

TULPINI DE MICROMICETE - SURSĂ POTENȚIALĂ DE PRINCIPII BIOACTIVE CU APLICARE ÎN APICULTURĂ

Bugneac Veronica

Universitatea Tehnică din Moldova

E-mail: veronica.bugneac@gmail.com

Abstract: *In this study, research was carried out related to the identification of some micromycetes strains as a source of bioactive principles with application in beekeeping. Thus, 22 strains of micromycetes, representatives of the genus Penicillium, were studied according to their antimicrobial properties against Aspergillus niger and Aspergillus flavus, pathogens of aspergillosis, and Paenibacillus larvae, pathogen of the american and european loci. Catalase activity was also studied. As a result, 5 strains of micromycetes were selected, possessing significant enzymatic and antimicrobial properties that will be further studied to obtain preparations of microbial origin as an alternative to the antibiotics used in beekeeping.*

Key words: *micromycetes, pathogens, aspergillosis, american loca and european loca, zone of inhibition*

INTRODUCERE

Albinele sunt o specie deosebit de importantă în natură avînd, rolul principal de polenizare. Albinele, ca și orice organisme vii, se pot îmbolnăvi de diferite boli. Acestea, prin mortalitatea pe care o produc în rândul indivizilor coloniei, reducînd numărul albinelor și prin aceasta familiile de albine se depopulează, devenind neproductive. În multe cazuri, se pierd familii sau chiar stupini întregi. De aceea, depistarea bolilor albinelor, prevenirea și combaterea lor, au o importanță deosebită în apicultură.

Aspergiloza reprezintă una dintre cele mai relevante amenințări de origine fungică pentru sănătatea umană și animală, genul *Aspergillus* include agenți patogeni oportuniști care pot infecta și albinele (Hymenoptera, Apoidea) în toate etapele de dezvoltare. Diagnosticul aspergilozei albinelor se face pe baza semnelor externe caracteristice ale puietului mort și ale adulților (larva devine verde deschis sau maro închis și tare), precum și după studii microscopice și microbiologice. Cercetările recente indică faptul că diferite specii de *Aspergillus* pot fi patogene atât pentru larve cât și pentru albinele adulte [4]. Un studiu efectuat în Anglia a arătat că, din 10 specii recuperate din stupine, trei specii (*A. flavus*, *A. nomius* și *A. phoenicis*) au manifestat patogenitate pentru larvele de albine. Testate în dieta albinelor adulte în diferite concentrații, *A. flavus* s-a dovedit a fi patogen la toate dozele studiate, în timp ce *A. niger* și *A. fumigatus* nu au fost infecțioși pentru albine. Virulența mai puternică manifestată de *A. flavus* la albinele melifere rezultă din toxicitatea mai mare în comparație cu *A. niger* și *A. parasiticus*, cea ce e posibil ca mortalitatea larvelor să se datoreze mai degrabă toxicității decât invaziei fungice [1; 3; 4]. Micromicetele din genul *Aspergillus spp.* sunt patogeni oportuniști și își dezvăluie patogenitatea numai în anumite circumstanțe, în special atunci când gazdele sunt imunocompromise, metodele de apărare sunt suprimate sau ocolite [2].

Bacteria Gram pozitivă *Paenibacillus larvae*, care formează spori, este agentul cauzal al loci americane și europene, un agent patogen periculos pentru larvele de albine *Apis mellifera*. Aceasta este cea mai răspândită dintre bolile larvelor de albine. Larvele tinere (din primul și al doilea stadiu) sunt foarte susceptibile la această boală, ingestia a doar 10 spori infecțioși fiind suficientă pentru a provoca mortalitatea [11]. Semne de boală apar de

regulă după căpăcire și provoacă mari pierderi economice în apicultură [7] în prezent, acest agent patogen este larg răspândit în albinele europene - *Apis mellifera*. Cu toate acestea, se știe puțin despre infecțiozitatea și patogenitatea larvelor de *P.* la albinele asiatice care cuibăresc cavitatea, *Apis cerana*. Mai mult, cunoștințele comparative despre infecțiozitatea și patogenitatea *P.* larvelor între ambele specii de albine melifere sunt limitate [10].

