

## STRATEGII ECO CU PRODUSE BIOLOGICE ÎN LIVEZILE DE MÂR

Stingaci Aurelia<sup>1,\*</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-6621-9919>

Goncharuk Violeta<sup>2,\*\*</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2992-1690>

<sup>1</sup> Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al USM, Chișinău

<sup>2</sup> Institutul de Chimie Bioorganică, Academia Națională de Științe din Belarus, Minsk,

\*e-mail: aurelia.stingaci@sti.usm.md

\*\*e-mail: happyletta@gmail.com

**Summary.** Products of microbial origin in combined with para-aminobenzoic acid (pABA) derivatives, can be the basis for organic farming and plant resistance to unfavorable environmental factors inducing, as well as for the crop yield increase. The article presents the results of the study of the efficiency of fruit-cultures and potato plantations treatment with aqueous suspensions of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* with addition of para-aminobenzoic acid derivatives solutions in concentrations  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  mM.. The results demonstrate the possibility of using entomopathogenic bacteria in a tank mixture with pABA to create biological preparations as alternatives to pesticides and the development of biological methods of plant protection.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*; *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*; para-aminobenzoic acid (pABA) derivatives; biological products.

### Introducere

Schimbările climatice globale observate în ultimele decenii afectează ciclul fonologic și productivitatea culturilor. În același timp, stadiul actual al tehnologiei în domeniul protecției plantelor nu rezolvă toate problemele legate de producția vegetală, deoarece pesticidele nu pot proteja plantele de stresul abiotic. Prin urmare, este necesar să se dezvolte practici agronomice care să atenueze impactul negativ al condițiilor externe și să permită obținerea unor producții constant ridicate.

Practicarea agriculturii ecologice a existat în mod tradițional, în condițiile în care practicile moderne au început în anii 1920 ca urmare a utilizării pesticidelor, care a fost popularizată în anii 1960. În anii 1970, această agricultură convențională a crescut odată cu creșterea cunoștințelor și dezvoltarea tehnologiei. Pe lângă producția de alimente sănătoase, agricultura ecologică contribuie și la protecția mediului natural. La un nivel ridicat de eficacitate ecologică și inofensivitate a preparatelor biologice, utilizarea acestora nu are întotdeauna un efect stabil în raport cu influența negativă a factorilor climatici asupra plantei gazdă (Skendžić, S. & Zovko, M., et al., 2021).

Bacteriile entomopatogene sunt cunoscute de mult timp ca regulatori naturali ai populației de insecte. Cele mai frecvent utilizate bacterii sunt din gen. *Bacillus* [Guliy et al., 1982; Garczynski și Siegel, 2007], care produc o proteină cristal parasporală toxică pentru insecte. Acest lucru a condus la utilizarea pe scară largă a *B. thuringiensis* ca componentă activă a preparatelor entomopatogene prietenoase cu mediul, ca alternativă la pesticidele chimice. Utilizarea bacteriilor care suprimă creșterea și dezvoltarea dăunătorilor și bolilor este cea mai sigură, deoarece reduce impactul negativ al pesticidelor în timpul sezonului de vegetație (Tikhonovich, I.A., 2005; Pusenkova L.I., 2010).

Faimosul învățat Rapoport I.A. a stabilit că efectul pozitiv al pABA asupra sistemelor vii se bazează pe fenomenul necunoscut anterior al interacțiunii sale cu enzimele. Efectul pozitiv al acidului para-aminobenzoic asupra plantelor, animalelor și oamenilor a fost argumentat (Kozhevnikova N.A., 1983). Există date despre eficacitatea pABA în reducerea efectului dăunător al mutagenilor. Se știe că pABA este capabil să absoarbă razele UV, care afectează negativ mecanismul de reproducere bacteriană, prin urmare, utilizarea pABA în preparatele bacteriene

destinate tratării părților aeriene ale plantelor poate fi deosebit de eficientă. Astfel, acizii benzoici, cunoscuți pentru importanța lor ca elemente de bază în elaborarea, au câștigat o atenție tot mai mare în știința plantelor, fiind implicați în diverse procese fiziologice de la reglarea germinării semințelor până la rezistența la boli și toleranța la stres (Eiges, N.S., 2015).

