

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos

Informe Final

Documento I

Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono en fitopatógenos aislados del cultivo de Gerberas (*Gerbera jamesonii*) en la zona de Llano Grande de Cartago

Lic. Fabiola Jiménez Rodríguez
Centro Químico de Investigación y Asistencia Técnica (CEQUIATEC)
Escuela de Química

MBA. Karla Valerín Berrocal
Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)
Escuela de Biología

Enero 2012 a Diciembre 2012

Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono en fitopatógenos aislados del cultivo de Gerberas (*Gerbera jamesonii*) en la zona de Llano Grande de Cartago

Investigadores participantes:

Lic. Fabiola Jiménez Rodríguez

fajimenez@itcr.ac.cr

Coordinadora

MBA. Karla Valerín Berrocal

kvalerin@itcr.ac.cr

Estudiantes participantes:

Evelyn Calderón Madrigal
Adriana Campos Barahona
(Carrera de Ingeniería en Biotecnología)

Agradecimiento:

Agradecemos la colaboración del Master Juan Scott Chaves y la Dra. Paola Vega y a su asistente Pamela Zúñiga del Programa de Nanotecnología del ITCR. Además, agradecemos al MGA. Ricardo Coy de la Escuela de Química y su asistente Naizmi Valverde por suministrarnos las nanopartículas y a la M.Sc. Dora Flores por facilitarnos los nanotubos de carbono.

Un especial agradecimiento al Máster Vladimir Villalba (QdDg) y al Máster William Rivera, de la Escuela de Biología por colaborar con la identificación de los hongos con los que se trabajó en esta investigación.

RESUMEN

La *Gerbera jamesonii* es un producto de gran importancia en la zona de Llano Grande de Cartago, sin embargo, ha sido afectada por una enfermedad difícil de controlar por métodos tradicionales tanto químicos como orgánicos, por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono sobre los agentes causales de la enfermedad. Se determinó que los microorganismos presentes en plantas enfermas eran *Phytophthora sp*, *Fusarium sp* y *Phityum sp*. Se establecieron pruebas de sensibilidad agregando diferentes concentraciones de nanopartículas al medio de cultivo en el cual se inocularon los fitopatógenos con el fin de determinar el efecto sobre los microorganismos aislados. Se hicieron mediciones del crecimiento del micelio cada cierto tiempo y se determinó que en ciertos casos hay un leve retardo del crecimiento, pero en todas las pruebas se observó que no hubo inhibición total, resultados que podrían deberse a que las cepas presentes en la zona de Llano Grande no son sensibles a las nanopartículas usadas.

Palabras clave: Nanopartículas, *Phytophthora sp*, *Phityum sp*, *Fusarium sp*. Gerbera.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes:

La zona de Llano Grande de Cartago, se ha caracterizado por su producción agrícola, siendo uno de sus principales cultivos las plantas ornamentales, entre ellas la *Gerbera jamesonii* y sus diferentes variedades. Por ser este un producto muy llamativo y de alta demanda por parte del consumidor, los agricultores de la zona han encontrado en su producción una forma de obtener ingresos económicos. En Llano Grande, se pueden encontrar pequeños productores que abastecen al mercado local, medianos que abastecen el mercado nacional y grandes productores que se dedican a la exportación.

Sin embargo, este es un cultivo que requiere muchos cuidados, se debe sembrar bajo condiciones de invernadero, para evitar que las condiciones climáticas afecten la inflorescencia. El riego no debe ser excesivo, para evitar el crecimiento de hongos fitopatógenos, pero debe garantizarse que el suelo tenga la humedad que la planta necesita. Es importante una adecuada fertilización y eliminación de restos de plantas y plantas enfermas así como el tratamiento previo del suelo antes de la siembra con descomponedores para eliminar la materia orgánica que pueda favorecer la propagación de fitopatógenos. (Rivera, 2012)

En los últimos tiempos los productores de la zona han reportado una serie de problemas con el cultivo de las flores, ocasionados por fitopatógenos (principalmente *Phytophthora* sp.), a pesar de que han recurrido a una gran variedad de productos con los que se pretendía darle solución, esto ha mermado la producción y ha incrementado los costos.

El crecimiento de hongos es muy difícil de controlar debido a que estos han desarrollado resistencia a muchos fungicidas convencionales. Para superar esta resistencia, es importante explorar nuevos agentes antifúngicos, que pueden sustituir las estrategias de control actuales. Por tal motivo se presentó la inquietud de si es factible utilizar nanopartículas para solucionar ese problema. En los últimos años, los materiales a escala nanométrica, como las nanopartículas han recibido una atención creciente debido a sus propiedades físicas y químicas únicas que difieren significativamente de sus homólogos convencionales. Estudios recientes han demostrado actividad antimicrobiana de diversos tipos de nanopartículas, incluyendo de cobre, de plata, de titanio y de zinc. Y si se

comparan con materiales orgánicos, las nanopartículas poseen una durabilidad superior, una mayor selectividad, y resistencia al calor. (He, *et al*, 2010)

Por ser la nanotecnología un tema reciente, no se cuenta con muchos estudios sobre propiedades antimicrobianas de nanopartículas sobre hongos, especialmente hongos que hayan sido aislados en Costa Rica, por lo que se decide plantear esta actividad de fortalecimiento con miras a adquirir información preliminar relacionada con el tema y con técnicas que podrían servir para utilizar nanomateriales en el control de microorganismos de importancia agroindustrial

Definición del problema.

A pesar de que la producción de *gerbera* trae beneficios económicos a los productores, ellos tienen que lidiar diariamente con el control de enfermedades en sus cultivos, las cuales encarecen los costos y generan pérdidas en la producción, al momento de la investigación las plantaciones estaban siendo atacadas por una enfermedad fúngica producto de un complejo de hongos, los productores probaron diferentes métodos de control tradicionales, como es el uso de agroquímicos, controladores biológicos y buenas prácticas agrícolas, que no dieron la respuesta necesaria para eliminar o controlar la enfermedad de tal forma que no perjudique significativamente la producción final.

De ahí la necesidad de encontrar nuevas alternativas que puedan tener mayor efecto, por lo que surge la posibilidad de probar diferentes nanopartículas para determinar si tienen algún efecto inhibitorio sobre los fitopatógenos causales de la enfermedad. Existe investigación previa en la que se han utilizado nanopartículas para evitar el crecimiento en microorganismos, lo relevante de la investigación es que es la primera vez que se aplica este tipo de tecnología en microorganismos aislados en el país.

Es importante tomar en cuenta que Costa Rica tiene un clima tropical que favorece el crecimiento de hongos, algunos beneficiosos otros no, y que cuando se trata de controlarlos resulta más difícil de lo que puede ser en otras latitudes. No necesariamente lo que se utiliza en otras regiones puede funcionar igual en Costa Rica, razón por la cual se hace necesario realizar investigaciones bajo condiciones nacionales.

Tradicionalmente se han utilizado compuestos de plata como agentes antimicrobianos, ya que los cationes de este metal interaccionan con los componentes de carga negativa de las paredes celulares, alteran la permeabilidad de la membrana celular y alteran la actividad de las enzimas al interactuar con las proteínas que poseen grupos sulfhídrico en su estructura (Santoro *et al.* 2007, Kemp *et al.* 2009).

También se ha estudiado efecto de diferentes nanopartículas sobre hongos como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, con resultados prometedores (Samrat *et al.*, 2011, He, *et al.*, 2010), por lo que se considera importante verificar el efecto que podría tener en hongos fitopatógenos en Costa Rica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono sobre fitopatógenos autóctonos de nuestro país aislados en Llano Grande de Cartago

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Lograr el aislamiento e identificación microorganismos patógenos que atacan el cultivo de Gerberas en Llano Grande de Cartago
2. Obtener y mantener un stock de cultivos de estos microorganismos a nivel de laboratorio, para ser utilizados en dicha investigación
3. Reconocer el efecto que las nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono puedan tener sobre los microorganismos aislados de los cultivos afectados.
4. Evaluar cuál es el tipo de nanopartícula y la concentración mínima inhibitoria que mejor controla el crecimiento de los microorganismos aislados.
5. Obtener una revisión bibliográfica que oriente sobre el efecto ambiental de las nanopartículas de cobre, plata y nanotubos de carbono.

REVISIÓN DE LITERATURA

La nanotecnología se ha definido como la manipulación de la materia a la escala de moléculas y átomos (en mil millonésimas de metro), el interés en esta nueva tecnología se debe a que la materia muestra a nivel de nanoescala, propiedades totalmente distintas a las que presenta en su dimensión macro, (Delgado, 2007), debido a que se incrementa la relación superficie/volumen, (Samrat *et al*, 2011).

Se han utilizado en diferentes aplicaciones, industriales y biomédicas, por ejemplo nanopartículas de Ag (AgNP's) como un agente antimicrobiano muy eficaz en el tratamiento de heridas y quemaduras. Estas son relativamente estables y se han reconocido como materiales seguros con fuertes efectos inhibitorios y bactericidas, en comparación con los productos que contienen plata iónica que puede causar efectos nocivos en la piel. (An, *et al*, 2009)

A nivel agrícola la investigación se ha enfocado en el control de fitopatógenos. Estudios recientes demuestran el efecto negativo que pueden tener las nanopartículas en el crecimiento de microorganismos. Por ejemplo, se ha observado que la actividad fungicida del azufre es más efectiva en su forma de nanopartícula, que en su forma de micropartículas, según el estudio realizado, el efecto en hongos del tipo *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* la inhibición del crecimiento es directamente proporcional al aumento en la concentración de nanopartículas de azufre, y es inversamente proporcional al aumento en el tamaño de la partícula, (Samrat *et al*, 2011).

Las nanopartículas de plata han sido hasta ahora los nanomateriales más empleados en la industria para el control de poblaciones microbianas en aplicaciones tan diversas como instrumentos médicos, agricultura, tratamiento de aguas, medicamentos tópicos para tratamientos de quemaduras, ropa, entre otros (Gardner & Jones 2009). También se ha visto que desestabiliza la formación de biopelículas, que son estructuras formadas por polímeros extracelulares que engloban y protegen grandes cantidades de microorganismos (Chaw *et al*. 2005). Las nanopartículas de plata, además de estas propiedades permitirían la liberación lenta y controlada de los cationes Ag⁺ lo que facilitaría la acción de éstos sobre las proteínas y evitaría su inactivación por la formación de sales (especialmente por el contacto con iones cloruro), además por su tamaño ofrecen una mayor área de contacto por unidad de masa, lo que aumenta su potencial

antimicrobiano (Kemp *et al.* 2009). En este sentido se ha reportado que las nanopartículas de plata con formas que favorecen mayores áreas de contacto presentan mayor capacidad inhibitoria del crecimiento de microorganismos (Pal, *et al.*, 2007).