Bacteria *Paenibacillus larvae* este rezistentă la antibiotice, cea ce complică tratatea bolii. În prezent sunt cunoscute mai multe metode de combatere a acestei maladii. Astfel, studiile efectuate pe larve infectate in vitro și, de asemenea, pe stupi în camp au demonstrat că fagii au un efect profilactic, prevenind infecția și, de asemenea, un efect curativ, ajutând la anihilarea infecției. Fagii *Paenibacillus larvae* par să fie siguri de utilizat și eficienți ca tratament pentru AFB, iar interesul față de aceștia în următorii ani va continua să crească [5; 11]. Administrarea în dieta familiilor de albine a amestecului de biomasă de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-04 cu pudră de zahăr în raport de 1,8-2,2 g. BAU la 100g. pudră de zahăr o singură dată în cantitate de 100 g. amestec la familie [8].

Este cunoscut că agenții antimicrobieni interferă cu procesele specifice, esențiale pentru creșterea și diviziunea agenților patogeni: bacterii, fungi. Ei pot fi grupați ca inhibitori ai peretelui celular bacterian și fungic, ori ca inhibitori ai funcției membranei citoplasmice, inhibitori ai sintezei acizilor nucleici și inhibitori ai funcției ribosomale [9; 13].

Micromicetele sunt cunoscute ca producători semnificativi de substanțe bioactive ca vitamine, enzime, antibiotice. Enzimele sunt catalizatorii tuturor reacțiilor biochimice din organismele vii. Miliardele de celule din corpurile vii sunt constant amenințate de compușii chimici cunoscuți sub numele de radicali liberi. Atunci când aceste molecule se acumulează la nivelul organismului, ele sunt capabile să deterioreze celulele și materialul genetic, ceea ce poate duce la diviziune celulară anormală, sau pieirea organismului. Pentru anihilarea radicalilor liberi sunt utilizați antioxidanți dintre care fac parte enzimele oxidative (catalaza, superoxidismutaza, etc). Anume enzimele oxidative joacă un rol important în anihilarea radicalilor liberi din organismele vii [6; 12; 17]. Multe procese biotehnologice, cum ar fi tratarea apelor uzate, compostarea deșeurilor organice, procesarea rocilor, sunt efectuate de o comunitate complexă de microorganisme care joacă un rol în procese naturale precum fertilitatea solului, autoepurarea apei și formarea compoziției microcomponente a atmosferei. Biodiversitatea microorganismelor este cel mai important rezervor de potențiale resurse microbiene și nu poate fi înlocuită de nicio colecție de microorganisme completă și atent conservată. Numai că poate servi ca sursă de obiecte microbiene pentru diverse tipuri de cercetări și componentele sale valoroase. Resursele de material bacteriologic, cele mai accesibile pentru scopurile biotehnologice actuale, constau nu numai din tulpini colectate, ci și din comunități naturale [13; 15].

În prezent se efectuează multiple cercetări în obținerea unor biopreparate ce ar putea combate maladiile și stumula productivitatea familiilor de albine. Cercetările efectuate de către noi au fost efectuate în această direcție.

Astfel, scopul cercetărilor a constat în identificarea unor tulpini de micromicete ca sursă de principii bioactive cu aplicare în apicultură.

MATERIALE ȘI METODE

Ca obiect de studiu au fost utilizate 22 tulpini din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, ce aparțin genului *Penicillium*. Tulpinile au fost testate după criteriul antimicrobian față de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, agenți patogeni ai aspergilozei și față de *Paenibacillus larvae*, agent patogen al locii americane și europene la familiile de albine *Apis mellifera*. Patogenii au fost izolați din probele prelevate din stupinele de albine. Tulpinile de micromicete din genul *Penicillium* au fost cultivate pe mediul malț-agar [18]. Tulpina *Paenibacillus larvae* a fost cultivată pe mediul BHI Difco cu componenta:

Brain infusion solids - 12,5 g/l, Beef heart infusion solids – 5,0 g/l, Peptocomplex – 10,0 g/l, Glucose – 2,0 g/l, NaCl – 5,0 g/l, Na₂HPO₄ – 2,5 g/l, agar – 15,0 g/l, pH=7,4. Ca martor au fost testați antibioticii Furazolidon, Tetraciclina și Neomicina.