Scopul cercetării a fost de a stabili posibilitatea utilizării unui amestec de tulpini entomopatogene de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* și *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* cu derivați ai acidului *para*-aminobenzoic pentru determinarea efectului sinergic în creșterea eficienței biologice și a investiga rolul acestora în creșterea și dezvoltarea culturii mărului.

### Materiale și metode

Cercetările au fost efectuate pe lotul experimental al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Universității de Stat, în anul 2024. Obiectele cercetării au fost suspensii de bacterii entomopatogene *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* și derivați ai acidului *para*-aminobenzoic în concentrații de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  mM. Tratamentele au fost realizate în livada de meri, soiul Renet Simirenko, în scopul protecției de dăunătorul *Cydia pomonella* L. Experiențele au fost montate randomizat conform schemelor clasice (Доспехов Б., 1985).

Ținând cont de faptul că moartea insectelor testate mai poate fi cauzată și de alți factori ce nu țin de potențialul de infecție ai bacteriilor, pentru determinarea activității biologice a preparatelor se aplică formula Abbot, care ia în considerație și mortalitatea larvelor în control:

Procentul mortalității larvelor s-a calculat după Abbot:

$$P = \frac{(Mc - Mo)}{100 - Mc} \times 100$$

unde P - activitatea biologică exprimată în procentul de mortalitate a insectelor,

Mo- larve moarte în experiență %;

Mc- larve moarte în martor %.

Pentru determinarea activității biologice a bacteriilor se mai aplică și timpul letal ( $TL_{50}$ ), care indică la timpul necesar pentru obținerea a 50% de mortalitate a larvelor. Acest indice se determină în mod analogic înregistrând rezultatele după diferite intervale de timp.



**Figura 1. Determinarea purității compușilor, folosind cromatografia lichidă.**

### Rezultate și discuții

În scopul pregătirii formelor preparative s-a efectuat screeningul acțiunii de reglare a creșterii și de protecție a derivaților acidului *para*-aminobenzoic (PABA) Un obiectiv esențial al protecției culturilor pomicole este prevenirea sau detectarea bolii cât mai devreme, astfel încât intervenția de protecție să fie mai eficientă a derivaților acidului *para*-aminobenzoic (PABA). În strategiile de screening de prevenție acțiunii de reglare a creșterii și de protecție, derivații acidului

para-aminobenzoic (PABA) trebuie să aibă un risc extrem de scăzut încât să aibă un raport beneficiu/risc acceptabil, abilitatea de a ținti organismele dăunătoare cu o probabilitate mai mare ar putea să ducă la aplicarea unui set larg de posibile abordări și la creșterea eficienței lor. Studiarea stabilității derivaților PABA, date HPLC pentru derivații PABA în condiții normale și după teste de stres (condiții normale, fotoprelucrare, termoprelucrare). S-a studiat stabilitatea foto- și termică a derivaților PABA, pentru a determina efectul radiației vizibile. Controlul calității derivaților a fost efectuat folosind cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Conform rezultatelor HPLC, cromatogramele probelor supuse tratamentului foto și termic conțin doar vârfuri de substanțe țintă și impurități inițiale, al căror conținut nu s-a modificat în timpul experienței. A fost elaborată procedura de laborator pentru sinteza derivaților acizilor grași para-aminobenzoic PABA și a derivaților lor.

Implementarea strategiilor de screening în practică este dificilă. Există câteva tehnici care pot ajuta agricultorii în furnizarea acestor servicii. Un dosar electronic configurat adecvat poate furniza sisteme de reamintire care îi ajută pe producători să urmărească și să descopere recomandările de utilizare. Unele sisteme le permit beneficiarilor accesul sigur la baza electronică, furnizând mijloace suplimentare pentru a îmbunătăți aderența la screening obișnuit.

**Analiza structurii derivaților sintezați.** Derivații PABA sintetizați au fost caracterizați folosind metode de cercetare fizico-chimice (spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie în infraroșu, spectrometrie de masă). Purity compuşilor, a fost confirmată folosind cromatografie lichidă de înaltă performanță, care a constituit 94-98% (Figura 2).

