

Estudio de compatibilidad “in vitro” de los productos OLeonim 80, Neonim 60 y Azadirachtin frente a biocontroles de origen bacteriano

Resumen

El INIFAT (Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”); lleva años de investigación en el árbol del Nim (*Azadirachta indica*, Juss). Productos como OLeonim- 80 y Neonim- 60, entre otros se elaboran en la planta piloto de este Instituto. La utilización correcta de estos formulados y su vinculación con otros bioplaguicidas harán nuestra agricultura más ecológica. En el presente trabajo estudiamos “in vitro”, por el método de inhibición zonal en placa la compatibilidad de los productos OLeonim -80, Neonim -60 y Azadirachtin (de factura extranjera), a las dosis recomendadas frente a los biorreguladores: *Bacillus thuringiensis* (insecticida), *Bacillus subtilis* (fungicida-bactericida), *Pseudomonas fluorescens* (bactericida) y *Bulkholderia cepacea* (fungicida). Los resultados evidenciaron que *Bacillus thuringiensis* mostró mayor sensibilidad frente a lo tratamientos realizados. *Bacillus subtilis* fue inhibido por la acción de Azadirachtin, mientras que con los productos OLeonim-80 y Neonim-60 fue compatible, al igual que los biocontroles *Pseudomonas fluorescens* y *Bulkholderia cepacea*, quienes además no mostraron sensibilidad con el Azadirachtin a las dosis recomendadas. Neonim-60 mostró menor acción inhibitoria que el resto de los plaguicidas. OLeonim-80 tuvo ocasionalmente acción inhibitoria no diferenciada significativamente con el Azadirachtin producto de peor comportamiento.

Palabras clave: Nim, Compatibilidad, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bulkholderia cepacea*, *Pseudomonas fluorescens*.

Introducción

EL árbol del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) se inserta en la agricultura cubana con todas sus potencia-

lidades en el combate contra las plagas, haciendo de ella una agricultura más ecológica. La planta puede ofrecer un gran número de subproductos altamente competitivos con los insecticidas sintéticos. Diferentes ensayos han corroborado además su efectividad inhibitoria “in vitro” frente a hongos fitopatógenos (Ortiz et al., 2000; Zayas et al., 2000), y su compatibilidad con hongos entomopatógenos (López et al., 1996).

La efectividad biológica de sus principios activos como insecticida, nemátocida y acaricida ha sido avalada por el trabajo de eminentes científicos a nivel mundial. Ellos actúan como repelente, antialimentario, reguladores del crecimiento, inhibidores de la oviposición y provocan la muerte de éstos por su acción directa. Plagas como *Bemisia tabaci*, *Diaphania hyalinata*, *Diadrotica balteata*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera frugiperda*, *Mocis latipes* y *Thrips tabaci*, entre otras, son susceptibles a la acción de estas sustancias activas (Pereira et al., 1994; Schmutlerer, 1994; Taveras, 1994; Chiang et al., 1996).

El INIFAT lleva años de investigación con el árbol del Nim. Los trabajos han estado encaminados al establecimiento del cultivo, así como introducción y elaboración de una tecnología cubana para la producción de plaguicidas a partir de sus materias primas. Productos como OLeonim 80, Neonim 60, entre otros se elaboran en la planta piloto de este Instituto, cuya acción insecticida ha sido avalada por otros trabajos de investigación (Zequeira et al., 1996; Estrada et al., 1996, 1998).

La utilización correcta de los formulados a partir del árbol de Nim y su vinculación con otros bioplagicidas harán nuestra agricultura más ecológica y sostenible. En el presente trabajo estudiamos la compatibilidad “in vitro” de los productos OLeonim 80, Neonim 60 y Azadirachtin (de factura extranjera), a las dosis recomendadas

frente a bioreguladores de origen bacteriano utilizados en el control de insectos, bacterias y hongos.

Materiales y métodos

En el ensayo se utilizaron los bioplaguicidas de origen botánico, elaborados en la planta piloto del INIFAT; **Oleonim 80**, **Neonim 60** y **Azadirachtin** (SIPCAM-INAGRA) España, a las dosis recomendadas: 5cc/ l de agua y 10 cc/ l de agua. Además se empleo como variante el producto puro, con el objetivo de medir la magnitud de la interrelación producto- microorganismo.

Los biocontroles utilizados fueron *Bacillus thuringiensis*; cepa LBT-13 y LBT- 24 (insecticida), *Bacillus subtilis* (funguicida- bactericida), *Pseudomonas fluorescens* (bactericida) y *Burkholderia cepacea* (funguicida); procedentes del laboratorio de bacteriología del INIFAT.