En un estudio realizado para determinar el efecto de nanopartículas de plata en bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos saprofitos, se observó que la eficacia antimicrobiana era mayor con las nanopartículas de plata más pequeñas. Además, se impregnaron nanopartículas de plata en tejidos de algodón, pinturas de agua y purificadores de agua. Se determinó que aunque se daba aglomeración de las nanopartículas en ciertos puntos, se presentaba actividad antifúngica y antibacteriana pronunciada en *Aspergillus niger*, *Penicillium phoeniceum* y *Staphylococcus. Aureus*. (Khaydarov, 2009)

Los nanotubos de carbono son otro tipo de nano material para el que se ha descrito actividad antimicrobiana en varios estudios, tanto los de pared simple (SWNT) como los de multipared (MWNT) (Arias & Yang 2009, Kang *et al.* 2008, Nepal *et al.* 2008, Kang *et al.* 2007, Jin-Woo Kim 2007). Se han señalado varios posibles mecanismos de toxicidad que explican esta actividad microbicida, como interrupción de la transferencia de electrones transmembrana, disrupción o penetración de la envoltura celular, oxidación de componentes celulares y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Liu *et al.* 2009, Kang *et al.* 2008).

Se ha determinado que son los tubos de pared simple los que poseen mayor toxicidad y los que tendrían más potencial para ser utilizados como materiales antimicrobianos (Kang *et al.* 2008, Kant *et al.* 2007, Arias & Yang 2009). También se ha descrito que esta actividad depende de la presencia de una solución buffer y de la concentración, y que los grupos funcionales de la superficie de los nanotubos no van a tener un papel importante en este sentido (Arias & Yang 2009), además se ha visto mayor actividad antimicrobiana en los tubos en suspensión en comparación con los agregados (Liu *et al.* 2009). En otro estudio se observó que el uso de radiación junto con la aplicación de nanotubos de carbono (CNT por sus siglas en inglés) a cultivos bacterianos puede incrementar la actividad antimicrobiana de este nano material (Jim-Woo *et al.* 2007).

METODOLOGÍA

Toma de muestras y aislamiento de microorganismos:

La colecta se realizó en un vivero para producción de Gerbera en la zona de Llano Grande de Cartago. Se tomaron muestras de suelo en el que se encontraron plantas visiblemente afectadas por la enfermedad. De estos mismos individuos se tomaron muestras de la base del talluelo, específicamente donde inicia la raíz, además de muestras de raíz. Todas las muestras se colocaron en bolsas estériles y fueron trasladadas en frío hasta el laboratorio. Además, se tomaron plantas enfermas completas, las cuales fueron llevadas al Máster William Rivera, en la Escuela de Biología del ITCR, quien tienen amplia experiencia en patógenos y enfermedades de plantas con el fin de que tener un diagnóstico preliminar de la enfermedad y los organismos causantes. Con lo cual se determinó que el organismo patógeno podría ser *Phytophthora sp*, que además, se encuentra comúnmente asociado con otros hongos como *Fusarium sp* y *Phityum sp*, los tres hongos combinados causan la enfermedad.

Con el diagnóstico previo, se procedió al aislamiento de los patógenos, para lo cual se utilizó la metodología descrita por Villalba (2010).

Identificación de los patógenos:

El medio de cultivo utilizado para aislar *Phytophthora sp* fue “medio Agar-V8” semisólido, que consiste en mezclar 200 ml de jugo de verduras (V8[®]) con 3 gramos de CaCO₃, en 1 litro de agua. (Dhingra y Sinclair, 1985) También se utilizó el medio semisólido a base de harina de maíz (AHM), (Villalba, 2010). El pH se llevó a 5,5 para favorecer el crecimiento de los hongos y limitar el crecimiento de las bacterias que pudieran estar presentes en la muestra.

En forma paralela se utilizó medio “Agar Papa Dextrosa (PDA)” a pH 5,5 para tratar de aislar *Phityum sp* y *Fusarium sp*

Se hizo una identificación previa mediante las características macroscópicas de los hongos, posteriormente se hicieron observaciones microscópicas para identificarlos mediante la espora, se procedió a hacer subcultivos en medio nuevo, hasta lograr aislar solamente los hongos de interés. Estos fueron analizados nuevamente al microscopio para corroborar que fueran los tres hongos citados anteriormente.

Los hongos se subcultivaron cada semana para mantener un inventario que fue utilizado durante la investigación, y de esta forma determinar el comportamiento del hongo en condiciones de laboratorio. En el caso de *Phytophthora* sp, se mantuvo en medio de harina de maíz (Villalba, 2010) mientras que *Phityum* sp y *Fusarium* sp se mantuvieron en agar PDA a pH 5,5.

Determinación del efecto de nanopartículas sobre los microorganismos aislados.

Prueba en medio semisólido.

Para determinar la actividad antifúngica de las nanopartículas, se adicionó el nanomaterial al medio de cultivo en diferentes concentraciones, antes y después de autoclavar el medio para determinar si esto influía en la estabilidad de las mismas.

Las nanopartículas utilizadas fueron sintetizadas por el método Creighton, en el cual se pueden obtener nanopartículas de aproximadamente 10 nm de diámetro, con una distribución estrecha de tamaños (monodispersas), (Monge, 2009), es decir, la diferencia de tamaños entre las nanopartículas obtenidas es muy poca.

Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

Cuadro 1. Concentración de nanopartículas de Plata y Cobre usada en el medio de cultivo para determinar si existe efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de *Gerbera jamesonii*

| Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| Concentración µg/L | Concentración µg/L | Concentración µg/L |
| 0 | 0 | 0 |
| 10 | 1000 | 20.000 |
| 100 | 2500 | 30.000 |
| 1000 | 5000 | -- |
| - | 7500 | -- |

Se tomó un segmento de aproximadamente 5 mm² de cultivo de agar con micelio de cada uno de los hongos y se colocó en el centro de las placas que contenían las diferentes concentraciones de nanopartículas. El crecimiento del hongo se determinó midiendo el diámetro del micelio en centímetros. La primera medición se hizo a los tres días de inoculado el hongo.

Cada prueba se montó por duplicado para verificar los resultados obtenidos.

Adicionalmente, se hizo una prueba en la que se adicionó 60 µl de la solución más concentrada de AgNP's sobre el medio de cultivo, distribuyéndola con un espátula drigalski solamente en la mitad de la placa, la otra mitad se mantuvo libre de las nanopartículas y se colocó el inóculo de hongo en el centro de mundo que estuviera en contacto con ambas mitades, esto con el fin de comparar el crecimiento bajo las mismas condiciones en presencia y ausencia de AgNP's.

Prueba en medio líquido.

Posteriormente se realizó una prueba adicional en la que se utilizó medio de cultivo líquido RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) cuyo color original es rojo y vira de color de acuerdo a cambios en su pH, en caso de que el pH disminuya, vira a amarillo y si el pH aumenta vira a fucsia. A este medio se le adicionó nanopartículas de plata y cobre en las concentraciones descritas en la prueba #1. La no inhibición del hongo haría virar el medio a la coloración amarilla, mientras que si no hay crecimiento del hongo, se esperaría que el pH permanezca constante por lo que la coloración permanecería en rojo.

Pruebas con nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono (CNT's) utilizados tenían un diámetro de entre 1 y 2 nm y una longitud de entre 0,5 y 2 µm. Se agregaron al medio de cultivo, antes de esterilizar, en las siguientes concentraciones:

- 500µg/ml
- 100 µg/ml
- 25 µg/ml
- 0µg/ml

Se utilizó agar PDA como medio de cultivo.

Adicionalmente se hizo una prueba en la que se dividió la placa a la mitad, en una sección se añadió 500 μ l de la solución de nanotubos de carbono con una concentración de 500 μ g/ml, la otra mitad se dejó sin CNT's, esto para determinar si había inhibición en el área tratada con CNT's.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los fitopatógenos.

La identificación preliminar realizada mediante los signos externos de la enfermedad, dio como resultado que había una alta probabilidad de que la misma estuviera siendo ocasionada por un complejo de tres hongos fitopatógenos: *Phytophthora sp*, *Pythium sp* y *Fusarium sp*. (Rivera y Villalba, comunicación oral, 2012). Por lo que el aislamiento estuvo enfocado en obtener cultivos puros de estos tres fitopatógenos.. La presencia de *Trichoderma sp* en la primera placa se debe a que es muy utilizada en esta plantación como biocontrolador de esta enfermedad.

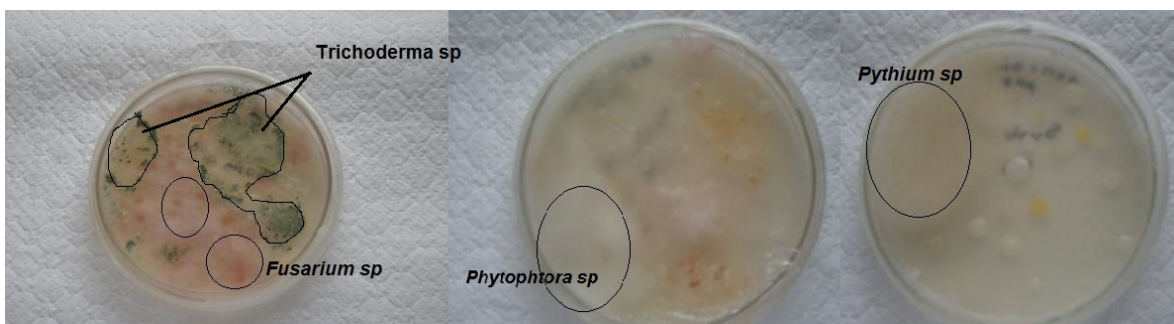


Figura 1. Microorganismos obtenidos a partir de muestras de tejido vegetal enfermo.