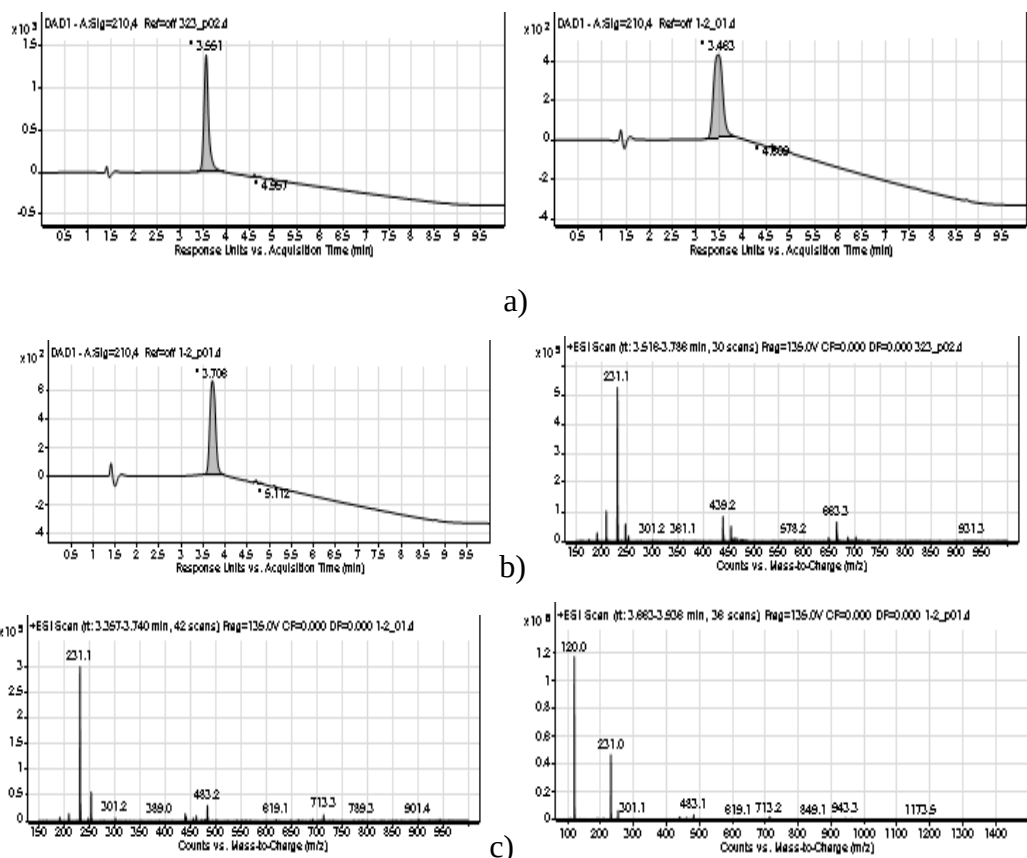


**Figura 2 (a, b, c). Cromatogramele și spectrele de masă ale acidului PABA (1) în condiții normale (a), după fotoprocessing (b) și tratament termic (c)**

**Studiarea stabilității derivaților PABA.** S-a studiat stabilitatea foto- și termică a derivaților PABA. Pentru a determina efectul radiației vizibile, derivații PABA au fost expuși sub o lampă incandescentă (75 W, 1 – 10 cm) în flacoane izolate timp de 50 și 125 de zile (1200 și, respectiv, 3000 de ore). Pentru a determina efectul temperaturii ridicate, PF-urile au fost ținute într-un dulap

termostat la +55 °C în flacoane izolate timp de 50 și 104 zile (1200 și, respectiv, 3000 de ore). Controlul calității derivaților a fost efectuat folosind cromatografie lichidă de înaltă performanță.

Conform rezultatelor HPLC, cromatogramele probelor supuse tratamentului foto- și termic conțin doar vârfuri de substanțe țintă și impurități inițiale, al căror conținut nu s-a modificat în timpul experienței. Nu au fost detectate semnale suplimentare în probele studiate, ceea ce indică stabilitatea foto- și termică a derivaților PABA studiați în condițiile experimentale. S-a stabilit că timpul de retenție a substanțelor inițiale și a substanțelor după testele de stres sunt la fel (tabel).