Se prepararon por cada organismo microbiano, 9 erlenmeyers que contenían 20 ml de medio LPGA (extracto de levadura- peptona- glucosa- agar) licuado, a los que se le adicionaron 0,5 ml de la suspensión bacteriana de los biocontroles a la concentración de 10^{-9} ufc/ ml. Posteriormente fueron agitados para homogenizar el medio y se vertieron en placas petris de 15 cm de diámetro. Cuando se solidificó por el Método de Inhibición Zonal en placa (Mariano, 1993), se realizaron cuatro pozos por placa, adicionándole en cada pozo 0,5 ml de la disolución Azadirachtin, Oleonim 80 y Neonim 60 a las dosis empleadas, producto puro y agua destilada y estéril como control.

Las placas se colocaron en incubadora a 28 °C realizándose las mediciones de los halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas. Se seleccionaron las mediciones obtenidas a las 72h. para el análisis.

El experimento se realizó dos veces y se replicó tres veces por cada tratamiento.

Los datos se procesaron de acuerdo a un Anova y las medias se compararon por la prueba de Duncan al 5%.

Resultados y discusión

La acción a las cepas de *Bacillus thuringiensis* frente de los productos Azadirachtin, Oleonim-80 y Neonim-60, fue diferente. La cepa LBT-13 mostró menor sensibilidad que la cepa LBT-24, cuyos halos de inhibición por la acción del Oleonim-80 y Neonim-60 llegaron a ser más amplios que los observados en la cepa LBT-13. El tratamiento con Azadirachtin mantuvo más uniformidad en su comportamiento frente a estas dos cepas microbianas, Tabla 1 y 2.

Los tratamientos **Oleonim-80** y **Neonim-60**, difirieron significativamente de **Azadirachtin**, a las dosis recomendadas frente a la cepa LBT-13, (Tabla 1). El halo de inhibición fue aumentando a medida que las dosis de los productos se hicieron mayores; en este sentido sólo el **Azadirachtin** mostró diferencias significativas entre dosis. **Neonim-60** mantuvo igual comportamiento entre las dosis y aunque la inhibición fue mayor con el producto puro no difirieron significativamente entre sí. La acción inhibidora del **Azadirachtin** a la dosis 5 cc/l de agua fue mayor que la del **Neonim-60** producto puro, e igual que la del **Oleonim-80**, a esta misma concentración, ello evidenció la acción tan severa de este producto.

La acción inhibidora de los productos utilizados fue más notoria frente a la cepa LBT-24, (Tabla 2). **Neonim-60** producto de mejor comportamiento fue capaz en su estado puro de originar sensibilidad sobre LBT-24 similares a los originados por **Azadirachtin** a la dosis de 5cc/l de agua frente a LBT-13, lo que evidenció lo antes expuesto, Los resultados obtenidos con **Oleonim.80** fueron intermedios a los del **Azadirachtin** y el **Neonim-60**, productos que presentan diferencias significativas a las mismas dosis.

Dosis	Azadirachtin	Oleonim-80	Neonim-60
5 cc./l de H ₂ O	17 b	8.15 d	9.00 cd
10 cc./l de H ₂ O	21.18 a	8.50 cd	9.00 cd
Puro	22.00 a	17.00 b	12.00 c
Agua(control)	0 e	0 e	0 e

TABLA 1.- SENSIBILIDAD DE *BACILLUS THURINGIENSIS*, CEPA LBT-13

A LOS TRATAMIENTOS, HALO DE INHIBICIÓN EN ML.

Significativo para > 0.001

Letras con medias comunes no difieren significativamente

Dosis	Azadirachtin	Oleonim-80	Neonim-60
5 cc./l de H ₂ O	21.17 bcd	16.77 cde	14.50 e
10 cc./l de H ₂ O	22.00 bc	19.42 bcde	16.00 de
Puro	28.87 a	24.42 ab	17.00 cde
Agua(control)	0 f	0 f	0 f

TABLA 2.- SENSIBILIDAD DE *BACILLUS THURINGIENSIS*, CEPA LBT-24

A LOS TRATAMIENTOS, HALO DE INHIBICIÓN EN ML.

Significativo para p>0.001

Letras con medias comunes no difieren significativamente

Los resultados demostraron que los productos obtenidos en el INIFAT, Oleonim-80 y Neonim-60 a las dosis indicadas para la lucha contra las plagas inhibieron las cepas de *Bacillus thuringiensis*, LBT-13 y LBT-24, pero en todos los casos siempre menor que cuando se usó el Azadirachtin, producto cuyo solvente lo constitu-

ye la Nafta. López et al. (1996) demostraron la incompatibilidad “in vitro” de los extractos obtenidos a partir de la semilla del Nim y algunos de sus formulaciones a diferentes concentraciones frente a *Bacillus thuringiensis* (cepa LBT-24). Sin embargo Hellpap y Zebitz (1986) lograron controlar al mosquito *Aedes aegypti* con la mezcla de los extractos de Nim y la cepa israelensis de este microorganismo.

