

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE ȘI BIOTEHNOLOGII**

Ing. TOFALVI MELINDA

**REZUMAT AL TEZEI
DE DOCTORAT**

**EFECTUL BIOSTIMULATOR AL UNOR EXTRACTE
VEGETALE ASUPRA DEZVOLTĂRII FAMILIILOR DE
ALBINE**

**Coordonator științific:
Prof. dr. ing. Liviu Al. Mărghițaș**

**CLUJ-NAPOCA
2009**

CUPRINS

| | Pag. teza | Pag. rezumat |
|--|--------------|-----------------|
| <i>PREFAȚĂ</i> | 4 | |
| <i>INTRODUCERE</i> | 13 | |
| <i>OBIECTIVELE CERCETĂRII</i> | 14 | |
| CAPITOLUL 1 IMPORTANȚA ȘI SITUAȚIA APICULTURII PE PLAN MONDIAL ȘI NAȚIONAL | 16 | 7 |
| CAPITOLUL 2 BIOLOGIA FAMILIEI DE ALBINE | 19 | 7 |
| 2.1. SISTEMATICA ZOOLOGICĂ A ALBINELOR MELIFERE | 19 | 7 |
| 2.2. COMPONENTA FAMILIEI DE ALBINE | 20 | 8 |
| 2.2.1. Matca | 20 | |
| 2.2.2. Trântorii | 23 | |
| 2.2.3. Albinele lucrătoare | 25 | |
| 2.3. RELAȚIILE DE NUTRIȚIE ÎN FAMILIA DE ALBINE | | 8 |
| 2.4. IMPLICAȚII ALE HRĂNIRII ASUPRA METABOLISMULUI ALBINELOR | | 8 |
| 2.5. ASPECTE GENERALE ALE PATOLOGIEI APICOLE | | 9 |
| CAPITOLUL 3 ASPECTE GENERALE PRIVIND TEHNOLOGIILE DE CREȘTERE ALE ALBINELOR | 35 | 10 |
| CAPITOLUL 4 STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRIILOR PRIVIND HRANA ALBINELOR ȘI ADMINISTRAREA BIOSTIMULATORILOR ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ACESTORA | 38 | 10 |
| 4.1. COMPONENTELE HRANEI ALBINELOR | 38 | 10 |
| 4.1.1. Nectarul | 38 | |
| 4.1.2. Polenul | 39 | |
| 4.1.3. Mierea | 46 | |
| 4.1.4. Mana | 50 | |
| 4.1.5. Apa | 51 | |
| 4.2. ADMINISTRAREA HRANEI SUPLIMENTARE ÎN HRANA ALBINELOR | 53 | 11 |
| 4.2.1. Hrânirile de completare | 54 | |
| 4.2.2. Hrânirile de stimulare | 56 | |
| 4.3. INFLUENȚA HRANEI ASUPRA DEZVOLTĂRII FAMILIEI DE ALBINE ȘI A STĂRII DE SĂNĂTATE A ACESTEIA | 59 | 11 |
| 4.4. UTILIZAREA SIROPULUI DE ZAHĂR ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ALBINELOR | 62 | 12 |
| 4.5. PROTOFIL | 63 | 12 |
| 4.6. ROLUL MICROELEMENTELOR ÎN ORGANIMELE VII: SELENIUL | 64 | 13 |
| 4.7. UTILIZAREA PLANTELOR MEDICINALE ÎN HRANA | 65 | 13 |

| | | |
|---|------------|-----------|
| SUPLIMENTARĂ A ALBINELOR | | |
| 4.7.1. Urzica | 67 | |
| 4.7.2. Ceapa | 71 | |
| 4.7.3. Usturoiul | 73 | |
| 4.7.4. Cimbrul | 75 | |
| 4.7.5. Echinacea | 77 | |
| CAPITOLUL 5 MATERIALE ȘI METODE PENTRU TESTAREA ÎN CÂMP A EFECTULUI BIOSTIMULATOR AL UNOR EXTRACTE VEGETALE ADMINISTRATE ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ALBINELOR | 79 | 14 |
| 5.1. MATERIALUL BIOLOGIC | 79 | 14 |
| 5.2. METODELE UTILIZATE | 80 | 14 |
| CAPITOLUL 6 MATERIALE ȘI METODE | 86 | 16 |
| 6.1. PLANTELE ȘI METODELE UTILIZATE PENTRU TESTAREA ACESTORA ÎN LABORATOR | 86 | 16 |
| 6.2. MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU PRIVIND EVALUAREA COMPOZIȚIEI ȘI A PROPRIETĂȚILOR PLANTELOR UTILIZATE | 88 | 17 |
| CAPITOLUL 7 REZULTATE ȘI DISCUȚII | 97 | 19 |
| 7.1. REZULTATE OBTINUTE ÎN URMA DETERMINĂRILOR DE LABORATOR EFECTUATE ASUPRA PLANTELOR | 97 | 19 |
| 7.2. REZULTATE OBTINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2005 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI URZICII, PROTOFILULUI, CEPEI ȘI USTUROIULUI ASUPRA FAMILIILOR DE ALBINE LA IEȘIREA DIN PERIOADA DE IERNARE ȘI PREGĂTIRE PENTRU CULESUL DE PRIMĂVARĂ | 112 | 22 |
| 7.2.1. Evoluția familiilor de albine din lotul martor hrănit cu turtă și sirop de zahăr | 112 | |
| 7.2.2. Evoluția familiilor de albine din lotul experimental, hrănit cu turtă și sirop de zahăr cu adaos de urzică | 116 | |
| 7.2.3. Evoluția familiilor de albine din lotul experimental, hrănit cu turtă și sirop de zahăr cu adaos de PROTOFIL | 120 | |
| 7.2.4. Evoluția familiilor de albine din lotul experimental, hrănit cu turtă și sirop de zahăr cu adaos de ceapă | 125 | |
| 7.2.5. Evoluția familiilor de albine din lotul experimental, hrănit cu turtă și sirop de zahăr cu adaos de suc de usturoi | 129 | |
| 7.2.6. Influența suplimentelor utilizate în hrana albinelor în anul 2005 asupra sporului efectiv realizat pentru parametrii urmăriți (număr de intervale ocupate cu albine, suprafață de puiet și suprafață de faguri cu albine) | 134 | |
| 7.3. REZULTATE OBTINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2006 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI URZICII, A PROTOFILULUI, CEPEI ȘI USTUROIULUI ASUPRA ROILOR ARTIFICIALI | 138 | 22 |
| 7.3.1. Evoluția roilor artificiali din lotul martor hrăniți cu sirop | 138 | |

| | | |
|---|------------|-----------|
| de zahăr | | |
| 7.3.2. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental, hrănit cu sirop de zahăr și adaos de urzică | 141 | |
| 7.3.3. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental, hrănit cu sirop de zahăr și adaos de Protofil | 145 | |
| 7.3.4. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental, hrănit cu sirop de zahăr și adaos de ceapă | 149 | |
| 7.3.5. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental, hrănit cu sirop de zahăr și adaos de usturoi | 153 | |
| 7.3.6. Influența suplimentelor utilizate în hrana albinelor în anul 2006 asupra sporului efectiv realizat pentru parametrii urmăriți (suprafață de puiet necăpăcit, suprafață de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet) | 158 | |
| 7.4. REZULTATE OBTINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2007 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI URZICII, A PROTOFILULUI, CEPEI ȘI USTUROIULUI ASUPRA FAMILIILOR DE ALBINE SLĂBITE ARTIFICIAL | 162 | 23 |
| 7.4.1. Evoluția lotului cu familii de albine slăbite artificial, hrănite cu sirop de zahăr | 163 | |
| 7.4.2. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de urzică | 164 | |
| 7.4.3. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de Protofil | 168 | |
| 7.4.4. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de ceapă | 171 | |
| 7.4.5. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental, hrănit cu sirop de zahăr și adaos de usturoi | 174 | |
| 7.4.6. Influența suplimentelor utilizate în hrana albinelor în anul 2007 asupra sporului efectiv realizat pentru parametrii urmăriți (suprafață de puiet necăpăcit, suprafață de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet) | 177 | |
| 7.5. REZULTATE OBTINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2008 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI CIMBRULUI, ECHINACEEI, A SELENIULUI ȘI A AMESTECULUI DE SELENIU ȘI ECHINACEA ASUPRA FAMILIILOR DE ALBINE | 180 | 24 |
| 7.5.1. Rezultatele obținute la familiile de albine după perioada de iernare și pregătire pentru culesul de primăvară | 180 | 24 |
| <i>7.5.1.1. Evoluția familiilor de albine din lotul martor hrănite cu turtă și sirop de zahăr</i> | 182 | |
| <i>7.5.1.2. Evoluția familiilor de albine din lotul experimental hrănit cu turtă și sirop de zahăr și adaos de cimbru</i> | 183 | |
| <i>7.5.1.3. Evoluția familiilor de albine din lotul experimental hrănit cu turtă și sirop de zahăr și adaos de Echinacea</i> | 187 | |
| <i>7.5.1.4. Evoluția familiilor de albine hrănite cu turtă și sirop de</i> | 191 | |

| | | |
|---|------------|-----------|
| <i>zahăr și adaos de seleniu</i> | | |
| <i>7.5.1.5. Evoluția familiilor de albine hrănite cu turtă și sirop de zahăr și adaos de seleniu și Echinacea</i> | 195 | |
| <i>7.5.1.6. Influența suplimentelor utilizate în hrana albinelor în anul 2008 asupra sporului efectiv realizat pentru parametrii urmăriți (număr de intervale ocupate cu albine, suprafață de puiet și suprafață de faguri cu albine)</i> | 199 | |
| 7.5.2. Rezultatele obținute la roii artificiali | 202 | 25 |
| <i>7.5.2.1. Evoluția roilor artificiali martor hrăniți cu sirop de zahăr</i> | 204 | |
| <i>7.5.2.2. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental hrăniți cu sirop de zahăr și adaos de cimbru</i> | 206 | |
| <i>7.5.2.3. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental hrăniți cu sirop de zahăr și adaos de Echinacea</i> | 210 | |
| <i>7.5.2.4. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de seleniu</i> | 213 | |
| <i>7.5.2.5. Evoluția roilor artificiali din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de seleniu și Echinacea</i> | 217 | |
| <i>7.5.2.6. Influența suplimentelor utilizate în hrana albinelor în anul 2008 asupra sporului efectiv realizat pentru parametrii urmăriți (suprafață de puiet necăpăcit, suprafață de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet)</i> | 222 | |
| 7.5.3. Rezultatele obținute la familiile de albine slăbite artificial | 225 | 26 |
| <i>7.5.3.1. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul martor hrănite cu sirop de zahăr</i> | 225 | |
| <i>7.5.3.2. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial hrănite sirop de zahăr și adaos de cimbru</i> | 227 | |
| <i>7.5.3.3. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de Echinacea</i> | 231 | |
| <i>7.5.3.4. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de seleniu</i> | 235 | |
| <i>7.5.3.6. Evoluția familiilor de albine slăbite artificial din lotul experimental hrănit cu sirop de zahăr și adaos de seleniu și Echinacea</i> | 238 | |
| <i>7.5.3.6. Influența suplimentelor utilizate în hrana albinelor în anul 2008 asupra sporului efectiv realizat pentru parametrii urmăriți la familiile slăbite artificial (suprafață de puiet necăpăcit, suprafață de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet)</i> | 242 | |
| CONCLUZII | 244 | 27 |
| BIBLIOGRAFIE | 250 | 31 |
| LISTA DE ABREVIERI SI ACRONIME | 260 | |

OBIECTIVELE CERCETĂRII

Obiectivul principal al cercetărilor întreprinse în cadrul acestei lucrări este de **stabilire a efectului utilizării unor infuzii și extracte de plante asupra dezvoltării familiilor de albine în diferite stări fiziologice**, cercetările raportându-se la evoluția biologică a familiilor de albine.

În vederea atingerii obiectivului principal au fost efectuate următoarele acțiuni:

- ❖ stabilirea loturilor experimentale, urmărindu-se atent o distribuție uniformă a familiilor în cadrul loturilor din punct de vedere al puterii familiilor;
- ❖ testarea extractelor alcoolice și apoase din plantele utilizate ca suplimente;
- ❖ efectuarea măsurătorilor înainte de administrarea hranei suplimentare;
- ❖ administrarea turtei și a siropului de zahăr conținând suplimentele stabilite;
- ❖ efectuarea măsurătorilor la intervale fixe de timp.

La administrarea hranei suplimentare a albinelor sub formă de sirop de zahăr și turtă, au fost adăugate: infuzie de urzică proaspătă sau uscată, infuzie de Echinacea, infuzie de cimbru, suc proaspăt de ceapă și usturoi, seleniu ca și microelement, amestec de Echinacea și seleniu, precum și produsul Protofil, un macerat din plante medicinale, îmbogățit cu elemente minerale și vitamine, utilizat de apicultori pentru combaterea nosemozei și pentru stimularea familiilor de albine primăvara.

Pe perioada desfășurării experimentelor (2005 - 2008) au fost create și observate loturi experimentale alcătuite din familii de albine după perioada de iernare, roi artificiali și familii de albine slăbite artificial prin eliminarea a $\frac{3}{4}$ din populație, toate suplimentele din plante amintite anterior fiind testate pe aceste 3 categorii de loturi experimentale.

Principalele caractere urmărite au fost numărul de intervale ocupate cu albine, suprafața de puiet depusă (puiet necăpăcit, căpăcit și total) precum și suprafața de faguri cu miere.

Teza este structurată în următoarele părți: introducere, obiective, studiu de literatură, cercetări proprii, concluzii și bibliografie

Partea generală: Studiu de literatură, cuprinde 4 capitole (I – IV), descriind din literatura de specialitate importanța apiculturii și situația acesteia pe plan național și mondial, noțiuni despre biologia albinei și structura familiei de albine, aspecte privind tehnologiile de creștere la albine și stadiul cunoașterii privind hrana albinelor și administrarea unor suplimente nutritive.

Partea de cercetări proprii este structurată în 3 capitole (V – VII), cuprinzând descrierea materialului biologic și a plantelor utilizate în studiu (V), metodele utilizate pentru determinarea compoziției extractelor și infuziilor (VI), precum și rezultatele tuturor cercetărilor din câmp, efectuate pe trei stări particulare din ciclul de dezvoltare a familiilor de albine (VII).

CAPITOLUL 1

IMPORTANȚA ȘI SITUAȚIA APICULTURII PE PLAN MONDIAL ȘI NAȚIONAL

Apicultura este o importantă ramură a agriculturii, care studiază biologia și tehnologia creșterii albinelor, cu scopul obținerii de produse apicole și creșterii producției de semințe la plantele agricole entomogame, ca urmare a polenizării acestora de către albinele melifere.

Albinele melifere prezintă particularități biologice specifice și furnizează importante produse, atât alimentare cât și terapeutice: mierea, ceara, polenul, păstura, lăptișorul de matcă, propolisul și veninul, iar prin polenizarea suplimentară a plantelor entomofile asigură însemnate sporuri de producție și de calitate superioară.

Ca ierarhizare pe continente, Europa produce 30% din totalul cantității de miere produsă în lume, iar țările membre ale Uniunii Europene reușesc realizarea a 10% din acest procent. Europa este urmată de Asia (care produce 28.3% din producția totală de miere) și America (25%).

La nivel național s-au înregistrat fluctuații permanente ale efectivului de familii de albine exploatate, și ele sunt datorate în principal evoluției bazei melifere, priceperii și profesionalismului apicultorilor și condițiilor social-economice din zonele de producție. Astfel, în anul 1989 existau 1.41 milioane de familii de albine, iar după 1990, până în anul 2000 acest efectiv a scăzut foarte mult, după acest an efectivul înregistrând o ușoară creștere.

În anul 1989 se înregistra o producție de 12.12 mii tone de miere, producția medie per familie de albine fiind de 8.5 kg/familie; în anul 2000 producția de miere a avut o tendință crescătoare, iar în anul 2004 s-a ajuns la valoarea maximă de 23.71 mii tone. Ultimele date, referitoare la anul 2007 arată o producție la nivel național de 14.7 mii tone, cu o producție medie de 13.9 kg/familie (Institutul Național de Statistică; www.insse.ro). Aceeași sursă arată că în ultimii 10 ani exportul de miere de albine a României a variat între 5 și 10 mii tone, principalele țări importatoare fiind Germania, Anglia, Franța și Italia.

❖ CAPITOLUL 2

BIOLOGIA FAMILIEI DE ALBINE

❖ 2.1. SISTEMATICA ZOOLOGICĂ A ALBINELOR MELIFERE

Albinele melifere fac parte din:

Regnul: *Animalia* (viețuitoare monocelulare și pluricelulare cu mod specific predominant de hrănire pe baza regnului vegetal).

Subregnul: *Nevertebrate* (animale fără coloană vertebrală și fără schelet osos intern).

Încrângătura: *Artropode* (animale nevertebrate cu picioare articulate).

Subîncrângătura: *Mandibulate* (artropode cu mandibulă).

Clasa: *Insecta* (artropode cu corpul alcătuit din trei segmente distincte: cap, torace, abdomen).

Subclasa: *Pterigota* (insecte care prezintă pe segmentele toracice 2 și 3 perechi de aripi)
Ordinul: *Apocrita* (himenoptere la care legătura dintre torace și abdomen se face printr-o porțiune îngustă numită pețiol).

Suprafamilia: *Apoidae* (insecte care-și hrănesc progenitura cu polen și nectar floral).

Familia: *Apidae*.

Subfamilia: *Apinae* (insecte constructoare de cuiburi și care prezintă la a III-a pereche de picioare un aparat pentru colectat polen).

Tribul: *Apini*

Genul: *Aphis* (albine care trăiesc în colonii permanente și monogine au o singură femelă cu organele reproducătoare dezvoltate, capabilă să asigure perpetuarea, corpul acoperit cu peri rari și scurți).

❖ 2.2. COMPONENTA FAMILIEI DE ALBINE

Albinele sunt insecte sociale din specia *Aphis mellifera* și aparțin ordinului *Himenoptera* (insecte cu aripi membranoase). Ele trăiesc în familie (colonie) compusă din 30000-50000 indivizi. Familia de albine este formată din albine lucrătoare, trântori și matcă. Nici unul din indivizii familiei nu poate trăi singur, și fiecare castă este pe larg descrisă în cadrul tezei.

2.3. RELAȚIILE DE NUTRIȚIE ÎN FAMILIA DE ALBINE

Schimbul intens de hrană care se realizează între albinele lucrătoare, matcă și trântori creează coeziunea și integritatea biologică a familiilor de albine. În contactele de nutriție, albinele se ating între ele prin intermediul antenelor care sunt în continuă mișcare. O albină poate fi donatoare sau primitoare de hrană. Albina donatoare deschide mandibulele și printr-o ușoară mișcare înainte a trompei, aduce între mandibule o picătură de hrană, albina primitoare își introduce trompa între mandibulele donatoare și aspiră hrana (Mărghițaș, 2002).

Cei mai puternici stimuli care contribuie la realizarea acestor contacte de nutriție sunt mirosul pe care îl emană corpul și contactul dintre antene. Când partenerii fac parte din aceeași familie, stimulul este mai intens decât în cazul când unul dintre ei este străin. Relațiile de nutriție între albine sunt acte reflexe înnăscute și ele se manifestă din primele ore de viață.

Albinele lucrătoare schimbă hrana între ele de repetate ori, independent de vârstă, dar dependent de starea familiei și de condițiile exterioare. Astfel, aceste schimburi de hrană sunt mai frecvente în perioada creșterii puietului și mai rare în perioada de toamnă, când creșterea puietului se reduce sau încetează. Albinele vârstnice sunt, de obicei, donatoare, iar cele tinere sunt primitoare de hrană.

2.4. IMPLICAȚII ALE HRĂNIRII ASUPRA METABOLISMULUI ALBINELOR

Substanțele alimentare ingerate de albină suferă modificări metabolice. Aceste procese metabolice sunt mai intense în familiile slabe și mai atenuate în cele puternice. Toamna la familiile slabe, metabolismul este mai intens pentru producerea căldurii, fapt ce determină o durată de viață mai scurtă a albinelor. O miere de calitate superioară are influență pozitivă asupra metabolismului indiferent de mărimea populației familiei de albine.

Procesele metabolice au efecte plastice, de reglare și energetice. Efectele plastice se manifestă prin participarea produselor metabolice la alcătuirea materiei și a celulelor și la creșterea acestora. Astfel, hrana primită diferențiat de cele trei caste de larve determină un metabolism diferențiat al acestora. Efectele de reglare intervin asupra substanțelor aflate în corpul albinei și exercită influență reglatoare a unor funcții. Reacțiile chimice ce au loc la nivelul țesuturilor determină efecte energetice manifestate prin degajare de energie calorică.

Intensitatea acestor procese metabolice este reglată pe de o parte de transformarea zahărului în grăsimi sau proteine, iar pe de altă parte de o sinteză mai pronunțată sau mai redusă de enzime ce intervin în anumite etape ale metabolismului.

Metabolismul celular se referă la toate substanțele ce intervin în nutriția albinei: glucide, lipide, proteine, substanțele minerale și apa.