Determinarea proprietăților antimicrobiene a tulpinilor

Proprietățile antimicrobiene au fost studiate conform metodei difuzimetrice, prin utilizarea blocurilor de geloză [15]. Metoda este bazată pe capacitatea de difuziune a metaboliților produși de microorganismele studiate în profunzimea gelozei și a acțiunii substanței active din zona de difuzie asupra culturilor fitopatogene. În calitate de tulpini-test au fost folosiți fitopatogenii: *Aspergillus niger*; *Aspergillus flavus*, *Paenibacillus larvae*. În conformitate cu mărimea zonelor de inhibiție tulpinile cercetate se împart în sensibile, moderat sensibile și rezistente:

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

Determinarea activității enzimaticice – catalaza

Pentru determinarea catalazei micromicetele au fost cultivate în baloane Erlenmayer, volumul 500 ml cu 100 ml mediu lichid cu compoziția (%): KNO₃ – 0,5; glucoză – 4,0; NaH₂PO₄ – 0,15; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄ x 7 H₂O – 0,05; FeSO₄ x 7 H₂O – 0,001; extract de drojdii – 0,1. Cultivarea s-a efectuat la temperatura de 28°C, timp de 6 zile, pe agitator cu 160 -180 rot./min. Valoarea pH-ului 6,3. În calitate de inocul s-a utilizat soluția apoasă de spori cu concentrația 5x10⁶ spori /ml mediu cultural.

Lichidul cultural a fost separat de biomasă prin filtrare.

Activitatea catalazei a fost determinată în lichidul cultural prin metoda titrimetrică [16].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La prima etapă au fost testate tulpinile de micromicete din genul *Penicillium* după proprietățile antimicrobiene.

Tupinile tes *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae* au fost cultivate pe mediile specifice, apoi introduse blocurile de geloză a tulpinilor de micromicete din genul *Penicillium*. În Fig.1 sunt prezentate coloniile ale patogenilor luați în studiu.

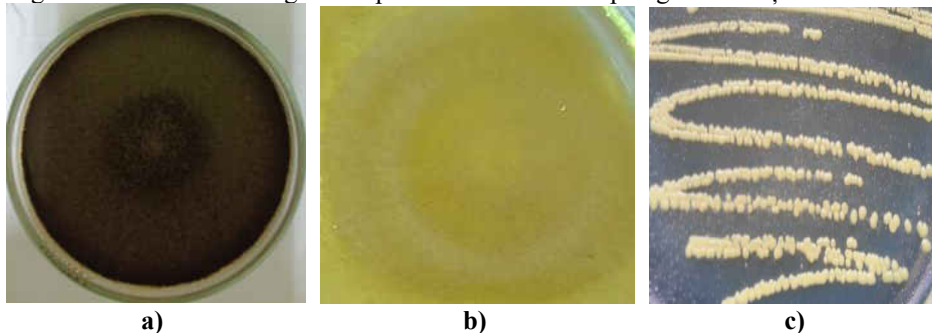


Fig. 1. Culturile test. a) *Aspergillus niger*, b) *Aspergillus flavus*, c) *Paenibacillus larvae*

În rezultatul studiului efectuat din 22 tulpini de micromicete au fost evidențiate tulpinile care posedă o sensibilitate semnificativă față de patogenii testați. Astfel, 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 constit 22,5, 28,2 mm respectiv, iar la tulpina *Penicillium sp.* 11 dimamerul

zonei de inhibiție a fost de 15,5mm. O sensibilitate sporită față de acest patogen a manifestat tulpina *Penicillium sp. 97*, diametrul zonei de inhibiție fiind de 32 mm.

Față de *A. niger* – de asemenea 3 tulpini de micromicete (*Penicillium sp. 62*; *Penicillium sp. 97* și *Penicillium sp. 104*) au manifestat sensibilitate, valorile zonelor de inhibiție fiind de 28,5, 15,1 și 12,0 mm respectiv (Fig. 2, Fig.3). Preparatul testat furazolidon, ce posedă proprietăți antifungice nu a manifestat activitate față de patogenii de aspergiloză *Aspergillus niger* și *Aspergillus flavus*.

