

## Actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra bacterias fitopatógenas

Antimicrobial activity of silver nanoparticles against phytopathogenic bacteria

Rojas-Avelizapa Norma Gabriela<sup>1</sup>, Regalado-Infante Paul Edgardo<sup>2</sup>, Dávila Lezama María del Rosario<sup>2</sup>, Llarena Hernández Regulo Carlos<sup>2</sup>, Rojas-Avelizapa Luz Irene<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, I.P.N. Cerro Blanco 141, Colinas del Cimatario, Querétaro 76090, Querétaro, México. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana (Región Orizaba-Córdoba) Josefa Ortíz de Domínguez S/N. Peñuela, 94945. Amatlán de los Reyes, Veracruz.

✉ Autor para correspondencia: [luzrojas@uv.mx](mailto:luzrojas@uv.mx)

**Recibido:** 15/04/2020

**Aceptado:** 19/08/2020

### RESUMEN

Las nanopartículas de plata (NPAg) representan un prometedor agente antibacteriano para combatir a bacterias fitopatógenas resistentes. Su tamaño nanométrico, les confiere la habilidad para penetrar distintas membranas biológicas como la pared bacteriana, incrementando su efecto bactericida. La presente investigación tuvo como objetivo utilizar NPAg sintetizadas por vía fúngica, contra bacterias fitopatógenas aisladas de frutos enfermos de diferentes cultivos agrícolas de importancia en la región. Se aislaron en total 21 bacterias fitopatógenas, las cuales fueron identificadas a nivel de género mediante pruebas morfológicas, microscópicas y bioquímicas como: *Pseudomonas* sp; *Serratia* sp; *Xanthomonas* sp; *Erwinia* sp; y *Acinetobacter* sp. El efecto de las nanopartículas de plata se evaluó en medio líquido adicionado con NPAg a diferentes concentraciones, los cuales evidenciaron una inhibición *in vitro* del crecimiento en un 93% a 99%, utilizando la dilución con una relación 1:5 de NPAg/caldo nutritivo (300 ppm).

**Palabras clave:** Patogenicidad, inocuidad alimentaria, sanidad vegetal.

### ABSTRACT

Silver nanoparticles (NPAg) are promising antibacterial agents against resistant phytopathogenic bacteria. Their nanometric size gives them the ability to penetrate different biological membranes such as the bacterial wall, increasing their bactericidal effect. The objective of this research was to use NPAg synthesized by fungi, against phytopathogenic bacteria isolated from diseased fruits of different agricultural crops of importance in the region. A total of 21 phytopathogenic bacteria were isolated, which were identified at the genus level by morphological, microscopic and biochemical tests, as *Pseudomonas* sp; *Serratia* sp; *Xanthomonas* sp; *Erwinia* sp; and *Acinetobacter* sp. The effect of silver

nanoparticles was evaluated in liquid media added with NPAg at different concentrations, which showed an *in vitro* growth inhibition of 93% to 99%, using dilution with a 1: 5 ratios of NPAg / nutritive broth (300 ppm).

**Keywords:** pathogenicity, Food safety, plant health.

---

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas, silvestres y cultivadas tienen inmunidad innata o resistencia a muchos patógenos, no obstante las bacterias fitopatógenas pueden causar enfermedades graves y económicamente dañinas, que manifiestan síntomas como manchas, tizones foliares y pudriciones blandas de frutos, raíces y órganos almacenados, y también como marchitamientos, crecimientos excesivos, sarnas, canchales, entre otros (Agrios, G. 2005; Commonwealth, 1985). Las bacterias fitopatógenas pertenecen a cinco géneros principales: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xantomonas*, aunque la mayoría de las enfermedades son causadas por las tres últimas (Orozco, E. 2000). Esta situación a dado lugar a la aplicación excesiva e indiscriminada de bactericidas para el control de las enfermedades agrícolas, ocasionando un sin número de problemas de resistencia, afectación del medio ambiente y graves complicaciones a la salud humana, además de elevar los costos de producción (Rutala *et al.*, 1975; McManus, P. 1999).