2.5. ASPTECTE GENERALE ALE PATOLOGIEI APICOLE

Bolile, tratate în capitolul de față, pot afecta soarta întregii populații de albine, fiindcă albinele pot supraviețui numai în colectivitate (**Tanada, 1993**). Populația este obiectivul care trebuie întreținut. Albina, ca individ este doar un membru în angrenajul de funcționare al superorganismului. Acest lucru ar trebui avut în vedere, în selectarea conceptelor pentru prevenirea și combaterea bolilor, cea mai bună apărare fiind prevenția. Condițiile de mediu și de întreținere au o importanță specială, datorită faptului că albinele sunt afectate de așa numitele *boli factoriale*, a căror apariție și evoluție depind în mod real de acestea. Pe de altă parte, apicultorilor le stau la dispoziție diferite metode biologice de combatere a bolilor. Medicamentele și alte mijloace terapeutice chimice nu trebuie aplicate decât în cazuri speciale, deoarece produsele apicole sunt foarte sensibile. De regulă, renunțarea la medicamente înseamnă o cheltuială de timp mai mare. O alternativă pentru apicultori ar fi micșorarea corespunzătoare a efectivului populației de albine (**Ritter, 2000**).

Majoritatea bolilor la albine sunt determinate, ca și la celelalte specii de animale, de diverse organisme, care se înmulțesc în interiorul sau în exteriorul corpului acestora, și se hrănesc pe seama acestuia, provocând leziuni anatomo-patologice și dereglări funcționale, care adesea duc la moartea individului. În limbaj medical aceste vietăți sunt numite **agenți patogeni**, **agenți etiologici** sau **agenți cauzali** (**Ogradă, 1986**; www.beehoo.com; www.beekeeping.com; www.betterbee.com). Astfel, loa americană, loa europeană, paratifoza și septicemia sunt produse de bacterii (**boli bacteriene**), puietul în sac, paralizia, boala neagră au la origine virusii (**boli virotice**), puietul văros (ascosferoza), puietul pietrificat (aspergiloza), melanoza sunt cauzate de ciuperci (**boli micotice**), iar nosemoza, amibioza, acarioza, brauloza (păduchele albinelor) și varooza au drept cauză determinantă paraziții (**boli parazitare**) (**Bura, 1997**; **Shimanuki, 1990**; **Mărghitaș, 2002**).

CAPITOLUL 3

ASPECTE GENERALE PRIVIND TEHNOLOGIILE DE CREȘTERE ALE ALBINELOR

La noi în țară, creșterea albinelor este una din cele mai vechi îndeletniciri a populației și s-a dezvoltat pe aceste meleaguri în condiții naturale deosebit de favorabile asigurate de situarea țării în spațiul carpato-danubian, ținut cu condiții de excepție privind clima, relieful și vegetația care au determinat an de an dezvoltarea familiilor de albine și obținerea, în decursul mileniilor, a unor însemnate producții apicole.

În condițiile naturale de astăzi, în bună măsură modificate de practicarea agriculturii și în special, de chimizarea acesteia, îngrijirea familiilor de albine impune măsuri și tehnologii care se înscriu pe coordonate noi, deosebit de importante determinate de necesitatea asigurării de către om a condițiilor pe care nu de mult le oferea natura pentru dezvoltarea familiilor de albine.

În prezent, prin tehnologii speciale, apicultorul poate pregăti familiile de albine pentru valorificarea culesului de primăvară, menținerea acestora în stare activă în perioada de vară, creșterea de albine tinere și asigurarea rezervelor de hrană de calitate în sezonul de toamnă pentru buna organizare a iernării albinelor. Toate acestea sunt etape deosebit de importante în îngrijirea familiilor pentru satisfacerea condițiilor necesare pregătirii albinelor în vederea valorificării superioare a resurselor melifere din flora spontană și cultivată.

De asemenea, adăpostirea și întreținerea familiilor de albine în diferite sisteme de stupi, cu volum reglabil, care să permită dezvoltarea în cursul anului de unități biologice puternice cu spații suficiente pentru depozitarea culesului de nectar acumulate, constituie un factor important pentru obținerea unor producții mari de miere, necesare, atât albinelor cât și producătorilor apicoli.

CAPITOLUL 4

STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR PRIVIND HRANA ALBINELOR ȘI ADMINISTRAREA BIOSTIMULATORILOR ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ACESTORA

4.1. COMPONENTELE HRANEI ALBINELOR

Prehensiunea alimentului, acțiune atât de simplă pentru atâtea ființe vii, a devenit la insectele sociale un lucru de o rară complexitate.

Albina domestică, insectă floricolă în esență vegetariană nu este exclusă acestei reguli. De la recoltarea nectarului la prepararea mierii și la transformarea polenului și până a ajunge la alimentația larvelor, o serie de intervenții tot mai elaborate fac din actul alimentar un stăpân al vieții sociale.

Incertitudinile încep deja la nivelul recoltei de nectar și al amestecului său cu enzimele glandulare pentru a le transforma în zaharuri. Cele patru substanțe culese de albinele culegătoare pentru colonie sunt: nectarul, polenul, propolisul și apa.

Nectarul este un produs complex, secretat de glandele nectarifere ale florilor, fiind o secreție dulce a plantelor. El este în mod normal secretat din nectariile asociate florilor, deși câteva plante au nectar pe frunze sau pe tulpină.

Polenul reprezintă unica sursă de proteine pentru albine. El este recoltat cu piesele bucale, umectat și liat cu miere regurgitată din gură, preluat cu membrele și transportat sub formă de sferule (ghemotoace) în corbicule.

Mierea este unica sursă de energie pentru albine. Componentul de bază al mierii îl reprezintă glucidele, $80\% \pm 5\%$, care asigură organismului energia necesară, având totodată și un important rol structural, prin participarea lor la constituirea membranelor celulare, a țesutului conjunctiv, hormonilor și anticorpilor.

În afară de nectar, albinele recoltează și excrețiile dulci ale unor paraziți ce se alimentează cu seva plantelor, rezultând astfel **mierea de mană**. Mierea de mană este deosebit de dăunătoare pentru hrana albinelor în timpul iernii, producând toxicoze, apariția diareei și mortalitate în masă a albinelor (**Mărghitaș, 2002**).

Apa constituie un component important al hranei, fiind indispensabilă vieții. Corpul albinelor conține 75-80 % apă, iar hemolimfa are un conținut de 90 % apă.

Apa prezintă un important rol fiziologic, participând la elaborarea lăptișorului (cca 40-60 g/zi) și la reglarea temperaturii din cuib pe timpul caniculelor de vară (cca 200 g/zi) (**Mărghitaș, 2002**).

4.2. ADMINISTRAREA HRANEI SUPLIMENTARE ÎN HRANA ALBINELOR

Hrămirile suplimentare la albine se pot clasifica în:

- 1 — Hrăniri de completare
- 2 — Hrăniri de stimulare, care pot fi:
 - a) energetică
 - b) proteică
 - c) energo-proteică
- 3 - Hrănire de dresaj
- 4 - Hrănire medicamentoasă

Hrănirea de completare se poate face pe seama fagurilor cu miere de rezervă de la magazia stupinei sau cu sirop de zahăr în general de concentrație 1:1.

Hrănirea de stimulare are rolul de a suplini culesul când acesta lipsește, asigurând o activitate continuă familiei de albine. Important este ca, prin modul de administrare să se creeze albinelor senzația de prezență permanentă a sursei de cules.

Hrămirile de stimulare se pot clasifica în:

- a) hrănire energetică
- b) hrănire proteică
- c) hrănire energo-proteică

4.3. INFLUENȚA HRANEI ASUPRA DEZVOLTĂRII FAMILIEI DE ALBINE ȘI A STĂRII DE SĂNĂTATE A ACESTEIA

Albina lucrătoare care ecloziona, deci care iese din celulă în stadiul de insectă perfectă, este încă incomplet dezvoltată. Ea va trebui să consume cantități de polen timp de încă șase - nouă zile pentru a-și încheia creșterea și pentru ca sistemul ei glandular să se dezvolte. Prin alimentație, greutatea ei corporală și conținutul de azot total, ca de altfel toate substanțele chimice din organismul lor sporesc. Lipsite de polen, tinerele lucrătoare

pot trăi foarte puțin timp și sunt incapabile de a secreta lăptișorul de matcă. În schimb, albina lucrătoare, cea care va deveni culegătoare, are nevoi mult mai reduse de alimente azotoase; ea nu mai consumă decât miere sau nectar, renunțând la polen.

Nu toate polenurile au aceeași valoare alimentară pentru albine. Există polenuri bune și polenuri proaste, diferențiate de compoziție, și mai ales, de bogăția în proteine; dar acest factor nu este singurul. Într-adevăr, nu se cunosc încă complet nevoile alimentare ale coloniei de albine și nici cele mai bune regimuri artificiale care se pot realiza nu au putut înlocui niciodată, total, polenul pe perioade lungi.

Trebuie încă semnalat faptul că există plante, din fericire puțin numeroase în flora noastră, al căror polen este toxic pentru albine, în cazul în care este consumat în cantități mari. Acesta este cazul gălbenelelor de pădure. Dar se remarcă, de asemenea, că albinele nu recoltează polenurile rele sau polenurile mai mult sau mai puțin periculoase pentru ele, decât în timpul lipsei de hrană. În acest sens, albina nu se comportă diferit de alte animale; ea selecționează alimentele foarte precis și cu siguranță, că studiind aceste selecții, vom putea cunoaște mai bine nevoile alimentare ale coloniilor de albine.

4.4. UTILIZAREA SIROPULUI DE ZAHĂR ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ALBINELOR

În urma cercetărilor întreprinse la noi în țară s-a stabilit că cea mai eficientă metodă de alimentație stimulentă constă în administrarea săptămânală a unei doze de 800-1000 ml sirop 1:1 pe familie, metodă ce asigură sporirea cantității de puiet cu 19.5%. Administrarea zilnică a unor doze mici de sirop (100-200 ml) s-a dovedit mai puțin eficace, întrucât cantitatea de puiet crește cu numai 13%, iar descăpăcirea unei suprafețe de 1 dm² de fagure cu miere la intervale de două-trei zile, deși sub aspect biologic a dat cele mai bune rezultate (puietul sporind cu 28%), metoda nu este aplicabilă în practică datorită frecvențelor intervenției, dar mai ales a pericolului declanșării furtului.

Siropul de zahăr 1:1 se prepară astfel: într-un vas smălțuit se pune la foc o cantitate de apă, la care în timpul fierberii se adaugă treptat o cantitate egală de zahăr. Siropul se amestecă în permanență cu o lingură de lemn, până în momentul în care tot zahărul s-a dizolvat.

Se va avea grijă ca siropul să nu dea în clocot, deoarece zahărul se caramelizează și devine dăunător pentru albine. Spuma formată la suprafața siropului se îndepărtează cu o spumieră sau cu o lingură (**Hristea, 1976; Mărghitaș, 2002, 2005**).

4.5. PROTOFIL

Protofilul este un produs medicamentos destinat combaterii nosemozei, stimulării familiilor de albine și în intoxicații, produs de Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Apicultură București. Este un preparat alcătuit exclusiv din extracte de plante.

Este un lichid brun, transparent, cu miros și gust caracteristic. Se livrează în flacoane de masă plastică, în cantitate de 1 kilogram și 500 de grame. Flacoanele se păstrează în locuri întunecoase și uscate, la temperatura camerei.

Prin substanțele active din plante, vitaminele și microelementele pe care le conține, stimulează secreția enzimatică digestivă a albinelor și larvelor, conducând la un înalt grad de digestibilitate a hranei. El inhibă flora patogenă intestinală și împiedică în mare măsură realizarea ciclului evolutiv a parazitului *Nosema apis*. Mătcile își intensifică ouatul, și crește populația și producția acestora.

Protofilul are în compoziție uleiuri esențiale conținând hidrocarburi ciclice și alifatice, sesquiterpene, triterpene, compuși fenolici, acid oleanolic, compuși flavonici, microelemente și vitamine, în special ale grupului B și alcool etilic (**Chioveanu, 2004**). Principalele plante care intră în rețeta de preparare a protofilului sunt: mușețelul, coada șoricelului, gălbenelele, sunătoarea, menta, teiul, patlagina, cimbrul, busuiocul, pelin cules în luna mai, măceșul, cătina, suc de lămâie, suc de ceapă și tinctură de usturoi.

4.6. ROLUL MICROELEMENTELOR ÎN ORGANIMELE VII: SELENIUL

Seleniul este un microelement esențial care este componenta cheie a mai multor selenoproteine funcționale.

În organismul animal, seleniul se află în cantități mici 1-3 ppm, cantitatea cea mai mare aflându-se în ficat, rinichi, cord și pancreas.

Absorbția seleniului are loc la nivelul intestinului subțire, iar excreția prin urină și prin aerul expirat. Seleniul intervine favorabil în funcția de reproducere, în ritmul de creștere, previne diateza exudativă, encefalomalacia, necroza și atrofia pancreasului.

De asemenea, seleniul este implicat și în reglarea mai multor sisteme enzimatice implicate în metabolismul energetic, funcțiile spermatozoizilor, sinteza prostaglandinelor și metabolismul acizilor grași esențiali, a bazelor purinice și pirimidinice și în imunitatea organismului.

Una dintre cele mai importante funcții ale seleniului în organismele animale constă, așa cum s-a subliniat deja anterior, în rolul său antioxidant. Acțiunea sa antioxidantă este potențată de interrelațiile existente între seleniu și vitamina E, vitamina liposolubilă existentă în membranele celulare și ale organitelor cu rol în mecanismele celulare de apărare împotriva peroxidării fosfolipidelor membranare. Seleniul, component al glutathion-peroxidazei, acționează printr-un mecanism secundar de apărare ca urmare a incapacității vitaminei E de a distruge toți peroxizii metabolici. Tot în calitate de component intracelular al glutathion-peroxidazei, seleniul acționează împreună cu vitamina E pentru reducerea stresului celular (**Sukesh și Anand, 2006**).

Seleniul organic dă rezultate mai bune administrat în hrana animalelor față de seleniul anorganic. Seleniul, alături de alte minerale organice precum fierul, cuprul și zincul are o acțiune foarte importantă în nutriție, lucru demonstrat de numeroase studii realizate în străinătate (**Hess și col., 2003; Ancuti, 2004; Arruda și col., 2004; Surai și col., 2004**). La noi în țară ultimele cercetări cu privire la acțiunea seleniului asupra animalelor de fermă au fost realizate de către **Șara și col. (2004, 2005)**.

4.7. UTILIZAREA PLANTELOR MEDICINALE ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ALBINELOR

Uneori în hrana suplimentară a albinelor se pot introduce plante medicinale de cultură sau din flora spontană, cu scopul prevenirii sau tratării bolilor, precum și a stimulării dezvoltării familiilor de albine. După efectul pe care îl au asupra organismului, distingem:

- **plante cu acțiune trofică și stimulentă generală:** cătină, măceș, **urzică**, sunătoare, păpădie, afin, mur, zmeur, frag, nuc;
- **plante cu acțiune antibacteriană:** **usturoi**, **ceapă**, coada șoricelului, mușețel, sunătoare, anghinare, pelin, izmă, tei, coada calului;

- **plante cu acțiune astringentă, dezinfectantă și stimulentă asupra tractusului digestiv:** pelin, roiniță, coada soricelului, izmă, măceș, urzică moartă, stejar, nuc mesteacăn.

Substanțele medicamentoase pot fi extrase din plante cu ajutorul unor lichide dizolvante (apă, alcool, ulei, oțet), folosind diferite procedee: infuzia, decoctia și macerația.

Plantele utilizate în desfășurarea experimentelor au fost urzica (*Urtica dioica*), ceapa (*Allium cepa*), usturoiul (*Allium sativum*), cimbrul (*Satureja hortensis*) și *Echinacea* (*Echinacea*). Acestea sunt pe larg tratate în cadrul tezei făcându-se referire la sistematica plantelor, la compoziția lor chimică și la proprietățile nutriționale (www.nutritiondata.com) și terapeutice.

CAPITOLUL 5

MATERIALE ȘI METODE PENTRU TESTAREA ÎN CÂMP A EFECTULUI BIOSTIMULATOR AL UNOR EXTRACTE VEGETALE ADMINISTRATE ÎN HRANA SUPLIMENTARĂ A ALBINELOR

5.1. MATERIALUL BIOLOGIC

Plantele testate pe familiile de albine, pentru efectul biostimulator, sunt urzica (*Urtica dioica*), ceapa (*Allium cepa*), usturoiul (*Allium sativum*), cimbru (*Satureja hortensis*) și *Echinacea*.

Aceste plante sunt utilizate în alimentația omului și/sau sub formă de infuzii sau extracte alcoolice, datorită conținutului lor mare de compuși biologic activi, responsabili pentru proprietățile lor antioxidante și antibacteriene.

Pentru testarea în câmp a efectului biostimulator, s-au utilizat infuzii, extracte sau suc proaspăt din plantele mai sus amintite.

Materialul biologic utilizat în testarea efectului biostimulator al plantelor și al seleniului organic a fost constituit din familii de albine aparținând rasei *Apis mellifera carpatica*. Aceste albine se caracterizează în general printr-un instinct moderat de roire, având un comportament calm pe faguri în timpul controlului și nu se pretează la furțișag (Mărghițaș, 2005).

Ferma apicolă în care au fost efectuate experimentele este situată în județul Harghita, localitatea Corund și deține un efectiv de 250 de familii. Dintre acestea cu 50 se practică stupăritul staționar (din cadrul acestora fiind create loturile experimentale) și 200 sunt destinate stupăritului pastoral. Se folosesc stupi verticali cu rame STAS 435 x 300 cm.

5.2. METODELE UTILIZATE

Experimentele au fost efectuate în două serii experimentale pe parcursul a 4 ani. Prima serie experimentală s-a derulat pe parcursul a 3 ani (2005 – 2008), iar seria a doua s-a desfășurat în anul 2008 (Tabel 1).

În seria I s-au utilizat ca și suplimente în hrana albinelor infuzia de urzică, suc proaspăt de ceapă și usturoi, precum și produsul Protofil.

Experimentele au fost realizate pe familii de albine la ieșirea din perioada de iernare (2005), pe roi artificiali (2006) și pe familii de albine slăbite artificial prin eliminarea a $\frac{3}{4}$ din populație (2007).

În anul 2008 s-au repetat experimentele din anii precedenți, utilizându-se ca și suplimente nutritive infuzia de cimbru, infuzia de *Echinacea*, seleniul ca element mineral și amestecul de seleniu și infuzie de *Echinacea*.

Pentru familiile de albine la ieșirea din perioada de iernare au fost urmărite numărul de intervale ocupate cu albine, suprafața totală de puiet și suprafața de faguri cu miere.

Pentru roii artificiali și familiile slăbite artificial au fost urmăriți următorii parametri: suprafața de puiet necăpăcit, suprafața de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet.

Tabel 1

Schema generală de organizare a experimentelor

| Anul | Lotul experimental format din: | Biostimulatorul adăugat în hrana suplimentară | Caracteristica urmărită |
|------|--|--|---|
| 2005 | Familii de albine la ieșirea din perioada de iernare și pregătire pentru culesul de primăvară | - urzică - Protofil - ceapă - usturoi | - număr de intervale ocupate cu albine - suprafața totală de puiet - suprafața de faguri cu miere |
| 2006 | Roi artificiali | - urzică - Protofil - ceapă - usturoi | - suprafața de puiet necăpăcit - suprafața de puiet căpăcit - suprafața totală de puiet |
| 2007 | Familii de albine slăbite artificial prin eliminarea a $\frac{3}{4}$ din populație și ramele aferente acestora | - urzică - Protofil - ceapă - usturoi | - suprafața de puiet necăpăcit - suprafața de puiet căpăcit - suprafața totală de puiet |
| 2008 | Familii de albine la ieșirea din perioada de iernare și pregătire pentru culesul de primăvară | - cimbru - <i>Echinacea</i> - Seleniu - Seleniu+ <i>Echinacea</i> | - număr de intervale ocupate cu albine - suprafața totală de puiet - suprafața de faguri cu miere |
| | Roi artificiali | - cimbru - <i>Echinacea</i> - Seleniu - Seleniu+ <i>Echinacea</i> | - suprafața de puiet necăpăcit - suprafața de puiet căpăcit - suprafața totală de puiet |
| | Familii de albine slăbite artificial prin eliminarea a $\frac{3}{4}$ din populație și ramele aferente acestora | - cimbru - <i>Echinacea</i> - Seleniu - Seleniu+ <i>Echinacea</i> | - suprafața de puiet necăpăcit - suprafața de puiet căpăcit - suprafața totală de puiet |

Turta de zahăr s-a efectuat în modul următor:

- S-a cântărit pentru fiecare lot experimental cantitatea necesară de zahăr
- În vase emailate s-au amestecat zahărul cu pudră cu apă sau infuzia de plante corespunzătoare fiecărei variante experimentale.
- Amestecul s-a omogenizat foarte bine cu ajutorul unei linguri de lemn și apoi s-a framântat energic pentru obținerea unei paste de consistența unui aluat mai tare.

Pasta astfel obținută a fost cântărită în porțiuni de 1000 g, care s-a ambalat în pungi de plastic perforate, s-a aplatizat sub forma unei turte și s-a administrat albinelor, așezându-se deasupra ramelor, cu partea perforată în jos, pentru ca albinele să aibă acces la ea.

