

Trabajo Original

Ecotoxicología

Toxicidad del Nematicida Biológico HeberNem en maíz, Frijol Negro y Soja.

Carballo Hondal O¹, Trujillo Hernández J², Ramírez Núñez Y³, Mena Campos J³

¹ Centro de Investigaciones Pesqueras. Calle 242 y 5^{ta} Ave. Playa. C. Habana. Cuba.

e-mail: onelio@cip.telemar.cu

² Centro Nacional de Toxicología.

³ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey.

Resumen

El nematocida biológico HeberNem® usado para el control de poblaciones de nemátodos en varios cultivos, contiene como agente activo a la bacteria *Tsukamurella paurometabola*. El objetivo del trabajo fue determinar el potencial fitotóxico del HeberNem® sobre plantas terrestres no blanco.

Se utilizaron semillas de *Zea mays*, *Phaseolo vulgaris*, *Glycine max*, con una germinación del 100%. Se sembraron en 400 g de suelo Ferralítico rojo a razón de tres semillas por replicas, quedando conformado dos grupos experimentales, un control negativo y un tratado en cada especie ensayada. El producto se aplicó a la concentración de 10^7 ufc / ml en el volumen de agua de riego. Se realizaron observaciones diarias y se cuantifico el número de semillas germinadas, el peso fresco de las plantas y las unidades formadoras de colonias (ufc) del micro organismo presente en el suelo y en las partes de las plantas.

No se observaron efectos fitotóxicos en ninguna de las especies expuestas al microorganismo. En los días 7 y 21 del ensayo, se cuantificaron en raíces y tallos valores en el orden de $10^2 - 10^3$ ufc / g de peso fresco, también en suelo al final del estudio, se cuantifico una concentración en el orden de 10^2 ufc / g de suelo.

Estos resultados son similares a los reportados para la *Beauveria bassiana* cepa GHA, las concentraciones del agente activo encontradas no están asociadas a infectividad en las plantas. No se produjo fitotoxicidad observable en estas especies bajo las condiciones de estudio.

Palabras claves: *Tsukamurella paurometabola*, HeberNem®, toxicidad en plantas.

Abstract

Toxicity of Biological Nematicidal HeberNem® in Mays, Phaseolo and soja

HeberNem®, a biological nematicide, used for controlling nematode populations in different crops, contains as an active agent the bacterium *Tsukamurella paurometabola*. The objective of investigation was determine the phytotoxic potential of HeberNem® in non target terrestrial plants.

Zea Mays, Phaseolo vulgaris and Glycine max seeds with a 100% of germination were used. The seed were planted on 400 g of red ferralitic soil at the rate of three seeds per replica. Two experimental groups were created a negative control and one group treated per each tested specie. The product was applied at a concentration of 10^7 ufc / ml in the volume of the water system. Daily observations were carried out, germinated seeds were quantified as well as the fresh weight of plants and the colony former unit (ufc) of the microorganism present in the soil and in the parts of the plant.

Non phytotoxic effects were observed in any of the species exposed to the species exposed to the microorganism. In the 7 and 21 days of the assay, valves of $10^2 - 10^3$ ufc/g of fresh weight were quantified in roots and stems. In addition, in the final soil of the study, a concentration of 10^2 ufc / g of soil was determined.

These results are similar to the ones reported for Beauveria bassiana strain GHA, the concentrations found for the active agent are not related to the infectivity of the plants. An observable phytotoxicity was not found in these species under the present test conditions.

Key words: *Tsukamurella paurometabola*, HeberNem®, Phytotoxicity, terrestrial plants, *Zea mays*, *Phaseolo vulgaris*, *Glycine max*.

Introducción

La contaminación ambiental constituye uno de los problemas que más interés y preocupación han generado en los últimos años. Específicamente la contaminación de las aguas y los suelos son hoy una seria dificultad que enfrentan los países desarrollados y los que están en vía de desarrollo. Las estadísticas muestran que un 51 % de los desechos tienen como destino final los ríos, embalses y aguas costeras.²

El uso de plaguicidas o productos fitosanitarios, junto a otras prácticas agrícolas, ha supuesto un incremento en el rendimiento de las cosechas de todo el mundo. Sin embargo se reconoce que el empleo de estos productos está asociado con un riesgo potencial para los seres humanos y el medio ambiente, fundamentalmente las consecuencias drásticas que han provocado en la biodiversidad de los agroecosistemas^{12,13}.

