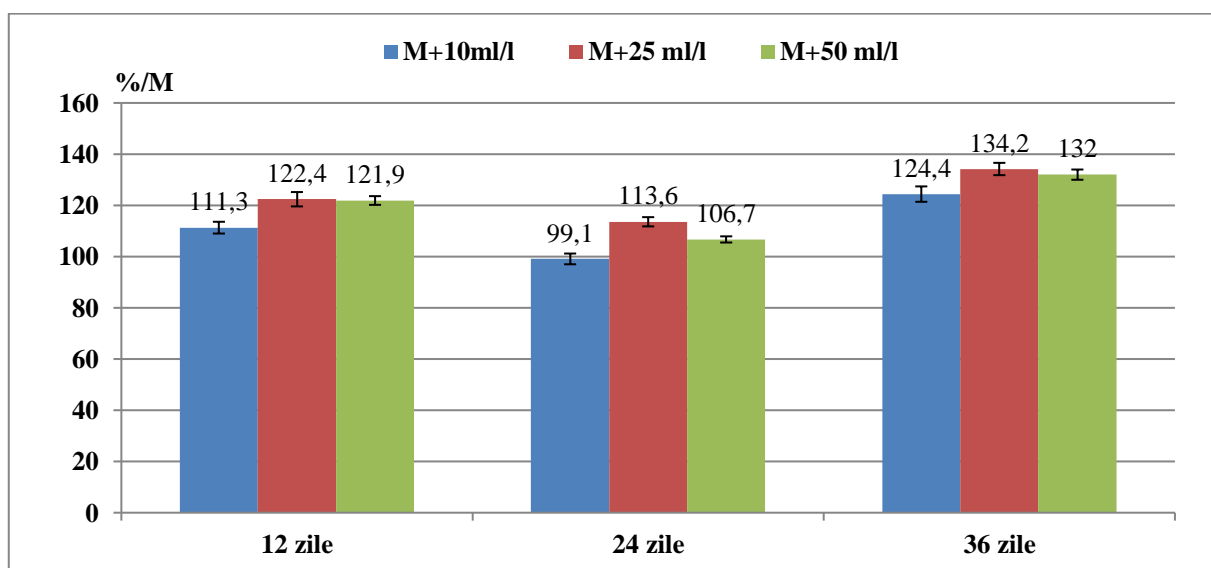
Nota:  $P < 0,01$ .

**Figura 4.1. Numărul de pătrate cu puiet căpăcit, % față de lot martor (100%) în varianta cu exometaboliți ai micromicetei *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp. 11*)**

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 exametaboliți, este prezentat pe Fig. 4.1.

La a 12-a zi după administrarea soluției de exometaboliți, numărul pătratelor cu puiet căpăcit a avut variații de la 143, 64 pătrate (în diluția 10 ml/l) pînă 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 pînă la 161,08 pătrate de puiet căpăcit, a fost obținut la 36 zile de la administrarea exometaboliților din tulpina *Penicillium sp.11*.

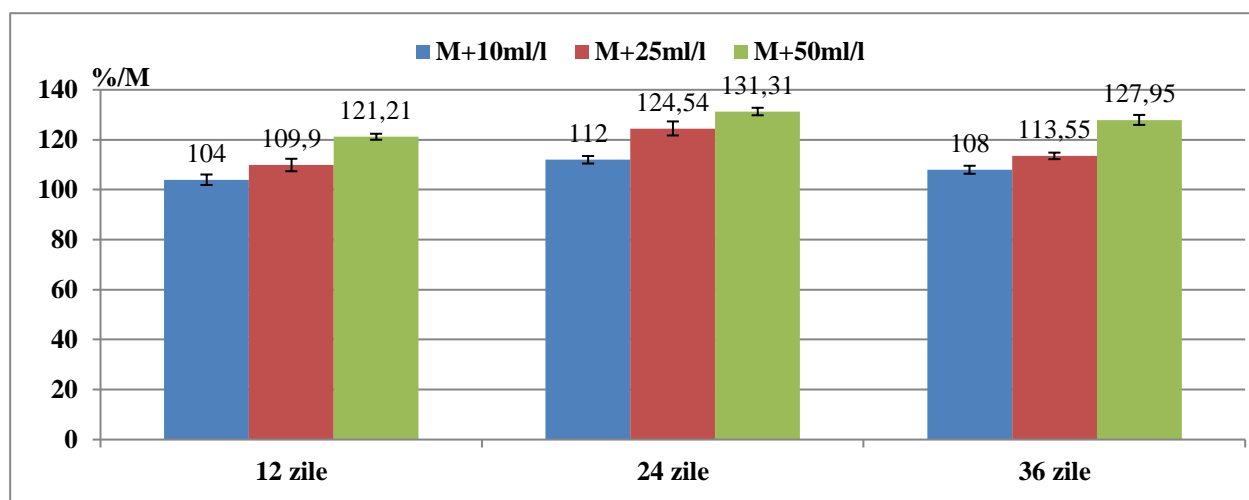
Un alt indicator aflat în studiu, a fost axat pe stabilirea procentului de prolificitate a mătcilor de albine, în cazul utilizării în hrăna albinelor a siropului de zahăr suplimentat cu soluția de exometaboliți obținuți din tulpinii de micromicete *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.11*). Rezultatul acestui studiu este prezentat în Fig. 4.2. de unde observăm, că cel mai înalt indicator al prolificității familiilor 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. 4.2. Prolificitatea mătcilor de albine, % față de lotul martor (M=100%) sub acțiunea EM tulpinii *Penicillium funiculosum* (*Penicillium 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. 4.3). Astfel, cel mai înalt procent de colectare a cantității de miere a fost stabilit la 24 de zile după alimentarea albinelor cu supliment de exometaboliți în concentrația de 50 ml/l de sirop, avînd valori de 131,31%, 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.