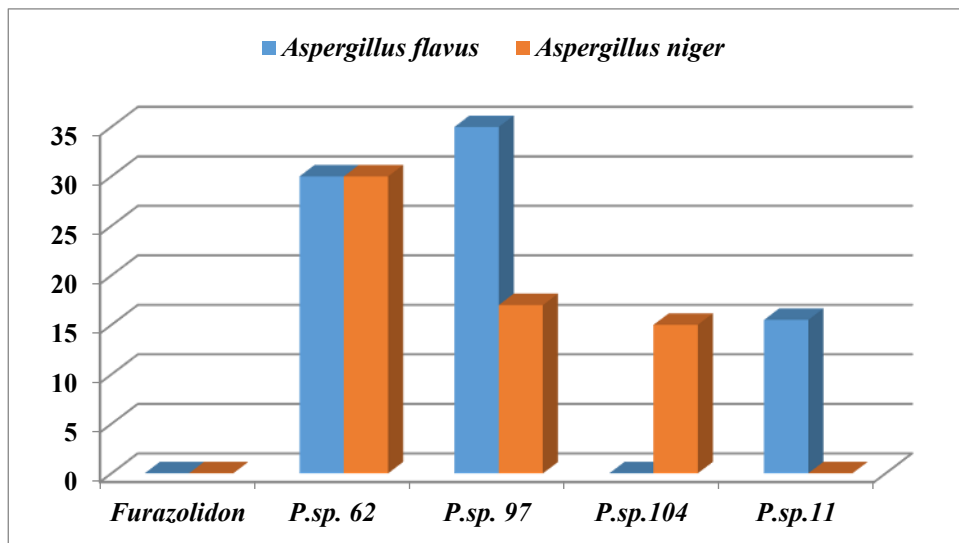


Fig. 2. Diametrul zonelor de inhibiție a fitopatogenilor *Aspergillus falavus* și *Aspergillus niger* sub acțiunea tulpinilor de micromicete din genul *Penicillium*

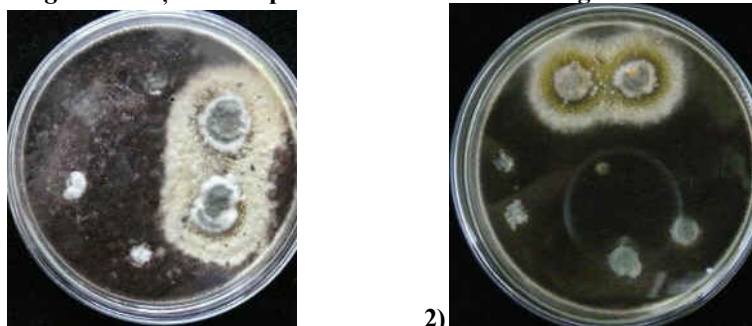


Fig. 3. Zonele de inhibiție a fitopatogenului *Aspergillus niger* 1) *P.sp.62*; 2) *P.sp.97*.

Rezultatele prezentate în fig. 4, fig. 5 demonstrează că din 22 tulpini de micromicete testate proprietăți antibacteriene față de *P. larvae* 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 acestui patogen variază de la 10,2 mm (*Penicillium sp. 104*) până la 20,5 mm (*Penicillium sp. 110*). Astfel, diametrul zonelor de inhibiție formate de către tulpinile *Penicillium sp. 91* și *Penicillium sp. 110* sunt la un nivel cu martorul tetraciclina și puțin mai mici decât zonele de inhibiție a neomicinei (Fig.4).

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. De asemenea sensibilitate față de acest patogen au manifestat și tulpinile *Penicillium sp. 62* și *Penicillium sp. 97* cu zone de inhibiție de $15 \pm 1,3$ mm.