Bacillus subtilis biorregulador de reconocida acción fungicida y bactericida (Baker et al., 1984; Pusey et al., 1984; castellano et al., 1995; Rodríguez et al., 1995; López. M. et al., 1996 y Rodríguez et al., 2001); mostró sensibilidad sólo con Azadirachtin, la inhibición fue mayor a medida que aumentó la dosis, hubo diferencia significativa entre el estado puro del producto y la dosis de 5 cc/l de agua, Tabla 3.

Dosis	Azadirachtin	Oleonim-80	Neonim-60
5 cc./l de H ₂ O	11.64 b	0	0
10 cc./l de H ₂ O	13.84 ab	0	0
Puro	16.20 a	0	0
Agua(control)	0 c	0	0

TABLA 3.- SENSIBILIDAD DE *BACILLUS SUBTILIS* A LOS TRATAMIENTOS, HALO DE INHIBICIÓN EN ML.

Significativo para p>0.001

Letras con medias comunes no difieren significativamente

Los biocontroles *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacea* con acción bactericida y fungicida respectivamente (Rodríguez et al., 1996 y Rodríguez et al., 1997); fueron compatibles con los productos usados a las dosis recomendadas. Sólo Azadirachtin en la variante de producto puro fue capaz de inhibir el crecimiento de estas cepas, pero nunca en la magnitud de las restantes cepas estudiadas (Tabla 4 y 5).

Dosis	Azadirachtin	Oleonim-80	Neonim-60
5 cc./l de H ₂ O	0	0	0
10 cc./l de H ₂ O	0	0	0
Puro	6.5	0	0
Agua(control)	0	0	0

TABLA 4.- SENSIBILIDAD DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* A LOS TRATAMIENTOS, INHIBICIÓN EN ML.

Significativo para p>0.001

Letras con medias comunes no difieren significativamente

Dosis	Azadirachtin	Oleonim-80	Neonim-60
5 cc./l de H ₂ O	0	0	0
10 cc./l de H ₂ O	0	0	0
Puro	6.5	0	0
Agua(control)	0	0	0

TABLA 5.- SENSIBILIDAD DE *BURKHOLDERIA CEPACEA* A LOS TRATAMIENTOS, INHIBICIÓN EN ML.

Significativo para p>0.001

Letras con medias comunes no difieren significativamente

Conclusiones

Bacillus thuringiensis en cualquiera de las dos cepas utilizadas mostró mayor sensibilidad a los tratamientos utilizados que el resto de los biocontroles

La cepa LBT-24 de *Bacillus thuringiensis* fue más sensible a los tratamientos que la cepa LBT-13.

Bacillus Subtilis fue inhibido por la acción del Azadirachtin, mientras que con los productos **Oleonim-80** y **Neonim-60** fue compatible.

Pseudomonas fluorescens y *Burkholderia cepacea* fueron compatibles con los tratamientos a las dosis recomendadas, sólo fueron sensible al estado puro de **Azadirachtin**.

Neonim-60 mostró menor acción inhibitoria que el resto de los plaguicidas. **Oleonim-80** tuvo ocasionalmente acción inhibitoria no diferenciada significativamente con el **Azadirachtin**, producto de factura extranjera que mantuvo el peor comportamiento en todos los análisis.

Los tratamientos empleados mostraron mayor acción inhibitoria a medida que las dosis aumentaron **i**

Referencias Bibliográficas

- BAKER, C. J.; J. R., STAVELY; C. A., TOMAS; M., PASSER Y J. S. S., MCFALL:
1994. “Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves”. *Phytopathology* 73(8):1148-1152.
- CASTELLANO, J. J.; P. H., OLIVA; E., IZQUIERDO.; N., MORALES:
1995. “Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol de patógeno *Alternaria porri* (Ell) Lif, en cebolla”. Primer Taller Internacional y Tercero Nacional sobre Plaguicidas Biológicos de Origen Botánico. Bio PLAG 95. C. Habana, pp. 21.