Nota:  $P < 0,05$

**Figura 4.3.** Cantitatea de miere pe ramă, % față de lot martor ( $M = 100\%$ ), obținute în varianta cu utilizarea EM de *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp. 11*).

Un alt indice este **puterea familiei**. Reieșind din datele obținute s-a constatat că puterea familiei după 36 de zile, în cazul suplimentării hranei de albine cu exometaboliți din tulpina *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 ( $P < 0,05$ ).

Rezultatele obținute în variantele montate cu utilizarea exometaboliților tulpinilor *Penicillium sp. 19* și *Penicillium sp. 62* au fost mai mici.

S-a demonstrat că valorile maxime ale indicilor monitorizați la familiile de albine, au fost obținute după 36 zile de la administrarea exometaboliților din tulpina *Penicillium piceum* (*Penicillium sp. 19*), în varianta cu diluția 50 ml/l. Astfel, numărul de pătrate cu puiet căpăcit a constituit 115,84 %, prolificitatea – 96,6%, cantitatea de miere pe ramă – 128,2%, puterea familiei - 112,7% față de lotul martor.

Datele obținute au demonstrat, că cel mai mare număr de pătrate cu puiet căpăcit a fost înregistrat la familiile de albine care au primit exometaboliții din tulpina *Penicillium corylophilum* (*Penicillium sp. 62*) la 24 de zile de la aplicarea hranei în varianta cu concentrația de 10 ml/l, acest indice a constituit 132,69%, iar la concentrația de 25 ml/l cel mai înalt indice de prolificitate - 110,6 % și cea mai mare cantitate de miere - 112,54 % față de lotul martor. Cele mai bune rezultate ale puterii familiei – 116,4% ( $P < 0,05$ ) față de martor au fost înregistrate în varianta în care concentrația soluției de exometaboliți a constituit 50 ml/l.

## CONCLUZII GENERALE

1. În rezultatul cercetărilor 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 locei americane și *Melissococcus plutonius*, agent patogen al locei europene, iar zonele de inhibiție a patogenilor menționați sub acțiunea exometaboliților acestor tulpini au avut variații în limitele 15,5 - 34,0 mm.

2. Au fost selectate tulpinile *Penicillium corylophilum* CNMN FD 20 (*Penicillium sp.* 62) și *Penicillium sp.* 97, care au manifestat 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. Investigațiile microbiologice au demonstrat că, exometaboliții tulpinile *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.* 11) și *Penicillium piceum* (*Penicillium sp.* 19), posedă o înaltă activitate a catalazei cu valori de 430 U/ml și 600 U/ml respectiv, fapt ce a permis utilizarea acestora ca supliment al hranei 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 submerse a tulpinilor de micromicete cu ulterioara tratare termică a soluțiilor de exometaboliți obținute la temperatura de 60°C, timp de 1 oră.

5. Studiul microbiotei familiilor de albine a demonstrat că, după perioada iernatului există o combinație de forme bacteriene din genurile: *E. coli*, cu ponderea peste 50%, o asociere de *Streptococi*, *Stafilococi* cu ponderea până la 30%, până la 5 % formele de bacterii din genul *Salmonella spp.* și unele forme de fungi cu un raport de 15%.

6. 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, a contribuit la îmbunătățirea indicilor de sănătate a albinelor, exprimați prin reducerea procentului de albine moarte după iernat, fortificarea rezistenței albinelor la iernare, stimularea gradului de câpăcire precum și ameliorarea comportamentului albinelor și a activității de zbor.