El uso de bactericidas disponibles comercialmente para el control de enfermedades en plantas es generalmente excesivo, y pueden ser fitotóxicos en algunos cultivos (Nicolopoulou-Stamati, 2016). Por lo tanto, es muy importante un manejo integrado en el control de las enfermedades bacterianas. Ante esta problemática fitosanitaria, el nuevo enfoque en el combate de las bacterias fitopatógenas trata de incluir nuevas opciones que propicien la

protección y mantenimiento de las cosechas como por ejemplo el uso de sustancias de origen natural, limitando por ende el uso de agroquímicos (Ragsdale, N. & Sisler, H. 1994). Otra alternativa actual es la nanotecnología, Recientemente también se han propuesto métodos de biosíntesis empleando métodos de química verde que usan agentes reductores biológicos naturales, tales como: bacterias y extracto de hongos o plantas. Estas metodologías se han convertido en una alternativa simple y viable a los procedimientos de síntesis química más compleja para obtener nanopartículas (Abou *et al.* 2010).

Las NPAg obtenidas por biosíntesis, han surgido como un prometedor agente antibacteriano que podría ser utilizado para combatir preferentemente a bacterias fitopatógenas resistentes, como ha sido sugerido en estudios de importancia médica, donde se han propuesto su uso para combatir virus y bacterias resistentes a los tratamientos convencionales (Chalopka, K. 2010). Cabe mencionar por último que con respecto al control de las infecciones causadas por bacterias fitopatógenas, el campo es extenso y poco explorado, por lo cual resulta importante para la presente investigación el incursionar en este tema, teniendo como objetivo principal el probar el efecto de las NPAg obtenidas por vía fúngica, como agente antimicrobiano en aislados bacterianos provenientes de muestras con síntomas de enfermedad en cultivos agrícolas de interés económico en la región centro del Estado de Veracruz, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Aislamiento de bacterias fitopatógenas.*

Las muestras se seleccionaron por la presencia de síntomas de enfermedad como: antracnosis, necrosis, atizonamientos, puntos necróticos rodeados de halo clorótico y amarillamiento, presentes en diferentes frutos (Manzana, plátano, mango, papaya, chayote, calabacita, jitomate, papa y caña de azúcar). El aislamiento se realizó cortando fragmentos de 0.5 a 1 cm del fruto infectado mediante un bisturí. Se colocaron en un vaso de precipitados y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4 % por 1 min. Se hicieron lavados con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro. Finalmente, se sembraron las muestras colocando 3 fragmentos desinfectados en placas de Petri con Agar nutritivo (AN). Se rotularon e incubaron a 28°C durante 3 días. Las bacterias fueron aisladas mediante la técnica de estría cruzada, purificadas mediante resiembra y conservación en tubos con AN inclinado a 4°C hasta su uso.

### *Identificación morfológica y microscópica*

Se llevó a cabo por observación de la morfología colonial (tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie, aspecto, luz reflejada, luz transmitida, consistencia, y producción de pigmento) y morfología microscópica utilizando la tinción de Gram y su observación al microscopio óptico.

### *Identificación bioquímica*

Las pruebas primarias utilizadas para la identificación de bacterias fitopatógenas fueron crecimiento a 37 y 41°C, prueba de oxidasa, prueba de catalasa, Prueba de Hugh-Leifson, reducción de nitratos, movilidad, actividad enzimática de quitinasa y quitosanasas, licuefacción de gelatina.

### *Pruebas de patogenicidad*

Estas pruebas se realizaron para determinar en un tiempo breve la patogenicidad de cada aislamiento bacteriano, lo que nos permitió, en algunos casos, conocer la especie de bacteria involucrada, mediante la prueba de pudrición de papa, hipersensibilidad en plantas de tabaco e hidrólisis de almidón.

### *Biosíntesis de las AgNP*

El proceso de síntesis de las AgNP se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Alamilla en 2017 utilizando al hongo *Penicillium purpurogenum*. Las nanopartículas obtenidas presentaron un tamaño de 10.5 nm. La solución madre de AgNP fue de 1500 ppm. Los testigos se prepararon con únicamente 10 ml de Caldo nutritivo (CN). El tratamiento 1 fue de 150 ppm de AgNP colocadas en una relación 1:10 (9 ml de CN estéril 1 ml de solución madre de AgNP). El tratamiento dos fue de 300 ppm en una relación 1:5 (8 ml de CN Y 2 mL de AgNP). El tratamiento tres fue de 500 ppm con una relación 1:3 (6.7 ml de CN y 3.3 de AgNP).