La técnica utilizada para limpieza de explantes funcionó muy bien para tratar de obtener en medio de cultivo los hongos de interés, limitando el crecimiento de otros microorganismos. En la figura 1 se aprecia claramente la presencia de los tres fitopatógenos, así como colonias de otros microorganismos, sin embargo, fue se pudieron obtener cultivos puros a partir de estas placas. (Figura 2)

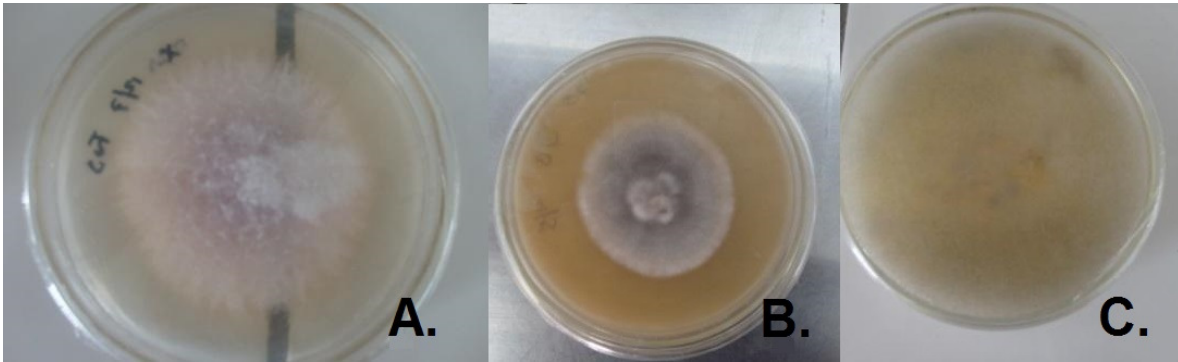


Figura 2. Hongos fitopatógenos aislados a partir de *Gerbera jamesonii* identificados como causantes de la enfermedad. **A.** Fusarium. **B.** Phytophthora. **C.** Pythium

La figura 3 muestra las esporas asexuales características de cada hongo, a través de las cuales se logró identificar de forma más certera que los microorganismos aislados efectivamente eran los que se habían identificados como causantes de la enfermedad.

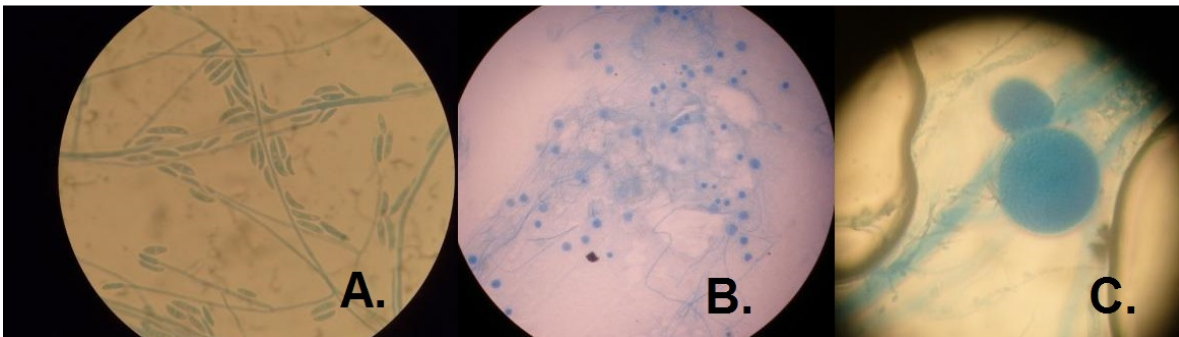


Figura 3. Montajes al microscopio óptico para identificar los hongos mediante su espora asexual. **A.** Fusarium (100X). **B.** Phytophthora (40X). **C.** Pythium. (100X)

El análisis de estructuras vegetativas como la espora asexual, es muy utilizado por los fitopatólogos para identificar los organismos causantes de enfermedades. Con estas imágenes se verificó la presencia en las plantas enfermas de los microorganismos que se sospechaba estaban ocasionando la enfermedad en las plantas de *Gerbera jamesonii* en Llano Grande de Cartago.

Determinación del efecto de nanopartículas sobre los microorganismos aislados.

Prueba en medio semisólido.

Con las pruebas iniciales, durante los primeros días después de inoculado el hongo en medio con nanopartículas de plata se observó un leve crecimiento del mismo. Los tres fitopatógenos presentaron crecimientos diferentes por lo que se tratarán por separado.

Fusarium sp

Tres días después del cultivo se observó que el crecimiento en la placa que contenía mayor concentración de nanopartículas el crecimiento era menos, presentando un micelio de menor tamaño con respecto a los demás, incluido el control. A los seis días de haber sido inoculado el hongo, se observó que aunque el micelio había aumentado, el crecimiento era menor en la placa con mayor concentración de AgNP, sin embargo, este resultado se dio solamente en uno de los duplicados de las placas por lo que no podría asegurarse que este comportamiento se deba a la exposición a mayor concentración de AgNP's, (Figura 4.A).

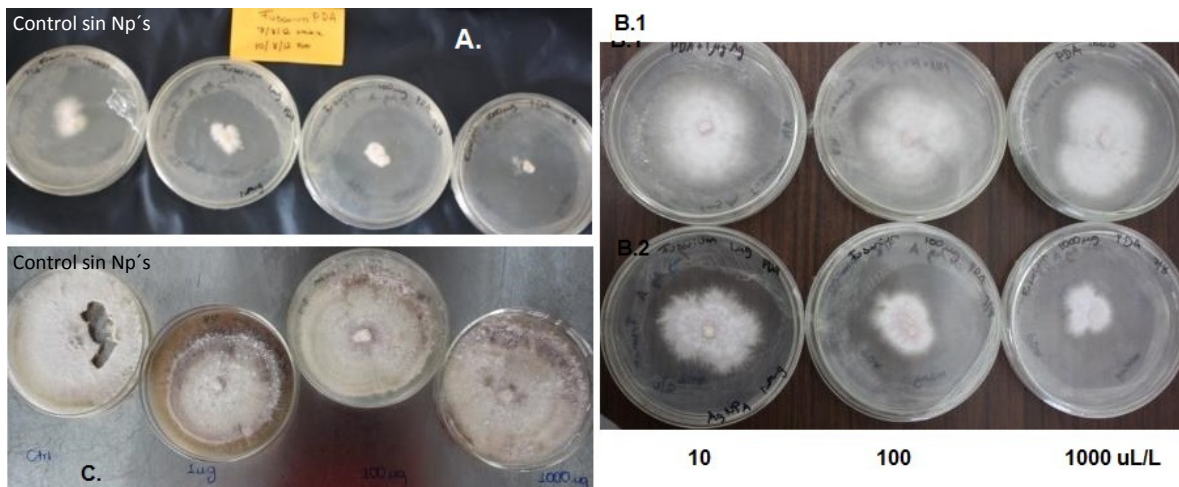


Figura 4. *Fusarium sp* en medio con diferentes concentraciones de AgNP's. La fotografía **A** muestra el crecimiento después de 3 días de inoculado el hongo, **B1** y **B2**. Crecimiento del hongo después de 6 días. **C**. Crecimiento después de un mes de cultivo.

Después de 6 días de cultivo, se observó que esta tendencia de crecimiento seguía siendo igual, solamente uno de los duplicados presentó menor crecimiento del hongo a mayor concentración de AgNP's, no así en el otro, donde el crecimiento fue igual en todas las placas independientemente de la concentración de nanopartículas (figura 4.B.1 y 4.B.2).

Ambos duplicados se mantuvieron en laboratorio durante un mes y en ambos casos el hongo continuó creciendo hasta cubrir la totalidad de la placa. Por lo que podría considerarse que las nanopartículas solo retardan el crecimiento del hongo, sin llegar a inhibirlo del todo. (Figura 4.C)

Phytophthora sp.

Con respecto a *Phytophthora sp.*, a los 3 días de inoculado el patógeno en medio PDA se notó menor crecimiento en el medio que tenía nanopartículas comparado con el control, mientras que cuando se usó agar a base de Harina de Maíz, el crecimiento fue muy similar en todas las placas, levemente mayor en el control. (Figura 7)

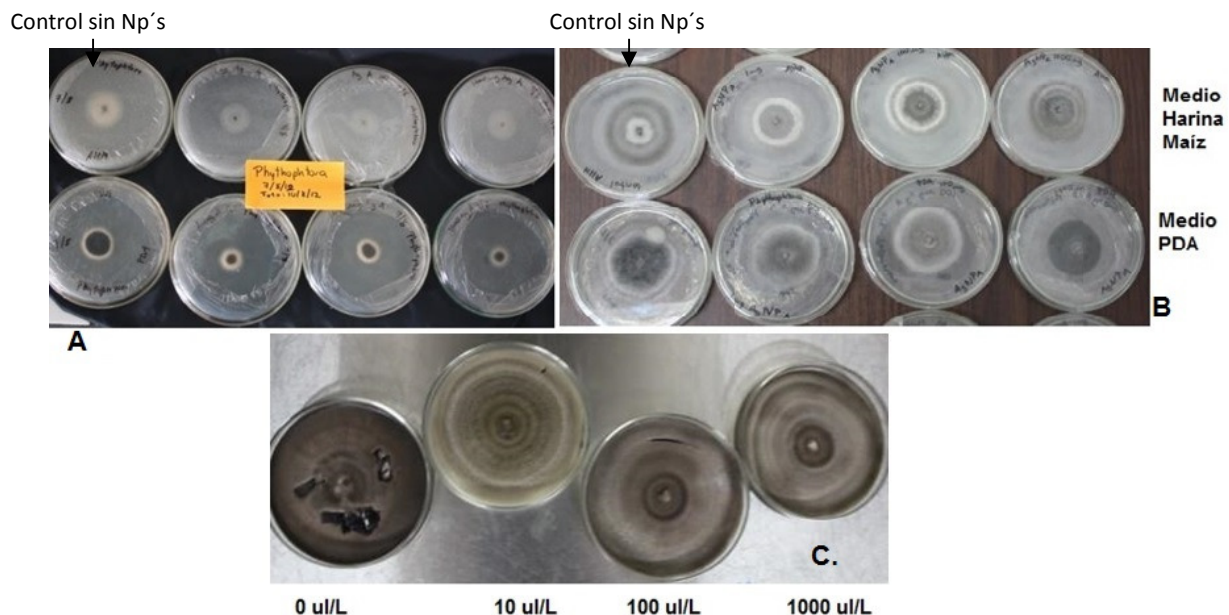


Figura 7. *Phytophthora sp.* en diferentes concentraciones de nanopartículas de plata. A. 3 días después de inoculación. B. 6 días después de inoculación. C. un mes después de inoculación. En todos los casos el control corresponde a la primera placa de izquierda a derecha.

