

SCRININGUL UNOR TULPINI DE MICROMICETE CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ ÎN MICOZE LA ALBINE

VERONICA BUGNEAC
Universitatea Agrară de Stat din Moldova

Abstract. The resistance to diseases of bees is due to natural immunity and acquired antimicrobial effect of salivary glands secretion and feticides which is in nectar and pollen plants and have to the bactericides and fungicides effects, but in honey bee intestines there are many pathogen spores which can be activated in the situation when the bee do not have enough quality food, or bad climatic conditions (high humidity, high temperature, bad ventilation, old combs et all). Aim of this investigations was to evaluate the antifungal potential of some fungal against *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigates*. For the object of study served 21 fungal isolates from the National Collection of Microorganisms Nonpathogenic and pathogenic strains 2 - *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. The tested strains were isolated from soil samples, taken from the central area of Moldova. As a nutrient medium for the isolation micromycetes served the malt-agar and Czapek medium. Growing strains was performed in thermostat at +28°C during 14 days. As the test-cultures were used two strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, aspergillosis bee pathogens which have been isolated from samples taken from the hive of bees.

Key words: Bee, Fungal culture media, Microorganisms, Micromicetes, Strains.

INTRODUCERE

În pofida progreselor importante în domeniul diagnosticului de boli, metodele de rutină utilizate în diagnosticarea bolilor albinelor sunt bazate pe metodologii tradiționale, cum ar fi microscopia elementară sau testarea serologică. Mucegaiurile (fungii nepatogeni) produc pentru industria farmaceutică compuși deosebit de importanți, precum antibioticele și enzimele cu rol terapeutic. Dintre produsele cu importanța farmaceutică obținute cu ajutorul microorganismelor, se pot menționa: antibioticele, aminoacizii și enzimele cu rol terapeutic, hormonii, interferonii, vaccinurile, bacteriocinele, interleukinele, alcaloizii, vitamine. Conform datelor multor autori fungii filamentoși sunt foarte răspândiți în natură, cu o concentrație majoră în sol, în special în stratul superficial al solului care le asigură condiții de creștere și supraviețuire.

Ciupercile parazite se dezvoltă pe organisme din diferite grupe. Majoritatea din ele parazitează pe plante, în special cu flori, însă se întâlnesc și pe alge, ferigi ș.a. În industria alimentară activitatea de biodeteriorare este nedorită deoarece fungii cauzează pierderi prin mucegăirea semințelor cerealelor și a altor produse alimentare. Ca efect secundar este formarea de micotoxine, de către unele mucegaiuri, încât alimentele devin inutilizabile.

În raport cu oxigenul, mucegaiurile sunt microorganisme aerobe, deci necesită pentru creștere prezența oxigenului din aer sau a oxigenului dizolvat în mediul lichid. Mucegăirea este posibilă dacă există gol de aer și este produsă de specii ale genurilor *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phyalophora*, etc. Micromicetele suportă cantități mari de substanțe tanante, se asociază adesea cu vegetația lemnoasă, realizând degradarea resturilor acestora. Din acest motiv, ciupercile aduc o contribuție deosebită în formarea părții organice a solurilor, în același timp, având un rol deosebit în cadrul lanțurilor trofice. Actualmente micromicetele sunt pe larg utilizate în producerea substanțelor biologice active și utilizate în producerea adausurilor pentru stimularea sistemului imun, iar unele dintre ele dispun și de acțiune antibacteriană. Obiectivul prezentelor cercetări este aprecierea proprietăților de inhibiție a unor tulpini de micromicete față de 2 tulpini patogene - *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.

- stabilirea posibilității utilizării unor tulpini de micromicete cu acțiune antifungică în unele boli la albine;
- screeningul unor tulpini de micromicete din sol cu acțiune antifungică față de fungii patogeni ce provoacă boli micotice la albine.

MATERIAL ȘI METODĂ

Ca obiect de studiu au servit 21 de izolanți de micromicete din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene și tulpini 2 patogene - *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. Tulpinile testate au fost izolate din probele de sol, prelevate din zona centrală a Moldovei. Ca mediu nutritiv, pentru izolarea micromicetelor, a servit mediul malț-agar și mediul Czapek. Cultivarea tulpinilor s-a efectuat în thermostat la temperatura de 28°C, timp de 14 zile.