Siropul de zahăr (1:1) s-a preparat din 1 kg zahăr și 1 l apă, respectiv infuzie în cazul loturilor experimentale. Cantitatea de apă necesară pentru prepararea infuziei de plante a fost adusă la fierbere, după care s-a adăugat zahărul, amestecând încontinuu până la dizolvarea completă. Siropul a fost lăsat să se răcească și a fost administrat familiilor de albine în dozele detaliate în capitolele următoare.

Biostimulatorii naturali au fost introduși în schemele de alimentare suplimentară, fiind preparați astfel:

- Infuzia de **urzică** s-a preparat în funcție de sezon, fie din urzică proaspătă, fie din urzică uscată. S-au utilizat pentru infuzie fie 10 g de urzică uscată/100 ml apă, fie 100 g urzică proaspătă/1000 ml apă. Infuzia astfel obținută s-a utilizat la pregătirea turtei sau a siropului de zahăr.
- **Protofilul** a fost procurat direct din comerț; s-a utilizat 17 ml Protofil/1000 g sirop de zahăr;
- **Extractul de ceapă** s-a obținut prin măcinarea fină a cepei proaspete și strecurarea acesteia printr-o sită fină; doar partea lichidă a fost utilizată la hrănirea suplimentară; s-au utilizat 5 ml de zeamă de ceapă la 1 kg de zahăr pudră utilizat pentru prepararea turtei și respectiv 5 ml/kg de sirop de zahăr.
- **Extractul de usturoi** s-a obținut prin măcinarea fină a acestuia și strecurare printr-o sită fină; s-a utilizat 2 ml de zeamă de usturoi /kg de zahăr pudră la turtă, sau /kg de sirop de zahăr.
- **Extractul de cimbru** a fost preparat astfel: din 50 de grame de plantă uscată s-a efectuat o infuzie de 10% în apă caldă; după strecurare, această soluție se introduce în 5 kg turtă sau sirop.
- S-au utilizat 10 ml de soluție de **Echinacea** 10%, obținută din planta uscată, la 1 kg de turtă sau 1 kg de sirop de zahăr.
- Amestecul de **seleniu și Echinacea** s-a obținut prin amestecarea a 1.5 grame seleniu cu 4.5 kg zahăr pudră și 0.5 litri infuzie de **Echinacea** 10%; acest amestec a fost utilizat pentru 5 familii de albine.

Pentru determinarea suprafețelor totale de puiet depus și a suprafețelor de faguri plini cu miere a fost utilizată rama Netz.

CAPITOLUL 6

MATERIALE ȘI METODE DE LABORATOR

6.1. PLANTELE ȘI METODELE UTILIZATE PENTRU TESTAREA ACESTORA ÎN LABORATOR

Plantele analizate în laborator în vederea stabilirii conținutului de compuși biologic activi și ulterior testate pe familiile de albine sunt urzica (*Urtica dioica*), ceapa (*Allium cepa*), usturoiul (*Allium sativum*), cimbru (*Satureja hortensis*) și *Echinacea*.

Aceste plante sunt utilizate în alimentația omului și/sau sub formă de infuzii sau extracte alcoolice, datorită conținutului lor mare de compuși biologic activi, responsabili pentru proprietățile lor antioxidante și antibacteriene.

Metodele de testare în laborator sunt metode standardizate, din Farmacopeea Română sau metode proprii dezvoltate în laborator.

Extractele și/sau infuziile realizate din plantele mai sus amintite au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Controlul Calității Produselor Apicole din Cadrul Disciplinei de Tehnologia Producțiilor Apicole și Sericicole din USAMV Cluj-Napoca.

Principalele caracteristici analizate din extractele sau infuziile efectuate au fost: spectrul glucidic, polifenolii totali, conținutul de flavonoide libere, precum și activitatea antioxidantă a lor.

Acești parametri au fost apoi corelați cu rezultatele obținute în câmp, în testele efectuate pe familiile de albine.

Tabelul 2 prezintă sintetic plantele analizate din punct de vedere al compoziției lor chimice și al unor proprietăți bioactive, precum și metodele aplicate pentru determinarea acestora.

Tabel 2

Metodele de testare a compoziției și proprietăților plantelor studiate

| Planta | Compușii determinați | Metoda aplicată |
|--|-------------------------|---|
| Urzica (<i>Urtica dioica</i>) | Polifenoli | Metoda Folin-Cocâlțeu (Singleton, 1965), Metodă spectrofotometrică |
| Ceapă (<i>Allium cepa</i>) | Flavonoide totale | Metoda spectrofotometrică, (Kim și col., 2003), modificată |
| | pH | Metoda potențiomtrică |
| Usturoi (<i>Allium sativum</i>) | Glucide | Testul Barfoed, Testul Selivanoff, Testul cu iodura de potasiu, |
| Cimbru (<i>Satureja hortensis L.</i>) | | Metoda HPLC, (Kroyar și Hegedus, 2001; Bonta și col., 2007) |
| Echinacea (<i>Echinacea sp.</i>) | Activitate antioxidantă | Metoda DPPH spectrofotometrică, (Meda și col., 2005) |

În afara plantelor amintite în tabelul 2 au mai fost testate pe familiile de albine Protofilul și seleniul organic.

6.2. MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU PRIVIND EVALUAREA COMPOZIȚIEI ȘI A PROPRIETĂȚILOR PLANTELOR UTILIZATE

Extractele metanolice utilizate în experimentele efectuate sunt prezentate în figura 1 și ele au prezentat culori diferite față de infuzia realizată din aceleași plante.

Studierea compoziției chimice a compușilor biologic activi din plantele utilizate în acest studiu, au fost precedate de efectuarea unor analize preliminare pentru punerea în evidență a compoziției glucidelor sau a compușilor polifenolici totali.

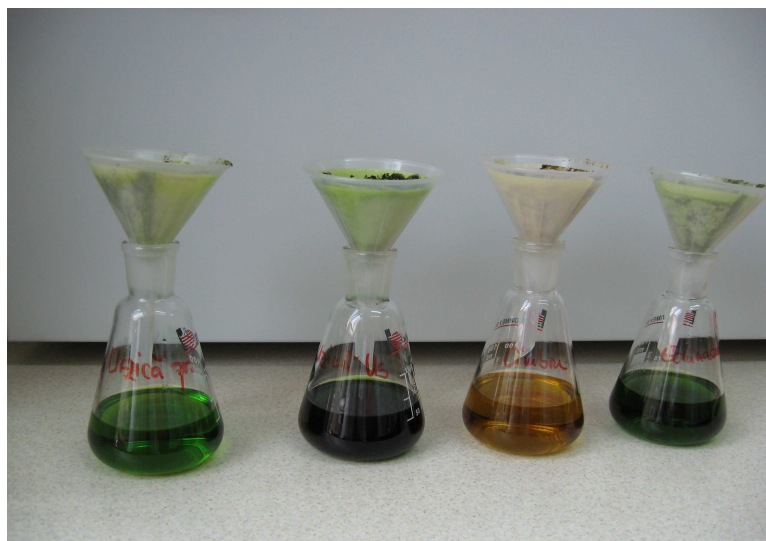


Figura 1. Extractele metanolice de urzica proaspătă, urzica uscată, cimbru și *Echinacea*

Pentru testarea prezenței și tipului de carbohidrați, a proteinelor, pigmentilor, pH-ului, au fost efectuate diferite experimente. Acestea au inclus: **testul Barfoed**, care determină prezența monozaharidelor sau polizaharidelor, **testul Selivanoff**, care determină dacă glucidul este o aldoză sau o cetoză, **testul cu iodură de potasiu**, care detectează prezența amidonului, **metoda Bradford**, care cuantifică proteinele și **măsurarea pH-ului** extractului supus analizei, precum și a infuziei realizate.

Testele care implică determinarea carbohidraților sunt teste calitative. Acestea dau informații asupra tipului de carbohidrați prezenți, a structurii lor moleculare. Toate aceste teste au ajutat în formarea unei idei asupra tipului de carbohidrați prezenți, dar au prezentat suport pentru studiile ulterioare, studii de cromatografie pentru determinarea glucidelor individuale prezente în probe. Aceste studii s-au realizat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (**HPLC**) cu detecție a indicelui de refracție. Metoda HPLC este o metodă simplă, reproductibilă și permite cuantificarea exactă a fiecărui glucid prezent în probe.

Sistemul HPLC la care au fost efectuate determinările (model SHIMADZU) are în componență o pompă LC-10AD, degazor DGU-14A, autosampler pentru probe SIL-10AV VP, detector al indicelui de refracție RID-10A, termostatat la 30°C cu reglator de temperatură CTO-10AS VP al coloanei de separare (Altima Amino 100A 5 μm, conținând silicagel amino modificat, 250mm x 4,6mm), utilizând ca și fază mobilă amestec acetone:apă (80:20).

Pentru testarea prezenței monozaharidelor, dizaharidelor sau polizaharidelor, a fost executat testul Barfoed. Testul Selivanoff a fost utilizat pentru diferențierea ketozelor și aldozelor. Testul cu iodura de potasiu a fost utilizat pentru punerea în evidență a amidonului. A fost deasemenea realizat testul Bradford pentru determinarea conținutului de proteină. Un colorant albastru este adăugat peste extractul de plante, schimbarea de culoare a mediului realizându-se pe baza prezenței și a cantității de proteine prezente.

Cromatografia în strat subțire a fost utilizată pentru a evidenția prezența pigmentilor în extracte și infuzia de *Echinacea*. Cantitățile de Clorofila A și B au fost deasemenea cuantificate.

Toate aceste teste au fost efectuate pentru a răspunde la întrebarea dacă infuzia utilizată în hrana albinelor conține aceleași tipuri și cantități de compuși ca și extractul realizat în metanol.

Materialul vegetal de *Echinacea* a fost obținut de la S.C. Proplanta S.A. Cluj-Napoca, sub formă de plante uscate de *Echinacea*, iar restul plantelor au fost recoltate din flora spontană.

Pentru testul Barfoed, s-a utilizat soluția Barfoed, iar rezorcina în acid clorhidric a fost utilizată pentru testul Selivanoff. Pentru testul cu iodul s-a utilizat o soluție de iod în iodura de potasiu. Soluția de Coomassie brilliant blue G-250 a fost utilizată pentru metoda Bradford.

Pentru cromatografia pe strat subțire au fost utilizate plăcuțe speciale introduse în cuve cu acid acetic 80% utilizat ca și agent de dezvoltare.

Analiza **polifenolilor totali** din probele de plante (infuzie și extract metanolic) s-a realizat utilizând metoda Folin-Ciocalteu modificată, metodă sensibilă pentru determinarea tuturor entităților fenolice din probe biologice vegetale sau animale (**Singleton și col., 1965**). Rezultatele au fost exprimate ca medie a trei determinări, în mg echivalenți de acid galic (GAE)/100 g plantă.

Flavonoidele totale din extract și infuzie au fost determinate după metoda utilizată de **Kim și col. (2003)**, utilizând ca și reactivi NaNO₂, AlCl₃ și NaOH. Rezultatele au fost exprimate ca medie a trei repetiții în mg echivalenți quercetină.

Activitatea antioxidantă a soluțiilor apoase sau a extractelor alcoolice din diferite plante a fost corelată cu compoziția lor chimică și comparată cu acțiunea cunoscută a unor antioxidanți naturali sau sintetici. În experimentele noastre activitatea antioxidantă a infuziei și extractului alcoolic a fost măsurată ca și capacitatea de captare a radicalului liber DPPH de către fitocompușii din plante, măsurată spectrofotometric și exprimată ca și procent de inhibiție a radicalului sau ca și milimoli Trolox (analog al vitaminei E).

CAPITOLUL 7

REZULTATE ȘI DISCUȚII

7.1. REZULTATE OBȚINUTE ÎN URMA DETERMINĂRILOR DE LABORATOR EFECTUATE ASUPRA PLANTELOR

Extractele alcoolice de plante au fost supuse mai multor teste preliminare, pentru determinarea tipului de glucide prezente, pentru determinarea tipului de pigmenți, a pH-ului și a conținutului de proteină. Ulterior s-a analizat prin metoda HPLC, tipul și cantitatea de glucide existente în extract, conținutul de polifenoli totali, flavonoide totale și activitatea antioxidantă.

Pentru **determinarea tipului de glucide** au fost efectuate testul Barfoed (care indică prezența monozaharidelor), Testul Selivanoff (care identifică aldozele și cetozele) și Testul cu iodura de potasiu pentru determinarea polizaharidelor.

Rezultatele analizelor testului Barfoed au demonstrat că extractul de *Echinacea* conține monozaharide în cantitate mai mare față de di- și polizaharide, testul Selivanoff a pus în evidență prezența în extractul de *Echinacea* a cetozelor, iar testul cu iodura de potasiu a identificat prezența polizaharidelor în toate probele analizate.

Metoda Bradford pentru **determinarea spectrofotometrică a proteinelor**, s-a bazat pe construirea unei curbe de calibrare cu albumină serică bovină, care a fost utilizată pentru determinarea concentrației proteinelor din extractele analizate. În privința conținutului de proteine, putem spune că extractele metanolice ale plantelor luate în studiu conțin cantități neînsemnate de proteine, cea mai ridicată concentrație fiind înregistrată în cazul extractului de *Echinacea* (53.93mg/ml).

Cromatografia în strat subțire (TLC) a fost utilizată pentru a determina tipul **pigmenților** prezenți în extract, și pentru a determina cantitatea de clorofilă a și b existentă în probe. Ca și control a fost utilizat un extract din frunze de spanac, extract ce conține clorofila a, clorofila b, xantofile și beta-caroten. Rezultatele au demonstrat că extractul de *Echinacea* conține clorofilă a și b, xantofile și β -caroten, așa după cum reiese din cromatografia în strat subțire. Nu au fost puși în evidență și alți pigmenți în extract. Studiile de literatură privind analizele spectrofotometrice (înregistrarea spectrului UV-VIS a clorofilei a și a clorofilei b) au fost corelate cu analizele efectuate în laborator pentru a identifica și cuantifica acești pigmenți în extractele luate în studiu.

Cantitatea de clorofilă a în plantele de *Echinacea* a fost de 0.140 μg per gram, iar cantitatea de clorofilă b de 0.238 μg per gram.

Rezultatele obținute la **determinarea pH-ului** extractelor alcoolice și a infuziei din plantele studiate sunt prezentate în figura 2. Extractele și infuziile de plante, având pH apropiat de valoarea neutră nu a acidifiat sau alcalinizat siropul sau turta de zahăr.

În ceea ce privește **conținutul de flavonoide**, s-au înregistrat cantități foarte ridicate la infuzia de urzică uscată (482 mg QE/100 g), urmat de infuzia de *Echinacea* (325.9 mg QE/100 g) și infuzia de urzică proaspătă (286 mg QE/100 g). Cantități mai mici s-au obținut la extractul de *Echinacea*, de cimbru, urzică uscată și infuzia de cimbru (183 – 123 mg QE/100 g).

Cantități foarte mici de flavonoide s-au obținut la extractele și sucurile proaspete de ceapă și usturoi (11.3 – 1.6 mgQE/100 g).

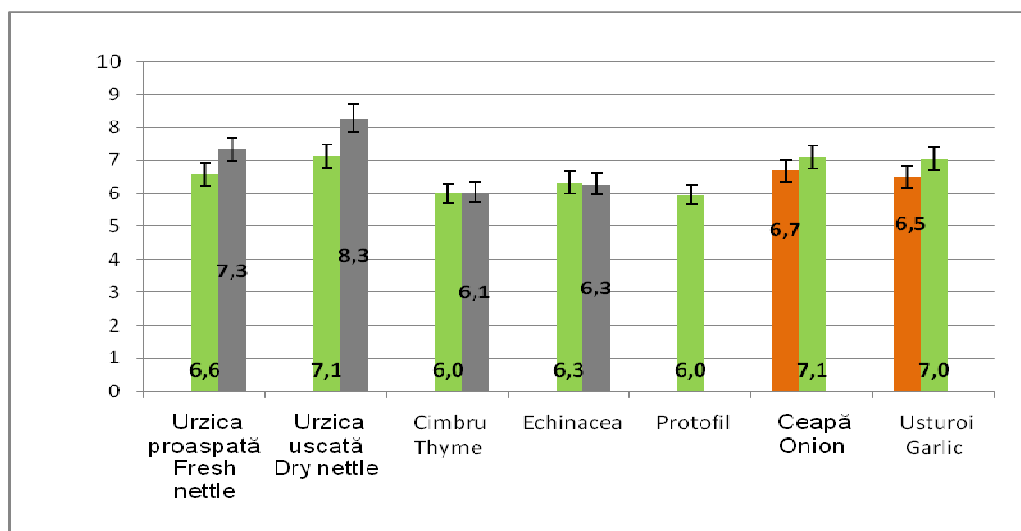


Figura 2. Valorile pH-ului extractului metanolic și a infuziei din plantele analizate (■ extract alcoolic; ■ infuzie; ■ suc proaspat)

Conținutul de polifenoli totali ai extractelor și infuziilor utilizate în acest studiu se prezintă în tabelul 3.

Tabel 3

Conținutul de polifenoli totali din extractele metanolice și infuziile plantelor studiate

| Planta | Polifenoli totali (mgGAE/100 g) | | |
|------------------|---------------------------------|--------------|--------------|
| | Extract alcoolic | Infuzie | Suc proaspăt |
| Urzica proaspătă | 192.0 | 310.0 | - |
| Urzică uscată | 294.0 | 510.0 | - |
| Cimbru | 555.0 | 530.0 | - |
| Echinaceea | 549.0 | 570.0 | - |
| Protofil | 576.0** | - | - |
| Ceapă | 33.0* | - | 150.9 |
| Usturoi | 88.0 | - | 69.0 |

* - valoarea minimă

** - valoarea maximă

Extractele alcoolice și infuziile realizate au fost supuse testului pentru determinarea activității antioxidante, utilizând metoda DPPH. Substanțele cu rol antioxidant din plante, reduc colorația radicalului 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (albastru), proporțional cu cantitatea existentă în probe. Procentul de inhibiție al radicalului DPPH de către 0.5 ml din fiecare probă este redat în tabelul 4.

Activitatea antioxidantă în produsele vegetale este datorată mai multor compuși biologic activi, nu doar entităților fenolice. Ceapa și usturoiul conțin în compoziția lor compuși cu sulf, care s-au dovedit a avea o acțiune puternic antioxidantă, compuși ce nu s-au extras cu amestecul metanol: apă, deoarece nu s-a obținut aceeași activitate antioxidantă ridicată și la extractele de ceapă și usturoi.

Tabel 4

Procentul de inhibiție a extractelor metanolice și infuziilor plantelor luate în studiu

| Planta | Activitatea antioxidantă (%Inhibiție) | | |
|------------------|---------------------------------------|---------|--------------|
| | Extract alcoolic | Infuzie | Suc proaspăt |
| <i>Echinacea</i> | 53.38 | 75.47 | - |
| Cimbru | 74.13 | 50.70 | - |
| Urzică uscată | 66.20 | 53.97 | - |
| Urzică proaspătă | 74.59 | 63.08 | - |
| Protofil | 55.48 | - | - |
| Ceapă | 29.84 | - | 84.85 |
| Usturoi | 20.98* | - | 95.10** |

* - valoarea minimă

** - valoarea maximă

Procentul de inhibiție nu a surprins în cazul extractelor sau infuziilor de urzică, cimbru sau *Echinacea*, deoarece aceste plante au prezentat și cantități ridicate de polifenoli sau flavonoide totale.

7.2. REZULTATE OBȚINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2005 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI URZICII, PROTOFILULUI, CEPEI ȘI USTUROIULUI ASUPRA FAMILIILOR DE ALBINE LA IEȘIREA DIN PERIOADA DE IERNARE ȘI PREGĂTIRE PENTRU CULESUL DE PRIMĂVARĂ

În anul experimental 2005 a fost testat efectul unor extracte și infuzii din plante ca adaus în hrana suplimentară a albinelor (1000 g turtă, administrată o singură dată și sirop de zahăr 1000g/zi, administrat timp de zece zile, preparate așa cum a fost descris în capitolul 6.3). Numărul de familii care au fost studiate a fost de 45, fiecare lot experimental hrănit diferențiat fiind compus din 9 familii de albine.

Caracteristicile urmărite au fost numărul de intervale ocupate cu albine, suprafața totală de puiet (dm²) și suprafața de faguri cu miere (dm²).

Aceste caracteristici au fost urmărite de două ori pe parcursul desfășurării experimentului, efectuându-se astfel două controale la fiecare familie de albine, unul după administrarea turtei de zahăr, iar al doilea după administrarea siropului de zahăr 1:1, conținând adaosurile aflate în testare și caracteristice fiecărui lot.

Tabelul 5 centralizează datele sporului efectiv obținut în anul 2005 la testarea în câmp a efectului adaosului de suplimente asupra creșterii numărului de intervale, a suprafeței medii de puiet și de faguri cu miere per familie. De asemenea, sunt prezentate pentru aceste caracteristici diferențele procentuale față de lotul martor.