### *Bioensayo en medio líquido con NP Ag*

Cada uno de los microorganismos se inoculó en caldo nutritivo e incubaron en agitación durante 8 h a 150 rpm a 30°C. Se midió densidad óptica de los cultivos a 600 nm y el inóculo se ajustó a una absorbancia de 0.05 en matraces) con AgNP a las diferentes concentraciones 150, 300 y 500 ppm y b) sin AgNP. Los sistemas se incubaron 150 rpm a 30°C. Ambos sistemas se monitorearon cada 2 horas durante las primeras 12 horas y posteriormente a las 24 horas.

### *Efecto bacteriostático y bactericida.*

Posteriormente al bioensayo de medio líquido se inocularon los microorganismos en caldo nutritivo nuevo y se incubaron 12 horas a 150 rpm a 30°C. Pasando de las 24 horas se midió la densidad óptica del cultivo, utilizando como

blanco medio estéril para calibrar el espectrofotómetro a 600 nm. El efecto bacteriostático o bactericida se determinó por la variación en la densidad óptica.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Aislamiento de las bacterias fitopatógenas*

Los aislamientos se llevaron a cabo en frutos con síntomas de enfermedad como Aguacate, Chayote, Durazno, Jitomate, Mango, Manzana, Papa, Papaya, Pepino, Pera, zanahoria y caña. Se

aislaron 21 bacterias, las cuales fueron identificadas por pruebas morfológicas, microscópicas y bioquímicas obteniendo como resultado que 8 correspondían al género *Pseudomonas*, 1 al género *Serratia*, 2 a *Xanthomonas*, 6 a *Bacillus* (Uno de ellos con morfología característica de *Erwinia carotovora* identificada por formación de reticulaciones en las colonias) y 4 con probabilidad de *Acinetobacter* (Ver tabla 1). Estos datos fueron también corroborados mediante pruebas de patogenicidad en plantas de tabaco con resultado positivo.

**Tabla 1.** Caracterización bioquímica de los diferentes aislados bacterianos provenientes de frutos con síntomas de enfermedad.