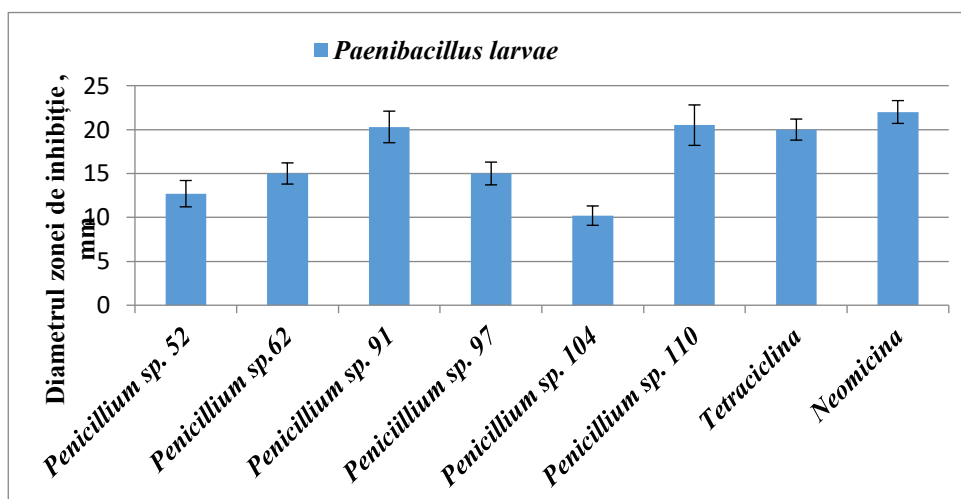


Fig. 4. Diametrul zonelor de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* sub acțiunea tulpinilor de micromicete din genul *Penicillium*.

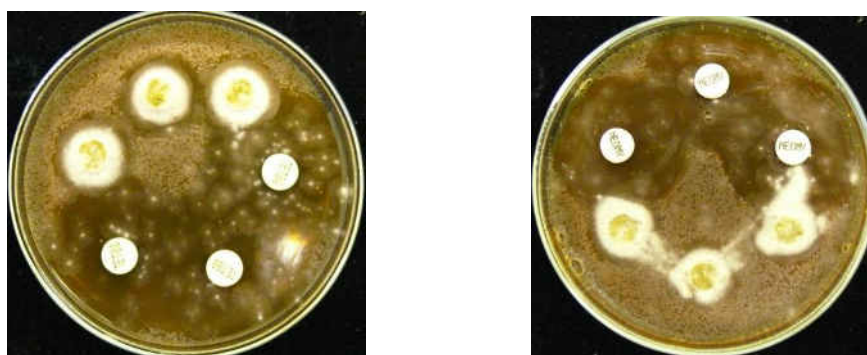


Fig. 5. Zone de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* sub acțiunea tulpinii *Penicillium sp. 62*

Pentru determinarea proprietăților enzimaticе a fost efectuat screeningul din 22 tulpini de micromicete după criteriul de sinteză a catalazei.

Tulpinile de micromicete luate în studiu au fost cultivate submers în baloane Erlenmayer de 500 ml cu câte 100 ml mediu nutritiv, timp de 6 zile, la temperatura de 28-30°C, prin agitare continuă. Componenta mediului nutritiv (%): KNO_3 - 0,5; glucoză - 4,0; NaH_2PO_4 - 0,15; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; CaCO_3 - 0,2; extract de drojdi - 0,5, pH - inițial 6,0-6,2, restul apă distilată până la 1 L. După separarea biomasei de lichidul cultural a fost determinată catalaza prin metoda titrimetrică.

Rezultatele obținute în aceste cercetări sun prezentate în Tab. 1.

Tabelul 1. Activitatea catalazei tulpinilor de micromicete obținute în rezultatul screeningului

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

În rezultatul cercetărilor efectuate a fost stabilit că din cele 22 tulpini testate la 4 tulpini activitate a 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), de asemenea a fost evidențiată și tulpina *Penicillium sp.* 62, la care activitatea catalazei a constituit 28,8U/ml. La restul tulpinilor luate în studiu activitatea catalaze în lichidul cultural a variat în limitele 1,7-21,6 U/ml.