În calitate de test-culturi au fost utilizate 2 tulpini de fungi *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*, agenți patogeni ai aspergilozei la albine, care au fost izolate din probele prelevate dintr-un stup de albine.

Proprietățile antimicrobiene ale izolațiilor au fost studiate conform metodei difuzimetrice, prin utilizarea blocurilor de geloză. Metoda este bazată pe capacitatea de difuziune a metaboliților produși de microorganismele studiate în profunzimea agarului și a acțiunii substanței active din zona de difuzie asupra test – culturilor. Pentru efectuarea experimentului tulpinile de micromicete supuse testării au fost cultivate timp de 4 zile pe mediul malț-agar la temperatura de 28-30°C. Diametrul zonei de inhibiție a patogenilor a fost măsurată după 4 zile de cultivare la temperatura de 28-30°C pe mediul malț-agar a tulpinilor patologice pe plăci Petri în care au fost introduse blocuri de geloză cu micromicetele testate.

Ca martor a servit discuri impregnate cu antibioticul furazolidon. Studiarea particularităților morfo-culturale ale tulpinilor de micromicete cu potențial sporit al activității antifungale au fost examinate vizual și la microscop tulpinile cultivate pe 4 medii nutritive: Malț-agar; Czapek; Sabouraud și Amidono-amoniacal. Cercetările au fost efectuate după 4, 7 și 14 zile de cultivare la temperatura de + 28+30°C.

Cercetările au fost efectuate în cadrul Colecției Naționale de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei în colaborare cu dr. biol., conferențiar cercetător Sîrbu Tamara și la catedra Epizootologie a UASM.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Micromicetele sunt microorganisme ușor adaptabile, deoarece au capacitatea de a forma enzime induse în funcție de natura substratului pe care se află, încât produc degradarea atât a produselor alimentare cât și a fibrelor textile, a cauciucului, betonului etc.

Acest studiu a fost efectuat în laboratorul de microorganisme neapatogene al Academiei de Științe din Moldova. În prezent se efectuează multiple cercetări în obținerea unor biopreparate ce ar putea combate această maladie. A fost efectuat un screening în scopul selectării unui producător de substanțe bioactive cu potențial antifungal sporit ce ar combate *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*. Pentru efectuarea screeningului au fost utilizate 21 tulpini de micromicete din genul *Penicillium*. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Indicii zonei de inhibiție ale unor tulpine de micromicete.

№ d/o	Culturile testate	Culturile test. Diametrul zonei de inhibiție (mm)	
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
1	P.sp. 19±	0	0
2	p.sp. 32		0
3	p.sp. 52	0	0
4	P.sp.62	25,8 ± 4,2	28,5 ± 2,6
5	P.sp.78	0	0
6	P.sp.79	0	0
7	P.sp.80	0	0
8	P.sp.81	0	0
9	P.sp.83	0	0
10	P.sp.88	0	0
11	P.sp.93	0	0
12	P.sp.91	0	0
13	P.sp.97	32,0 ± 3,2	15,4 ± 1,1
14	P.sp.100	0	0
15	P.sp.101	0	0
16	P.sp.102	0	0
17	P.sp.103	0	0
18	P.sp.104	0	12,0 ± 2,31
19	P.sp.106	0	0
20	P.sp. 109	0	0
21	P.sp. 110	0	0
control	Furazolidon	0	0

Din numărul total de micromicete testate activitatea antifungală față de patogenul *Aspergillus flavus* a manifestat 2 tulpini (*P.sp.* 62; *P.sp.* 97), diametrul zonei de inhibiție constituind 30 și respectiv 35mm, iar față de *Aspergillus niger* -3 tulpini (*P.sp.* 62; *P.sp.* 97 și *P.sp.* 104), diametrul zonei de inhibiție fiind de 30; 17mm și respectiv 15mm. Antibioticul testat furazolidon nu a manifestat activitate antifungală față de patogenii testați.