În anul experimental 2005, Protofilul demonstrează cel mai puternic efect asupra celor trei caracteristici urmărite. De asemenea, extractul de urzică are influențe importante asupra numărului de rame și implicit asupra suprafeței de puiet.

Extractul de ceapă și cel de usturoi nu influențează în mod evident caracteristicile urmărite.

Tabel 5

Centralizarea datelor privind sporul efectiv realizat în 2005 la familiile de albine
The centralised data regarding effective growth in 2005 at bee colonies

| Caracteristica | Hrana suplimentara | Urzică | Protofil | Ceapă | Usturoi |
|---|---------------------|-----------|----------|------------|-----------|
| Număr de intervale ocupate cu albine | După turta de zahăr | -0.8 | +0.2 | +0.3 | -0.4 |
| | După sirop de zahăr | +1.7 | +3.3 | +0.3 | +1.0 |
| Suprafața totală de puiet (dm ²) | După sirop de zahăr | +0.6 | +13.0 | +1.8 | +1.2 |
| Suprafața de faguri cu miere (dm ²) | După sirop de zahăr | +1.2 | +5.6 | -4.4 | -6.4 |
| IERARHIZAREA SUPLIMENTELOR | | II | I | III | IV |

7.3. REZULTATE OBȚINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2006 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI URZICII, A PROTOFILULUI, CEPEI ȘI USTUROIULUI ASUPRA ROILOR ARTIFICIALI

În anul experimental 2006 au fost testate efectele infuziei de urzică, ale Protofilului, ale sucului proaspăt de ceapă și usturoi, asupra roilor artificiali, creați în luna iulie.

Roi artificiali au fost creați din 3 rame cu puiet și albinele aferente, o ramă cu miere și o ramă cu ceară artificială pentru clădit, la care s-a adăugat o matcă în colivie împerecheată în anul curent. Cu această ocazie s-a efectuat și controlul preliminar.

După o săptămână, s-a verificat dacă roii au acceptat matca, efectuându-se primele măsurători. Au fost urmărite suprafețele de uiet necăpăcit, căpăcit și suprafața totală de puiet.

Tabelul 6 centralizează datele sporului efectiv obținut în anul 2006 la testarea în câmp a efectului adaosului de suplimente asupra creșterii suprafeței de puiet necăpăcit, a suprafeței de puiet căpăcit și a suprafeței totale de puiet. Deasemenea, sunt prezentate pentru aceste caracteristici diferențele procentuale față de lotul martor și ierarhizarea suplimentelor utilizate în acest experiment.

Tabel 6

Centralizarea rezultatelor obținute pentru anul experimental 2006 la roii artificiali

| Caracteristica | Hrana suplimentara | Urzică | Protofil | Ceapă | Usturoi |
|---|---------------------|----------|-----------|-----------|------------|
| Suprafața de puiet necăpăcit (dm ²) | După sirop de zahăr | -3.7 | +5.8 | -4.0 | -2.6 |
| | După repaus 22 zile | +1.2 | +2.2 | +7.9 | +12.2 |
| Suprafața de puiet căpăcit (dm ²) | După sirop de zahăr | +11.8 | -0.2 | +0.3 | +7.0 |
| | După repaus 22 zile | +2.5 | +1.0 | -7.5 | -9.3 |
| Suprafața totală de puiet (dm ²) | După sirop de zahăr | +8.2 | +5.7 | +4.4 | +6.7 |
| | După repaus 22 zile | +3.5 | +3.2 | +0.4 | +2.9 |
| IERARHIZAREA SUPLEMENTELOR | | I | II | IV | III |

Analizând datele experimentale se poate observa că **toate suplimentele nutritive** au un efect de scădere a **suprafeței de puiet necăpăcit** pe durata experimentului. Cea mai mare scădere a suprafeței de puiet necăpăcit pe durata întregului experiment a fost înregistrată la urzică. Protofilul, ceapa și usturoiul acționează în manieră similară, producând o scădere cu aproximativ 6 dm² suprafața de puiet necăpăcit pe durata experimentului.

7.4. REZULTATE OBȚINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2007 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI URZICII, A PROTOFILULUI, CEPEI ȘI USTUROIULUI ASUPRA FAMILIILOR DE ALBINE SLĂBITE ARTIFICIAL

În anul experimental 2007 a fost testat efectul urzicii, a Protofilului, a cepei și a usturoiului asupra familiilor de albine slăbite artificial. Slăbirea artificială a familiilor de albine s-a făcut prin înlăturarea ramelor acoperite cu albine din fiecare familie, până când au rămas 4 rame cu puiet, miere și albinele aferente, împreună cu matca existentă în familie. Suprafața de puiet era în medie de 102 dm²/lot, iar suprafața de miere de 20 – 24 dm²/lot.

Au fost create 25 de familii slăbite artificial, fiecare lot fiind format din 5 astfel de familii; lotul martor a fost hrănit numai cu sirop de zahăr 1:1, câte 1000 g/familie, timp de 10 zile, iar după ultima administrare s-a efectuat măsurarea suprafeței de puiet necăpăcit, a suprafeței de puiet căpăcit și a suprafeței totale de puiet corespunzătoare fiecărei familii.

La familiile de albine slăbite artificial, valorile parametrilor urmăriți ar putea fi similari cu cei de la roii artificiali, cu deosebirea că aici matca a rămas cea existentă în

vechea familie și teoretic nu ar trebui să existe acea perioadă de acomodare a mătcii cu noua familie, sau să existe pericolul ca matca să nu fie acceptată.

La slăbirea familiilor s-a încercat o distribuire cât mai uniformă a materialului biologic, a suprafeței de puiet și a suprafeței de miere.

Loturile martor și experimentale au fost alcătuite din câte 5 familii, caracteristicile urmărite fiind suprafața de puiet necăpăcit, suprafața de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet.

Schema experimentală aplicată a fost asemănătoare cu cea aplicată familiilor de albine care și-au încheiat perioada de iernare și roilor artificiali.

Rezultatele obținute în anul experimental 2007 sunt reprezentate grafic în figura 3.

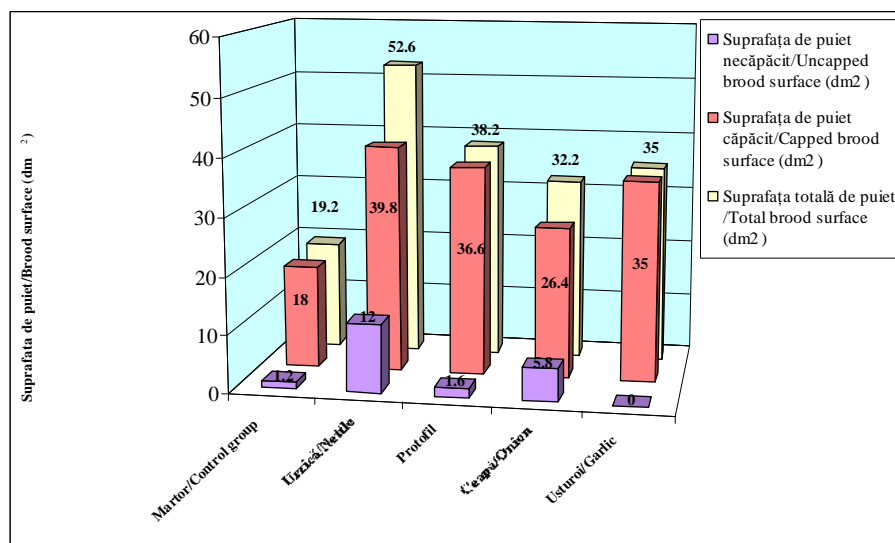


Figura 3. Centralizarea rezultatelor obținute pentru anul experimental 2007 la familiile de albine slăbite artificial

Putem afirma că, în anul experimental 2007, infuzia de urzică a demonstrat efectul cel mai puternic asupra celor trei caracteristici urmărite. Într-o ierarhizare a suplimentelor utilizate în acest an, ceapa s-ar situa pe locul II (datorită influenței pe care a avut-o asupra suprafeței de puiet necăpăcit), pe locul III, utilizarea Protofilului, iar cel mai slab biostimulator este și de data aceasta (ca și la familiile ieșite din iarnă și la roi artificiali), suc de usturoi și cel mai slab supliment ceapa. Aceeași ierarhizare este valabilă și pentru suprafața totală de puiet.

Pentru suprafața de puiet căpăcit, ierarhizarea ar fi: infuzie de urzică, Protofil, suc de usturoi și cel mai slab supliment ceapa. Aceeași ierarhizare este valabilă și pentru suprafața totală de puiet.

7.5. REZULTATE OBȚINUTE ÎN ANUL EXPERIMENTAL 2008 PRIVIND TESTAREA EFECTULUI CIMBRULUI, *ECHINACEEI*, A SELENIULUI ȘI A AMESTECULUI DE SELENIU ȘI *ECHINACEA* ASUPRA FAMILIILOR DE ALBINE

7.5.1. Rezultatele obținute la familiile de albine după perioada de iernare și pregătire pentru culesul de primăvară

Efectul infuziei de cimbru, al *Echinacei*, al seleniului, și a amestecului de seleniu și *Echinacea* a fost testat în anul experimental 2008 asupra familiilor de albine după perioada de iernare, iar schema experimentală aplicată acestora se regăsește în tabelul 9.

În anul experimental 2008 au fost formate 4 loturi experimentale formate din familii de albine care și-au încheiat perioada de iernare și care au fost hrănite suplimentar cu turtă și sirop de zahăr conținând adaosurile enumerate mai sus și un lot martor, hrănit convențional.

Ca și caracteristici urmărite, s-a înregistrat sporul numărului de intervale ocupate cu albine, evoluția suprafeței de puiet și a suprafeței de faguri cu miere.

La toți parametri urmăriți în acest experiment se înregistrează creșteri ale valorilor înregistrate, mai mici după administrarea turtei (fiindcă familiile de albine se află într-o regresie fiziologică normală - schimb de generații), dar însemnate după administrarea siropului de zahăr cu adaus de suplimente nutritive.

Diferențele înregistrate între suplimente (figura 4) au arătat că amestecul a două dintre ele (seleniul și *Echinacea*) nu induce efecte cumulate, cum poate să se aștepte, unii dintre parametri fiind mai creșcuți la utilizarea seleniului (suprafața de faguri cu miere), alții la utilizarea infuziei de *Echinacea* (numărul de intervale ocupate cu albine și suprafața de puiet), dar nici unul dintre ei neprezentând efect biostimulator mai mare atunci când s-a utilizat amestecul de seleniu și *Echinacea*.

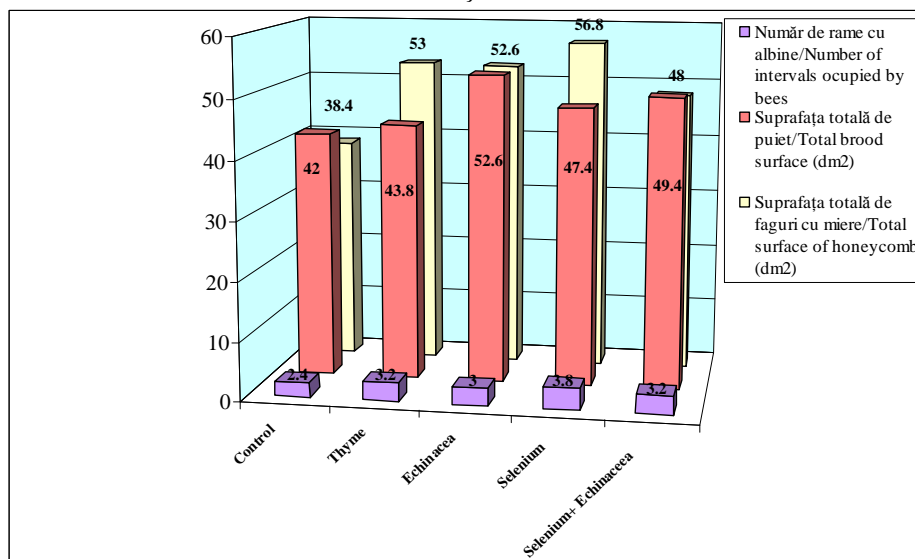


Figura 4. Centralizarea rezultatelor privind sporul efectiv pentru anul experimental 2008 la familiile de albine

După acest experiment putem concluziona că utilizarea infuziei de *Echinacea* și a seleniului în hrana suplimentară a albinelor, generează creșteri al numărului de intervale acoperite cu albine, ale suprafeței de puiet și ale suprafeței de miere, aproximativ egale, în timp ce administrarea celor două suplimente sub formă de amestec, nu generează creșteri cumulate, nici măcar mai mari ca și dacă sunt administrați separat.

Infuzia de cimbru s-a dovedit cel mai slab biostimulator din acest experiment.

7.5.2. Rezultatele obținute la roi artificiali

Testarea efectului cimbrului, *Echinaceei*, a seleniului și ale amestecului de seleniu și *Echinacea* a fost efectuată în anul 2008 și asupra roilor artificiali.

Parametrii determinați în anul experimental 2008 au fost suprafața de puiet necăpăcit, suprafața de puiet căpăcit și suprafața totală de puiet, iar rezultatele sunt centralizate în figura 5. Determinarea suprafețelor de puiet a fost realizată înainte de a începe hrănirea cu sirop, după terminarea celor 10 administrări, și după o lună după terminarea hrănirii suplimentare.

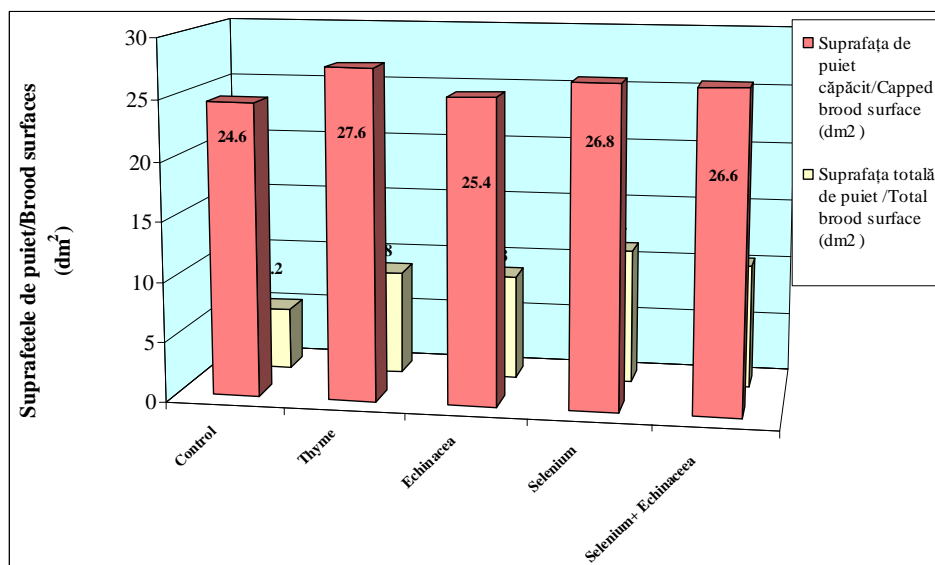


Figura 5. Centralizarea rezultatelor obținute pentru anul experimental 2008 la roiile artificiale

Analizând datele experimentale se poate observa că **toate suplimentele nutritive** au un efect de scădere a **suprafeței de puiet necăpăcit** pe durata experimentului. Cea mai mare scădere a suprafeței de puiet necăpăcit pe durata întregului experiment a fost înregistrată la infuzia de cimbru. Protofilul, ceapa și usturoiul acționează în manieră similară, producând o scădere cu aproximativ 15 dm² suprafața de puiet necăpăcit pe durata experimentului.

După acest experiment putem concluziona că efectul biostimulator cel mai pronunțat pentru suprafața de puiet căpăcit îl are infuzia de cimbru, celelalte suplimente utilizate, induc și ele valori ridicate ale sporului efectiv al familiilor. În ce privește suprafața totală de puiet, este influențată în cea mai mare măsură de utilizarea seleniului și a amestecului de *Echinacea* și seleniu. Infuzia de cimbru și *Echinacea* induc creșteri mai scăzute ale suprafeței totale de puiet pentru loturile experimentale în comparație cu lotul martor.

Suprafața de puiet necăpăcit nu a înregistrat la nici o variantă experimentală creșteri efective, pe tot parcursul experimentului și la toate suplimentele utilizate, înregistrându-se scăderi ale acestui parametru.

7.5.3. Rezultatele obținute la familiile de albine slăbite artificial

Efectul infuziei de cimbru, de *Echinacea*, a seleniului și a amestecului de seleniu și *Echinacea* a fost testat asupra familiilor de albine slăbite artificial. Acestea au fost obținute prin eliminarea a $\frac{3}{4}$ din populație.

Rezultatele obținute în anul experimental 2008 la loturile formate din familii de albine slăbite artificial, asupra cărora au fost testate efectul infuziei de cimbru, de *Echinacea*, al seleniului și al amestecului de seleniu și *Echinacea*, sunt redată în tabelul 7, atât ca medie obținută per familie, cât și ca exprimare procentuală față de lotul martor.

Tabel 7

Centralizarea rezultatelor obținute pentru anul experimental 2008 la familiile de albine slăbite artificial

| Caracteristica analizată | Hrana suplimentara | Cimbru | <i>Echinacea</i> | Seleniu | Seleniu+ <i>Echinacea</i> |
|---|---------------------|-----------|------------------|------------|---------------------------|
| Suprafață de puiet necăpăcit (dm ²) | După sirop de zahăr | -0.6 | -0.5 | +1.9 | +0.9 |
| Suprafața de puiet căpăcit (dm ²) | După sirop de zahăr | +3.2 | +4.7 | -1.1 | +0.6 |
| Suprafața totală de puiet (dm ²) | După sirop de zahăr | +4.8 | +5.2 | -3.0 | -3.0 |
| IERARHIZAREA SUPLIMENTELOR | | II | I | III | IV |

Analizând datele experimentale se poate observa că toate suplimentele nutritive au un efect de creștere foarte ușoară a suprafeței de puiet necăpăcit pe durata experimentului. Cea mai pronunțată stimulare a **suprafeței de puiet necăpăcit** pe durata întregului experiment a fost înregistrată la utilizarea seleniului ca adaus nutritiv.

CONCLUZII

1. **Scopul** cercetărilor întreprinse în prezenta lucrare a fost determinarea în laborator și în câmp a **efectului unor infuzii și extracte de plante asupra productivității familiilor de albine** aflate în diverse stadii ale evoluției lor biologice. Suplimentele studiate au fost urzica (*Urtica dioica*), Protofilul, ceapa (*Allium cepa*), usturoiul (*Allium sativum*), cimbrul (*Satureja hortensis*), *Echinacea* (*Echinacea sp.*) și seleniul. Loturile experimentale asupra cărora a fost testat efectul biostimulator al acestor suplimente au fost constituite din familii de albine care și-au încheiat perioada de iernare și încep perioada de cules de primăvară, roi artificiali și familii de albine slăbite artificial.
2. **Determinările de laborator** au vizat testarea extractelor alcoolice și apoase din plantele amintite anterior, fiind determinate conținutul de **polifenoli totali, flavonoide totale, pH-ul** extractelor, **identificarea și cuantificarea glucidelor, determinarea proteinelor totale**, precum și **activitatea antioxidantă** a acestora.
 - 2.1. **Valorile pH-ului** au fost cuprinse între 5.96 la Protofil și 7.12 la extractul metanolic de urzică uscată și între 6.05 la infuzia de cimbru și 8.27 la cea de urzică uscată.
 - 2.2. **Polifenolii totali** (exprimați în mg GAE/100 g SU) au prezentat valori cuprinse între 310 mg GAE/100 g SU la infuzia de urzică proaspătă și 570 mg GAE/100 g SU la infuzia de *Echinacea*, iar în ceea ce privește extractele metanolice valorile au fost cuprinse între 33 mg GAE/100 g SU la cel de ceapă și 576 mg GAE/100 g SU la Protofil.
 - 2.3. Infuzia de cimbru a prezentat cel mai mic conținut de **flavonoide totale**, respectiv 123 mg QE/100 g SU, cel mai ridicat conținut fiind înregistrat la urzică uscată, acesta fiind de 482 mg QE/100 g SU. În extractele metanolice conținutul de flavonoide totale este mai scăzut, valori de 4 mg QE/100 g SU obținându-se la extractul de ceapă și de 183 mg QE/100 g SU la cel de *Echinacea*.

