

CZU 619 : 579

INDICI ANTIMICROBIENI AI UNOR TULPINI DE MICROMICETE UTILIZATE ÎN TRATAMENTUL LOCII AMERICANE

*Veronica BUGNEAC**Universitatea Agrară de Stat din Moldova*

Abstract. The aim of our investigations was to make the screening of 21 strains of micromycetes (*Penicillium*) from the National Collection of Nonpathogenic Microorganisms of the Institute of Microbiology and Biotechnology of the Academy of Sciences of Moldova, in order to establish their antimicrobial effect on the causal agent of American foul brood *Paenibacillus larvae*. The tested strains were isolated from soil samples taken from the central region of the Republic of Moldova. Malt agar and Czapek medium served as nutrient mediums for the isolation of micromycetes. Micromycetes cultivation was carried out in the thermostat at the temperature of 28°C for 14 days. Out of the 21 tested cultures, only 6 strains possessed high antibacterial properties against *Paenibacillus larvae*, the diameter of inhibition zone of the pathogen ranging from 10.2 ± 1.1 mm to 2.5 ± 2.31 mm. Two strains possessing the most intense antimicrobial activity were selected for subsequent investigations. The diameter of the inhibition zone of *Paenibacillus larvae* when treated with exometabolites of this two strains constituted 22-23 mm, which is equivalent to the effect of neomycin.

Key words: *Penicillium*; Antimicrobial properties; *Paenibacillus larvae*; Honey bees.

Rezumat. În studiul de față s-a realizat screeningul a 21 tulpini de micromicete (*Penicillium*) din Colecția Națională de Microorganisme non-patogene de la Institutul de Microbiologie al Academiei de Științe a Moldovei pentru a se determina acțiunea antimicrobiană a acestora față de agentul patogen al locii americane *Paenibacillus larvae*. Tulpinile testate au fost izolate din probele de sol prelevate din zona centrală a Moldovei. Ca mediu nutritiv pentru izolarea micromicetelor a servit malț-agarul și mediul Czapek. Cultivarea micromicetelor s-a efectuat în termostat, la temperatura de 28°C, timp de 14 zile. Din cele 21 de culturi testate, numai 6 tulpini posedă proprietăți antibacteriene față de *Paenibacillus larvae*, diametrul zonei de inhibiție a patogenului variind între 10.2 ± 1.1 mm și 2.5 ± 2.31 . Pentru cercetările ulterioare au fost selectate 2 tulpini, care posedă cea mai intensă activitate antimicrobiană. Diametrul zonei de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* la tratarea cu exometaboliți ai acestor tulpini constituie 22-23 mm, ceea ce este echivalent cu acțiunea antibioticului neomicina.

Cuvinte-cheie: *Penicillium*; Proprietăți antimicrobiene; *Paenibacillus larvae*; Albine.

INTRODUCERE

Apicultura este una dintre cele mai vechi activități care s-a dezvoltat în condiții naturale favorabile privind clima, relieful și vegetația. Pentru societate apicultura are o importanță primordială atât prin aportul pe care îl asigură la menținerea echilibrului ecologic și biologic în natură, cât și prin produsele directe ale stupului, care reprezintă o sursă de venit (Eremia, N. 2009; Pavliuc, P. et al. 2006). Tendințele și cerințele actuale de dezvoltare în apicultură sunt de a menține produsul de miere cât mai ecologic, fără reziduuri de antibiotice, pentru a putea fi exportat pe piața Uniunii Europene (Acha, P. et al. 2003; Ruttner, F. 1980). Programele de monitorizare și de supraveghere în acest sens sunt axate pe normele sanitar-veterinare care prevăd examinări clinice sistematice ale familiilor de albine, prelevarea de probe de material biologic pentru investigații de laborator, iar măsurile de însănătoșire se bazează pe metode radicale de asanare. Este cunoscut faptul că albinele, ca și alte vietăți, sunt supuse unor riscuri de contaminare cu diferite boli de origine infecțioasă. În aceste situații, tratamentele cu preparate antibacteriene sunt limitate sau chiar interzise (Pavliuc, P. et al. 2006). Din aceste considerente, scopul investigațiilor noastre a fost de a efectua un screening al unor tulpini de micromicete cu acțiune antimicrobiană pentru a fi ulterior utilizate în combaterea bolilor de origine micotică și bacteriană la familiile de albine.

În ultimii ani, micromicetele reprezintă sursa principală a biotehnologiei moderne pentru producerea unui spectru larg de substanțe bioactive în care se utilizează cu succes microorganismele, fapt determinat de caracteristicile tehnologice prețioase: ciclul scurt de dezvoltare, posibilitatea cultivării în condițiile reglării și obținerii sistemelor enzimatică cu o componentă prognozată a unei cantități nelimitate de diferite substanțe bioactive. Un rol aparte îl au micromicetele din genul *Penicillium*. Utilizarea activității biochimice a micromicetelor din genul *Penicillium* și-a găsit întrebuințarea în medicină și farmaceutică, precum și la obținerea substanțelor bioactive utilizate în diferite ramuri ale economiei (Bebear, C. 1996).