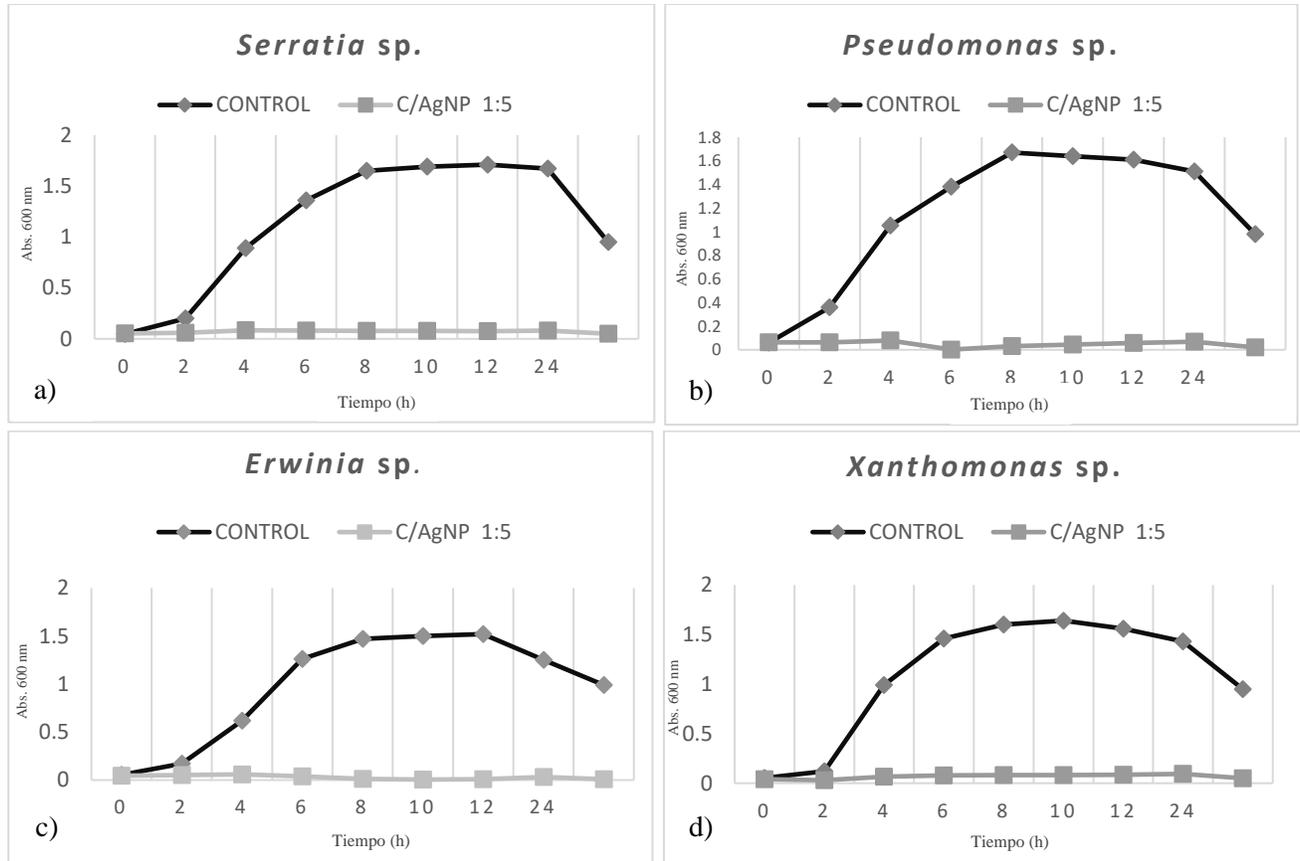
Prueba	Aislado pigmento verde (8)	Aislado pigmento rojo (1)	Aislado pigmento amarillo (2)	Aislado blanco brillante (6)	Aislado blanco opaco (4)
<i>Catalasa</i>	positivo	-	negativo	positivos	positivo
<i>Oxidasa</i>	positivo	negativo	negativo	negativos	negativo
<i>Oxidación-Fermentación</i>	negativo	positivo	negativo	negativo	Variable (3+, 1-)
<i>Movilidad</i>	positivo	positivo	positiva	Variable (3+, 3-)	negativo
<i>Licuefacción de gelatina</i>	+	+	+	+	+
<i>Actividad quitinasa</i>	-	positivo	-	-	-
<i>Actividad de quitosanasa</i>	-	negativo	-	-	-
<i>Reticulaciones</i>	-	-	-	(1+5-)	-
<i>Prod. esporas</i>	negativo	negativo	negativo	variable	negativo
<i>Género</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.	<i>Xanthomonas</i> sp.	(1 <i>Erwinia</i> , 5 <i>Bacillus</i> sp)	<i>Acinetobacter</i> sp.

*Efecto de las NPAg adicionadas en medio líquido con las diferentes bacterias aisladas.*  
Los resultados del efecto de las NPAg sobre el

crecimiento de los aislados bacterianos se pueden observar en las cinéticas de crecimiento realizadas para cada uno de los

microorganismos. A manera de ejemplo podemos observar en la figura 1, la comparación de las cinéticas de crecimiento obtenidas para 4 de los microorganismos aislados. Puede observarse que en el medio adicionado con NPAg a una concentración de 300 ppm, hubo una inhibición del crecimiento en un porcentaje del 93 al 95% cuando se le comparo con los

resultados obtenidos en el testigo sin NPAg. El comportamiento en todos los casos fue similar. Tales resultados son comparables a los reportados por Paredes en 2014, quien logró una inhibición bacteriana de un 95% utilizando Nanopartículas de Ag sobre bacterias de importancia médica como *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*.



**Figura 1.** Comparación del efecto de las NPAg en el crecimiento de 4 aislados bacterianos: a) *Serratia* sp., b) *Pseudomonas* sp., c) *Erwinia* sp., d) *Xanthomonas* sp.