La determinación de la ecotoxicidad, se ha convertido en uno de los aspectos más importantes a evaluar cuando se trata de contaminación en un ecosistema. Para estas determinaciones se utilizan diferentes bioensayos con organismos acuáticos y terrestres, ya que son los mejores bioindicadores de cualquier efecto de toxicidad en un ecosistema y en el medio ambiente¹

En Cuba la producción de bioplaguicidas por métodos artesanales e industriales se ha estabilizado y permitido al país contar con recursos en un campo tan importante como la protección fitosanitaria de los cultivos.

El plaguicida biológico HeberNem[®] es un formulado en un polvo sólido seco, muy fino estable que ha demostrado efectividad en el control de nemátodos de las especies *Meloidogyne incógnita*, *Radopholus similis* y *Pratylenchus ssp.* producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camaguey¹⁷. El HeberNem[®] se encuentra registrado en Cuba y es utilizado en la agricultura cubana con gran efectividad como nematicida. El agente activo de este producto es la bacteria gram-positiva *Tsukamurella paurometabolum*, cepa – 924, posee una alta actividad biológica demostrada mediante la producción de sulfuro de hidrogeno y quitinasas, las cuales ejercen la acción nematicida

cuando ambos componentes se aplican de manera concurrente sobre los huevos y larvas de nemátodos. La efectividad del producto tiene lugar cuando las bacterias están vivas y la concentración de aplicación en la agricultura es de $10^6 - 10^7$ ufc / ml, la cual es la concentración letal media (CL_{50}) para el control de fitonemátodos en el suelo. La dosis de aplicación varía de 500 g – 10 kg / ha para los cultivos de tomate, pepino, lechuga, melón, etc.; y de 200 g – 4 kg / ha para los cultivos de guayaba, banano, plátano, etc., Las células vivas del producto, mantienen su estabilidad en el suelo durante varios meses después de ser aplicado. Paulatinamente su presencia en el mismo disminuye hasta llegar a niveles no detectables³.

El objetivo de este trabajo fue determinar la fitotoxicidad de HeberNem® sobre plantas terrestres expuestas. Se emplearon las especies *Zea mays* (maíz), *Phaseolo vulgaris* (frijol negro) y *Glycine max* (soja). Se realizó un estudio de toxicidad aguda según las guías descritas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA)^{4,5}. de los Estados Unidos y la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD)⁶.

Materiales y Métodos

Este estudio se realizó en los laboratorios de ecotoxicología de la subdirección de evaluaciones toxicológica y medio ambiente del Centro Nacional de Toxicología (CENATOX) en ciudad habana. Cuba.

La sustancia de ensayo estudiada es la formulación final del bioproducto HeberNem®, que se aplica en la agricultura y se elabora a base del microorganismo *Tsukamurella paurometabola*. Los componentes de su formulación son la levadura torula (30 g/l) y goma xantano (0.2 %).

Sistema de estudio

Se utilizaron tres especies de plantas terrestres *Z. mays*, monocotiledónea, familia de las gramíneas poaceae, con un 100 % de germinación y las leguminosas *P. vulgaris* y *G. max*, frijol negro y soja respectivamente con 100 % de germinación.

Todas procedentes del Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Alejandro de Humboldt (INIFAT), perteneciente al Ministerio de la Agricultura (MINAGRI).

Se emplearon semillas sanas y libres de agentes químicos, su selección se basó en que son especies utilizadas históricamente para determinar fitotoxicidad y además por cumplir los criterios de selección^{7, 18}.

Diseño experimental

Este estudio se corresponde con las guías EPA^{4, 5} y OECD⁶ que describe los protocolos para los estudios de toxicidad aguda en plantas terrestres no blanco.

Preparación y aplicación de la sustancia

Se realizó a partir de la formulación final del HeberNem[®], en forma de polvo soluble en agua a una concentración de 10^{11} ufc / ml, la cual fue diluida hasta obtener la concentración de 10^7 ufc / ml, que equivale a la de máxima aplicación en el campo. Las soluciones fueron incorporadas sobre la superficie del suelo y se plantaron las semillas¹⁹, el volumen aplicado de la sustancia de prueba fue de 168 ml para el primer riego teniendo en cuenta la humedad del suelo del 75% y la cantidad de suelo por pote, la profundidad de siembra fue de 1cm.

Se plantaron tres semillas de la misma especie en cada pote o replica, correspondiendo a dos potes y un total de 6 plantas en cada muestreo a los 7, 14 y 21 de días de duración del ensayo. Los potes utilizados fueron de 500 g y el volumen de tierra usado fue de 400 g. el formulado fue disuelto con agua destilada.