MATERIAL ȘI METODĂ

Drept obiect de studiu au servit 21 de izolanți de micromicete din Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene (CNMN) și tulpina de bacterii *Paenibacillus larvae*. Tulpinile de micromicete testate (21 de tulpini) au fost izolate din probele de sol prelevate din zona centrală a Moldovei.

Ca mediu nutritiv pentru izolarea micromicetelor a servit malț-agarul și mediul Czapek. Mediul de păstrare a micromicetelor în CNMN este malț-agarul. Componenta mediului nutritiv malț-agar (g/l): agar – 20; extract de malț 6 (Ba) – 1 litru; pH – 5,5–6,0.

Componenta mediului nutritiv Czapek (g/l): zaharoză – 30; NaNO₃ – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; Mg SO₄·7H₂O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO₄·7H₂O – 0,01; agar – 20,0; apă distilată – 1l; pH – 6,5–7,0.

Cultivarea tulpinilor de micromicete izolate s-a efectuat în termostat, la temperatura de 28°C, timp de 14 zile. Culturile au fost examinate vizual, după caracterele morfoculturale, dar și microscopic (Bebear, C. 1996).

În calitate de cultură-test a servit bacteria *Paenibacillus larvae*, agentul patogen al locii americane la albinele *Apis mellifera*.

Tulpina patogenă *Paenibacillus larvae* a fost izolată din probele prelevate dintr-un stup de albine și păstrată în condiții de laborator pe mediu agarizat.

Pentru izolarea și păstrarea în condiții de laborator a tulpinii de bacterii *Paenibacillus larvae* a fost utilizat mediul Brain Heart Infusion (BHI) (agar cu adaos de vitamina B6). Componenta mediului nutritiv Brain Heart Infusion (BHI) (g/l): Brain infusion solids – 12,5; Beef heart infusion solids – 5,0; peptocomplex – 10,0; glucoză – 2,0; NaCl – 5,0; Na₂HPO₄ – 2,5; agar – 15,0; tiamină - 0,1%; pH – 7,4.

Proprietățile antimicrobiene ale izolanților de micromicete au fost studiate conform metodei difuzimetrice, prin utilizarea blocurilor de geloză. Metoda este bazată pe capacitatea de difuziune a metaboliților produși de microorganismele studiate în profunzimea agarului și a acțiunii substanței active din zona de difuzie asupra culturilor-test.

Descrierea metodei:

1) Soluția de spori (1 ml) ai micromicetelor testate se însămânțează pe mediul malț-agar repartizat în plăci Petri.

2) Incubarea are loc în termostat (la 28°C) timp de 4 zile, în care hifele ating un grad mediu de dezvoltare.

3) După 4 zile se însămânțează în plăci Petri, pe mediul BHI agar cu adaos de vitamina B6, pe calea incorporării unui ml suspensie bacteriană (*Paenibacillus larvae*).

4) Din plăcile Petri cu bacteria *Paenibacillus larvae* se scot blocuri de geloză cu diametrul de 8 mm, care sunt înlocuite cu blocuri de aceeași dimensiune de micromicete luate din plăcile Petri cu micromicetele crescute deja timp de 4 zile.

5) Incubarea în termostat (la 28°C) a plăcilor Petri timp de 48 de ore.

După 2 zile de incubare, pe suprafața plăcii Petri, în jurul blocurilor introduse, apar zone de liză, în care bacteria *Paenibacillus larvae* nu crește. Diametrul zonei de inhibiție a bacteriei *Paenibacillus larvae* denotă intensitatea antagonismului dintre aceste microorganisme.

Ca martor au servit discurile impregnate cu antibioticele neomicina și canamicina.

Pentru descrierea proprietăților morfoculturale ale izolanților cu potențial antimicrobian, tulpinile de micromicete selectate au fost cultivate pe diferite medii agarizate: malț-agar; Czapek; raistrick; amidono-amoniacal. Descrierea proprietăților s-a efectuat peste 4, 7 și 14 zile de cultivare la temperatura de 28-30°C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele cercetărilor efectuate sunt prezentate în tabelul 1, din care se observă că, din 21 de culturi testate, numai 6 tulpini posedă proprietăți antibacteriene față de *Paenibacillus larvae* (*P. sp.* 52, 62, 91, 97, 104, 110). Diametrul zonei de inhibiție a fitopatogenului variază în limitele a $10,2 \pm 1,1$ mm (*P. sp.* 104) pînă la $2,5 \pm 2,31$ mm (*P. sp.* 110). Astfel, diametrul zonei de inhibiție marcat de către tulpinile *P. sp.* 91 și *P. sp.* 110 este egal cu diametrul zonei de inhibiție față de antibioticul canamicina și mai mic comparativ cu antibioticul neomicina.