- 2.4. Testele de evidențiere a **monozaharidelor** (testul Barfoed) au confirmat prezența acestora în toate plantele analizate, iar cele de evidențiere a **cetozelor și aldozelor** (testul Selivanoff) au confirmat prezența zaharozei și respectiv a maltozei și trehalozei. Conform analizei HPLC efectuate asupra extractelor de plante, cele mai ridicate cantități de glucoză și fructoză se găsesc în frunzele de *Echinacea*.
- 2.5. Metoda Bradford pentru determinarea **conținutului total de proteine** a relevat cantități nesemnificative de proteine în extractele analizate, iar metoda de cromatografie în strat subțire (TLC) pentru **evidențierea pigmentilor clorofilieni și carotenoidici** a confirmat prezența beta-carotenului, clorofilei a și b și a xantofilelor în aceste plante.
- 2.6. În ceea ce privește **activitatea antioxidantă (% de inhibiție)** valorile sunt foarte diferite: extractul metanolic de usturoi a prezentat o valoare de numai 20.98%, pe când sucul proaspăt de usturoi are un procent de inhibiție a radicalilor liberi de 95.10%. Extractele metanolice de urzică și de cimbru prezintă valori apropiate, de 74.59 și respectiv de 74.13%. În cazul infuziilor studiate cea mai mică valoare a procentului de inhibiție se înregistrează la cimbru (50.70%), pe când cea mai ridicată activitate antioxidantă o reprezintă infuzia de *Echinacea* (75.47%).
3. **Determinările din câmp** au fost efectuate pe perioada a 4 ani, constituindu-se loturi experimentale și loturi martor după cum urmează: în anul 2005 a fost studiat efectul infuziei de urzică, a Protofilului și a sucului proaspăt de ceapă și usturoi asupra familiilor ieșite de la iernat, care se pregătesc pentru culesul de primăvară. În anul 2006 a fost studiat efectul aceluiași supliment pe roi artificiali, iar în anul 2007 a fost studiat efectul suplimentelor de mai sus pe familii slabite artificial, prin îndepărtarea a $\frac{3}{4}$ din populația de albine cu ramele aferente. În anul 2008 s-a studiat efectul infuziei de cimbru, *Echinacea*, a seleniului și a amestecului de seleniu și *Echinacea* asupra familiilor ieșite de la iernat, asupra roilor artificiali și asupra familiilor slăbite artificial.
4. **În anul experimental 2005** au fost testate efectul urzicii, a Protofilului, a cepei și a usturoiului asupra familiilor de albine după perioada de iernare și începerea culesului de primăvară. Caracteristicile urmărite pentru aceste familii au fost numărul intervale ocupate cu albine, suprafața de puiet (dm²) și suprafața de faguri cu miere (dm²).
- 4.1. **Numărul de intervale ocupate cu albine** pe întreg experimentul: Protofil: creștere cu 3.45 intervale (51.81%) față de lotul martor; Urzica: creștere cu 0,89 intervale (13.37%) față de lotul martor; Ceapa și usturoi: creștere cu 0.56 intervale (8.41%) față de lotul martor
- 4.2. **Suprafața de puiet** pe întreg experimentul: Protofil: creștere cu 13 dm² (17.57%) față de lotul martor; Ceapa: creștere cu 1.88 dm² (2.54%) față de lotul martor; Usturoiul: creștere cu 1.22 dm² (1.65%) față de lotul martor; Urzica: creștere cu 0.66 dm² (0.9%) față de lotul martor
- 4.3. **Suprafața de faguri cu miere** pe întreg experimentul: Protofil: creștere cu 5.62 dm² (18.2%) față de lotul martor; Urzica: creștere cu 1.22 dm² (3.95%) față de lotul martor; Ceapa: scădere cu 4.43 dm² (14.34%) față de lotul martor; Usturoiul: scădere cu 6.23 dm² (20.16%) față de lotul martor
5. **În anul experimental 2006** au fost testate efectul urzicii, a Protofilului, a sucului proaspăt de ceapă și usturoi asupra roilor artificiali. Caracteristicile urmărite la

lotul experimental format din roi artificiali au fost suprafața de puie necăpăcit (dm^2), suprafața de puie căpăcit (dm^2) și suprafața totală de puie (dm^2).

- 5.1. **Suprafața de puie necăpăcit;** Usturoi: 4.67 dm^2 creștere înregistrată după o lună de la încheierea hrănirii suplimentare; Ceapa: 3.5 dm^2 creștere înregistrată după aproximativ o lună de la încheierea hrănirii suplimentare; Pe toată durata experimentului s-au înregistrat scăderi ale suprafeței de puie necăpăcit (involuție) la martor și urzică
- 5.2. **Suprafața de puie căpăcit;** Urzică: creștere cu 4.51 dm^2 (22.19%) față de martor; Pe toată durata experimentului au fost înregistrate scăderi față de lotul martor la: Ceapă ($-9 \text{ dm}^2 - 44.27\%$); Protofil ($-10.33 \text{ dm}^2 - 50.81\%$) și Usturoi ($-14.33 \text{ dm}^2 - 70.48\%$)
- 5.3. **Suprafața totală de puie;** Urzică: creștere cu 4.17 dm^2 (62.62%), față de martor; Pe toată durata experimentului au fost înregistrate scăderi față de lotul martor la: Usturoi ($-0.99 \text{ dm}^2 - 14.86\%$); Ceapă ($-1.66 \text{ dm}^2 - 24.92\%$) și Protofil ($-2.66 \text{ dm}^2 - 39.94\%$)
6. **În anul experimental 2007** au fost testate efectul urzicii, a Protofilului, a sucului proaspăt de ceapă și usturoi asupra familiilor de albine slăbite artificial prin eliminarea a $\frac{3}{4}$ din populația existentă inițial. Caracteristicile urmărite la loturile experimentale format din familii de albine slăbite artificial și la lotul martor au fost suprafața de puie necăpăcit (dm^2), suprafața de puie căpăcit (dm^2) și suprafața totală de puie.
 - 6.1. **Suprafața de puie necăpăcit;** Urzică: creștere cu 10.8 dm^2 (900%) față de martor; Ceapa: creștere cu 4.6 dm^2 (383.3%) față de martor; Protofilul: creștere cu 0.4 dm^2 (33.3%) față de martor; Usturoi: 0
 - 6.2. **Suprafața de puie căpăcit;** Urzică: creștere cu 21.8 dm^2 (121.1%) față de martor; Protofil: creștere cu 18.6 dm^2 (103.3%) față de martor; Usturoi: creștere de 17 dm^2 (94.4%) față de martor; Ceapă: creștere cu 8.4 dm^2 (46.6%) față de martor
 - 6.3. **Suprafața totală de puie;** Urzică: creștere cu 33.4 dm^2 (173.9%) față de martor; Protofil: creștere cu 19 dm^2 (98.9%) față de martor; Usturoi: creștere de 15.8 dm^2 (82.3%) față de martor; Ceapă: creștere cu 13 dm^2 (67.7%) față de martor
7. **În anul experimental 2008** a fost testat efectul cimbrului, a *Echinaceei*, a seleniului și a amestecului de seleniu și *Echinaceea* asupra familiilor de albine după perioada de iernare și începere a culesului de primăvară, asupra roilor artificiali și asupra familiilor de albine slăbite artificial. **(De v tab.final 7.5.1.eu)**
 - 7.1. În cazul **familiilor de albine** după perioada de iernare și începere a culesului de primăvară caracteristicile urmărite au fost numărul de intervale ocupate cu albine, suprafața totală de puie și suprafața totală de faguri cu miere.
 - **Familii ieșite de la iernare**
 - **Numărul de intervale ocupate cu albine** pe întreg experimentul: Seleniu: creștere cu 1.4 intervale (58.34%) față de martor; Cimbru: creștere cu 0.8 intervale (33.34%) față de martor; Seleniu+Echinacea: creștere cu 0.8 intervale (33.34%) față de martor; Echinacea: creștere cu 0.6 intervale (25%) față de martor
 - **Suprafața de puie** pe întreg experimentul: Echinacea: creștere cu 10.6 dm^2 (25.37%) față de martor; Seleniu+Echinacea: creștere cu $7,4 \text{ dm}^2$ (17.63%)

- față de martor; Seleniu: creștere cu 5.4 dm² (12.86%) față de martor; Cimbru: creștere cu 1.8 dm² (4.29%) față de martor
- **Suprafața de faguri cu miere** pe întreg experimentul: Seleniu: creștere 18,4 dm² (47.92%) față de martor; Cimbru: creștere cu 14.6 dm² (38.02%) față de martor; *Echinacea*: 14.2 dm² (36.98%) față de martor; Seleniu+*Echinacea*: 9.6 dm² (25%) față de martor
 - **Roi artificiali**
 - **Suprafață de puiet necăpăcit**; Pe toată durata experimentului au fost înregistrate scăderi față de lotul martor la: Seleniu (-64 dm²); *Echinacea* (-67 dm²); Seleniu+*Echinacea* (-67 dm²); Cimbru (-76 dm²);
 - **Suprafață de puiet căpăcit**: Cimbru: creștere cu 3 dm² (12.2%) față de lotul martor; Seleniu: creștere cu 2.2 dm² (8.95%) față de lotul martor; Seleniu+*Echinacea*; creștere cu 2 dm² (8,13%) față de lotul martor; *Echinacea*; creștere cu 0.8 dm² (3.26%) față de lotul martor
 - **Suprafață totală de puiet**; Seleniu: creștere cu 6.2 dm² (119.23%) față de lotul martor; Seleniu+*Echinacea*: creștere cu 5.2 dm² (100%) față de lotul martor; Cimbru: creștere cu 3.6 dm² (69.23%) față de lotul martor; *Echinacea*: creștere cu 3.6 dm² (69.23%) față de lotul martor
 - **Familii de albine slăbite artificial**
 - **Suprafață de puiet necăpăcit**: Seleniu: creștere cu 8.7 dm² (145%) față de lotul martor; Seleniu+*Echinacea*: creștere cu 3.7 dm² (61.67%) față de lotul martor; Pe toată durata experimentului au fost înregistrate scăderi față de lotul martor la: Cimbru (-3.8 dm²); *Echinacea* (-3.8 dm²) față de lotul martor
 - **Suprafață de puiet căpăcit**: *Echinacea*: creștere cu 23.7 dm² (24.95%) față de lotul martor; Cimbru: creștere cu 16.1 dm² (16.67%) față de lotul martor; Seleniu+*Echinacea*: creștere cu 2.9 dm² (3.06%) față de lotul martor; Seleniu: scădere cu 5.5 dm² (scădere cu 5.79%) față de lotul martor
 - **Suprafață totală de puiet**: *Echinacea*: creștere cu 24 dm² (29.27%) față de lotul martor; Cimbru: creștere cu 22 dm² (26.83%) față de lotul martor; Seleniu+*Echinacea*: creștere cu 17 dm² (20.73%) față de lotul martor; Seleniu: creștere cu 16.9 dm² (20.6%) față de lotul martor

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Anciuți, M.A, Rutz F, da Silva L. A., Cosenza R. C., Cosenza R. G. (2004) – Effect of dietary inorganic by organic selenium (Sel-plex) on performance of broilers, Proceedings of the 20th Annual Alltech Symposium Re-immaging the Feed Industry, Kentucky, USA, suppl. 11, p.14.
2. Arruda, J. S., Rutz, F., and Pan, E.A., (2004), Influence of replacing dietary inorganic with organic selenium (Sel-plex) on performance of broilers, Proceedings of the 20th Annual Alltech Symposium Re-immaging the Feed Industry, Kentucky, USA, suppl. 11, p. 13.
3. Bura, M., (1997) – Creșterea intensivă a albinelor, Ed. Helicon, Timișoara.
4. Chioveanu, G., Ionescu D., Mardare A., (2004), Control of nosemosis – the treatment with „Protofil”, *Apiacta* 39, p. 31 – 38.
5. Hristea, C.L., (1976) – Stupăritul nou, Redacția Revistelor Apicole, București.
6. Kim, Dae-Ok, S. W. Jeong, C. Y. Lee, (2003), Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chem.*, 81, p. 321-326.
7. Lazăr, Stefan, (2003) – Morfologia și tehnica creșterii albinelor, Editura „Terra nostra”, Iași
8. Marin, M., (1994) – Viața și sănătatea albinelor, *Revista România apicolă*, 3, București, p. 3.
9. Mărghitaș, L. (2002) – Albinele și produsele lor, Ed. Ceres, București.

10. Mărghitaș, L. (2005) – Albinele și produsele lor, Ed. Ceres, București.
11. Ogradă, I. (1986) – Bolile și dăunătorii albinelor, Redacția Crescătorilor de Albine din Republica Socialistă România, București.
12. Ritter, Wolfgang, (2000) – Bolile albinelor, M.A.S.T., ©1994 Verlag Eugen UlmerStuttgart, Germany.
13. Shimanuki, H., (1990) – Bacteria. Honey Bee Pests, Predators and Diseases, 2nd edition, Morse, R.A., Nowogrodzki, R., (eds). Cornell University Press, USA, p. 27-47.
14. Singleton V.L., Rossi, J.A., (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, vol. 16, p. 144-158.
15. Sharma S.C., Anand S.M., (2006), Role of selenium supplementation and heat stress of trehalose and glutathione content in *Saccharomyces cerevisiae*, Applied biochemistry and Biotechnology, 133 (1), p. 1 - 7.
16. Surai, P.F., Karadas, F., Pappas, A.C., Dvorska, J. E. (2004) – Selenium distribution in the eggs of ISA brown commercial layers, Proceedings of the 20th Annual Alltech Symposium Reimagining the Feed Industry Kentuchcky, USA, suppl. 11, p. 17.
17. Șara, A., Sasca L., Maieran P. (2004) – Efectele utilizării mineralelor organice în nutriția animalelor, Bulletin USAMVCN, seia ZB, vol. 60, p. 100 – 103.
18. Șara, A., Antonia Odagiu, Mariana Dinea, S. Dărăban, (2005) – Research concerning the influence of organic selenium (Sel-plex) on production in broiler chickens, Proceedings of the XL Croatian Symposium on Agriculture 16-19 February 2005, Opatija.
19. Tanada, Y., H. K. Kaya (eds) (1993) – Insect Pathology. Academic press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers
20. www.beehoo.com
21. www.beekeeping.com
22. www.betterbee.com
23. www.nutritiondata.com
24. Colecția Revistei România Apicolă.

UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY
MEDICINE CLUJ-NAPOCA
DOCTORAL SCHOOL
ANIMAL HUSBANDRY AND BIOTECHNOLOGY FACULTY
BEEKEEPING AND SERICICULTURE DEPARTMENT

Eng. TOFALVI MELINDA

SUMMARY OF PhD THESIS

**BIOSTIMULATING EFFECT OF SOME
PLANT EXTRACTS UPON BEE FAMILIES
DEVELOPMENT**

**Scientific coordinator:
Prof. dr. ing. Liviu Al. Mărghițaș**

**CLUJ-NAPOCA
2009**

CONTENTS

| | PhD page | Summary page |
|---|-------------|-----------------|
| PREFACE | 4 | |
| INTRODUCTION | 13 | |
| OBJECTIVES OF RESEARCH | 14 | |
| CHAPTER 1. THE IMPORTANCE AND THE UP-TO-DATE SITUATION OF BEEKEEPING WORLDWIDE AND IN ROMANIA | 16 | 38 |
| CHAPTER 2. THE BIOLOGY OF BEE COLONIES | 19 | 38 |
| <i>2.1. THE ZOOLOGICAL SYSTEMATIC OF MELLIFEROUS BEES</i> | 19 | 38 |
| <i>2.2. THE BEE COLONY COMPONENCE</i> | 20 | 39 |
| 2.2.1. The queen | 20 | |
| 2.2.2. The drones | 23 | |
| 2.2.3. Worker bees | 25 | |
| <i>2.3. NUTRITIONAL RELATIONSHIPS IN BEE COLONIES</i> | | 39 |
| <i>2.4. THE FEEDING IMPLICATIONS ON BEE'S METABOLISM</i> | | 39 |
| <i>2.5. GENERAL ASPECTS OF BEE PATHOLOGY</i> | | 40 |
| CHAPTER 3. GENERAL ASPECTS REGARDING THE BEE BREEDING TECHNOLOGIES | 35 | 40 |
| CHAPTER 4. THE PRESENT STAGE OF THE RESEARCH REGARDING THE BEE FEEDING AND BIOSTIMULATOR ADMINISTRATION IN SUPPLEMENTARY FEEDING | 38 | 41 |
| <i>4.1. COMPONENTS OF BEE FEEDING</i> | 38 | 41 |
| 4.1.1. Nectar | 38 | |
| 4.1.2. Pollen | 39 | |
| 4.1.4. Honey | 46 | |
| 4.1.5. Honeydew | 50 | |
| 4.1.6. Water | 51 | |
| <i>4.2. ADMINISTRATION OF SUPPLEMENTARY FOOD IN BEE FEEDING</i> | 53 | 41 |
| 4.2.1. Additional feeding | 54 | |
| 4.2.2. Stimulation feeding | 56 | |
| <i>4.3. FEEDING INFLUENCE ON BEE COLONIES DEVELOPMENT AND HEALTH</i> | 59 | 42 |
| <i>4.4. USE OF SUGAR SYRUP IN SUPPLEMENTARY FEEDING OF BEES</i> | 62 | 42 |
| <i>4.5. PROTIFIL</i> | 63 | 42 |
| <i>4.6. ROLE OF MICROELEMENTS IN LIVING ORGANISMS: SELENIUM</i> | 64 | 43 |
| <i>4.7. USE OF MEDICINAL HERBS IN SUPPLEMENTARY FEEDING OF BEES</i> | 65 | 43 |

| | | |
|---|------------|-----------|
| 4.7.1. Nettle | 67 | |
| 4.7.2. Onion | 71 | |
| 4.7.3. Garlic | 73 | |
| 4.7.4. Thyme | 75 | |
| 4.7.5. Echinacea | 77 | |
| CHAPTER 5. MATERIALS AND METHODS FOR FIELD TESTING OF BIOSTIMULATOR EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS ADMINSTRATED IN BEE FEEDING | 79 | 44 |
| <i>5.1. BIOLOGICAL MATERIAL</i> | 79 | 44 |
| <i>5.2. METHODS USED</i> | 80 | 44 |
| CHAPTER 6. MATHERIALS AND METHODS FOR LABORATORY TESTING | 86 | 46 |
| <i>6.1. PLANTS AND METHODS USED FOR LABORATORY TESTING</i> | 86 | 46 |
| <i>6.2. MATERIAL AND METHODS REGARDING THE EVALUATION OF TESTED PLANT COMPOSITION AND PROPERTIES</i> | 88 | 47 |
| CHAPTER 7. RESULTS AND DISCUSSIONS | 97 | 48 |
| <i>7.1. RESULTS OBTAINED AFTER LABORATORY DETERMINATIONS ON PLANTS</i> | 97 | 48 |
| <i>7.2.RESULTS OBTAINED IN EXPERIMENTAL YEAR 2005 REGARDING THE EFFECT OF NETTLE, PROTOFIL, ONION AND GARLIC ON BEE COLONIES AFTER WINTERING PERIOD AND THEIR PREAPRATION FOR SPRING HARVESTING</i> | 112 | 50 |
| 7.2.1. Evolution of control group colonies fed with sugar cake and syrup | 112 | |
| 7.2.2. Evolution of bee colonies fed with nettle added in sugar cake and syrup | 116 | |
| 7.2.3. Evolution of bee colonies fed with Protofil added in sugar cake and syrup | 120 | |
| 7.2.4. Evolution of bee colonies fed with onion added in sugar cake and syrup | 125 | |
| 7.2.5. Evolution of bee colonies fed with garlic in supplementary food | 129 | |
| 7.2.6. Influence of supplements used in bee colonies feeding in 2005 upon efective growth for pursued parameters for bee colonies after wintering period | 134 | |
| <i>7.3. RESULTS OBTAINED IN EXPERIMENTAL YEAR 2005 REGARDING THE EFFECT OF NETTLE, PROTOFIL, ONION AND GARLIC ON ARTIFICIAL SWARMS</i> | 138 | 51 |
| 7.3.1. Evolution of artificial swarms from control group fed with sugar syrup | 138 | |
| 7.3.2. Evolution of artificial swarms fed with nettle added in sugar syrup | 141 | |

| | | |
|---|------------|-----------|
| 7.3.3. Evolution of artificial swarms fed with Protofil added in sugar syrup | 145 | |
| 7.3.4. Evolution of artificial swarms fed with onion added in sugar syrup | 149 | |
| 7.3.5. Evolution of artificial swarms fed with garlic added in sugar syrup | 153 | |
| 7.3.6. Influence of supplements used in bee colonies feeding in 2006 upon effective growth for pursued parameters in artificial swarms | 158 | |
| <i>7.4. RESULTS OBTAIN IN EXPERIMENTAL YEAR 2007 REGARDING THE EFFECTS OF NETTLE, PROTOFIL, ONION AND GARLIC ON BEE COLONIES ARTIFICIALLY WEAKEN</i> | 162 | 52 |
| 7.4.1. Evolution of weaken bee colonies fed with sugar syrup | 163 | |
| 7.4.2. Evolution of weaken bee colonies from experimental group, fed with sugar syrup and nettle | 164 | |
| 7.4.3. Evolution of weaken bee colonies from experimental group, fed with sugar syrup and Protofil | 168 | |
| 7.4.4. Evolution of weaken bee colonies from experimental group, fed with sugar syrup and onion | 171 | |
| 7.4.5. Evolution of weaken bee colonies from experimental group, fed with sugar syrup and garlic | 174 | |
| 7.4.6. Influence of supplements used in bee colonies feeding in 2007 upon effective growth for pursued parameters in artificially weaken families | 177 | |
| <i>7.5. RESULTS OBTAIN IN EXPERIMENTAL YEAR 2008 REGARDING THE EFFECTS OF THYME, ECHINACEA, SELENIUM AND SELENIUM AND ECHINACEA MIXTURE ON BEE COLONIES</i> | 180 | 53 |
| 7.5.1. Results obtained on bee colonies after wintering period and preparation for spring harvesting | 180 | 53 |
| <i>7.5.1.1. Evolution of bee colonies from control group fed with sugar cake and syrup</i> | 182 | |
| <i>7.5.1.2. Evolution of bee colonies fed with thyme added in sugar cake and syrup</i> | 183 | |
| <i>7.5.1.3. Evolution of bee colonies fed with Echinacea added in sugar cake and syrup</i> | 187 | |
| <i>7.5.1.4. Evolution of bee colonies fed with selenium added in sugar cake and syrup</i> | 191 | |
| <i>7.5.1.5. Evolution of bee colonies fed with selenium and Echinacea added in sugar cake and syrup</i> | 195 | |
| <i>7.5.1.6. Influence of supplements used in bee colonies feeding in 2007 upon effective growth for pursued parameters in artificially weaken families</i> | 199 | |
| 7.5.2. Results obtained at artificial swarms | 202 | 54 |
| <i>7.5.2.1. Evolution of artificial swarms fed with sugar syrup</i> | 204 | |
| <i>7.5.2.2. Evolution of artificial swarms fed with thyme</i> | 206 | |

| | | |
|---|------------|-----------|
| <i>added in sugar syrup</i> | | |
| <i>7.5.2.3. Evolution of artificial swarms fed with Echinacea added in sugar syrup</i> | 210 | |
| <i>7.5.2.4. Evolution of artificial swarms fed with selenium added in sugar syrup</i> | 213 | |
| <i>7.5.2.5. Evolution of artificial swarms fed with selenium and Echinacea added in sugar syrup</i> | 217 | |
| <i>7.5.2.6. Influence of supplements used in bee colonies feeding in 2008 upon effective growth for pursued parameters in artificial swarms</i> | 222 | |
| 7.5.3. Results obtained at artificially weaken bee colonies | 225 | 55 |
| <i>7.5.3.1. Evolution of artificially weaken colonies fed with sugar syrup</i> | 225 | |
| <i>7.5.3.2. Evolution of weaken bee colonies fed with thyme added in supplementary food</i> | 227 | |
| <i>7.5.3.3. Evolution of weaken bee colonies from experimental group fed with Echinacea added in supplementary food</i> | 231 | |
| <i>7.5.3.4. Evolution of weaken bee colonies from experimental group fed with selenium added in supplementary food</i> | 235 | |
| <i>7.5.3.5. Evolution of weaken bee colonies fed with selenium and Echinacea added in supplementary food</i> | 238 | |
| <i>7.5.3.6. Influence of supplements used in bee colonies feeding in 2008 upon effective growth for pursued parameters in weaken bee colonies</i> | 242 | |
| CONCLUSIONS | 244 | 55 |
| REFERENCES | 250 | 59 |
| ABBREVIATION AND ACRONIM LIST | 260 | |