7. Administrarea soluției de exometaboliți ai tulpinii *Penicillium funiculosum* (*Penicillium sp.* 11), suplimentar în hrana albinelor în concentrație de 25 ml/l soluție de zahăr de 50%, primăvara timpuriu, a contribuit la stimularea indicilor de productivitate față de martor, fiind exprimați prin majorarea numărului de larve câpăcite cu 61%, indicele de prolificitate cu 34,2%, cantitatea mierii pe ramă 13% și puterea familiilor cu 56,7%.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

Se recomandă 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 bolilor Loca americană și Loca europeană.

Pentru profilaxia și combaterea fungilor *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai Aspergilozei la albine se recomandă utilizarea exometaboliților micromicetelor *Penicillium sp.* 97 și *Penicillium sp.* 11.

Pentru profilaxia infecțiilor bacteriene și fungice, dar și stimularea familiilor de albine se recomandă administrarea ca supliment în hrana albinelor 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 [citată 20.07.2023]. ISSN: 2223-7747. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/plants10112316>.
2. 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 [citată 20.07.2023]. ISSN 1876-2891. Disponibil: <https://doi.org/10.3920/bm2017.006>.
3. 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. [citată 23.07.2023]. ISSN 1932-6203. Disponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261957>.
4. 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>.
5. 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: <http://doi.org/10.1556/004.2020.00057>.
6. 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>.
7. **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.

8. 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.
9. 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>.
10. EREMIA, N. *Apicultura*. Ch.: IEFS, 2009. 332 p. ISBN 978-9975-9823-6-8.
11. 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.
12. 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 [citat 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).
13. 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 [citat 04.05.2023]. ISSN 1878-4380. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003>.
14. 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/feco.2022.837381>.
15. LAZĂR, Ș., VORNICU, O.C. *Apicultura*. Iași: Alfa, 2007. 658 p. ISBN 978-973-8953-37-6.
16. 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>.
17. STEINHAUER, 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>.

18. 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*. 2014, nr. 3 (324), pp. 4–15. ISSN 1857-064X.
19. TUKTAROV, V., KUZNETOVA, V., MUSHUKOVSKAIA, G. et. al. *Preparation for stimulation of physiological functions in bees and their protection against infectious diseases*. R.F. Baskartostan, Ufa, 2010. RU 2380406 C2 2010.01.27.
20. 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*. 2022, nr. 1(13). ISSN 2041-1723.

Lista

lucrărilor științifice și metodico-didactice  
ale d-lui (d-nei) **BUGNEAC Veronica**, doctorand  
la Departamentul Siguranța Alimentelor și Sănătate Publică  
facultatea de Medicină Veterinară al UTM

**LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE**

**Articole în reviste științifice**

- în reviste din bazele de date **Web of Science** și **SCOPUS**

1. **BUGNEAC, V., STARCIUC, N.** The impact of the microbial status of bee families during the winter period. În: Revista One Health and Risk Management, Vol. 5, No 1, 2024, pp. 4-8. 0,32 c.a. ISSN 2587-3458. <https://doi.org/10.38045/ohrm.2024.1.01>

- în alte reviste din străinătate recunoscute

2. **STARCIUC, N., BUGNEAC, V.** Antifungal index of some strains of micromycetes against mycotic infections of apes melifera. În: *Lucrări științifice medicină veterinară*, vol. XLIX(2), Timișoara, 2016, pp. 119-123. 0,32 c.a.
3. **BUGNEAC V., STARCIUC N., ȘÎRBU T.** The use of some exometabolites from micromycetes for the fortification of resistance indices in bee. În: *Scientific Papers Journal – vol. 66 no 3 / 2023, VETERINARY SERIES (21-22 octombrie 2023, Iași, Romania)*, p. 64-68. ISSN (print) 1454-7406; ISSN (electronic) 2393-4603  
[https://www.uaiasi.ro/revmvis/index\\_htm\\_files/vol\\_66\\_2023\\_3.pdf](https://www.uaiasi.ro/revmvis/index_htm_files/vol_66_2023_3.pdf)

- în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B;