La figura 7 muestra que después de 6 días de cultivo, el fitopatógeno ha crecido de manera muy similar en todas las placas, por lo que no parece que las nanopartículas ejerzan algún efecto inhibitorio sobre *Phytophthora* sp. Después de un mes de crecimiento del organismo en condiciones de laboratorio se observó como este crecía hasta abarcar la totalidad de la placa en todas las concentraciones utilizadas.

Pythium sp

Con respecto a *Pythium* sp, se observó un crecimiento muy similar en todas las placas, sin embargo, parecía tener un crecimiento levemente mayor en la placa control con concentración 0 $\mu\text{L/L}$ de AgNP's (Figura 8.A y B). Al inicio del cultivo se observó el crecimiento de lo que parecía ser una levadura, la cual no pudo ser eliminada de los cultivos, sin embargo, el hongo continuó creciendo sin que esta lo afectara. Finalmente, al igual que sucedió con los otros dos microorganismos, en todas las concentraciones, el fitopatógeno abarca toda la placa.

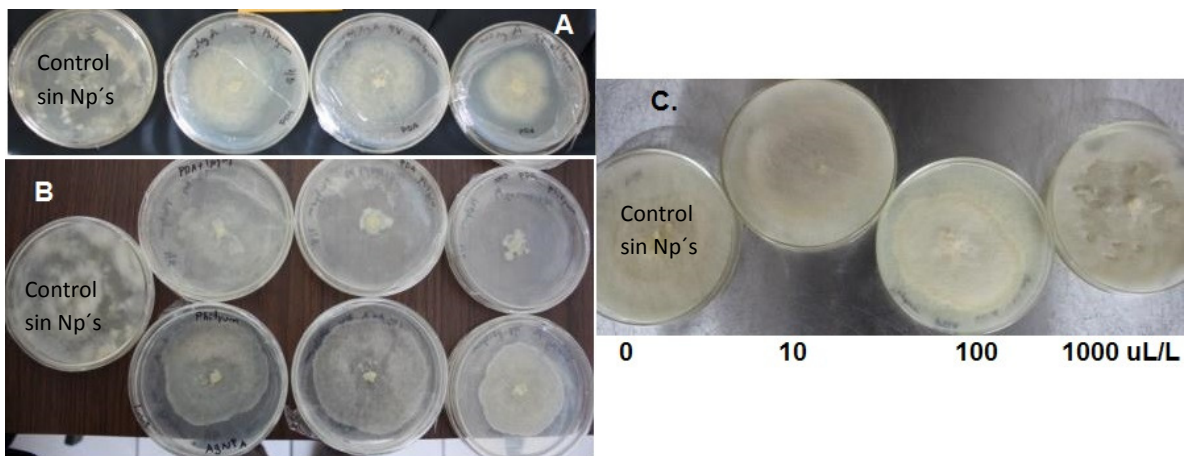


Figura 8. *Pythium* sp en medio con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata. **A.** tres días después de inoculado. **B.** 6 días después de inoculado. **C.** Un mes de crecimiento en laboratorio. (La primer placa corresponde al control sin nanopartículas y el orden de las placas en A y B es igual que en C.)

Pruebas de solución de AgNP's sobre el medio.

Al adicionar la solución de nanopartículas sobre una mitad del medio de cultivo , no se apreció diferencia en el crecimiento de *Fusarium sp* y *Pythium sp* en ambas secciones de la placa. En el caso de *Phytophthora sp*, se puede observar lo que parecía un crecimiento menor en la mitad tratada con AgNP's, además, el color del micelio era diferente entre ambas secciones del medio, (Figura 9). Luego de un mes de cultivo el hongo continuó su crecimiento sin, embargo, este fue levemente menor en la sección tratada con AgNP's (B). Como se observa en la imagen la sección libre de nanopartículas presenta crecimiento del micelio hasta el límite de la placa, mientras que en la otra mitad el micelio no llega al borde de la misma.

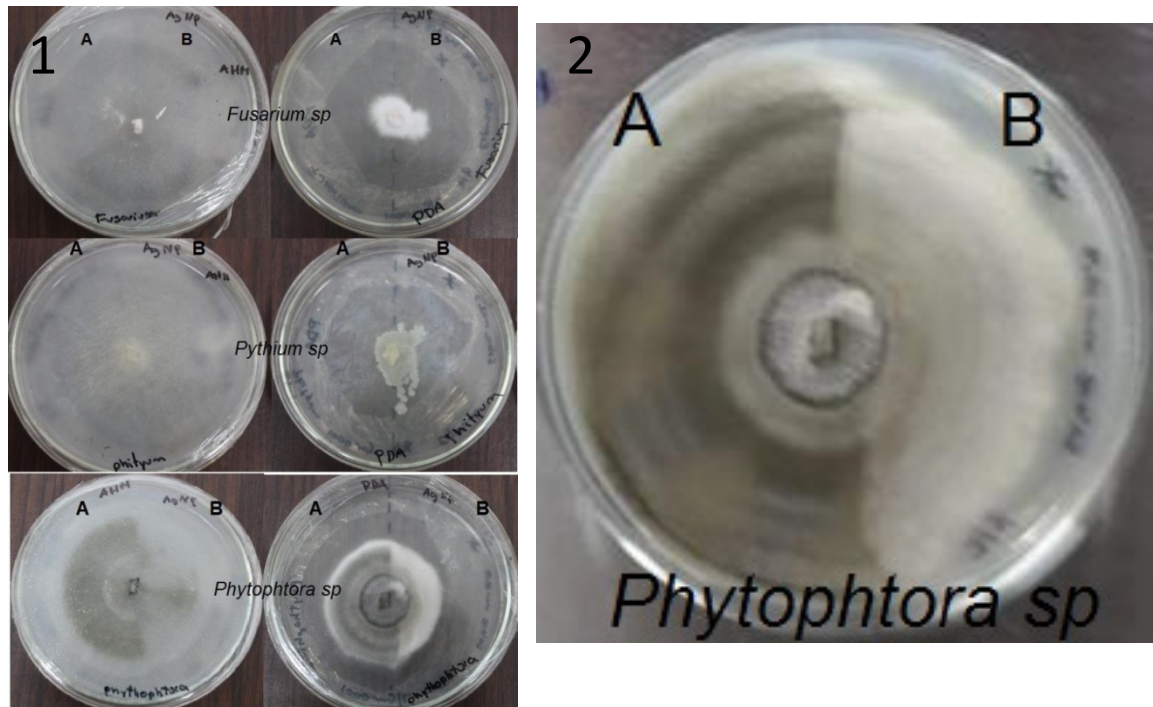


Figura 9. 1. Crecimiento de los fitopatógenos de *Gerbera jamesonii* después de 6 días de cultivo. La mitad A es la sección de la placa libre de AgNP's y la mitad B corresponde a la sección a la que se le aplicó la solución de AgNP's. La foto número 2 es después de 1 mes de cultivo.

Prueba realizada incrementando las concentraciones de nanopartículas

Al aumentar las concentraciones de nanopartículas en el medio, no se observó gran diferencia en el crecimiento del micelio del fitopatógeno expuesto a la concentración más alta comparado con el testigo, que no tenía nanopartículas. Contrario a lo que se esperaba, en la mayoría de los casos se obtuvo un crecimiento menor en el medio sin nanopartículas (testigo). Solamente en la prueba realizada para *Phytophthora* sp se obtuvo que el micelio de nanopartículas de cobre, era 4 mm más pequeño en la concentración de 7500 µg/L que en el testigo (Figura 13).

La mayoría de las pruebas realizadas, el micelio cubría todo el medio (9 cm de diámetro) a los 11 días de cultivo. Sin embargo, en el caso de *Phytophthora* sp, se pudo observar que el micelio era menos denso a mayor concentración de nanopartículas, aunque el halo de crecimiento abarcara toda la placa, mientras que en las concentraciones menores las hifas eran más abundantes.

Las mediciones se dejaron de hacer en el momento en que el hongo cubría casi la totalidad de la placa, es decir, a los 9 cm de diámetro o cerca de esta medida.

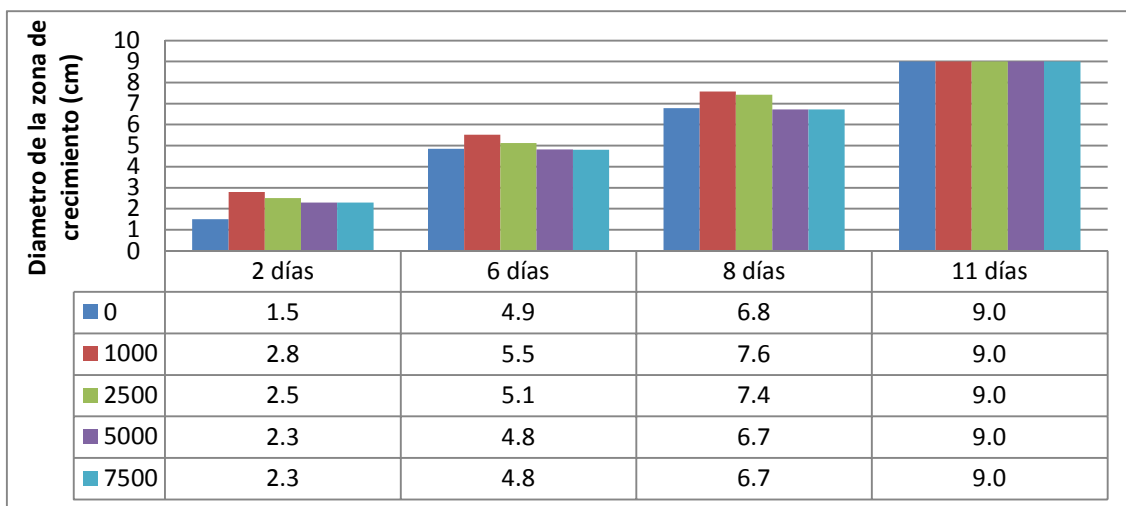


Figura 10. Medición del diámetro de crecimiento del micelio en *Fusarium* sp utilizando nanopartículas de plata.