*Efecto bacteriostático y bactericida*

Posteriormente al tratamiento en medio líquido con las NPAg, los microorganismos fueron inoculados e incubados a 28°C, 180 rpm durante 48 h en caldo nutritivo, con el propósito de observar el efecto que causa las AgNP sobre los cultivos bacterianos. Se puede afirmar que las AgNP en las diferentes concentraciones, mostraron un efecto bactericida en los 21

cultivos ensayados pues las células inoculadas, no fueron viables y no hubo crecimiento en ninguno de los casos. Esto se corroboró mediante tinciones de Gram pudiendo observar en los testigos células completas y bien definidas, no así en los problemas donde se observa lisis celular y daño en la membrana celular. Estos resultados pueden compararse con un estudio realizado por Lara en 2009, quien reporta que no existe efecto bacteriostático en

los microorganismos al utilizar NPAg contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* O157:H7 resistentes a antibióticos, sino solo un efecto bactericida. Otros reportes muestran que las NPAg interactúan con la pared celular de la bacteria, provocando la lisis de la misma, lo cual propicia una mayor permeabilidad de la pared celular, dejando a la célula bacteriana incapaz regular el transporte a través de su membrana plasmática, lo que deriva en posterior muerte celular (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Morones *et al.*, 2005).

### CONCLUSIONES

Los datos presentados aquí son novedosos porque prueban que las nanopartículas de plata obtenidas por vía fúngica a una concentración de 300 ppm, pueden recomendarse como un agente antibacteriano de amplio espectro, pues presentaron un efecto bactericida sobre las 21 bacterias fitopatógenas aisladas de frutos de diferentes cultivos agrícolas de importancia económica, identificadas principalmente como *Pseudomonas* sp; *Serratia* sp; *Xanthomonas* sp; *Bacillus* sp; *Erwinia carotovora* y *Acinetobacter* sp.

### LITERATURA CITADA

Abou, K., Eftaiha, A., Al Warthan, A., Ammar, R. 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arab. J. Chem. 3(3): 135-140.  
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5ta ed. Elsevier Academic Press, Estados Unidos de América. 922 p.

Alamilla-Martínez, D.G., Rojas-Avelizapan, N.G., Domínguez, I., López, J., Barcenás-Sánchez, D., Gómez-Ramírez, M. 2017. Effect of culture media and silver nitrate concentration on nanoparticle biosynthesis by a *Filamentous fungus*. Mex. J. biotechnol. 3(3):1-14.  
<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.3.1>

Chalopka, K., Yogeshkumar, M., Seifalian, A. M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. Trends Biotechnol. 8(11):580-588.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>

Commonwealth Agricultural Bureaux. Manual para Patólogos Vegetales. América Latina y El Caribe: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Doc. Tec., 1985.

Lara, H., Ayala-Núñez, N.V., Ixtapan, L., Rodríguez, C. 2009. Bactericidal effect of AgNPs against multidrug-resistant bacteria World J Microbiol Biotechnol 26(4):615-621.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>

McManus, P.S. 1999. Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas. Inf. Infect y Microbiol. 19 (4):192-196.

Morones J.R., Elechiguerra J.L, Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Tapia J., Yacaman M.J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16: 2346–2353.  
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>

- Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L. 2016. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Public Health Front.* 4:148-156. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Orozco, E.F. 2000. *Recopilación Bacterias Fitopatógenas*. México: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Paredes, D., Ortiz, C., Torres, R. 2014. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Int J Nanomedicine.* 9: 1717–1729. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57156>
- Ragsdale, N.N. y Sisler, H.D. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 545-557 <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.002553>
- Rutala, W. A., Stiegel, M. M., Sarubbi, F. A., and Weber, D. J. 1997. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacteria to disinfectants. *Infect. Control.* 18:417-421. <https://doi.org/10.2307/30141249>
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. 2005. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 275(1):177-82. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>

Copyright (c) 2020 Norma Gabriela Rojas Avelizapa, Paul Edgardo Regalado Infante, María del Rosario Dávila Lezama, Regulo Carlos Llarena Hernández, Luz Irene Rojas Avelizapa



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumendelicencia](#) - [Textocompletodelalicencia](#)