- CHIANG, M. L.; M., GONZÁLEZ; R., AVILEZ; J., ESTRADA; S., FRAGA:
1995. "Efecto antiapetitivo de Oleonim-80 y Melitox (IF-43) sobre Mocis latines (Leiodoptera, Noctuidae)". Primer Taller Internacional y Tercero Nacional sobre Plaguicidas Biológicos de Origen Botánico. Bio Plag 95. C. Habana, pp. 76.
- ESTRADA, J:
1996. "Avances sobre el establecimiento del árbol del Nim en Cuba y de las investigaciones de sus productos derivados" VII Jornada Científica INIFAT, pp. 95.
- ESTRADA, L.; M. T.; LÓPEZ Y P., BARRIOS:
1998. "El Nim y sus bioinsecticidas una alternativa agroecológica" Folleto.
- HELLPAP, C. Y C. P. W., ZEBITZ:
1986. "Kombiniere Aswendung von Niem-Samca Extracten mit Bacillus thuringiensis produkten bei der Bekämpfung von Spodoptera frugiperda and Aedes spp". Z. Angen. Entomol. 101:515-524.
- LÓPEZ, M.; M. T., PÉREZ; R., MARTÍNEZ Y N., MORALES:
1996. "Efecto antagonista de Bacillus subtilis sobre diferentes aislados de Xanthomonas spp". VII Jornada Científica INIFAT. pp. 84.
- LÓPEZ, M. T.; J., ESTRADA; G., CROCHÉ; A., GONZÁLEZ; I., GONZÁLEZ Y M. E., ÁLVAREZ:
1995. "Compatibilidad de extractos naturales con hongos Entomopatògenos". Primer Taller Internacional y Tercero Nacional sobre Plaguicidas Biológicos de origen Botánico. Bio Plag 95. C. Habana, pp. 132.
- LÓPEZ, M. T.; J., ESTRADA; G., CROCHÉ; B., CASTILLO; A., GONZÁLEZ:
1996. "Resultados acerca de la compatibilidad entre productos Nim Y algunos microorganismos de interés agrícola". VII Jornada Científica INIFAT. pp. 90.
- MARIANO, R. L. R.:
1993. "Métodos de selecao "in vitro" para o controle microbiológico de patògenos de planta". Rev. ANV. Patol. PL. 1:369-409.
- ORTIZ, L.; J. J., CASTELLANO; S., FRAGA Y J., ESTRADA:
2000. "Control de la germinación conidial del Fusarium oxysporum fsp cucumerium por los bioproductos del Nim y el Bacillus subtilis (Enrenberg) Cohn". Novena Exposición Forjadores del Futuro INIFAT.
- PEREIRA, B. Y J. C., MOHN:
1994. "Cultivo y utilización del Nim". Primer Congreso Latinoamericano y del Caribe sobre Nim y otros insecticidas vegetales pp. 34.
- PUSEY, P. L. Y C. L.; WILSON:
1984. "Post harvest biological control of strepenit bron rot of Bacillus subtilis". Plant Disease Reportez 68(9):753-756.
- RODRÍGUEZ, N.; N., MORALES; I., CUELLAR; R., CASTAÑEDA; M. A., PÉREZ; M., HERNÁNDEZ; P., OLIVA; S., VIERA Y X., GARCÍA:
1995. "Efecto antagonista de Pseudomonas sp y Bacillus subtilis sobre hongos fitopatògenos del suelo". Primer Taller Internacional y Tercero Nacional sobre Plaguicidas Biológicos de origen Botánico. Bio Plag 95. C. Habana. pp. 18.
- RODRÍGUEZ, N.; N., MORALES; M., LÓPEZ; M. A., PÉREZ; T., SHAGARODSKI; R., CASTAÑEDA:
1996. "Efecto biofungicida de Pseudomonas sp.". VII Jornada Científica. INIFAT. pp. 84.
- RODRÍGUEZ, W.; M., LÓPEZ; N., MORALES Y J., GONZÁLEZ:
1997. "Efecto antagonista de Pseudomonas fluorescens sobre diferentes aislados de bacterias fitopatògenas". XII Forum de Ciencia y Técnica INIFAT.
- RODRÍGUEZ, W.; G., TEJEDA; N., MORALES; J., RODRÍGUEZ; M. E., SIMANCA Y J., GONZÁLEZ:
2001. "Control de la mancha bacteriana del tomate y el pimiento con un bioproducto a partir de Bacillus subtilis "Joven Ciencia, C. Habana.
- TAVERAS, K.:
1994. "Control de plagas con el uso del Nim en Republica Dominicana (Bemisia tabaci, Pseudoacysta perseae y otros)". Primer Congreso Latinoamericano y del Caribe sobre Nim y otros insecticidas vegetales. pp. 19-24.
- ZAYAS, M. A.; G., CROCHÉ; J., ESTRADA; J., GONZÁLEZ:
2000. "Efecto fungicida del Oleonim 80 y Neonim 60 sobre hongos fitopatògenos "XIII Seminario Científico CNIC, pp. PT-11.
- ZEQUEÍRA, P. R.; M., HERNÁNDEZ; J., ESTRADA; L., RODRÍGUEZ; A., RODRÍGUEZ Y J. M., PAÍS:
1996. "Diseño tecnológico de planta piloto para Plaguicidas naturales". VIII Jornada Científica. INIFAT. pp.94.

J. Miguel Dueñas, Jesús Estrada Ortiz,
Nilda Morales y Bárbara Castillo.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Ciudad Habana.