4. **BUGNEAC, V.** Indici antimicrobieni ai unor tulpini de micromicete utilizate în tratamentul locii americane. În: *Știința Agricolă*, UASM, Chișinău, 2016, nr. 1, pp. 97-100., 0,25 c.a. ISSN 1857-0003
5. **BUGNEAC, V.** Indici microbiologici ai familiilor de albine înaintea iernatului. În: *Știința Agricolă*, UASM, Chișinău, 2017, nr. 2, pp. 125-128., 0,25 c.a. ISSN 1857-0003
6. **BUGNEAC, V., ȘÎRBU, T., STARCIUC, N.** Studiul proprietăților morfo-culturale și biosintetice ale micromicetelor în dependență de mediul de cultură. *Intellectus*, nr. 2, 2023, p. 123-130. ISSN 1810-7087. <https://agepi.gov.md/ro/intellectus/intellectus-2-2023>

**Articole în culegeri științifice naționale/internaționale**

- în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

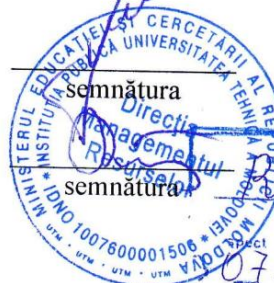
7. **BUGNEAC, V.** Scrinul unora tulpini de micromicete cu acțiune antifungică în micoze la albine. În: *Lucrări științifice*, UASM, Chișinău, 2014, Vol. 40 (Medicina Veterinară), pp. 223-225. 0,20 c.a. ISBN 978-9975-64-263-7.
8. **BUGNEAC, V.** Controlul statusului igienic și microbial la familiile de albine prin utilizarea unor produse din micromicete. În: *Lucrări științifice la conferința științifico-practică cu participare internațională cu genericul „Gestionarea fondului genetic animalier – probleme, soluții, perspective”*, 28-30 septembrie 2023. Chișinău, pp. 361-368., 0,56 c.a. ISBN 978-9975-175-38-8.

Autor:

Veronica BUGNEAC

Secretar științific al Senatului UTM  
dr., conf. universitar

07.03.2024



9. **BUGNEAC, V.** Tulpini de micromicete – sursă potențială de principii bioactive cu aplicare în apicultură. În: *Lucrări științifice la conferința științifico-practică cu participare internațională cu genericul „Gestionarea fondului genetic animalier – probleme, soluții, perspective”*, 28-30 septembrie 2023. Chișinău, pp. 476-482., 0,44 c.a. ISBN 978-9975-175-38-8

• **Teze ale conferințelor științifice**

10. **SÎRBU, T., BURȚEVA, S., STARCIUC, N., BUGNEAC, V., POSTOLACHI, O.** **Micromicete – perspectivi producători de substanțe bioactive.** *Biotehnologii avansate – realizări și perspective. Al III Simpozion național cu participare internațională.* Chișinău 2013. p.p. 64. 0,07 c.a. ISBN 978-9975-56-111-2.
11. **SÎRBU, T., STARCIUC N., BUGNEAC, V.** **Environmental influence of solid composition of growing on growth and character of antagonist fungal strains.** *Scientific international conference on microbial biotechnology (2nd edition),* Chișinău 2014. p.p. 177. 0,7 c.a. ISBN 978-9975-4432-8-9.
12. **БУГНЯК ВЕРОНИКА, СЫРБУ ТАМАРА.** **Эффективность экзометаболитов микромицетов в профилактике и борьбе с аспергиллёзом пчел.** 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 c. 394. 0,07 c.a.

• **Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală, materiale la saloanele de invenții**

13. **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.
14. **SÎRBU, T., BUGNEAC, V., STARCIUC, N.** **Silver Medal.** *International Salon Invention and Innovative Entrepreneurship with the paper FEEDING PROCESS OF BEE FAMILIES.* 12-13 octombrie 2023, Chișinău. „Ion Creangă” State Pedagogical University.
15. **SÎRBU, T., BUGNEAC, V., STARCIUC, N.** **Medalie de argint.** *Feeding process of bee families. Salonul Inovării și cercetării UGAL-INVENT, 09-10 noiembrie 2023, Galați, România.*

Autor:

Secretar științific al Senatului UTM  
dr., conf. universitar

07.03.2024

Veronica BUGNEAC



## 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, stimulative, 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 *Penicillium* 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).



**BUGNEAC VERONICA**

**UTILIZAREA UNOR PRODUSE DIN MICROMICETE ÎN  
PROFILAXIAȘI COMBATEREA LOCII AMERICANE ȘI  
EUROPENE LA ALBINE**

**431.03 - MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE,  
EPIZOOTOLOGIE, MICOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE  
VETERINARĂ**

Rezumatul tezei de doctor în științe medical-veterinare

---

Aprobat spre tipar: 26.03.2024

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Coli de tipar: 1,75

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Tiraj: 40 ex.

Comanda nr. 2587

---

Editura "ARVA COLOR" SRL

MD 2049, or. Chișinău, str. Mircești 22/4B

Tel. 060 92 66 64