**Tabel**

**Date HPLC pentru derivații PABA în condiții normale și după teste de stres**

| Derivații | Date HPLC              |                         |                        |                         |                        |                         |
|-----------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|           | condiții normale       |                         | fotoprelucrare         |                         | termoprelucrare        |                         |
|           | RT <sub>1</sub> , min* | RT <sub>2</sub> , min** | RT <sub>1</sub> , min* | RT <sub>2</sub> , min** | RT <sub>1</sub> , min* | RT <sub>2</sub> , min** |
| 1         | 3,62                   | 3,55                    | 3,51                   | 3,46                    | 3,77                   | 3,71                    |
| 2         | 4,12                   | 4,05                    | 4,12                   | 4,05                    | 4,14                   | 4,07                    |
| 3         | 2,19                   | 2,12                    | 2,20                   | 2,13                    | 2,22                   | 2,15                    |
| 4         | 2,37                   | 2,30                    | 2,36                   | 2,28                    | 2,47                   | 2,39                    |
| 5         | 5,82                   | 5,75                    | 5,85                   | 5,78                    | 5,84                   | 5,78                    |
| 6         | 4,83                   | 4,76                    | 4,86                   | 4,79                    | 4,86                   | 4,79                    |
| 7         | 4,46                   | 4,39                    | 4,49                   | 4,41                    | 4,48                   | 4,42                    |
| 8         | 4,80                   | 4,73                    | 4,82                   | 4,75                    | 4,84                   | 4,77                    |
| 9         | 5,10                   | 5,04                    | 5,14                   | 5,08                    | 5,14                   | 5,08                    |
| 10        | 5,82                   | 5,75                    | 5,83                   | 5,77                    | 5,84                   | 5,78                    |

\* - timpul de retenție înregistrat cu ajutorul unui detector de masă;

\*\* - timpul de retenție înregistrat cu ajutorul unui detector cu matrice de diode.

În prima etapă a cercetării, a fost determinată compatibilitatea suspensiilor bacteriene și a derivaților de pABA pentru utilizarea în amestecuri de rezervoare. Experimentele au fost efectuate pe agar de dextroză de cartofi, utilizând metoda discului filtrant (Egorov N.S., 2004). Plăcile de agar au fost inoculate cu suspensii bacteriene, după care discurile filtrante impregnate cu derivați pABA la concentrații de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> mM au fost plasate în centrul plăcii Petri, separat pentru fiecare bacterie.

În livada de meri au fost efectuate tratamente cu suspensia bacteriană *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* și derivați de pABA în combaterea larvelor viermelui de măr prin pulverizare manuală. Experiența a fost realizată în 8 variante cu 3 repetiții, în fiecare repetiție 3 pomi. Variantele experienței: 1) Martor; 2) Standard chimic Avaunt-15 EC, 0,4 l/ha; 3) Standard biologic „Actoverm Formula”; 4) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1,5×10<sup>9</sup> + pABA 10<sup>-2</sup> mM; 5) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1,5×10<sup>9</sup> + pABA 10<sup>-4</sup> mM; 6) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1,5×10<sup>9</sup> + pABA 10<sup>-6</sup> mM; 7) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 1,5×10<sup>9</sup>; 8) pABA 10<sup>-6</sup> mM.

Au fost efectuate 6 tratamente cu suspensia *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* contra viermele merelor (*Cydia pomonella* L.) în prima decadă a lunii mai contra I, II generație.