RESEARCH OBJECTIVES

The main objective of the research from this thesis is to **establish the effect of some plant infusions and extracts on honeybee colonies from different physiological stages.**

Regarding the main objective, following actions were made:

- ❖ Experimental lots establishment, carefully following an uniform distribution of the colonies considering their force;
- ❖ Alcoholic and aqueous extracts testing from plants used as supplements;
- ❖ Measurements before supplementary food administration;
- ❖ Cake and sugar syrup administration with supplements;
- ❖ Measurements on well established time intervals.

In honeybees supplementary feeding as sugar syrup and cake, were added: *fresh and dry nettle infusions, Echinacea infusion, thyme infusion, fresh onion and garlic juices, selenium as microelement, Echinacea and selenium mixture*, and also Protofil, which is a medicinal plants extract enriched with minerals and vitamins, used by beekeepers against *Nosema* and for spring stimulation.

During the experiments (2005-2008) were created and observed lots formed out of *honeybee colonies after wintering period, artificial swarms and artificial weaken colonies by eliminating a ¾ of the population*. All supplements were tested on these three categories of experimental lots.

The main followed characters were *honeybee interval numbers, brood surface (uncapped brood, capped brood and total brood surface) and honeycombs surface*.

The thesis is structured in the following parts: introduction, objectives, literature study, personal research, conclusions and bibliography.

The general part: literature study, contains 4 chapters (I-IV), and describes the importance of beekeeping and current situation on national and international level, notions about honeybee biology and colony structure, aspects regarding beekeeping and feeding and also nutritive supplements administration.

Personal research part is structured in 3 chapters (V-VII), containing biological material and used plants (V), methods used for extracts and infusions composition determinations (VI) and also results of the field testing done on different development honeybee colony stages (VII).

CHAPTER 1

THE IMPORTANCE AND THE UP-TO-DATE SITUATION OF BEEKEEPING WORLDWIDE AND IN ROMANIA

Beekeeping is an important discipline of agriculture, which studies the honeybee biology and beekeeping, aiming to obtain bee products and to increase the agricultural plant seed production as a result of pollination by melliferous honeybees.

Melliferous honeybee possesses specific biological particularities and offers important alimentary and therapeutic products: honey, wax, pollen, beebread, royal jelly, propolis and bee venom. As a result of plant pollination, honeybees ensure an increased production and a high quality of bee products.

Regarding the continental classification, Europe produces 30% from the total honey quantity obtained in the world, although the member countries of European Union succeed to obtain 10% of this. Europe is followed by Asia (28.3% from total honey production) and United States (25%).

On national level, permanent fluctuations were registered regarding honeybee colonies effective, mainly due to the evolution of melliferous base, beekeepers perception and professionalism and socio-economical conditions within the production areas. In 1989 there were 1.41 millions of honeybee colonies, after 1990 up to 2000 this effective has dropped out a lot and afterwards was registered a slight increase.

In 1989 was registered a production of 12.12 thousand honey tones, the average production per colony being 8.5 kg; in 2000 honey production has slightly increased and in 2004 a maximum value of 23.71 honey tones was achieved. Latest data regarding 2007 show a national production of 14.7 thousand honey tones, with an average production of 13.9 kg/colony (National Institute of Statistics; www.insse.ro). The same source shows that in that last 10 years, Romanian honey export ranged between 5 and 10 thousand tones, the main receiver countries being Germany, England, France and Italy.

❖ CHAPTER 2

THE BIOLOGY OF BEE COLONIES

❖ 2.1. ***THE ZOOLOGICAL SYSTEMATIC OF MELLIFEROUS BEES***

Melliferous honeybees:

Animal kingdom: *Animalia* (unicellular and pluricellular organisms with specific feeding based on vegetal kingdom).

Subkingdom: *Invertebrate* (animals without backbone and internal bone skeleton)

Phylum: *Artropode* (invertebrates with articulate legs).

Subphylum: *Mandibulate* (arthropod with mandible).

Class: *Insect* (arthropod with 3 distinguished body parts: had, abdomen and thorax).

Subclass: *Pterigota* (insects which presents on the 2nd and 3rd thoracic segment pairs of wings).

Order: *Apocrita* (hymenoptera: the bond between thorax and abdomen is made by a thin portion called petiole).

Over family: *Apoidae* (insects which feed their progeny with pollen and floral nectar).

Family: *Apidae*.

Subfamily: *Apinae*.

Tribe: *Apini*

Genus: *Aphis* (honeybees which live in permanent colonies, with one reproductive queen able to perpetuate, and having a hairy body).

❖ 2.2. *THE BEE COLONY COMPONENTS*

Honeybees are social insects from *Aphis mellifera* specie, being part of *Hymenoptera* (insects with membranous wings). They live in colonies of 30000-50000 individuals. Worker bees, drones and queen form honeybee colony. As individuals they cannot survive, each caste being described as follows.

2.3. *NUTRITIONAL RELATIONSHIPS IN BEE COLONIES*

Worker bees, the queen and the drones creating the biological integrity of the colony make the intense food exchange. Regarding nutrition, honeybees touch each other using the antennas, which are in continuous movement. One honeybee may be a food donator or receiver. The donator honeybee opens the mandibles and by an easy movement of proboscis, brings the feed between the mandibles and the receiver honeybee inserts the proboscis and sucks up the feed (Mărghitaş, 2002).

The strongest stimulus that participates to accomplish the nutritional contacts is the smell of the body and the contact between antennas. When the partners are from the same colony, stimulation is much more intense. Nutritional relations between honeybees are being developed from an early age.

Worker bees exchange the food various times, regardless the age and depending on the colony health and external conditions. These food exchanges are more frequent during spring and not very frequent during autumn. Older bees are usually the donator and the young ones the receiver.

2.4. *THE FEEDING IMPLICATIONS ON BEE'S METABOLISM*

Alimentary substances ingested by honeybee suffer metabolic modifications. These metabolic processes are much more intense within weaken colonies and more diminished within the strong ones. Metabolism is much more intense during autumn in order to produce heat in weaken colonies, thing that leads to a shorter honeybee life. A superior honey quality has a positive influence on metabolism regardless of the colony size.

Metabolic processes have different effects: plastic, adjustment and energetic. Plastic effect is expressed by metabolic products participation in order to form the substances and the cells and their growth. A differential metabolism is the result of differential food received by the three larvae caste. Adjustment effects overcome on substances from honeybee body and exercise regulation of different functions. Chemical reactions on tissue level determine energetic effects by caloric energy release.

The intensity of the metabolic processes is regulated by the transformation of sugar in fats or proteins, and on the other hand by an enzyme synthesis.

Cellular metabolism is about all the substances which occur during honeybee nutrition: glucose, lipids, proteins, mineral substances and water.

2.5. GENERAL ASPECTS OF BEE PATHOLOGY

Diseases may affect honeybee populations, because honeybees can only live in colonies (**Tanada, 1993**). Honeybee, as individual is only a part of the organism functionality. This thing should be considered in order to prevent diseases that occur in the colonies. Environment and maintenance conditions have a special importance, due to the fact that honeybees are being affected by factorial diseases, which occurrence are mainly due to these conditions. Treatments and other chemical therapeutic remedies must be applied only in special cases, because bee products are very sensitive. Usually, giving up treatment requires an important time consume. An alternative for beekeepers is to diminish the population effective (**Ritter, 2000**).

Most honeybee diseases are caused by different organisms, which grow inside or outside the body and feed themselves on honeybee expense that causes anatomic-pathological injuries and functional discomfort that leads to death. In medical language, these are called pathogens, ethological agents or causal agent (**Ograda, 1986**; www.beehoo.com; www.beekeeping.com; www.betterbee.com). American foulbrood, European foulbrood and septicaemia are caused by bacteria (**bacterial diseases**), paralysis, black disease are caused by viruses (**viral infections**) (**Bura, 1997**; **Shimanuki, 1990**; **Mărghitaș, 2002**).

CHAPTER 3

ASPECTE GENERALE PRIVIND TEHNOLOGIILE DE CREȘTERE ALE ALBINELOR

In our country, beekeeping is one of the most ancient professions and was developed in natural friendly conditions provided by the geographical orientation, climate, relief and vegetation, which determined the development of honeybee colonies.

Due to natural conditions, modified by practicing agriculture and chemicals, beekeeping requires special technologies, which subscribe on new coordinates, highly important determined by the necessity to offer conditions that the nature does not offer anymore.

In the present, by special technologies the beekeeper may prepare the colony for the spring exploitation, maintenance of an active state during summer, young honeybees' growth. The beekeeper may also ensure quality food preserves during autumn for a good wintering. All of these stages are important regarding beekeeping with the purpose of superior exploitation of melliferous resources from the spontaneous and cultivated flora.

Another important factor in achieving a high honey production is the maintenance of the colonies in hives with adjustable volume to allow the development of strong biological organizations with enough space for the nectar stock.

CHAPTER 4

THE PRESENT STAGE OF THE RESEARCH REGARDING THE BEE FEEDING AND BIOSTIMULATOR ADMINISTRATION IN SUPPLEMENTARY FEEDING

4.1. COMPONENTS OF BEE FEEDING

Food grabbing, a simple action for every human has become a thing with a rare complexity for social insects.

Domesticated honeybee, a vegetarian insect is not an exception of this rule. From nectar harvesting up to honey production and pollen transformation, a number of important transformations determine the alimentary act to be a complex one.

Uncertainty begins from nectar harvesting and its mixture with glandular enzymes in order to obtain sugars. The four substances harvested by honeybees are: nectar, pollen, propolis and water.

Nectar is a sweet complex product, produced by plants. Normally it is produced by flowers secretion, even though some plants have nectar on leaves and stem.

Pollen is the unique protein source for honeybees. It is harvested orally, mixed with regurgitated honey and taken over with bee legs and transported as little spheric balls in corbicula's.

Honey is the only energy source for honeybees. The main component of honey are the sugars, 80%±5%, which give the organism the necessary energy and also having an important structural role to form the cellular membranes, conjunctive tissue, hormones and antibodies.

Except nectar, honeybees harvest also sweet secretions of some parasites that feed themselves with plant sap, resulting **honeydew honey**. Honeydew honey is extremely noxious for honeybee feeding during winter by causing diarrhea and death (**Mărghitaș, 2002**).

Water, is an important food component, being indispensable to life. Honeybee body contains 75-80% water, and haemolymph has 90% water content.

Water has an important physiological role, by participating to royal jelly production (40-60 g/day) and regulating the temperature inside the hive during summer (200 g/day) (**Mărghitaș, 2002**).

4.2. ADMINISTRATION OF SUPPLEMENTARY FOOD IN BEE FEEDING

Honeybee supplementary feeding:

1. Supplementary feeding
2. Stimulation feeding: energetic, protein, energetic-protein.
3. Train feeding
4. Treatment feeding

Supplementary feeding may be done by reserve honeycombs or by sugar syrup in a 1:1 concentration.

Stimulation feeding has the role to supplement harvesting when is missing, ensuring a continuous activity for the colony. The important thing is to create the feeling of permanent harvesting source.

4.3. FEEDING INFLUENCE ON BEE COLONIES DEVELOPMENT AND HEALTH

Worker bee coming out of the cell as an insect is incompletely developed. It will have to consume pollen during six-nine days in order to complete growing and to develop the glandular system. By feeding, the body weight and total nitrogen content is increasing. Young worker bees lack of pollen will only live a short period of time and are not capable of royal jelly secretion. Worker bee, that becomes a harvesting bee has more diminished needs of nitrogen food and will consume more honey or nectar, giving up pollen.

Not every sort of pollen has the same alimentary value to bees. There are good and bad sorts of pollen with different composition especially regarding protein content. So far the alimentary needs of the colony are not known and even the best artificial diets were not able to substitute the pollen during long periods.

Has to be noticed the fact that there are some plants, few in our flora, which have toxic pollen for honeybees in large amounts. It has to be also noticed that honeybees do not harvest pollen more or less dangerous for themselves except when there is a lack of food. Honeybee is very different from other animals, it selects very precise the food. By studying these selections we will be able to know better the alimentary needs of the colonies.

4.4. THE USE OF SUGAR SYRUP IN SUPPLEMENTARY FEEDING OF BEES

The most efficient stimulative feeding is the administration of 800-1000 ml syrup 1:1 weekly for each colony, method that ensures the increasing of brood with 19.5%. Daily administration of smaller doses of syrup (100-200ml) was proved to be less effective, because the brood quantity only increases with 13%, even though uncapping 1dm² of honey comb every 2-3 days gives good results, the method is not applicable in practice due to frequent interventions and also especially to stiling.

Sugar syrup 1:1 is made as follows: in an enamel pot a certain water quantity is being boiled. During boiling an equal amount of sugar is added and is being mixed continuously with a wood spoon until all the sugar is dissolved.

A special attention requires the caramelization of the syrup, which makes it unhealthy for honeybees. The formed foam has to be removed (**Hristea, 1976; Mărghitaș, 2002, 2005**).

4.5. PROTOFIL

Protofil is treatment product destined to treat *Nosema*, to stimulate honeybee colonies, which is developed by Research-Development Institute for beekeeping Bucharest. It is an exclusive plant extract.

It is a brown liquid, transparent, with characteristic smell and taste. It is delivered in plastic bottles of 1 kg and 500 grams. The bottles have to be kept in dark, dry spaces, at room temperature.

With the help of active constituents from plants, vitamins and microelements, that Protofil contains, it stimulates the digestive enzymatic secretion of honeybees and larvae, leading to a high level of food digestibility. It inhibits intestinal pathogen flora and stops in a great measure the evolution cycle of *Nosema apis*. Helps queens to increase laying eggs and increases the population.

Protofil has in his composition essential oils that contain cyclic and aliphatic carbohydrates, sesquiterpenes, triterpenes, phenolic compounds, oleanolic acid, flavonoids, microelements and vitamins from B category and ethylic acid (**Chioveanu, 2004**). Main plants form Protofil composition are: chamomile, tansy, pot marigold, St. John's worth, menthe, tilia, plantain, thyme, basil, mugwort, wild rose, box thorn, lemon juice, onion juice and garlic tincture.

4.6. *ROLE OF MICROELEMENTS IN LIVING ORGANISMS: SELENIUM*

Selenium is an essential microelement, which is the key component of different functional selenium-proteins.

In animal organism, selenium is found in small quantities 1-3ppm, the highest quantity being in liver, kidneys, heart and pancreas.

Selenium absorption is realized on intestinal level and the excretion is made by urine and breath out air. Selenium favorably intervenes in reproduction, growth rhythm, prevents exudative diathesis, necrosis and pancreas atrophy.

Selenium is also implicated in regularization of different enzymatic systems involved in energetic metabolism, spermatozoon functions and essential fatty acid functions, and organism immunity.

One of the most important functions of selenium in animal organisms is the oxidative role. Antioxidant activity is pointed out by the relations between selenium and vitamin E, present in cellular membranes with role in the defense cellular mechanisms against phospholipidic membrane per oxidation. Selenium, component of glutathion-peroxidation, acts through a secondary metabolism as a result of vitamin E incapacity to destroy metabolic peroxides. It also acts along with vitamin E to reduce cellular stress (**Sukesh and Anand, 2006**).

Organic selenium offers better results when administered in animal feeding than inorganic one. Selenium, along with iron, copper and zinc has an important nutritional effect, which was demonstrated by numerous studies (**Hess and col., 2003; Ancuti, 2004; Arruda and col., 2004; Surai and col., 2004**). In our country latest research regarding selenium action on animals were done by **Sara and col. (2004, 2005)**.

4.7. *USE OF MEDICINAL HERBS IN SUPPLEMENTARY FEEDING OF BEES*

Sometimes in honeybee supplementary feeding may be introduced medicinal plants with the purpose to prevent and treat diseases and also to stimulate the development of honeybee colonies. Regarding the effect that these plants have we may distinguish:

- **Plants with trophy action and general stimulation:** box thorn, wild rose, nettle, dandelion, blackberries, bramble, raspberry, wild strawberry, walnut;
- **Plants with antibacterial action:** garlic, onion, tansy, chamomile, tutsan, artichoke, mugwort, horsemint, tilia, horse tail;
- **Plants with astringent, disinfectant and stimulative actions on digestive apparatus:** mugwort, balm mint, tansy, horsemint, wild rose, dead nettle, oak, walnut, birch.

Medicament substances may be extracted from plants with the help of different solvents (water, alcohol, oil, vinegar) using several processes: infusion, maceration.

Used plants for the experiments were: nettle (*Urtica dioica*), onion (*Allium cepa*), garlic (*Allium sativum*), thyme (*Satureja hortensis*) and *Echinacea* (*Echinacea*). These plants were discussed along the thesis with regards to their chemical composition and nutritional and therapeutically properties (www.nutritiondata.com).

CHAPTER 5

MATERIALS AND METHODS FOR FIELD TESTING OF BIOSTIMULATOR EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS ADMINSTRATED IN BEE FEEDING

5.1. BIOLOGICAL MATERIAL

Tested plants for biostimulative effect are: nettle (*Urtica dioica*), onion (*Allium cepa*), garlic (*Allium sativum*), thyme (*Satureja hortensis*) and *Echinacea*.

These plants are used in human nutrition as infusions and/or alcoholic extracts, due to their high content in biological active constituents, responsible for antioxidant and antibacterial properties.

For field-testing, infusions, extracts and fresh juice were used.

Biological material used was honeybees *Apis mellifera carpatica*. These honeybees are characterized by moderate swarming, having a calm comportment on combs during controls (Mărghițaș, 2005).

Beekeeping farm where the experiments were done is in Harghita county, Corund and has a 250 colonies. 50 colonies are used for stationary beekeeping (also used for the experiments) and 200 colonies for migratory beekeeping. Vertical hives with frames STAS 435 x 300 cm are used.

5.2. METHODS USED

Experiments were developed in two different series during 4 years. First experimental series was during 3 years (2005-2008) and the second one was in 2008 (Table 1).

In the first experiment as supplementary feeding were used: nettle infusion, fresh onion and garlic juice and also Protofil.

Experiments were realized on colonies when coming out of wintering (2005), on artificial swarms (2006) and on artificial weaken honeybee colonies by elimination of a $\frac{3}{4}$ of the population (2007).

In 2008 experiment from previous years were repeated, by using nutritive supplements based on thyme infusion, *Echinacea* infusion, selenium and selenium and *Echinacea* infusion mixture.

For the colonies coming out of wintering were followed interval numbers with honeybees, total brood surface and honey combs surface.