Grupos de tratamiento

La siembra de las semillas se realizó aleatoriamente, tres semillas por pote, según tamaño y características botánicas de cada especie. Se evitó el solapamiento de las hojas entre sí durante su crecimiento.

Se crearon dos grupos experimentales con dos replicas con tres semillas en cada replica por especie, el grupo control negativo y el grupo tratado con la formulación final a la concentración de 10^7 ufc / ml.

Observaciones durante el estudio

Posterior a la aplicación de la sustancia se realizaron observaciones diarias, registrando el número de semillas germinadas y signos de fitotoxicidad. En los días 7, 14 y 21 del estudio se cuantificó al microorganismo en suelo, raíz, tallo y hojas. Los signos de toxicidad medidos fueron clorosis, rayas amarillas intervenales, deformación de la raíz, deformaciones foliares, atrofia del crecimiento, crecimiento lento, color púrpura en tallo y/o hojas, inclinación del tallo y hojas cerradas.

Determinación del microorganismo.

La determinación del microorganismo se realizó según el procedimiento establecido en el laboratorio, se tomó 1 g de suelo y 1 g de las partes de la planta en 10 ml agua destilada, se maceró, disolvió y filtró, se aplicó en las placas del medio de cultivo selectivo para este tipo de microorganismo según la técnica descrita en el expediente de producto y la literatura^{3, 17, 21}.

Análisis estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar para el peso de la planta y cada una de sus partes (raíz, tallo y hojas), así como para los valores de cuantificación del microorganismo, en suelo, raíz, tallo y hojas. Estadísticamente se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de comparación múltiple de la media de los grupos con un nivel de significación del 5 % ($p < 0.05$) para todas las variables, utilizando el programa Dunnett.⁸

Resultado y discusión

La valoración de riesgo medioambiental de plaguicidas regulada por las Directivas 2001/36/CE y 2005/25/CE están constituidas por una serie de procedimientos, destinados a conocer el comportamiento ambiental y la ecotoxicidad de cada compuesto biológico que se quiera registrar como sustancia activa lo cual autoriza su uso como producto formulado a nivel nacional^{9,10}.

En las tres especies evaluadas no se observó ningún efecto del bionematicida sobre la germinación, se obtuvo un 100 % de semillas germinadas e igual porcentaje en la emergencia.

Durante el desarrollo y la culminación de este estudio no se observaron daños visuales, ni signos de fitotoxicidad en los dos grupos experimentales en cada especie, lo que demuestra que el HeberNem[®] no induce fitotoxicidad aguda a las plantas no objetivo como el maíz, el frijol negro y la soja.

Por otra parte, se observaron diferencias significativas entre los grupos control negativo y el tratado, en cuanto al peso fresco de las raíces, los tallos y las hojas, en plantas de maíz y soja según las tablas 1, 2, 3. Esto no se asocia por la exposición al producto HeberNem[®], dado a que en los grupos tratados de las distintas especies evaluadas, no se presentó ningún otro signo de fitotoxicidad atribuible a estas diferencias estadísticas con respecto al peso fresco de las plantas. Resultados similares se reportan por la EPA para la *Beauveria bassiana* cepa GHA la cual no ha resultado tóxica para las plantas según estudios de laboratorio¹¹.

En las tres especies estudiadas se detectó al microorganismo en la raíz y en el tallo a partir del día 14 del estudio, en las leguminosas se encontraron ufc desde el día 7. No se observaron ufc en las hojas de ninguna de las tres especies durante el tiempo de ensayo (tabla 5). Las concentraciones del microorganismo encontradas en raíz y tallo de las tres especies, son relativamente bajas de acuerdo a la duración del estudio (21 días), las mismas no causaron fitotoxicidad atribuible al producto, por lo que sería necesario diseñar un ensayo con las tres especies que abarque hasta la cosecha. Las

concentraciones encontradas del agente activo no están asociadas a infectividad en las plantas. Los niveles de microorganismo detectados en raíces están en el mismo orden que los encontrados por otros autores^{14, 15, 16}, y los niveles de microorganismo detectado en tallo consideramos niveles bajos teniendo en cuenta el tiempo de duración del ensayo de laboratorio, la translocación hacia el tallo a niveles bajos detectados no tendrá posibilidad de producir toxicidad en la cadena alimentaria, teniendo como referencia investigaciones anteriores sobre la no toxicidad del HeberNem en mamíferos y aves expuestos a dosis altas del formulado²⁰.