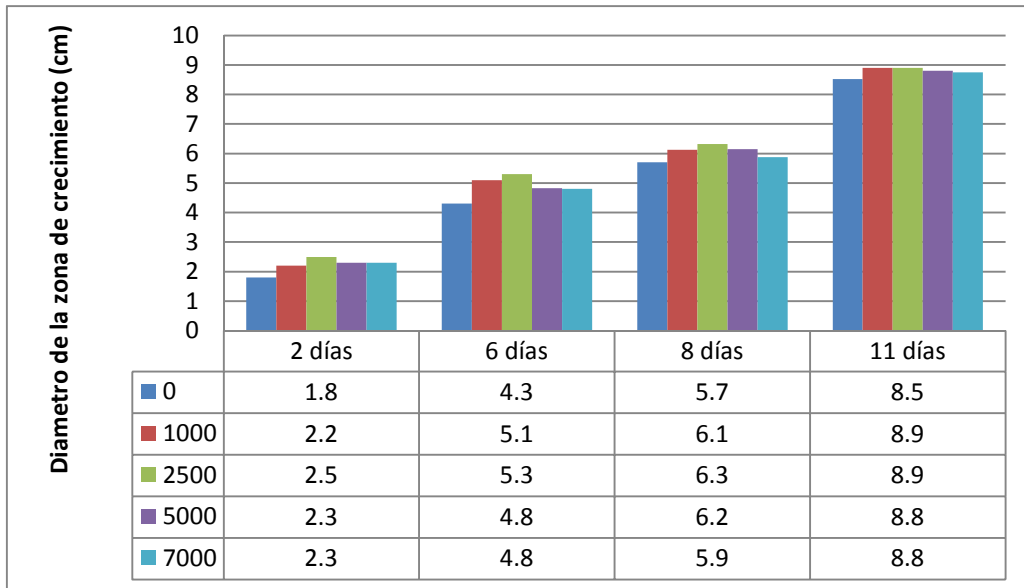


Figura 11. Medición del diámetro (en cm) de crecimiento del micelio en *Fusarium sp.*, utilizando nanopartículas de Cobre.

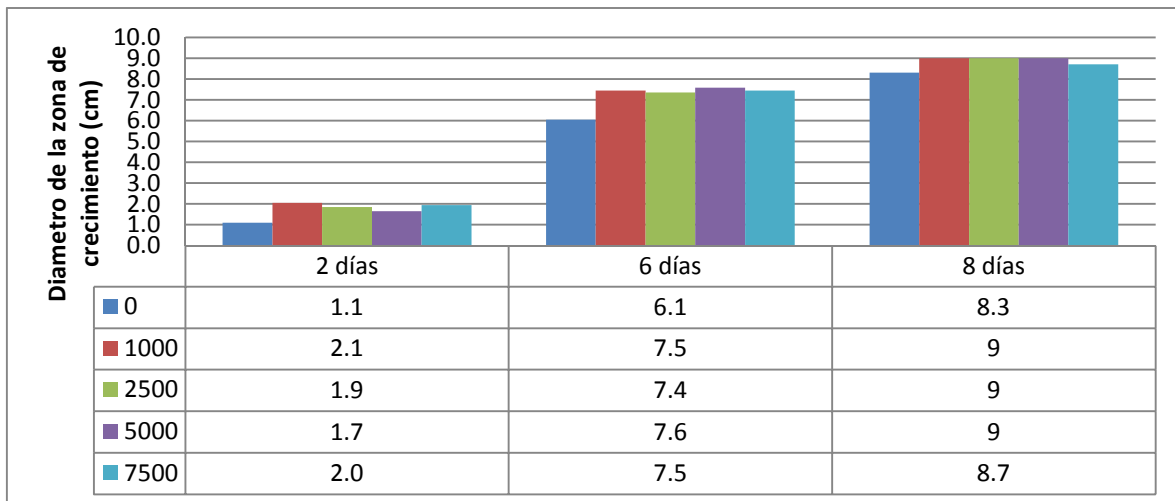


Figura 12. Crecimiento del micelio de *Phytophthora sp.* en medio semisólido con diferentes concentraciones de AgNP's durante 8 días. Medición del diámetro de la zona de crecimiento en cm.

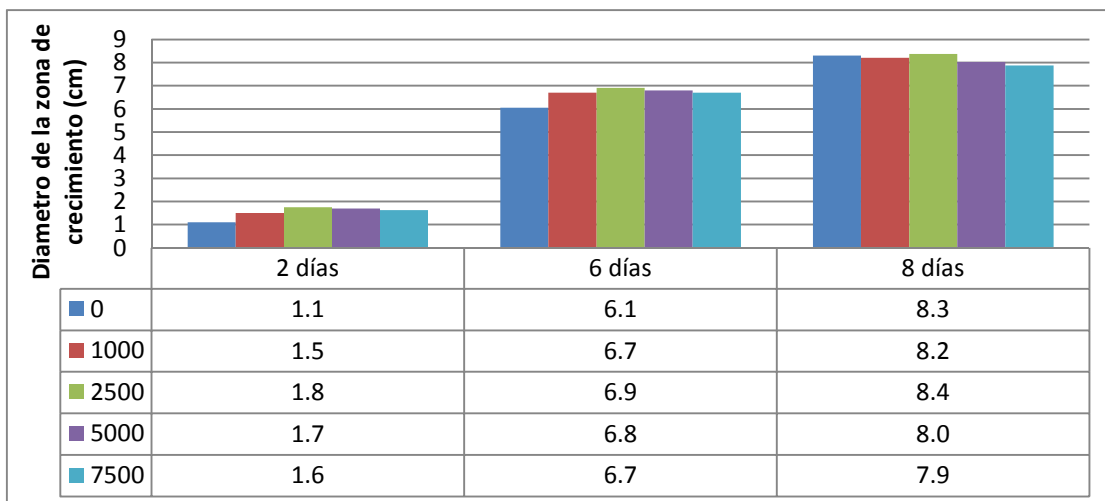


Figura 13. Crecimiento del micelio de *Phytophthora sp.* en medio semisólido con diferentes concentraciones de **CuNP's** durante 8 días. Diámetro de la zona de crecimiento en cm.

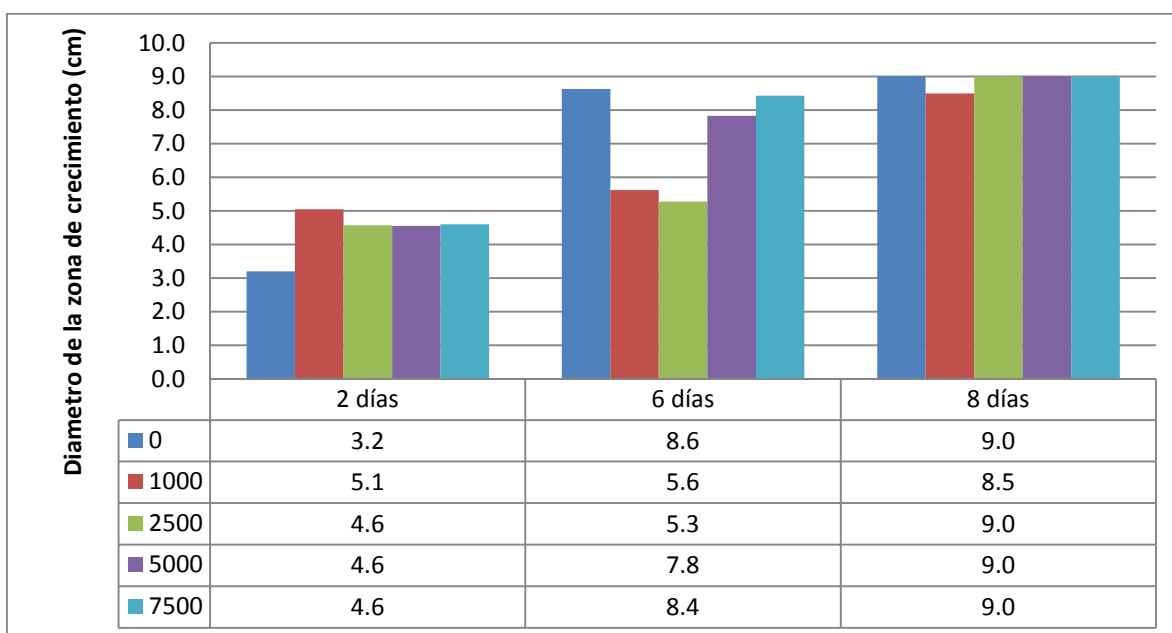


Figura 14. Medición del diámetro de crecimiento del micelio de *Pythium sp.* en medio con AgNP's