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

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

Astfel, pentru cercetările ulterioare de selectare a tulpinilor de micromicete cu potențial semnificativ de principii bioactive pentru a fi aplicate în apicultură au fost selectate 5 tulpini de micromicete , reprezentanți ai genului *Penicillium*.

CONCLUZII

Au fost selectate tulpini de micromicete *Penicillium sp.* 11, *Penicillium sp.* 19, *Penicillium sp.* 62 cu potențial enzimatic semnificativ și tulpinile *Penicillium sp.* 91 și *Penicillium sp.* 97 cu proprietăți antimicrobiene față de patogenii din stupinele de albine *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Paenibacillus larvae*.

Cercetările în această direcție continuă pentru identificarea tulpinilor benefice ca sursă de principii bioactive pentru apicultură.

BIBLIOGRAFIE

1. Amaike S., N.P. Keller N.P. *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. Phytopathol., 49 (2011), pp. 107-133
2. Evison, S. E. F., Fazio, G., Chappell, P., Foley, K., Jensen, A. B., and Hughes, W. O. H. (2016). Innate expression of antimicrobial peptides does not explain genotypic diversity in resistance to fungal brood parasites in the honey bee. *Apidologie* 47, 206–215. doi: 10.1007/s13592-015-0388-4
3. Foley K, Fazio G, Jensen AB, Hughes WOH. 2014. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Vet Microbiol* 169:203–210.
4. Foley, K., Fazio, G., Jensen, A. B., and Hughes, W. O. H. (2014). The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Vet. Microbiol.* 169, 203–210. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.11.029
5. Franziska Dickel, Nick Maria Peter Bos, Huw Hughes, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes, Annette Kleiser, Dalial Freitak. 2022 Oct 17;9:946237. doi: 10.3389/fvets.2022.946237. eCollection 2022. The oral vaccination with *Paenibacillus larvae* bacterin can decrease susceptibility to American Foulbrood infection in honey bees-A safety and efficacy study. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36325099/Karigar CS, Rao SS. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. Enzyme Res. 2011; 2011:805187. doi: 10.4061/2011/805187.>
6. Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J.* 2012; 2:e201209017. doi: 10.5936/csbj.201209017.
7. Manhong Ye, Xiaoyuan Li, Fengping Yang, Bin Zhou. Beneficial bacteria as biocontrol agents for American foulbrood disease in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Sci.* 2023 Mar 1;23(2):6. doi: 10.1093/jisesa/iead013.
8. Postolachi Olga. Modificarea caracterelor culturale și bichimice ale unor tulpini de streptomicete după păstrarea îndelungată. Autoreferatul tezei de doc. boil. Chișinău 2009, 28 p.
9. Rudic V., Dencicov-Cristea Lidia, Microbiologie generală, Chișinău, 2007
10. Sasiprapa Krongdang, Jay D Evans, Yanping Chen, Wannapha Mookhploy, Panuwan Chantawanakul. Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29578641/> 2019 Oct;26(5):831-842. doi: 10.1111/1744-7917.12593.
11. Tsourkas PK. *Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future. *Microb Genom.* 2020 Feb;6(2):e000329. doi: 10.1099/mgen.0.000329. PMID: 32111267; PMCID: PMC7067210.
12. Vingiani GM, De Luca P, Ianora A, Dobson ADW, Lauritano C. Microalgal enzymes with biotechnological applications. *Mar Drugs.* 2019; 17:459. <https://doi.org/10.3390/md17080459>
13. Zarnea G., Mihăescu Gr. Principii și tehnici de microbiologie generală. București. 1992. 307p
14. 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. *Nat Commun.* 2022 Apr 19;13(1):2037. doi: 10.1038/s41467-022-29760-0. PMID: 35440638; PMCID: PMC9018956.
15. Егоров Н. С. 2004. Основы учения об антибиотиках. М. Изд-во МГУ „Наука” с. 5-7
16. Методы экспериментальной микологии 189
17. логиию Справочник. Киев. Наукова Думка. 1982, 550с.
18. МИХАЙЛОВА, Р.В. Мацерующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. Минск: Белорусская наука, 2007. 408 с. ISBN 978-985-08-53-0
19. Семёнов. Справочник. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. «Агропромиздат», 1990, 240с.