El plaguicida biológico HeberNem[®] formulación final que contiene como agente activo *Tsukamurella paurometabola*, evaluado a una concentración de 10^7 ufc / ml, no produjo fitotoxicidad en las especies de plantas terrestres ensayadas.

La presencia del agente activo, en la raíz y el tallo de las plantas estudiadas, indican la necesidad de prolongar los estudios hasta completar el ciclo vegetativo.

Referencias bibliográficas.

1. Carballo Hondal. O. 2003. Estudios Ecotoxicológicos del Bionematicida HeberNem®. Tesis en oposición al título académico de Master en Toxicología Experimental. La Habana: CENATOX.
2. Repetto M. 1995. Toxicología Avanzada. Madrid: Ed. Díaz de Santos.
3. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey. 2001. Proyecto Nematicida. Información HeberNem. Expediente para registro. Camagüey: CIGB Camagüey.
4. EPA, 1996. United States Environmental Protection Agency Prevention, Pesticides y Toxic substances (7101) EPA 712 – C – 96 – 335 February. Microbial Pesticide Test Guidelines.
5. EPA, 1996. Environmental Protection Agency: Microbiol pesticide test guidelines. OPPTS 885.4300. Nontarget plant studies, Tier I. /s.l/:
6. OECD, 2000. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals. Terrestrial (Non – target) Plant test: 208 A: Seedling Emergence and Seedling Growth test. Paris.
7. EPA, 1994. Environmental Protection Agency: Pesticide reregistratium. rejection rate analysis. Ecological effects. 738 – R – 94 – 035. /s.
8. EPA, 1998. Environmental Protection Agency: Dunnett Programa Version 1.5, Ecological Monitoring Research Toxicity test / s. I .
9. CE, 2001. Comisión del consejo relativa a la comercialización. Directiva 2001 / 36 / CE. Diario Oficial Jun. 20; p. 1-38.
10. CE, 2005. Comisión del consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Directiva 2005 / 25 / CE. Diario oficial. Mar. 14; 2005. p. 1-34.

11. EPA, 2003. Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Biopesticide fact sheet. *Beauveria bassiana* strain GHA (128924). Disponible en URL: <http://www.epa.gov/pesticide/biopesticide/factsheet/>.
12. Peña E., Gómez EC, 2000. Evaluación toxicológica de plaguicidas y la sanidad ambiental. Murcia: AET.
13. Uhart M, Zaccagnini ME., 1999. Manual de procedimientos operativos estandarizados de campo para documentar incidentes de mortalidad de fauna silvestre en agroecosistemas. Argentina: INTA.
14. Ferry BR, Kikwood IA, De Leij FAAM, Barba J, Leidens BM, Brookes PC. 1993. Growth and survival of *verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. Biocontrol Sci. Technol; 3: 355-365.
15. Peteira B, Montes de Oca N, Atkins S, Hidalgo L, and Kerry BR. 2005. Estudio de estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*. Parte II Indicadores bioquímicos. Rev. Protección Vegetal; 20 (2).
16. García García L. 2006. Evaluación Toxicológica y Ecotoxicológica de un Bionematicida constituido por la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*. Tesis en oposición al título académico de Doctor en Ciencias. La Habana: CENSA..
17. Hernandez A, Weekers F, Mena J, Pimentel E, Zamora J, Borroto C, Thonart P. 2007. Culture and spray-drying of *Tsukamurella paurometabola* C-924: Stability of formulated powders. Biotechnol Lett. 29 (11): 1723-8.
18. Chung MK, Hu R, Wong MH, Cheung KC. 2007. Comparative toxicity of hydrophobic contaminants to microalgae and higher plants. Ecotoxicology, 16 (5): 393-402.
19. Lin Q, Shen KL, Zhao HM, Li WH. 2007. Growth response of *Zea mays* L. in pyrene-copper co-contaminated soil and the fate of pollutants. J Hazard Mater, May 5.

- 20.** Castro Beiro O. 2003. Evaluación toxicológica del HeberNem[®] en mamíferos. Estudio del I Segmento. Tesis en oposición al título académico de Master en Toxicología Experimental. La Habana: CENATOX.
- 21.** Steinhaus, E. 1941. A study of the bacteria associated with thirty species of insects. J Bacteriol, 42; 757 – 790.

Tabla N° 1. Peso fresco del Maíz (Zea mays) (g) durante el ensayo.