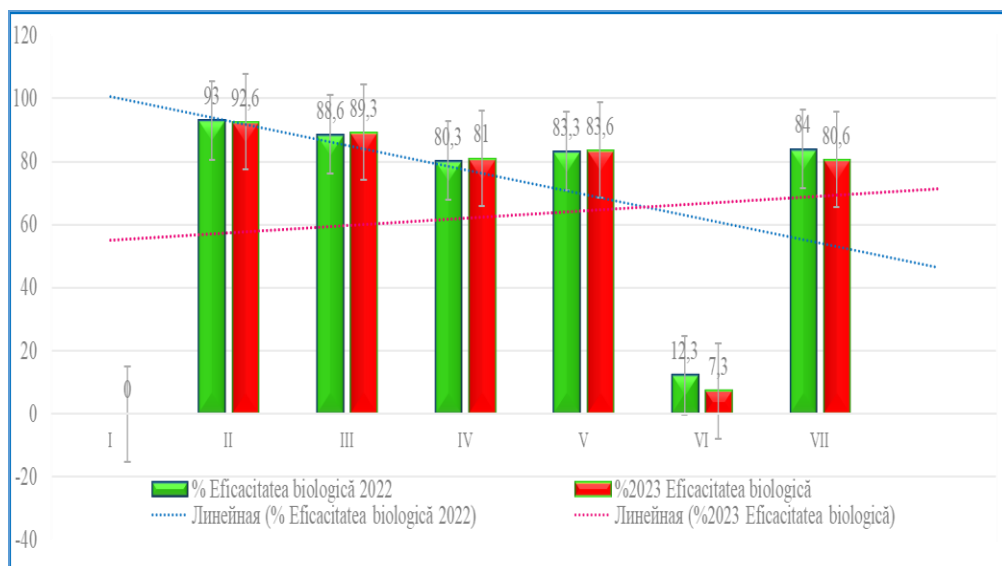


**Figura 3. Eficacitatea biologică a suspensiei bacteriene *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* contra viermele merelor (*Cydia pomonella* L), I generație, soiul Renet Simerenco**

Variante: I - Martor; II- *Et. Avaunt* -15EC; III- *Et.biologic "Actoverm Formula"*, Ucraina; IV - *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*+ PABA  $10^{-4}$ ; V - *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* + PABA  $10^{-6}$ ; VI - PABA  $10^{-6}$ ; VII - *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Conform datelor obținute la martor, numărul fructore de măr afectate a fost de 91%. Când pomii au fost tratați cu suspensie de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, numărul de fructe afectate a fost de 19,3%, iar eficiența biologică a constituit 80,6%. Aplicarea amestecurilor din rezervor cu derivați de PABA a crescut eficiența biologică a acestora în protecția fructelor de măr împotriva larvelor la Viermele merelor.

Concentrațiile mici de PABA  $10^{-4}$  și PABA  $10^{-6}$  în amestecurile din rezervor a mărit efectul de protecție, deteriorarea fructelor a scăzut la 18,3% și 17,3%, iar eficiența biologică a crescut la 81,6% și, respectiv, 82,6%. Eficacitatea etalonului chimic a fost de 92,6%, iar etalonul biologic a fost de 89,3%.

Un efect destul de benefic al microorganismelor și derivaților acidului para-aminobenzoic (PABA) s-a înregistrat asupra creșterii și maturării lăstarilor în timpul cercetării. Tratarea plantelor de măr atât cu derivați PABA la plantele pomicole, cât și cu suspensiei entomopatogene de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (titrul  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml) + derivați acidului para-aminobenzoic (PABA),  $10^{-6}$  mM a condus la optimizarea proceselor de creștere, care se confirmă prin sporirea lungimii liniare a lăstarilor anuali cu 5-8 cm respective (Figura 4).