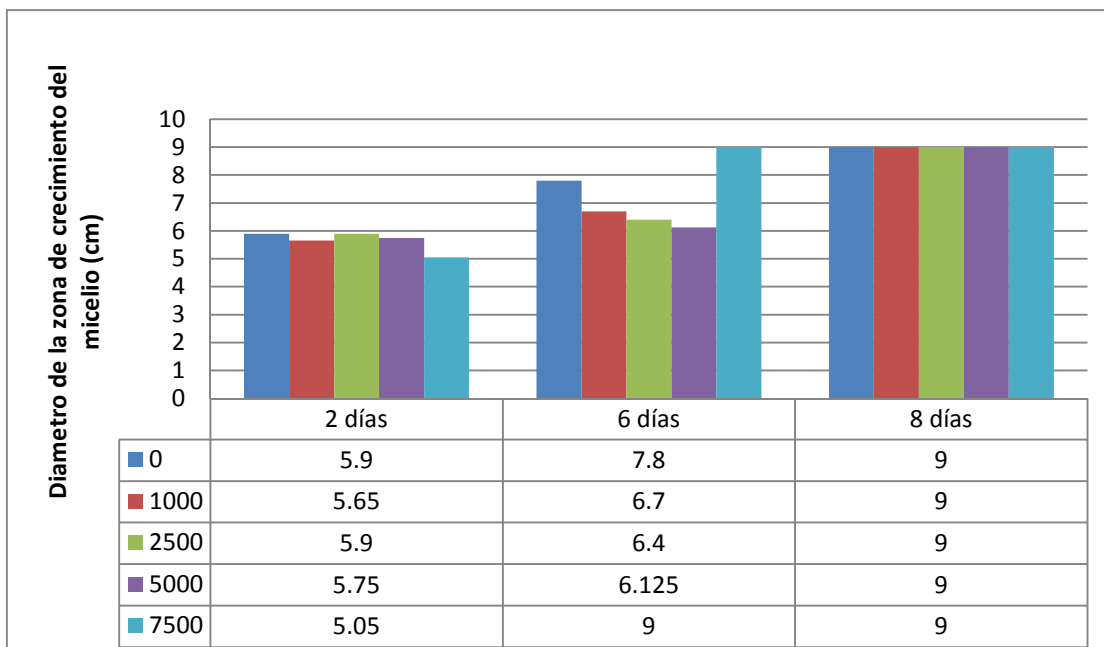


Figura 15. Medición del diámetro de crecimiento del micelio de *Pythium* sp en medio con CuNP's

Estos resultados indican que no hay inhibición significativa, tampoco muerte de los fitopatógenos, pero, se podría considerar que cuando se usaron CuNP's se retardó levemente el crecimiento. Sin embargo, con el paso del tiempo el fitopatógeno colonizó toda la placa, indistintamente si el medio es inoculado o no con nanopartículas.

Al aumentar la concentración de nanopartículas a 20 y 30 mil $\mu\text{L/L}$ utilizando nanopartículas de Zinc y de plata se obtuvieron los siguientes resultados.

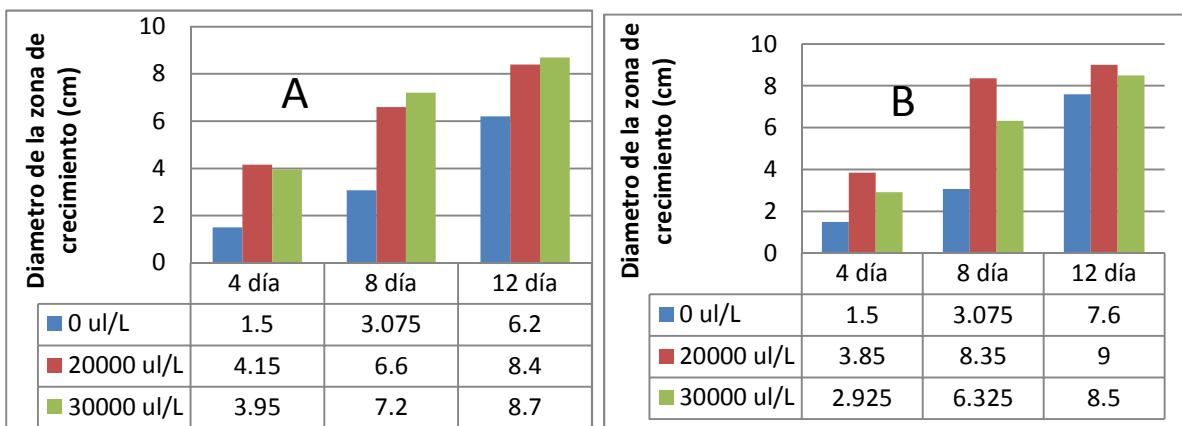


Figura 16. Crecimiento de *Fusarium* sp en medio tratado con AgNP's (Figura A) y ZnNP (Figura B).

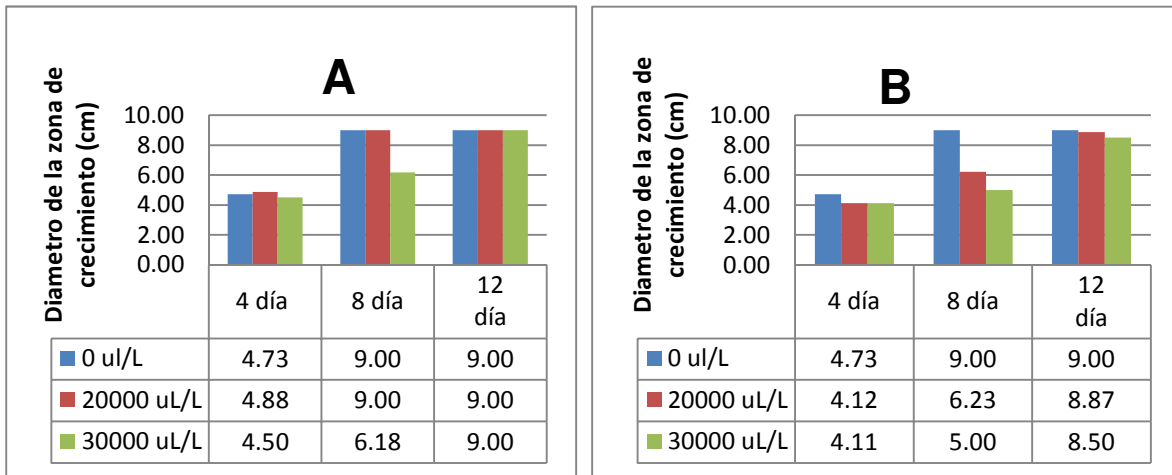


Figura 18. Crecimiento de *Phytophthora sp* en medio con AgNP (A) y ZnNP (B).

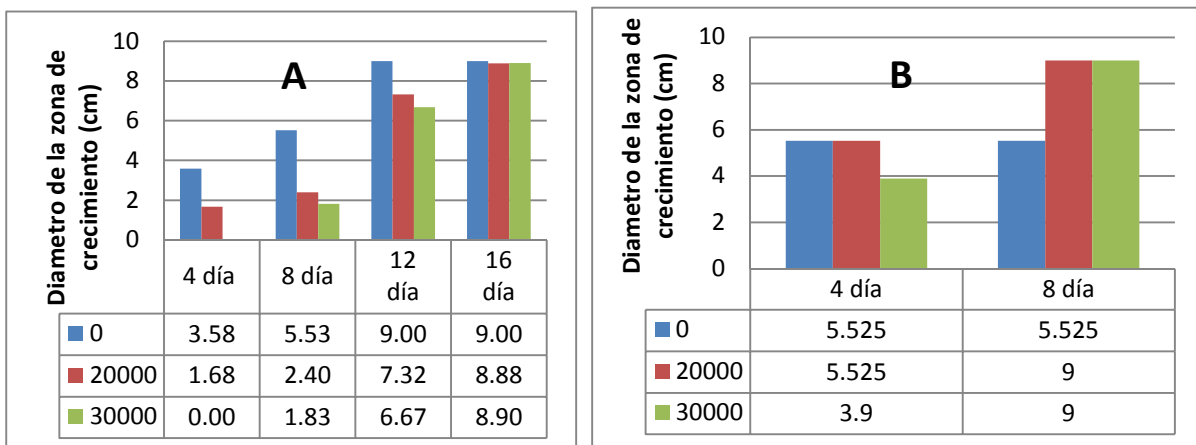


Figura 19. Crecimiento de *Pythium sp* en medio con AgNP (A) y ZnNP (B).

En el caso de *Fusarium sp*, se aprecia menor diámetro del micelio en el control en comparación con los medios tratados con nanopartículas, por lo que en este caso se considera que las nanopartículas no están ejerciendo efecto inhibitorio sobre el hongo, (Figura 17).

Para *Phytophthora sp*, sí se logra ver un menor crecimiento a mayor concentración de nanopartículas, lo cual se aprecia mejor al usar ZnNP's, (figura 18). Sin embargo, con el paso de los días el hongo continúa creciendo hasta cubrir casi la totalidad de las placas, por lo que nuevamente se ve que solo se da un efecto retardante en el crecimiento sin matar al hongo.

El efecto más notorio fue en *Pythium* sp, donde se observó un crecimiento menor cuando se aumentó la concentración de NP's, efecto que fue más significativo al usar AgNP's, ya que, tardó 16 días en cubrir la totalidad de la placa, a diferencia de los demás tratamientos y demás hongos, donde el tiempo máximo fue de 12 días, (figura 19).

Comparando con investigaciones previas, se han obtenido resultados inhibitorios al usar nanopartículas de Zinc en concentraciones mayores a 3 mmol/L en los hongos: *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Sin embargo, se determinó que las nanopartículas fueron más efectivas contra *P. expansum* que en *B. cinérea*, (He, et al, 2011). Los resultados obtenidos por estos investigadores demuestran que el efecto varía dependiendo del organismo con el que se esté trabajando. Esta investigación muestran algo similar, ya que, se observó mayor inhibición en *Phytophthora* sp al inocular el medio con ZnNP's. Pero en el caso de *Pythium* sp la inhibición fue mayor al usar AgNP's. Mientras que para *Fusarium* sp no se observó inhibición alguna con ningún tratamiento.

Otros autores reportan disminución en el diámetro de crecimiento de algunos tipos de hongos cuando se aplican nanopartículas de plata en el medio de cultivo, tal es el caso de una investigación realizada con el hongo *Colletotrichum gloesporioides*, donde disminuía la velocidad del crecimiento micelial en comparación con el control, además se observó que a mayor concentración de nanopartículas el crecimiento era más lento. Los investigadores en este caso aclaran que obtuvieron efecto fungistático solamente, (Aguilar, 2009).

Pruebas en medio líquido

Al utilizar el medio líquido RPMI, se obtuvo viraje de color de rojo a amarillo, lo que indica crecimiento del hongo en todas las concentraciones utilizadas.