For the artificial swarms and artificial weaken colonies following parameters were followed: uncapped brood surface, capped brood surface and total brood surface.

Table 1

General scheme of experiment organization

| <i>Year</i> | <i>Experimental lot formed by:</i> | <i>Biostimulator added in supplementary food</i> | <i>The followed characteristic</i> |
|-------------|---|---|--|
| 2005 | Colonies coming out of wintering and getting ready for spring harvesting. | - nettle - Protofil - onion - garlic | - number of intervals with honeybees - total brood surface - honey combs surface |
| 2006 | Artificial swarms | - nettle - Protofil - onion - garlic | - uncapped brood surface - capped brood surface - total brood surface |
| 2007 | Artificially weaken colonies by elimination of ¼ of the population and their frames | - nettle - Protofil - onion - garlic | - uncapped brood surface - capped brood surface - total brood surface |
| 2008 | Colonies coming out of wintering and getting ready for spring harvesting. | - thyme - <i>Echinacea</i> - Selenium - Selenium+ <i>Echinacea</i> | - number of intervals with honeybees - total brood surface - honey combs surface |
| | Artificial swarms | - thyme - <i>Echinacea</i> - Selenium - Selenium+ <i>Echinacea</i> | - uncapped brood surface - capped brood surface - total brood surface |
| | Artificially weaken colonies by elimination of ¼ of the population and their frames | - thyme - <i>Echinacea</i> - Selenium - Selenium+ <i>Echinacea</i> | - uncapped brood surface - capped brood surface - total brood surface |

Sugar cake was made as follows: for each experimental lot was measured the necessary sugar amount; in enamel pots were mixed powder sugar with water or plant infusion depending on the experiment; the mixture was homogenized with the help of a wood spoon and than energetic mixed in order to obtain a harder paste.

The paste obtained was measured in portions of 1000 g, which was deposited in plastic perforated bags and further administered to honeybees, by placing it above the frames with the perforations heading down.

Sugar syrup (1:1) was prepared from 1 kg of sugar and 1 l water, respectively infusions for the experimental lots. The water amount necessary to prepare the plan infusion was boiled and afterwards the sugar was added by mixing continuously until total dissolution. Syrup was left to cool off and than administered to the colonies in the dosage described in the next chapters.

Natural biostimulators were introduced in the supplementary feeding scheme as follows:

- **Nettle** infusion was prepared in each season differently either fresh or dry. For the infusion was used 10g dry nettle/100ml water or 100 g fresh nettle/1000 ml water. This infusion was further used for cake or sugar syrup preparation.
- **Protofil** was directly bought from the producer; was used 17 ml Protofil/1000 g supur.

- **Onion extract** was obtained by grinding fresh onion and filtering through a sieve; only the liquid was used in supplementary feeding; 5 ml of onion extract for each kg of powder sugar in order to prepare the cake and 5ml/1 kg sugar syrup.
- **Garlic extract** was obtained by grinding fresh onion and filtering through a sieve; 2 ml of garlic extract was used / kg powder sugar to prepare the cake and 2 ml/ kg sugar syrup.
- **Thyme extract** was prepared as follows: 50 grams of dry plant were added to hot water 10%; after filtering this solution was introduced in 5 kg cake or syrup.
- 10 ml of *Echinacea* solution 10% obtained from dry plant were used for 1 kg cake or sugar syrup.
- **Selenium and *Echinacea*** mixture was obtained by mixing 1.5 grams of selenium with 4.5 kg powder sugar and 0.5 liters of *Echinacea* infusion; this mixture was further used for 5 honeybee colonies.

Netz frame was used in order to determine total brood surface and honey comb surface.

CHAPTER 6

MATERIALS AND METHODS FOR LABORATORY TESTING

6.1. PLANTS AND METHODS USED FOR LABORATORY TESTING

Laboratory tested plants in order to establish the biological active constituents are: nettle (*Urtica dioica*), onion (*Allium cepa*), garlic (*Allium sativum*), thyme (*Satureja hortensis*) and *Echinacea*.

These plants are used in human nutrition as infusions or/and alcoholic extracts, due to their high content in biological active constituents, responsible for antioxidant and antibacterial activities.

The used methods are standardized methods from Romanian Pharmacopeia or own methods developed in the laboratory.

The extracts and/or infusions were made in the Bee products Quality Control Laboratory within the Department of Beekeeping and Sericulture from USAMV Cluj-Napoca.

The main analyzed characteristics of the extracts and infusions were: glucose spectrum, total polyphenols, free flavonoid content, antioxidant activity.

Same parameters were correlated with the results obtained in the field.

Table 2 presents the analyzed plants from chemical composition and bioactive properties point of view, and also the methods used for the determinations.

Table 2

Methods used for composition and bioactive properties determination of studied plants

| Plant | Investigated compounds | Method |
|---|------------------------|--|
| Nettle (<i>Urtica dioica</i>) | Polyphenols | Folin-Cocalteu method (Singleton, 1965), spectrophotometric method |
| Onion (<i>Allium cepa</i>) | Total flavonoids | spectrophotometric method, (Kim și col., 2003), modified |
| | pH | Metoda potențiomtrică |
| Garlic (<i>Allium sativum</i>) | Glucose | Barfoed Test, Selivanoff Test, Potassium iodide test, HPLC method, (Kroyar și Hegedus, 2001; Bonta și col., 2007) |
| Thyme (<i>Satureja hortensis L.</i>) | | |
| Echinacea (<i>Echinacea sp.</i>) | Antioxidant activity | DPPH spectrophotometric method, (Meda și col., 2005) |

Except the plants presented in table 2, Protofil and organic selenium was also tested.

6.2. MATERIAL AND METHODS REGARDING THE EVALUATION OF TESTED PLANT COMPOSITION AND PROPERTIES

Methanolic extracts used in the experiments are presented in figure 1, having different colors against the infusions from the same plant.

Chemical composition study of the biological active constituents from the studied plants, were preceded by preliminary analysis in order to point out the glucose spectrum and total polyphenols.

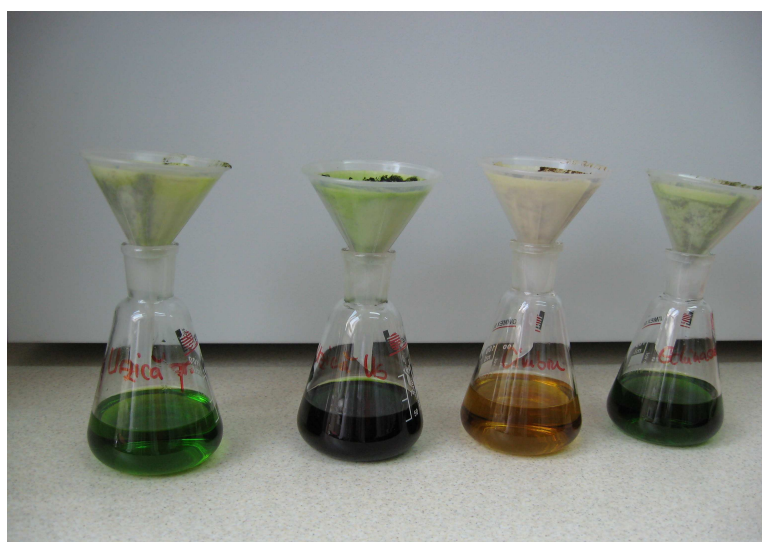


Figure 1. Methanolic extracts of fresh nettle, dried nettle, thyme and Echinacea

In order to observe the presence and the type of carbohydrates, proteins, pigments and pH, different experiments were made. These included: Barfoed test, which

determines the presence of mono and polysaccharides; Selivanoff test, which shows the presence of an aldehyde or ketonic group; potassium iodide test, to detect the starch, Bradford test, to quantify the proteins and pH measurement of the extracts and infusions.

Tests that involve carbohydrates determinations are qualitative ones. These offer informations about present carbohydrates type and their molecular structure. All these tests helped to form an idea about the carbohydrates type and also gave further support for chromatographic studies for sugars determinations. These studies were done by HPLC, a simple method, reproducible which allows quantification of each sugar.

HPLC system (SHIMADZU model) is using a LC-10AD pump, DGU-14A degas system, SIL-10AV VP autosampler, RID-10A refraction index detector, thermostat with CTO-10AS temperature control for the separation column (Altima Amino 100A 5 μ m, 250mm x 4,6mm). Mobile phase was acetonitril: water (80:20).

Barfoed test was done in order to detect the presence of monosaccharides, disaccharides or polysaccharides. Selivanoff test was used to differentiate the ketones from aldehydes. Potassium iodide test was employed to point out the presence of starch. Bradford test was also used to determine the protein content.

Thin layer chromatography was used to show the presence of pigments in *Echinacea* extracts and infusions. Chlorophile A and B were also quantified.

All of these tests were done in order to have an answer a simple question: the infusions contain the same amounts and types od compundts as the methanolic extracts?

Echinacea was obtained from SC Proplanta S.A. clinj-Napoca, as dry plant and the other plants were harvested from spontaneous flora.

Total phenolics from samples (infusions and methanolic extracts) were quantified by Folin-Ciocalteu colorimetric method with modifications (**Singleton and col., 1965**). Results were expressed as average of three determinations, in galic acid mg equivalents (GAE)/100 g plant.

Total flavonoid content from extracts and infusions was determined after **Kim and col. (2003)** method, using NaNO_2 , AlCl_3 and NaOH . Results were expressed as average of three determinations, in mg quercetin equivalents.

Antioxidant activity was correlated with chemical composition and compared with the known action of natural or synthetic antioxidants. Antioxidant activity of infusions and extracts was measured as the radical scavenging activity of DPPH, measured spectrophotometrically and expressed as radical inhibition percent or mmols Trolox (vitamin E anlogue).

CHAPTER 7

RESULTS AND DISCUSSIONS

7.1. RESULTS OBTAINED AFTER LABORATORY DETERMINATIONS ON PLANTS

Plant alcoholic extracts were subjected to preliminary tests, in order to determine the type of the present glucid, and also to determine the pigment type, ph and protein content. Furthermore by HPLC method, glucidic content, total polyphenols, total flavonoids and antioxidant activity was investigated.

In order to determine the sugar type, the following tests were done: Barfoed (indicates the presence of the monosaccharide), Selivanoff (indicates the aldehyde and ketonic groups) and potassium iodide test to determine the polysaccharides.

Barfoed test result demonstrated that *Echinacea* extract contains monosaccharide in a large amount comparing with the content of di- and polysaccharide. Selivanoff test pointed out the presence of ketone group in *Echinacea* extract and with the potassium iodide test the presence of polysaccharides was pointed out in all the samples.

Bradford method for the spectrophotometric quantification of proteins was based on a calibration curve with seric bovine albumin. All methanolic extracts showed insignificant amounts of proteins, the highest concentration being 53.93 mg/ml for *Echinacea* extract.

Thin layer chromatography (TLC) was used to determine the pigments type from the extracts and also to determine chlorophyll a and b quantity present in the samples. As control spinach leaves extract was used, which contains chlorophyll a, chlorophyll b, xanthophylls and beta-carotene. Results showed that *Echinacea* extract contains chlorophyll a and b, xanthophylls and beta-carotene. Other pigments were not observed. Literature data regarding spectrophotometric analysis were correlated with laboratory determinations to identify and quantify the pigments from the used extracts.

Chlorophyll a quantity in *Echinacea* plants was 0.140 µg per gram, and chlorophyll b quantity was 0.238 µg per gram.

Results regarding pH determinations of extracts and infusions are presented in figure 2. The extracts and the infusions, having a pH value close to neutral one did not influence the cake or sugar syrup.

Regarding the flavonoid content, very high quantities were registered for dry nettle infusion (482 mg QE/100 g), followed by *Echinacea* infusion (325.9 mg QE/100 g) and fresh nettle extract (286 mg QE/100 g). Low values were obtained for *Echinacea*, thyme, dry nettle extracts and thyme infusin (183 – 123 mg QE/100 g).

Very low flavonoid quantities were registered for onion and garlic extracts and fresh juices (11.3 – 1.6 mgQE/100 g).

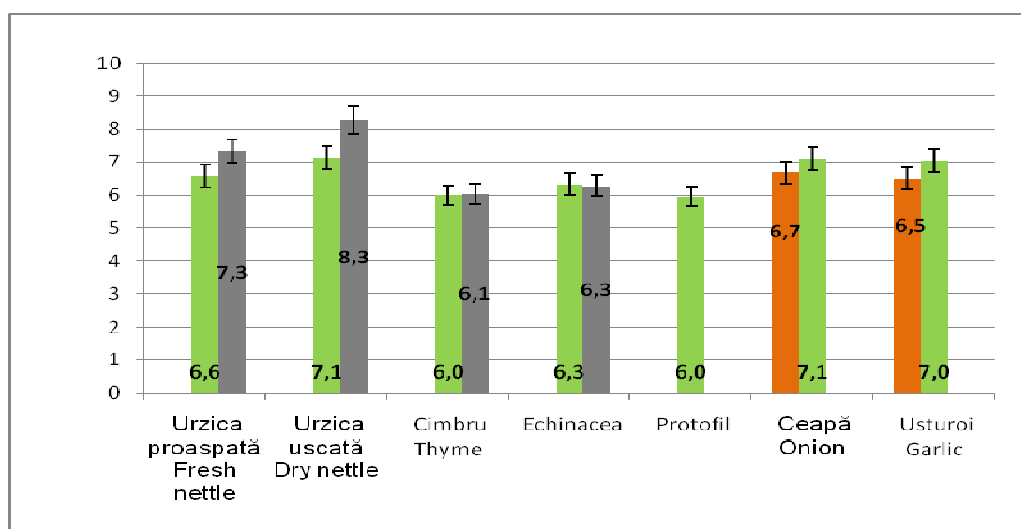


Figure 2. pH values of methanolic extracts, infusions and fresh juice (□ alcoholic extract; □ Infusion; □ Fresh juice)

Total phenolics content is presented in table 3.

Table 3

Total phenolic content for studied plant extracts and infusions

| Plant | Total polyphenolic content (mgGAE/100 g) | | |
|--------------|--|--------------|--------------|
| | Alcoholic extract | Infusion | Fresh juice |
| Fresh nettle | 192.0 | 310.0 | - |
| Dry nettle | 294.0 | 510.0 | - |
| Thyme | 555.0 | 530.0 | - |
| Echinacea | 549.0 | 570.0 | - |
| Protofil | 576.0** | - | - |
| Onion | 33.0* | - | 150.9 |
| Garlic | 88.0 | - | 69.0 |

* - minimum value

** - maximum value

The alcoholic extracts and infusions were submitted to DPPH test in order to determine the antioxidant activity. Compounds with antioxidant power from plants have the power to diminish the DPPH color (blue); table 4 presents these results.

Antioxidant activity from plant is due to biological active constituents and not just to phenolics. Onion and garlic have sulph compounds, which resulted to have a good antioxidant activity. These compounds were not extracted with methanol : water mixture because the same high antioxidant activity was not registered for onion and garlic extracts.

Table 4

Inhibition percent (antioxidant activity) of methanolic extracts and plant infusions taken into study

| Plant | Antioxidant activity (% Inhibition) | | |
|------------------|-------------------------------------|----------|-------------|
| | Alcoholic extract | Infusion | Fresh juice |
| <i>Echinacea</i> | 53.38 | 75.47 | - |
| Thyme | 74.13 | 50.70 | - |
| Dry nettle | 66.20 | 53.97 | - |
| Fresh nettle | 74.59 | 63.08 | - |
| Protofil | 55.48 | - | - |
| Onion | 29.84 | - | 84.85 |
| Garlic | 20.98* | - | 95.10** |

* - minimum value

** - maximum value

Inhibition percent was not a surprise for nettle, thyme or *Echinacea* extracts or infusions, because these also presented high content of phenolics and total flavonoids.

7.2. RESULTS OBTAINED IN EXPERIMENTAL YEAR 2005 REGARDING THE EFFECT OF NETTLE, PROTOFIL, ONION AND GARLIC ON BEE COLONIES AFTER WINTERING PERIOD AND THEIR PREPARATION FOR SPRING HARVESTING

In 2005 experimental year, the effect of some extracts and infusions as additions in supplementary feeding was tested (1000 g cake administered once and 1000 g / day sugar syrup for 10 days, as described in chapter 6.3). 45 honeybee colonies were subjected to this experiment, each experimental lot having 9 colonies.

Followed characteristics were honeybee interval number, total brood surface (dm²) and honey combs surface (dm²).

These characteristics were followed twice along the experiment; two controls were done for each colony after the cake administration and after sugar syrup administration, each of these containing plant addititons.

Table 5 offers the results of effective growth during 2005 for field testing. Percentage differences are also presented.

In 2005, protofil was proven to have the strongest effect on the followed characteristics. Nettle extract also has important influences on frame number and brood surface.

Onion and garlic extracts do not influence in an obvious way the followed characteristics.

*Table 5
The centralised data regarding efective growth in 2005 at bee colonies*

| Characteristic | Supplementary feed | Nettle | Protofil | Onion | Garlic |
|--|--------------------|-----------|----------|------------|-----------|
| Nr.Intervals covered with bees | After sugar cake | -0.8 | +0.2 | +0.3 | -0.4 |
| | After sugar syrup | +1.7 | +3.3 | +0.3 | +1.0 |
| Total brood surface (dm ²) | After sugar syrup | +0.6 | +13.0 | +1.8 | +1.2 |
| Honeycomf surface (dm ²) | After sugar syrup | +1.2 | +5.6 | -4.4 | -6.4 |
| SUPPLEMENTS CLASIFFICATION | | II | I | III | IV |

7.3. RESULTS OBTAINED IN EXPERIMENTAL YEAR 2006 REGARDING THE EFFECTS OF NETTLE, PROTOFIL, ONION AND GARLIC ON ARTIFICIAL SWARMS

In experimental year 2006 the effect of nettle infusion, Protofil, fresh onion and garlic juice was tested on artificial swarms created in July.

Artificial swarms were made out from 3 brood frames and their bees, one honey frame and one artificial wax frame for buiding to which a queen copulated in the current year was added. The preliminary control was also made.

After a week, was checked if the swarms accepted the queen. Uncapped brood surface, capped brood surface and total brood surface were also followed.

Experimental scheme applied to artificial swarms is shown in table 7.

Table 6 shows the effective growth in 2006 on filed testing against uncapped brood surface, capped brood surface and total brood surface.

Table 6

Centralised data obtained for experimental year 2006 at artificial swarms

| Characteristic | Supplementary feed | Nettle | Protofil | Onion | Garlic |
|---|--------------------|----------|-----------|-----------|------------|
| Uncapped brood surface (dm ²) | After sugar syrup | -3.7 | +5.8 | -4.0 | -2.6 |
| | After 22 days | +1.2 | +2.2 | +7.9 | +12.2 |
| Capped brood surface (dm ²) | After sugar syrup | +11.8 | -0.2 | +0.3 | +7.0 |
| | After 22 days | +2.5 | +1.0 | -7.5 | -9.3 |
| Total brood surface (dm ²) | After sugar syrup | +8.2 | +5.7 | +4.4 | +6.7 |
| | After 22 days | +3.5 | +3.2 | +0.4 | +2.9 |
| SUPPLEMENTS CLASIFFICATION | | I | II | IV | III |

All nutritive supplements have an inhibition effect on uncapped brood surface during the experiment. The highest inhibition of uncapped brood surface during this experiment was registered for nettle. Protofil, onion and garlic act in a similar way, causing an approximate 6 dm² decrease on uncapped brood surface during the experiment.

7.4. RESULTS OBTAINED IN EXPERIMENTAL YEAR 2007 REGARDING THE EFFECTS OF NETTLE, PROTOFIL, ONION AND GARLIC ON BEE COLONIES ARTIFICIALLY WEAKEN

In 2007 the effect of nettle, Protofil, onion and garlic on artificial weaken colonies was tested. Artificial weaken was realized by removing frames with honeybees from each colony, until 4 brood, honey and bee frames were left and also the queen. Brood surface was approximatively 102 dm² / lot, honey surface 20-24 dm² / lot.

25 artificial weaken colonies were created, each lot formed out of 5 colonies; control lot was fed up with sugar syrup 1:1, 1000 g/colony, during 10 days. After last syrup administration uncapped brood surface, capped brood surface and total brood surface were measured.

For artificial weaken colonies the values of the followed parameters could be similar with the one of artificial swarms, except that the queen being the old one does not need accommodation and it is not in danger of not being accepted.

Control and experimental lots were of 5 colonies each, followed characteristics being uncapped brood surface, capped brood surface and total brood surface.

Experimental scheme was similar with the one applied for honeybee colonies after wintering period and artificial swarms.

Results are presented as graph in figure 3.

