

## Metodologías para Evaluar el Efecto de Nanopartículas en el Control de Hongos y Bacterias Fitopatógenos

(Cálculo de parámetros de inhibición)

<sup>1</sup>Ileana Vera-Reyes e <sup>2</sup>Itandehui Esparza-Arredondo

<sup>1</sup>Investigadora Cátedras CONACYT-CIQA, Departamento de Plásticos en la Agricultura, <sup>2</sup>Asistente de Proyecto, CIQA, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25294.

### Introducción

Las plantas durante su ciclo de crecimiento son atacadas por plagas y enfermedades controladas básicamente con agroquímicos sintéticos de gran impacto ambiental. Por eso, en la agricultura moderna sustentable, la nanotecnología promete aportar soluciones mediante el uso nanopartículas (NPs) para el control de microorganismos patógenos, con menor impacto ecológico (1). Una de las aplicaciones de las NPs metálicas es como antimicrobianos; ya que elementos como ZnO, Cu, Ag y Fe son antagonistas de una diversidad de microorganismos, entre los que se incluyen hongos y bacterias fitopatógenos (2).

Los hongos y las bacterias son responsables de grandes pérdidas económicas durante el crecimiento de las plantas, maduración en campo y el manejo pos cosecha. Todos estos factores determinan el éxito o fracaso económico del producto, finalmente, el precio de venta al consumidor (3). Entre los patógenos de hongos y bacterias que generan grandes pérdidas económicas se encuentran los generos *Alternaria*, *Fusarium*, *Botryotinia*, *Rhizoctonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, entre otras. Por lo anterior es necesario la búsqueda de nuevos productos que sean amigables con el medio ambiente y que no generen resistencia entre los microorganismos.

## Objetivo general

Obtención de datos experimentales que nos permita estudiar el efecto antifúngico y antibacterial de NPs ZnO, ZnO +Ag, Cu, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## Materiales y equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Campana de flujo laminar
- Lupa Estereoscópica
- Incubadora con agitación
- Sonicator
- Matraces o frascos de vidrio con tapa rosca
- Cajas petri
- Asa bacteriológica
- Celda para espectrofotómetro
- Vernier
- Mechero
- Agar papa dextrosa (PDA)
- Agar King's B (KB)
- Extracto de malta
- Alcohol
- Campana de flujo laminar
- Espectrofotómetro
- Micropipetas

## Procedimiento

### *Ensayo con hongos fitopatógenos*

#### **Preparación de medio de cultivo envenado**

Para las cepas de hongos se prepara medio adicionado con 5g/L de extracto de malta. Se coloca en autoclave por 15 min a una temperatura de 121°C para su esterilización. Al mismo tiempo se preparan las nanopartículas en tubos de vidrio con 10 ml de agua destilada estéril se vacía la cantidad de nanopartículas de acuerdo a la concentración deseada. Las NPs son dispersadas por sonicación en tres ciclos de 15 min. Finalizada la esterilización se deja enfriar el medio de cultivo, el cual se completa con la solución de NPs previamente sonicada, se deja

agitando un momento breve para lograr homogenizar la solución con el medio y por último se vacía en cajas Petri.

### **Establecimiento del ensayo en medio envenenado.**

El hongo se siembra a través de explante en el medio con nanopartículas, se incuban de 7 a 11 días dependiendo de la especie que se esté manejando a 27 °C.

### **Evaluación de parámetros y análisis de datos**

Se mide el diámetro de crecimiento del hongo con ayuda de un vernier, posteriormente se calcula el porcentaje de inhibición con la fórmula descrita por Orbera et. al. (4).

$$PICR = \left( R1 - \frac{R2}{R1} \right) \times 100$$

Dónde:

PICR: es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

R1: representa el valor promedio del radio del crecimiento del hongo.

R2: Es el valor promedio del radio de la colonia inhibida.

Para concluir se realiza un análisis de varianza y comparación de medias a través de Turkey ( $\alpha \leq 0.05$ ) con un diseño experimental completamente al azar.

### *Ensayo con bacterias fitopatógenos*

### **Preparación de medio de cultivo**

Se utilizará medio King's B (KB) sólido y líquido, el cual se prepara con 20 g/L de proteasa peptona, 1.5 g/L de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 1.5 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y 15 ml de glicerol, para gelificar se

utilizará 15 g/L de agar bacteriológico. El medio se esteriliza en autoclave por 15 min a una temperatura de 121°C. Para preparar los medios con nanopartículas están fueron pesadas de acuerdo a la concentración deseada, posteriormente se dispersan en medio KB mediante sonicación en tres ciclos de 15 min.

### **Inóculo para cultivo**

A partir de células crecidas en caja Petri tomar tres colonias grandes y resuspender en un tubo de vidrio con 3 ml de medio KB, dejarlo a 37 °C por 24 h con agitación de 100 rpm. Posteriormente, se adicionaran 1 ml del cultivo preparado previamente a un matraz con medio de cultivo el cual servirá de inóculo para los ensayos. El inóculo se incubara durante 24 h, hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de aproximadamente 1. Para inocular los matraces de 250 ml que se utilizaran para el ensayo se tomaran 2 ml de inóculo. Los medios de cultivo inoculados se incubaran a 37 °C y 100 rpm.

### **Determinación de la concentración celular**

Se tomaran muestras de 1 ml en condiciones de esterilidad cada 2 horas incluyendo el tiempo 0. En cada muestra se determina la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) a 600 nm en el espectrofotómetro.

Los ensayos se realizan por triplicado en forma independiente. Se registran los datos por tratamientos en la tabla siguiente:

Tabla 1: Datos para calcular densidad óptica por tratamiento

Lectura	TRATAMIENTO		
	Repetición	Horas de cultivo	Densidad óptica (600 nm)
1	1		
	2		
	3		
2	1		
	2		
	3		
3	1		
	2		
	3		
4	1		
	2		
	3		

Finalmente se calcula la desviación estándar de cada punto, se el porcentaje de inhibición de crecimiento, para poder calcular la IC<sub>50</sub> a través del método propuesto por Volpe et al., (5), en donde se graficara la concentración molar de las NPs contra el porcentaje de inhibición cuando las células se encontraba a mitad de la fase de crecimiento exponencial. El porcentaje de crecimiento se determinará con la fórmula:

$$[(At)/Ac] \times 100$$

Donde:

At: Promedio de los valores de absorbencia de tratamientos

Ac: Promedio de los valores de absorbencia del control

IC<sub>50</sub> es calculado por la correlación lineal entre la probabilidad de inhibición y el logaritmo de la concentración de acuerdo a Volpe (4). Con la siguiente ecuación:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + 10^{((x - \log IC_{50})m)}}$$

Donde:

Y= A los valores máximos y mínimos del porcentaje de inhibición

X= La concentración de nanopartículas

IC<sub>50</sub>= La concentración de NPs que inhibe el 50 % del crecimiento

m=La pendiente de la curva

Se utilizará el programa GraphPad Prism® (version 5.0, La Jolla, CA) para realizar los cálculos correspondientes.

### Literatura Citada

1. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. y Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of advanced research*, 7: 17-28.
2. Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A. y Biswas, P. (2015). *International Journal of Biological Macromolecules*, 75:346-353.
3. Carreón, L.S. y Fentanes, E.G. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>
4. Orberá, R.T.M.; Serrat, D.M.J. y González, G.Z. (2009). Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13:95-100.
5. Volpe, D.A., Hamed, S.S. y Zhang, L.K. (2014). Use of different parameters and equations for calculation of IC50 values in efflux assays: potential sources of variability in IC50 determination. *The AAPS journal*, 16: 172-180.