Tabelul 1. Zona de inhibiție a culturilor testate

| № d/o | Culturile testate | Cultura-test. Diametrul zonei de inhibiție (mm) |
|---------|-------------------|---|
| | | <i>Bacillus larvae</i> |
| 1 | <i>P. sp.</i> 19 | 0 |
| 2 | <i>P. sp.</i> 32 | 0 |
| 3 | <i>P. sp.</i> 52 | 12,7 ± 1,5 |
| 4 | <i>P. sp.</i> 62 | 15,0 ± 1,2 |
| 5 | <i>P. sp.</i> 78 | 0 |
| 6 | <i>P. sp.</i> 79 | 0 |
| 7 | <i>P. sp.</i> 80 | 0 |
| 8 | <i>P. sp.</i> 81 | 0 |
| 9 | <i>P.sp.</i> 83 | 0 |
| 10 | <i>P. sp.</i> 88 | 0 |
| 11 | <i>P. sp.</i> 93 | 0 |
| 12 | <i>P. sp.</i> 91 | 20,3 ± 1,8 |
| 13 | <i>P. sp.</i> 97 | 15,0 ± 1,31 |
| 14 | <i>P. sp.</i> 100 | 0 |
| 15 | <i>P. sp.</i> 101 | 0 |
| 16 | <i>P. sp.</i> 102 | 0 |
| 17 | <i>P. sp.</i> 103 | 0 |
| 18 | <i>P. sp.</i> 104 | 10,2 ± 1,1 |
| 19 | <i>P. sp.</i> 106 | 0 |
| 20 | <i>P. sp.</i> 109 | 0 |
| 21 | <i>P. sp.</i> 110 | 20,5 ± 2,31 |
| Control | Neomicina | 22,0 ± 1,31 |

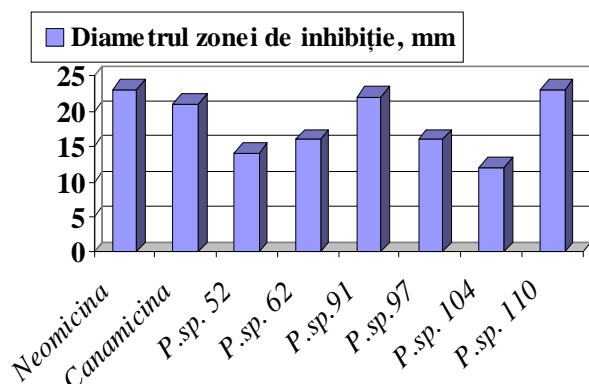


Figura 2. Activitatea antimicrobiană a tulpinilor de micromicete testate față de patogenul *Paenibacillus larvae*



Figura 3. Zonele de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae*: centru - neomicină, stânga - *P. sp.* 104

Conform rezultatelor prezentate, diametrul maxim de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* a fost înregistrat la tulpinile *P. sp.* 91 și *P. sp.* 110, constituind 20,3 ± 1,8 mm și, respectiv, 20,5 ± 2,31 mm.

Având în vedere rezultatele obținute, pentru cercetările ulterioare au fost selectate tulpinile *P. sp.* 91 și *P. sp.* 110, care posedă cea mai intensă activitate antimicrobiană față de patogenul testat *Paenibacillus larvae*.

CONCLUZII

1. În rezultatul screeningului efectuat, din 21 de tulpini de micromicete au fost selectate tulpinile *P. sp.* 91 și *P. sp.* 110, cu potențial antibacterian sporit față de patogenul *Paenibacillus larvae*.

2. Diametrul zonei de inhibiție a patogenului *Paenibacillus larvae* la tratarea cu exometaboliți ai tulpinilor *P. sp.* 91 și *P. sp.* 110 constituie 22-23 mm, ceea ce este echivalent cu acțiunea antibioticului neomicina.

3. Activitatea antibacteriană maximală a tulpinilor *P. sp.* 91 și *P. sp.* 110 față de *Paenibacillus larvae* a fost obținută la cultivarea acestora pe mediul malț-agar.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ACHA, P.N ., SZYFRES, B. (2001). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Volume 1. Bacterioses and mycoses. Third edition. Washington, D.C., pp. 168-179. ISBN 92-75-31580-9.
2. BEBEAR, C. (1996). Introductory remarks of Section C: Antibiotic sensitivity testing. In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol. II. Diagnostic procedures. London: Academic Press. pp. 181-183. ISBN 978-0-12-583806-1.
3. EREMIA, N. (2009). Apicultura. Chișinău. 331 p. ISBN 978-9975-9823-6-8.
4. EREMIA, N., EREMIA, Nina. (2011). Pčelovodstvo. Chișinău: Print-Caro. 531 p. ISBN 978-9975-56-007-8.
5. PAVLIUC, P., CONDRATIUC, S. (2006). Efectele produselor apicole, apicultura ecologică și sănătatea omului. Chișinău. 184 p. ISBN 9975-78-446-1.
6. RUTTNER, F. (1980). Creșterea mătcilor: Baze biologice și indicații tehnice. București: Apimondia. 332 p.

Data prezentării articolului: 21.04.2016

Data acceptării articolului: 25.05.2016