MAIZ			Grupo Control Negativo				Grupo Tratado con Hebernem			
Días	n		Raíz	Tallo	Hojas	Planta	Raíz	Tallo	Hojas	Planta
7	6	X	0.82 7	0.54 4	1.290	2.140	0.659 *	0.425 *	0.572 *	1.657 *
		± SD	0.10	1.10	0.70	0.29	0.19	0.07	0.16	0.38
14	6	X	0.98 4	0.76 6	1.130	2.879	1.196	0.876	1.375	3.448
		± SD	0.18	0.19	0.18	0.52	0.48	0.29	0.43	1.18
21	6	X	1.10 8	1.75 0	2.358	5.216	1.112	1.252 *	1.937 *	4.301
		± SD	0.2	0.4	0.4	0.9	0.3	0.4	0.5	1.2

*Diferencias significativas respecto al control negativo (p<0,05)

Tabla N°2. Peso fresco de la soja (glycine max) (g) en el ensayo.

SOYA			Grupo control negativo				Grupo Tratado con Hebernem			
Días	n		Raíz	Tallo	Hojas	Planta	Raíz	Tallo	Hojas	Planta
7	6	X	0.38 8	0.78 3	0.664	2.073	0.276 *	1.066	0.324 *	1.634 *
		± SD	0.1	0.4	0.38	0.29	0.03	0.03	0.06	0.13
14	6	X	0.30 1	1.16 7	0.579	2.048	0.529 *	0.890 *	0.640	2.059
		± SD	0.06	0.14	0.12	0.12	0.26	0.34	0.06	0.28
21	6	X	0.84 5	1.35 0	1.425	3.626	0.680 *	1.355	1.455	3.049
		± SD	0.1	0.3	0.1	0.5	0.2	0.2	0.3	0.7

*Diferencias significativas respecto al control negativo (p<0,05)

Tabla N° 3. Peso fresco del frijol negro (*Phaseolo vulgaris*) (g) en el ensayo.

FRIJOL		Grupo control negativo				Grupo tratado con Hebernem				
Días	n		Raíz	Tallo	Hojas	Planta	Raíz	Tallo	Hojas	Planta
7	6	X	0.64 0	0.60 1	1.142	2.156	0.55 7	0.59 4	0.886	2.038
		± SD	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.13	0.4	0.7
14	6	X	0.88 2	0.60 3	2.140	3.512	0.84 4	0.62 9	2.155	3.720
		± SD	0.61	0.15	0.8	1.45	0.13	0.11	0.46	0.72
21	6	X	1.33 4	1.02 2	3.945	6.301	1.38 3	1.20 3	4.539	7.127
		± SD	0.6	0.4	1.6	2.6	0.6	0.3	1.0	1.9

* Diferencias significativas respecto al control negativo (p<0,05)

Tabla N° 4. Cuantificación de las ufc de *Tsukamurella paurometabolum* C-924, en el suelo y en las plantas expresadas como la X ± SD ufc/g.

CULTIVOS	DIAS	SUELO	RAIZ	TALLO	HOJAS
MAIZ	0	1.27 ± 0.3 x 10 ⁵	-	-	-
	7	9 ± 0.3 x 10 ³	2.0 ± 1.9 x 10 ³	0	0
	14	1.7 ± 1.2 x 10 ³	1.9 ± 2.0 x 10 ³	5.9 ± 4.0 x 10 ³	0
	21	6.75 ± 5.25 x 10 ²	5.8 ± 3.0 x 10 ²	4.0 ± 3.0 x 10 ²	0
SOYA	0	1.0 ± 0.3 x 10 ⁵	-	-	-
	7	3.45 ± 1.3 x 10 ³	1.3 ± 0.9 x 10 ⁴	5.4 ± 7.0 x 10 ²	0
	14	1.95 ± 1.5 x 10 ³	2.1 ± 2.5 x 10 ³	5.7 ± 2.5 x 10 ³	0
	21	1.4 ± 1.2 x 10 ³	1.24 ± 1.5 x 10 ³	1.26 ± 2.0 x 10 ³	0
FRIJOL	0	1.15 ± 0.1 x 10 ⁵	-	-	-
	7	5.65 ± 1.5 x 10 ³	6.6 ± 4.0 x 10 ³	2.8 ± 2.0 x 10 ³	0
	14	3.7 ± 1.0 x 10 ³	2.1 ± 1.5 x 10 ³	8.7 ± 6.5 x 10 ³	0
	21	6.29 ± 4.4 x 10 ²	6.5 ± 9.0 x 10 ²	6.5 ± 9.0 x 10 ²	0

Recibido: 30/06/08

Aceptado: 03/09/08