El tipo de nanomaterial utilizado en esta investigación se basa en el hecho de que los metales intervienen de forma directa o indirecta en todos los procesos vitales de los hongos; mientras que algunos son esenciales y se les clasifica como “elemento traza” pues se requieren en concentraciones muy bajas (cantidades mayores son tóxicas para el hongo), otros resultan ser absolutamente tóxicos (Gradd 1993, Carlile et al. 2001)

Los metales se han usado como componentes antifúngicos en agricultura y la industria. Aunado a esto, en los últimos tiempos la polución causada por la actividad humana ha aumentado las concentraciones de metales en la naturaleza, lo que ha seleccionado a las cepas de hongos que desarrollan resistencia al efecto tóxico de estos. Metales como el cobre y la plata son tóxicos para las células porque se unen a grupos funcionales de enzimas y transportadores de membrana, bloqueando su funcionamiento; sustituyen cofactores metálicos, como hierro, en biomoléculas, desnaturalizan, modifican o inactivan enzimas y alteran la integridad de las membranas (Gradd 1993)

Algunas de las propiedades intrínsecas que pueden permitirle a los hongos resistir la acción tóxica de metales son la presencia de pigmentos impermeables en la pared celular, polisacáridos extracelulares, excreción de metabolitos. También puede estar implicadas la precipitación extracelular, formación de complejos, cristalización, transformación química de metales (metilación, oxidación, reducción, etc) bioabsorción a la pared celular y compartimentalización. Un mismo organismo podría presentar una o varias de estas estrategias (Gradd 1993). Estos mecanismos podrían explicar el hecho que las nanopartículas en estudio no inhibieran completamente el crecimiento de los hongos.

Los organometales resultan ser más tóxicos para los hongos que los metales propiamente, estos actúan a nivel de membrana mitocondrial alterando el gradiente electroquímico, con lo que interfiere en la fosforilación oxidativa, además de que induce la producción de radicales libres en la célula (Gradd, 1993). Esto nos plantearía la posibilidad de que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre y plata podría verse potenciada si se asocian a moléculas orgánicas, de tal forma que los mecanismos de resistencia a metales pesados no intervengan en la actividad antimicrobiana.

Hay que tomar en cuenta que los hongos con los cuales se trabajó en esta investigación fueron cepas aisladas de la zona de Llano Grande en Cartago, las cuales podrían no ser tan susceptibles a las nanopartículas empleadas.

Pruebas con nanotubos de carbono

Al realizar las pruebas con los nanotubos de carbono no se obtuvo inhibición alguna, ya que en todas las concentraciones probadas los tres fitopatógenos crecieron en igual proporción que el control. No se observó ninguna diferencia aparente. Esto podría deberse a que los nanotubos utilizados no tienen el diámetro y tamaño adecuados para pasar a través de la membrana celular del hongo.

Como toda célula, los hongos están rodeados por una membrana plasmática, donde el principal esteroide es el ergosterol y no el colesterol como en las células animales y vegetales. En algunas células se ha descrito una capa de glucocálix sobre la membrana, que está conformada por una capa limosa de polisacáridos. Sobre éstas se ubica la pared celular, que en los hongos se caracteriza por la presencia de quitina, un polímero lineal conformado por unidades de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β 1-3. La pared celular fúngica está lejos de ser una estructura estática, su ensamblado es dinámico y complejo. Sobre la membrana tiene una capa de fibras de quitina se sirven de andamio, unidas a estas se encuentran fibras de glucanos y proteínas y sobre ellos glicoproteínas. La pared celular es porosa, su permeabilidad puede variar dependiendo si se encuentra en un medio hiper o hipotónico y a través de ella pueden pasar moléculas de bajo peso molecular, como iones metálicos (Carlile et al. 2001, Potón 2008).

La pared celular de los hongos contribuye a darle forma a la célula, controla su permeabilidad y es el contacto directo con el medio exterior; permite el paso de moléculas pequeñas, iones y agua (Potón 2008).

En el caso de las pruebas realizadas con nanotubos de carbono podríamos pensar que estos no fueron capaces de atravesar todas estas barreras, ya sea por impedimento estérico en los canales proteicos o por incompatibilidad de carga, y esto impidió que ejercieran su efecto antimicrobiano. Se sugiere probar con otros nanotubos que reúnan condiciones químicas que si les permitan entrar a la célula fúngica.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La cepa de *Fusarium sp* aislada de Llano Grande de Cartago, no presenta susceptibilidad a las nanopartículas empleadas en esta investigación con las concentraciones utilizadas.
- *Phytophthora sp*, presentó un leve efecto fungistático al usar nanopartículas de Zinc en concentraciones de 20 mil y 30 mil μL . Mientras que en *Pythium sp* dicho efecto se presentó al usar nanopartículas de Plata en concentraciones de 20 mil y 30 mil μL .
- Los efectos de las nanopartículas varían de acuerdo al organismo con el que se esté trabajando.
- No se obtuvo efecto fungicida sobre los organismos aislados en esta investigación.
- Propiedades intrínsecas de los hongos pueden permitirles resistir la acción tóxica de los metales y en consecuencia de las nanopartículas.
- Los nanotubos de carbono usados no tuvieron efecto sobre los fitopatógenos en las condiciones utilizadas.
- La compleja composición de la pared celular y la membrana de los hongos podría estar confiriendo resistencia al tipo de nanotubos usados, sin embargo, es necesario hacer investigación que apoye esta premisa.
- Se recomienda hacer pruebas en las que se utilicen nanopartículas de cobre y plata asociadas a moléculas orgánicas, para potenciar su acción y determinar si se inhibe el factor de resistencia a metales dado por las propiedades intrínsecas de los hongos.
- Se recomienda hacer estudios con cepas que provengan de laboratorio que sirvan de referencia para verificar si se presentan resultados similares en comparación con las cepas aisladas en plantas de Gerbera de la zona de Llano Grande.
- Se recomienda realizar pruebas con nanotubos de carbono de menor diámetro y longitud a los usados en este estudio.
- Es importante hacer un estudio en microscopio electrónico de cada uno de los hongos tratados con nanopartículas y CNT's con el fin de determinar si hay absorción de las mismas.

APORTES Y ALCANCES

1. Esta investigación permitió adquirir conocimiento sobre las propiedades antimicrobianas de nanopartículas sobre hongos aislados en Costa Rica, gracias a esto, ya se cuenta con información preliminar sobre el uso de nanomateriales en el control de microorganismos de importancia agroindustrial.
2. Se cuenta con una revisión de literatura que muestra el impacto potencial de las nanopartículas sobre microorganismos ambientales, poniendo en evidencia el cuidado que se debe tener al trabajar con estos materiales para evitar daños potenciales al ambiente.
3. Ahora se cuenta con 3 cepas de hongos en el laboratorio: *Phytophthora sp*, *Fusarium sp* y *Phityum sp*.
4. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con la visita del Dr. David B. Janes, especialista en Nanotecnología de la Universidad de Purdue, a quien se le presentó la investigación realizada y de quien se recibió retroalimentación. El Dr. Janes planteó la sugerencia de usar nanopartículas en materiales de uso para el ser humano.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.A. 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. México. 89 p.
- Alday, E., García, N., Mejías, M.P., Silbermins, M. 2012. Nanopartículas de plata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. 26 p
- An, J. Zhang, H., Zhang, J., Zhao, Y., Yuan, X. 2009. *Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles*. Springer-Verlag. P.p. 1425–1434
- Arias L.R., Yang Liju. 2009. *Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions*. Langmur 25:3003-3012.
- Chaw K.C., Manimaran M., Tay F.E.H. 2005. *Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measures by atomic force microscopy in Staphylococcus epidermidis biofilm*. Antimicrob. Agents. Chemother. 49:4853-4859.
- Carlile, J, Watkinson, C., Gooday, W. 2001. The Fungi. 2nd Ed. Academic Press. Great Britain.
- J.A. Creighton, C.H.G. Blatchford, M.G. Albrecht. Trans. Faraday Soc. 75 (1979) 790
- Delgado, G.C. 2007. *Nanotecnología: Avances y retos*. Ciencia y Desarrollo. 33 (206):19.23
- Dhingra, O., Sinclair, J. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Pres, Inc. Boca Raton, Florida. USA. 355 p.
- Gardner, G.E., Jones, M.G. 2009. *Bacterial Buster: Testing antibiotic properties of silver nanoparticles*. Amer. Biol. Teacher. 71:231-234.
- Gradd, G.M. 1993. *Interactions of fungi with toxics metals*. New Phitol. 124:25-60.
- He, L., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M. 2010. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. Food Science Program, Division of Food Systems & Bioengineering, University of Missouri, Columbia. Microbiological Research 166 (2011) 207—215
- Jin-Woo, K, Shaskov E.V., Galanzha E., Kotagiri N., Zharov V.P. 2007. Photothermal antimicrobial nanotherapy and nanodiagnostics with self-assembling carbon nanotube clusters. Lasers in Surgery and Medicine 39: 622-634.
- Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., Elimelech M. 2008 Antibacterial Effects of Carbo Nanotubes: Size Does Matter!. Langmuir 24:6409-6413.

Kant S., Pinault M., Pfefferle L.D., Elimelech M. 2007. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir* 23:8670-8673.

Kemp M.M., Kumar A., Clement D., Mousa S., Linhardt R.J. 2009. Hyaluronan an heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties. *Nanomedicine* 4:421-429.

Khaydarov, R.R., Khaydarov, R.A., Gapurova, O., Estrin, Y., Evgrafova, S., Scheper, T., Cho, S.Y. 2009. "Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized by an Electrochemical Method." *Nanostructured Materials for Advanced Technological Applications*. p.p. 215-218. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/xh37406xh2042177/> Consultado el 30 de marzo, 2011

Liu S., Wei L., Fang N., Chank M.W., Xu R., Yang Y., Chen Y. 2009. Sharper and faster "Nano Darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *Acsnano* 3:3891-3902.

Monge, M. 2009. *Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas*. Investigación Química. Real Sociedad Española de Química. 105 (1): 33-41

Nepal D., Balasubramanian S., Simonian A.L., Davies V.A. 2008. Strong Antimicrobial Coatings: Single-Walled Carbon Nanotubes Armored with Biopolymers. *Nanoletters* 8(7):1896-1901.

Potón. 2008. *La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina*. *Rev Iberoam. Micol.* 25:78-82.

Rivera, W. 2012. Comunicación personal. Profesor del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Consulta realizada el 03 de febrero y 05 de marzo, 2012.