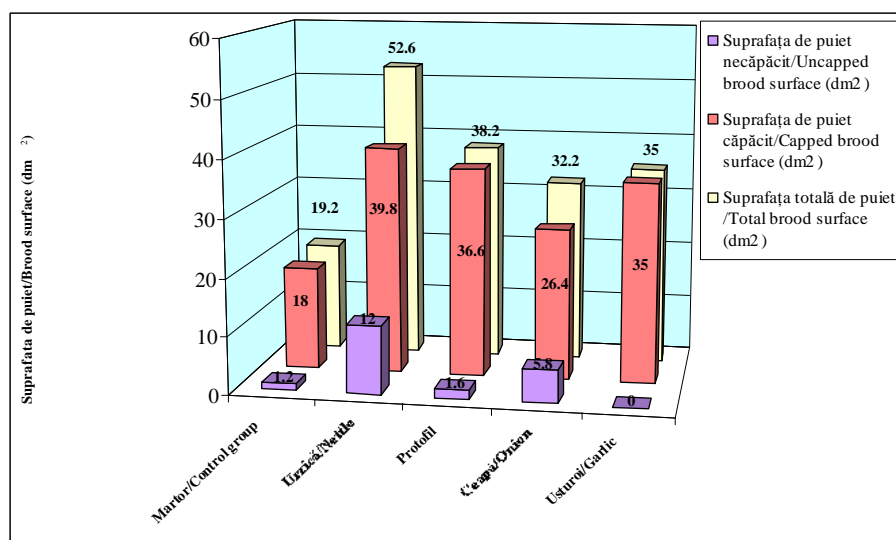


Figure 3. Centralised data obtained for experimental year 2007 at bee colonies artificially weaken

We may say that in 2007, nettle infusion had the strongest effect on the followed characteristics. As a classification we may say that onion was on the second place (due to the influence on uncapped brood surface), Protofil on the third, and on the last place onion juice.

For the capped brood surface, the classification is: nettle infusion, Protofil, garlic juice and onion. Same classification is valid for total brood surface.

7.5. RESULTS OBTAINED IN EXPERIMENTAL YEAR 2008 REGARDING THE EFFECT OF THYME, ECHINACEA, SELENIUM AND SELENIUM AND ECHINACEA MIXTURE ON BEE COLONIES

7.5.1. Results obtained on bee colonies after wintering period and preparation for spring harvesting

Thyme infusion, *Echinacea*, selenium and selenium and *Echinacea* mixture effect was tested in 2008 on colonies coming out of wintering period; experimental scheme is presented in table 9.

In 2008, 4 experimental lots were made, which were supplementary fed with cake and sugar syrup with the additions presented above; a control lot was fed conventionally.

Followed characteristics were: honeybee interval number growth, brood surface evolution and honey combs surface.

All these parameters registered an increasing of the values after the syrup administration with the additions.

Differences registered between supplements (figure 4) showed that the mixture (selenium and *Echinacea*) does not induce cumulative effects, which was expected.

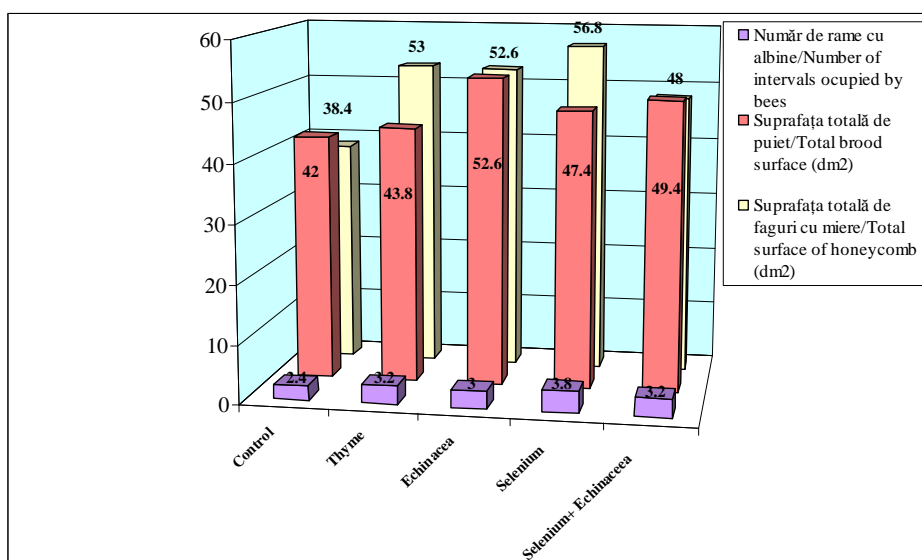


Figure 4. Centralised data regarding effective growth for experimental year 2008 in bee colonies

After this experiment we may conclude that using *Echinacea* infusion and selenium in supplementary feeding generate increasing of the honeybee interval numbers, brood surface and honey surface. The mixture does not generate cumulative effect, not even higher than the products administered separately.

Thyme infusion was proven to be a weak biostimulator.

7.5.2. Results obtained in artificial swarms

Thyme, *Echinacea*, selenium and selenium – *Echinacea* mixture effect was tested in 2008 on artificial swarms; experimental scheme is presented in table 9.

Followed parameters were uncapped brood surface, capped brood surface and total brood surface; the results are centralized in figure 5. Brood surface determination was made before syrup feeding, after 10 administrations and after one month after finishing supplementary feeding.

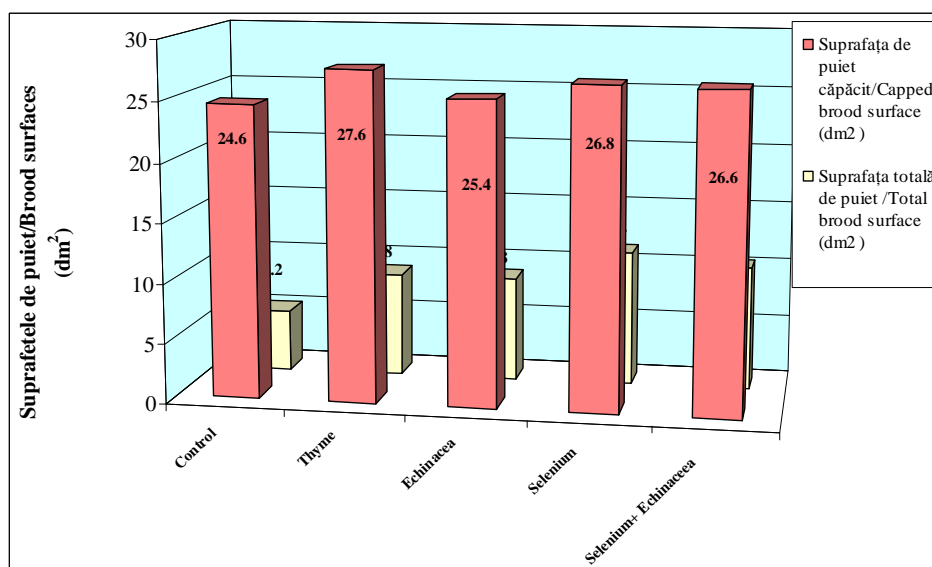


Figure 5. Centralised data obtained for experimental year 2008 at artificial swarms

All nutritive supplements used in this experiment have an increasing effect on uncapped brood surface. The highest decrease of the uncapped brood surface was registered for thyme infusion. Protofil, onion and garlic act in a similar manner causing an approximate 15 dm² decrease of uncapped brood surface.

After this experiment we may conclude that the most pronounced biostimulator effect for capped brood surface was for thyme infusion, other supplements inducing high values of the effective colony growth. Regarding total brood surface, the highest influence is the one of selenium and the selenium – *Echinacea* mixture. Thyme and *Echinacea* infusions generate small increases of the total brood surface.

Uncapped brood surface has not registered effective growth for neither experimental trials.

7.5.3. Results obtained in artificially weakened bee families

Thyme, *Echinacea*, selenium and selenium – *Echinacea* mixture infusions were tested on artificially weakened colonies. These were obtained by eliminating ¾ of the population.

Results from experimental year 2008 regarding the effect of thyme, *Echinacea*, selenium, selenium – *Echinacea* mixture on artificially weakened colonies are presented in table 7.

Table 7
Centralised data obtained for experimental year 2008 at bee colonies artificially weakened

| Analyzed characteristic | Supplementary feed | Thyme | <i>Echinacea</i> | Selenium | Selenium+ <i>Echinacea</i> |
|---|--------------------|-----------|------------------|------------|----------------------------|
| Uncapped brood surface (dm ²) | After sugar syrup | -0.6 | -0.5 | +1.9 | +0.9 |
| Capped brood surface (dm ²) | After sugar syrup | +3.2 | +4.7 | -1.1 | +0.6 |
| Total brood surface (dm ²) | After sugar syrup | +4.8 | +5.2 | -3.0 | -3.0 |
| SUPPLEMENTS CLASSIFICATION | | II | I | III | IV |

We may conclude that all nutritive supplements have a slightly increasing effect on uncapped brood surface. The most pronounced stimulation on uncapped brood surface was registered when selenium was used as nutritive supplement.

CONCLUSIONS

- The purpose** of the present research was to determine in the laboratory and in the field **the effect of different plant infusions and extracts on honeybee colonies productivity** at various stages of biological evolution. Studied supplements were nettle (*Urtica dioica*), Protofil, onion (*Allium cepa*), garlic (*Allium sativum*), thyme (*Satureja hortensis*), *Echinacea* (*Echinacea sp.*) and selenium.

Experimental lots were build out of colonies which have finished the wintering period and began spring harvesting; artificial swarms and artificial weaken colonies.

9. Laboratory determinations were about testing alcoholic and aqueous plant extracts, by determining **total phenolics, total flavonoids, pH, sugars identification and quantification, total protein content, antioxidant activity.**

9.1. pH values ranged from 5.96 for Protofil and 7.12 for methanolic dry nettle extract; 6.05 for thyme infusion and 8.27 for dry nettle infusion.

9.2. Total phenolics (mg GAE/100 g DS) presented values within 310 mg GAE/100 g DS for fresh nettle infusion and 570 mg GAE/100 g DS for *Echinacea* infusion; values for methanolic extracts were between 33 mg GAE/100 g DS for onion and 576 mg GAE/100 g DS for Protofil.

9.3. Thyme infusion showed the lowest **total flavonoid content** 123 mg QE/100 g DS, the highest being 482 mg QE/10 g DS for dry nettle infusion. For the methanolic extracts total flavonoid content has lower values of 4 mg QE/100 g DS for onion extract and 183 mg Qe/100 g Ds for *Echinacea* extract.

9.4. Tests to mark out the **monosaccharides** (Barfoed test) confirmed their presence in all analyzed plants; tests to dignify **ketones** and **aldehydes** (Selivanoff test) confirmed the presens of suchrose, maltose and trehalose. According to HPLC procedure plant extracts with high content of glucose and fructose are *Echinacea* leaves extracts.

9.5. Bradford method for **total protein content** showed insignificant protein quantities in analyzed extracts, and thin layer chromatography for **pigments control** confirmed the presence of beta-carotene, chlorophyll a and b and xantophyll.

9.6. Regarding the **antioxidant activity (inhibition %)**, values are very different: methanolic garlic extract showed a value of 20.98% and the fresh garlic juice showed 95.10% free radicals inhibition. Methanolic nettle and thyme extracts have close values 74.59%, 74.13% respectively. As for the infusions the lowest value was registered for for thyme (50.70%) and the highest for *Echinacea* infusion (74.47%).

10. Field determinations were developed during 4 years as followes: in 2005 was studied the effect of nettle infusion, Protofil and fresh onion and garlic juices on colonies coming out of wintering which prepare for spring harvesting. In 2006 the effect of same supplements was investigated on artificial swarms, and in 2007 the same ones on artificial weaken colonies by removing $\frac{3}{4}$ of the populations. In 2008 the effect of thyme, *Echinacea*, selenium and selenium – *Echinacea* infusions was tested on colonie coming out of wintering period, artificial swarms and artificial weaken honeybee colonies.

11. During experimental year 2005 the effect of nettle, Protofil, onion and garlic was tested on colonies coming out of wintering period and beginning spring harvesting. Followed characteristics for these colonies were honeybee interval number, brood surface (dm²) and honey combs surface (dm²).

11.1. Honeybee intervals during experiment:

- Protofil: increase with 3.45 (51.81%) intervals towards control
- Nettle: increase with 0.89 (13.37%) intervals towards control
- Onion and garlic: increase with 0.56 (8.41%) intervals towards control

11.2. Brood surface during experiment:

- Protofil: increase with 13 dm² (17.57%) towards control
- Onion: increase with 1.88 dm² (2.54%) towards control
- Garlic: increase with 1.22 dm² (1.65%) towards control
- Nettle: increase with 0.66 dm² (0.9%) towards control

11.3. Honey combs surface during experiment:

- Protofil: increase with 5.62 dm² (18.2%) towards control
- Nettle: increase with 1.22 dm² (3.95%) towards control
- Onion: decrease with 4.43 dm² (14.34%) towards control
- Garlic: decrease with 6.23 dm² (20.16%) towards control

12. During experimental year 2006 effect of nettle, Protofil, fresh onion and garlic juice was tested on artificial swarms. Followed characteristics were uncapped brood surface (dm²), capped brood surface (dm²) and total brood surface (dm²).

12.1. Uncapped brood surface

- Garlic: 4.67 dm² increase registered one month after supplementary feeding has finished
- Onion: 3.5 dm² increase registered one month after supplementary feeding has finished
- During the experiment decreasing of the uncapped brood surface was registered for control and nettle

12.2. Capped brood surface

- Nettle: increase with 4.5 dm² (22.19%) towards control
- During the experiment decreasing was registered towards control for: onion (-9 dm² – 44.27%); Protofil (-10.33 dm² – 50.81%) and garlic (-14.33 dm² – 70.48%)

12.3. Total brood surface

- Nettle: increase with 4.17 dm² (62.62%) towards control
- During the experiment decreasing was registered towards control for: garlic (-0.99 dm² – 14.86%); onion (-1.66 dm² – 24.92%) and Protofil (-2.66 dm² – 39.94%)

13. During experimental year 2007 effect of nettle, Protofil, fresh onion and garlic juices was tested on artificial weaken colonies by eliminating $\frac{3}{4}$ of the initial population. Followed characteristics were uncapped brood surface (dm²), capped brood surface (dm²) and total brood surface (dm²).

13.1. Uncapped brood surface

- Nettle: increase with 10.8 dm² (900%) towards control
- Onion: increase with 4.6 dm² (383.3%) towards control
- Protofil: increase with 0.4 dm² (33.3%) towards control
- Garlic: 0

13.2. Capped brood surface

- Nettle: increase with 21.8 dm² (121.1%) towards control
- Protofil: increase with 18.6 dm² (103.3%) towards control
- Garlic: increase with 17 dm² (94.4%) towards control
- Onion: increase with 8.4 dm² (46.6%) towards control

13.3. Total brood surface

- Nettle: increase with 33.4 dm² (173.9%) towards control
- Protofil: increase with 19 dm² (98.9%) towards control
- Garlic: increase with 15.8 dm² (82.3%) towards control
- Onion: increase with 13 dm² (67.7%) towards control

14. During experimental year 2008 effect of thyme, *Echinacea*, selenium, selenium – *Echinacea* mixture was tested on colonies coming out of wintering period and beginning spring harvesting, artificial swarms and artificial weaken colonies.

14.1. Regarding honeybee colonies coming out of wintering period and beginning spring harvesting, followed characteristics were honeybee interval number, total brood surface and total honey combs surface.

➤ **Colonies coming out of wintering period**

- **Honeybee interval number:**

- Selenium: increase with 1.4 intervals (58.34%) towards control
- Thyme: increase with 0.8 intervals (33.34%) towards control
- Selenium+*Echinacea*: increase with 0.8 intervals (33.34%) towards control
- *Echinacea*: increase with 0.6 intervals (25%) towards control

- **Brood surface:**

- *Echinacea*: increase with 10.6 dm² (25.37%) towards control
- Selenium+*Echinacea*: increase with 7.4 dm² (17.63%) towards control
- Selenium: increase with 5.4 dm² (12.86%) towards control
- Thyme: increase with 1.8 dm² (4.29%) towards control

- **Honey combs surface:**

- Selenium: increase with 18.4 dm² (47.92%) towards control
- Thyme: increase with 14.6 dm² (38.02%) towards control
- *Echinacea*: increase with 14.2 dm² (36.98%) towards control
- Selenium+*Echinacea*: increase with 9.6 dm² (25%) towards control

➤ **Artificial swarms**

- **Uncapped brood surface**

- During the experiment were registered decreasing towards control for selenium (-64 dm²); *Echinacea* (-67 dm²); Selenium+*Echinacea* (-67 dm²); thyme (-76 dm²);

- **Capped brood surface**

- Thyme: increase with 3 dm² (12.2%) towards control
- Selenium: increase with 2.2 dm² (8.95%) towards control
- Selenium+*Echinacea*: increase with 2 dm² (8.13%) towards control
- *Echinacea*: increase with 0.8 dm² (3.26%) towards control

- **Total brood surface**

- Selenium: increase with 6.2 dm² (119.23%) towards control
- Selenium+*Echinacea*: increase with 5.2 dm² (100%) towards control
- Thyme: increase with 3.6 dm² (69.23%) towards control
- *Echinacea*: increase with 3.6 dm² (69.23%) towards control

➤ **Artificial weaken honeybee colonies**

- **Uncapped brood surface**

- Selenium: increase with 8.7 dm² (145%) towards control
- Selenium+*Echinacea*: increase with 3.7 dm² (61.67%) towards control
- During the experiment were registered decreasing towards control for: Thyme (-3.8 dm²); *Echinacea* (-3.8 dm²)

- **Capped brood surface**
 - *Echinacea*: increase with 23.7 dm² (24.95%) towards control
 - Thyme: increase with 16.1 dm² (16.67%) towards control
 - Selenium+*Echinacea*: increase with 2.9 dm² (3.06%) towards control
 - Selenium: decrease with 5.5 dm² (decrease with 5.79%) towards control
- **Total brood surface**
 - *Echinacea*: increase with 24 dm² (29.27%) towards control
 - Thyme: increase with 22 dm² (26.83%) towards control
 - Selenium+*Echinacea*: increase with 17 dm² (20.73%) towards control
 - Selenium: increase with 16.9 dm² (20.6%) towards control.

SELECTIVE BIBLIOGRAPHY

25. Anciuți, M.A., Rutz F, da Silva L. A., Cosenza R. C., Cosenza R. G. (2004) – Effect of dietary inorganic by organic selenium (Sel-plex) on performance of broilers, Proceedings of the 20th Annual Alltech Symposium Re-imagining the Feed Industry, Kentucky, USA, suppl. 11, p.14.
26. Arruda, J. S., Rutz, F., and Pan, E.A., (2004), Influence of replacing dietary inorganic with organic selenium (Sel-plex) on performance of broilers, Proceedings of the 20th Annual Alltech Symposium Re-imagining the Feed Industry, Kentucky, USA, suppl. 11, p. 13.
27. Bura, M., (1997) – Creșterea intensivă a albinelor, Ed. Helicon, Timișoara.
28. Chioveanu, G., Ionescu D., Mardare A., (2004), Control of nosemosis – the treatment with „Protofil”, *Apiacta* 39, p. 31 – 38.
29. Hristea, C.L., (1976) – Stupăritul nou, Redacția Revistelor Apicole, București.
30. Kim, Dae-Ok, S. W. Jeong, C. Y. Lee, (2003), Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, *Food Chem.*, 81, p. 321-326.
31. Lazăr, Stefan, (2003) – Morfologia și tehnica creșterii albinelor, Editura „Terra nostra”, Iași
32. Marin, M., (1994) – Viața și sănătatea albinelor, *Revista România apicolă*, 3, București, p. 3.
33. Mărghitaș, L. (2002) – Albinele și produsele lor, Ed. Ceres, București.
34. Mărghitaș, L. (2005) – Albinele și produsele lor, Ed. Ceres, București.
35. Ogradă, I. (1986) – Bolile și dăunătorii albinelor, Redacția Crescătorilor de Albine din Republica Socialistă România, București.
36. Ritter, Wolfgang, (2000) – Bolile albinelor, M.A.S.T., ©1994 Verlag Eugen UlmerStuttgart, Germany.
37. Shimanuki, H., (1990) – Bacteria. Honey Bee Pests, Predators and Diseases, 2nd edition, Morse, R.A., Nowogrodzki, R., (eds). Cornell University Press, USA, p. 27-47.
38. Singleton V.L., Rossi, J.A., (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, p. 144-158.
39. Sharma S.C., Anand S.M., (2006), Role of selenium supplementation and heat stress of trehalose and glutathione content in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied biochemistry and Biotechnology*, 133 (1), p. 1 - 7.
40. Surai, P.F., Karadas, F., Pappas, A.C., Dvorska, J. E. (2004) – Selenium distribution in the eggs of ISA brown commercial layers, Proceedings of the 20th Annual Alltech Symposium Reimagining the Feed Industry Kentucky, USA, suppl. 11, p. 17.
41. Șara, A., Sasca L., Maieran P. (2004) – Efectele utilizării mineralelor organice în nutriția animalelor, *Bulletin USAMVCN, seia ZB*, vol. 60, p. 100 – 103.
42. Șara, A., Antonia Odagiu, Mariana Dinea, S. Dărăban, (2005) – Research concerning the influence of organic selenium (Sel-plex) on production in broiler chickens, Proceedings of the XL Croatian Symposium on Agriculture 16-19 February 2005, Opatija.
43. Tanada, Y., H. K. Kaya (eds) (1993) – *Insect Pathology*. Academic press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers
44. www.beehoo.com
45. www.beekeeping.com
46. www.betterbee.com
47. www.nutritiondata.com
48. Colecția Revistei România Apicolă.