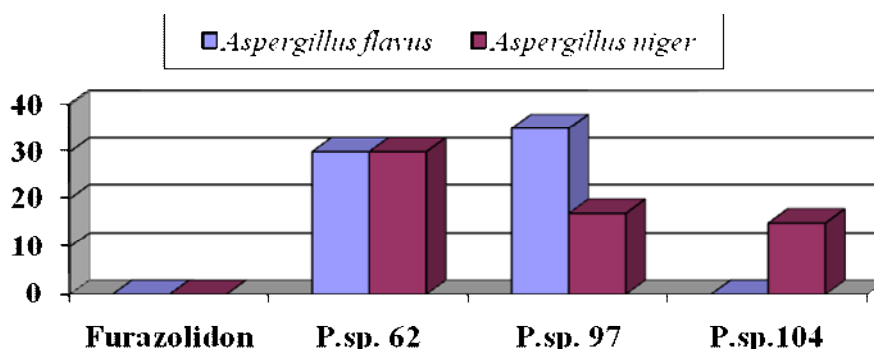


Figura 1. Diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenilor la tulpinile de micromicete testate.

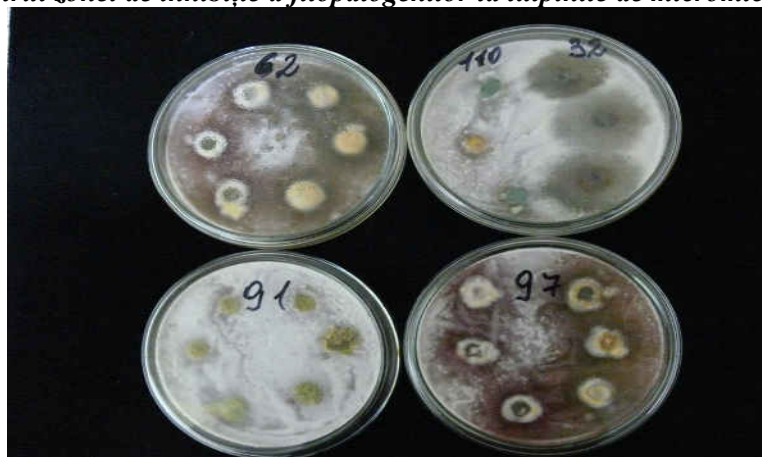


Figura 2. Zonele de inhibiție ale patogenului *Aspergillus flavus*.

Conform rezultatelor obținute cele mai active tulpini după criteriul proprietăților antifungale sunt *P.sp.* 62 și *P.sp.* 97. Aceste tulpini au fost selectate pentru cercetările ulterioare.

Mediul nutritiv joacă un rol important în creșterea și dezvoltarea micromicetelor și poate modifica proprietățile morfo-culturale și biosintetice ale culturii [4-6]. Pentru a studia proprietățile morfo-culturale tulpinile selectate au fost cultivate pe 4 medii nutritive: malț-agar; Czapek; Saburo, amidono-amoniacal. Examinarea și descrierea tulpinilor s-a efectuat la 4, 7 și 14 zile de cultivare.

CONCLUZII

1. În rezultatul screeningului efectuat din 21 tulpini de micromicete au fost selectate 2 culturi *P.sp.* 62 și *P.sp.* 97 cu potențial antifungal sporit față *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger* – agenți patogeni ai aspergilozei (puietul pietrificat) la albine.

2. Diametrul zonei de inhibiție a patogenului *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger* sub acțiunea exometaboliților tulpinii *P.sp.* 62 constituie 30mm, iar a tulpinii *P.sp.* 97 – 35mm și respectiv 16mm.

3. Mediul optim de cultivare a tulpinilor *P.sp.* 62 și *P.sp.* 97 în scopul obținerii exometaboliților cu proprietăți antifungale sporite este malț-agar.

BIBLIOGRAFIE:

- Adrițoiu V. Mierea. In cap.VI Produse apicole, Apiterapia în planningul familial, teză de disertație, Arad, 2006; 162-166.
- Ashiralieva A., Generschi E. Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honey bees - a review. *Apidologie* 2006; 37: 411-420.
- Beaune P, Diserens JM, Reybroeck W. Proficiency Testing of Charm II Tests for Residue Control of honey. *Proceedings of the 39th tional Agricultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005: 33-34.*
- Bariou D., Apostu S. *Microbiologia produselor alimentare*, Editura Risoprint, Cluj-Napoca, 2003.
- Grigore G. *Fitoterapia și apiterapia. Boli tratate cu plante medicinale și produse apicole*, București, Ed. Ștefan, 2008, 98-115.