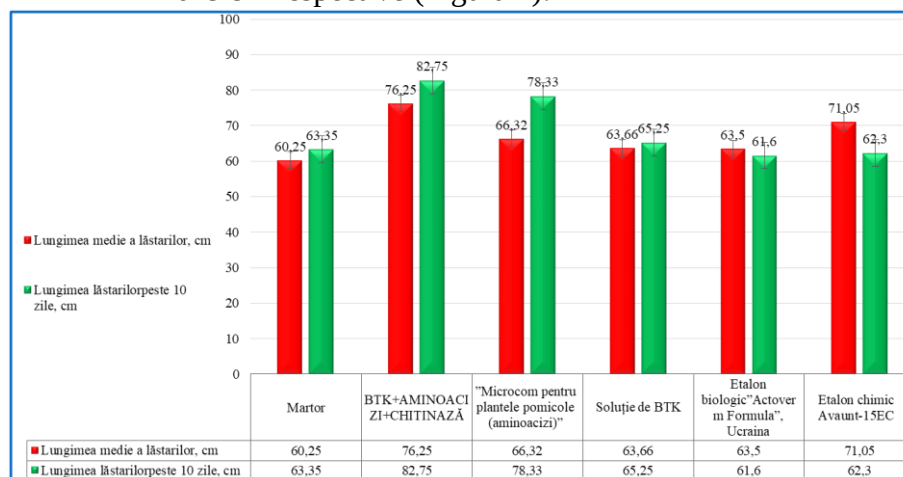


**Figura 4. Creșterea lăstarilor plantelor pe rod în funcție de tratarea foliară, soiul Renet Simerenco**

Determinarea creșterii și maturării lăstarilor, evident a demonstrat efectul benefic al derivațiilor PABA și microorganismelor asupra maturării lăstarilor anuali, ce contribuie la realizarea potențialului de rezistență a plantelor de măr și corespunzător, la sporirea productivității plantelor.

Cercetările noastre efectuate la determinarea lungimii lăstarilor și maturării lor la plantele de măr au scos în evidență, că tratarea foliară a plantelor cu metaboliții bacterieni a condus la sporirea lungimii medii a lăstarilor comparativ cu varianta martor. O acțiune mai pronunțată a fost înregistrată în variantele fertilizate suplimentar și cu derivații PABA la plantele pomicole, unde acest indicator a atins cele mai mari valori.

**Notă.** Cercetările au fost realizate în cadrul subprogramului: 011103 „Elaborarea mijloacelor ecologic inofensive de reducere a impactului organismelor dăunătoare ale culturilor agricole pe fundalul schimbărilor climatice”, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al RM.

### Referințe bibliografice

1. Paini A, Sheppard D.R., et al. *Global threat to agriculture from invasive species*. Proceedings of the National Academy of Science USA, 2016, vol. 113, p. 7575-7579.
2. Skendžić, S., Zovko, M. et al.. *The Impact of climate change on agricultural insect pests*. Insects, 2021, vol.12, p 440.<https://doi.org/10.3390/insects12050440>
3. Cojevniceva, N. *Vlianie para-aminobenzoinoi cisloti na aktivnosti dezosiiribonucleazi intactogo i oblucenogo preparata* / Н. А. Кожевникова, И. А. Рапопорт, Е. А. Иванитская, И. Д. Пудрина. In: Reports of the Academy of Sciences of the SSSR, 1983, vol. 273, nr.2, p. 476–479.
4. Petrovskii, F & Caractov S. *Microbiologiceskie preparati v rastenivodstve*. In: Zasita rastenii, 2017. vol. 2, p.14-18.[in Russian] <https://doi.org/10.25630/PAV.2022.34.66.001>
5. Eigeis, N. *Isledovanie deistvia antiohidanta para-aminobenzoinoi cisloti na zernovie i drugie culituri* / N.S. Eiges, G.A. Volchenko, S.G. Volchenko // New and non-traditional plants and perspectives of their use: mater. XI International symposium, Pushchino, 15–19 June 2015.– Moscow: RUDH,172–176.[in Russian]
6. Large workshop on microbiology. M., Higher School. 1962, 490 p.
7. Weather and climate. available <http://www.pogodaiklimat.ru/archive.php>. [ cited 10.05.2023].
8. Доспехов, Б.А. *Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)*. In: Москва: Агропромиздат, 1985, 351 с.
9. Кожевникова, Н. А. Влияние пара-аминобензойной кислоты на активность дезосирибонуклеазы интактного и облученного препарата / Н. А. Кожевникова, И. А. Рапопорт, Е. А. Иванитская, И. Д. Пудрина // Доклады АН СССР, 1983, Т. 273, № 2., с. 476–479.
10. Тихонович, И.А., Кожемяков, А.П., Чеботарь, В.К. и др. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. In: . Москва: Россельхозакадемия, 2005, 154 с.