Samrat, R. Mahua, G., Amrita, M., Dipankar, C., Moumita, P., Saheli, P., Arunava, G. 2011. "Surface-modified sulfur nanoparticles: an effective antifungal agent against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 90, Num 2, Pág 733-743. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/?k=Surface-modified+sulfur+nanoparticles> Consultado el 30 de marzo, 2011

Santoro C.M., Duchsherer N.L., Grainger D.W. 2007. Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotech* 3:55-65.

Villalba, V. 2012. Comunicación personal. Profesor del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Consulta realizada el 09 de abril, 2012

Villalba, V. 2010. Aspectos Moleculares de la Fitopatología. Manual de Laboratorio. Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 73 p.

Anexos

Anexo 1. Imágenes de los fitopatógenos vistas al microscopio electrónico de Barrido (SEM)

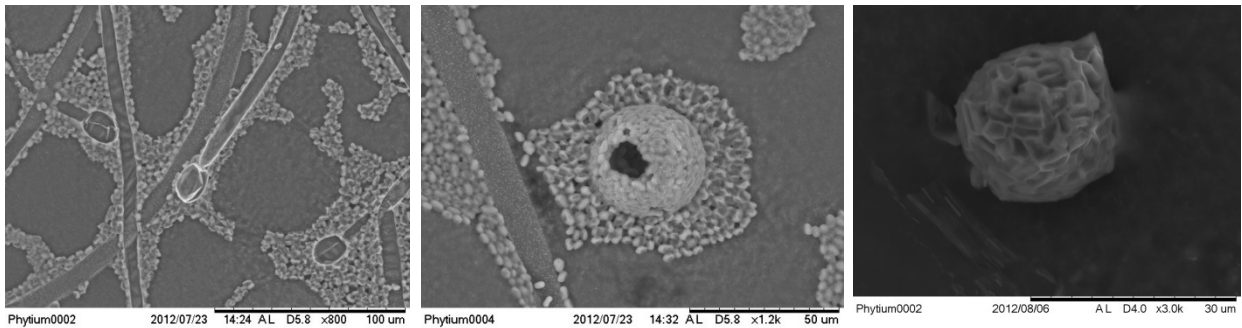


Figura 20. Imágenes de los fitopatógenos aislados de *Gerbera jamesonii*, cultivados en el laboratorio. Se aprecia las esporas. (Fotos cortesía Pamela Zúñiga. Laboratorio de Nanotecnología del ITCR)

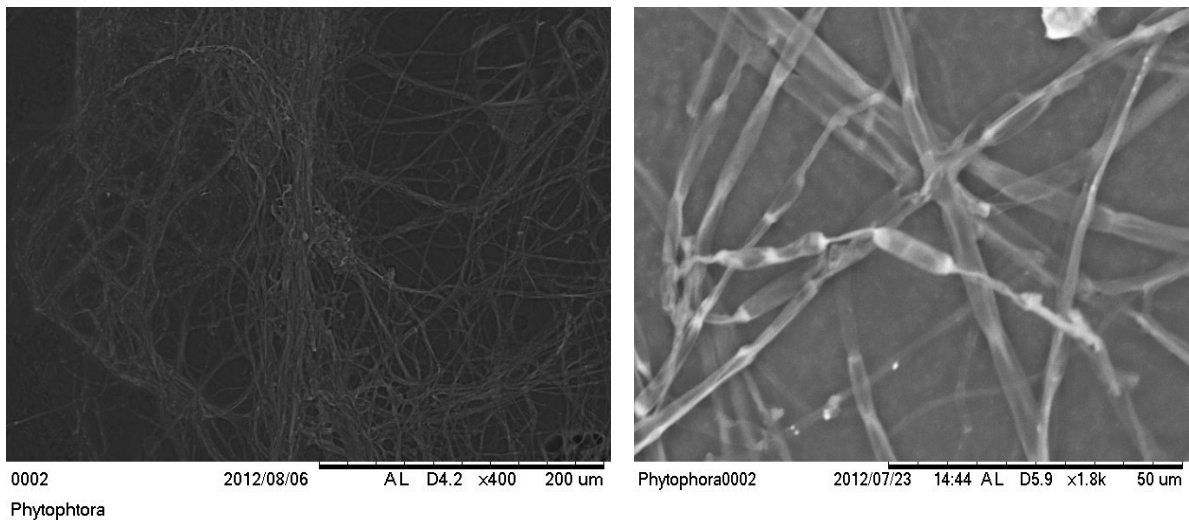


Figura 21. Imágenes de *Phytophthora sp* obtenidas a partir de los cultivos realizados en laboratorio. Se aprecian las hifas, en ningún caso se logró obtener la espora, debido a que resulta muy difícil que este organismo produzca esporas bajo condiciones de laboratorio. Las imágenes que se observan en la figura 3.B. fueron obtenidas cuando el cultivo estaba recién establecido, caso contrario, estas imágenes son a partir de *Phytophthora sp* con varios meses de subcultivos en laboratorio. (Fotos cortesía Pamela Zúñiga. Laboratorio de Nanotecnología del ITCR)

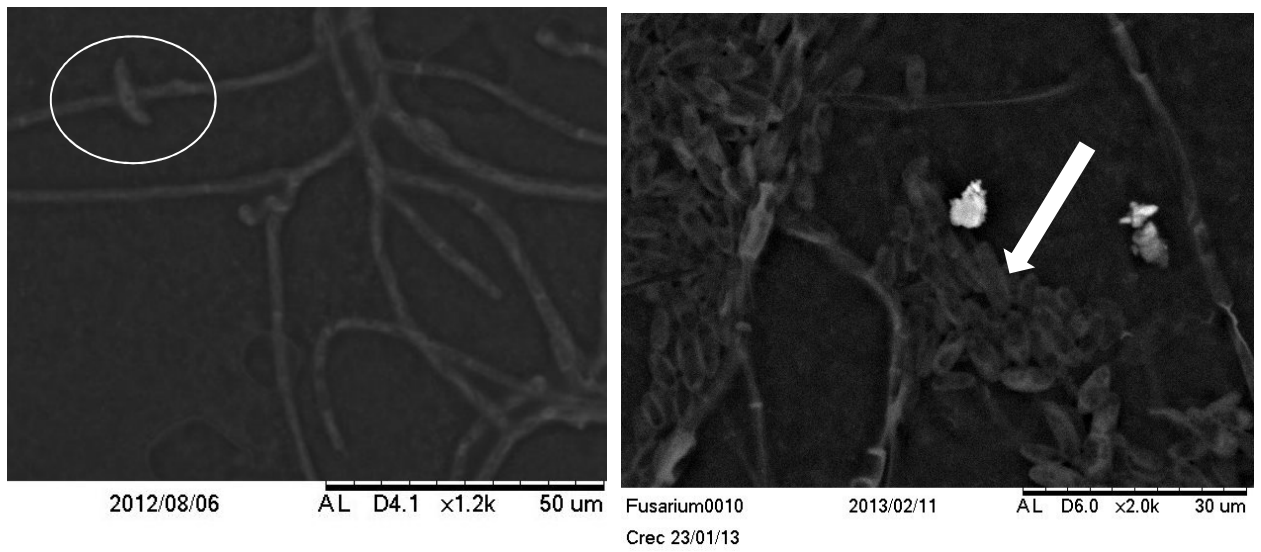


Figura 22. *Fusarium sp*, después de varios meses de subcultivo en laboratorio. Se observan las esporas. (Fotos cortesía Pamela Zúñiga. Laboratorio de Nanotecnología del ITCR)

Anexo 2. Nanopartículas de plata obtenidas mediante el método de Creighton.

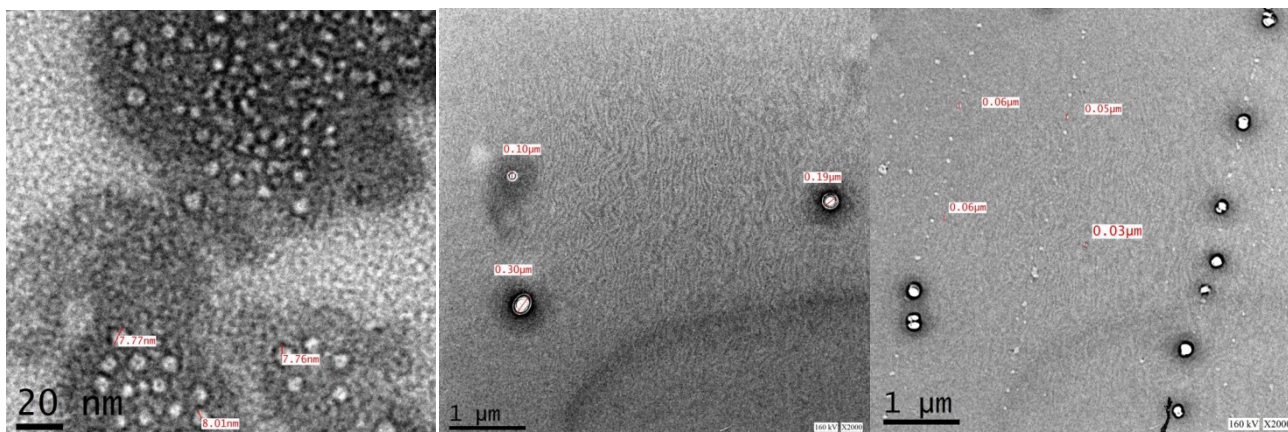


Figura 23. Nanopartículas de plata utilizadas en las pruebas de sensibilidad durante la investigación. Fotografías tomadas con el Microscópio electrónico de Transmisión (TEM). Se aprecia que son esféricas y con tamaños uniformes en algunos casos menores a los 100 nanómetros. (Cortesía Pamela Zúñiga. Laboratorio de Nanotecnología del ITCR)

Anexo 3. Método de Creighton para obtener nanopartículas.

Se agregan gota a gota (~ 1 gota/seg) 10 mL de AgNO_3 1.0 mM a 30 mL de NaBH_4 2.0 mM colocados en un baño de hielo, bajo agitación vigorosa. La solución toma un color amarillo intenso al finalizar la adición de AgNO_3 , la agitación debe finalizar una vez se termina de adicionar el AgNO_3 . La reacción se realiza en medio acuoso (agua destilada). Las condiciones de reacción (tiempo de agitación y cantidades relativas de reactivos) deben ser controladas cuidadosamente para obtener soles estables de plata. (Alday, *et al.* 2012)