

Año 13, PCTI 204-2022-04-04

## Nanoestructuras de óxido zinc para el control de *Erwinia amylovora*, patógeno que provoca la mancha de fuego en manzanos

Aurora Araiza-Campos<sup>1</sup>, Antonia Luna-Velasco<sup>1</sup>, Francisco Paraguay-Delgado<sup>1</sup>, Joan S. Salas-Leiva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), <sup>2</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).  
[joan.salas@cimav.edu.mx](mailto:joan.salas@cimav.edu.mx)

Biotecnología y Ciencias Agropecuarias.

### Abstract

Fire blight is a disease of apple trees caused by the bacterium *Erwinia amylovora*. In this research, the antibacterial effect on *E. amylovora* of two zinc oxide nanostructures (nZnO) was determined: platelets (planar structures) and quasi-rounded (rounded structures), each with oxygen vacancies (empty spaces in the molecular structure) (cVo) and without oxygen vacancies (sVo). The nZnO were dispersed in water, and the microbial growth inhibition capacity was evaluated by the agar diffusion method. Two times of aging of the nZnO in the aqueous suspension were considered (1 and 15 days). The results indicate that all nZnO can inhibit the growth of *E. amylovora*. On day one, the greatest growth inhibition occurred with nZnO quasi-rounded (cVo), and on day 15, the platelets (cVo and sVo) were the most effective. The antibacterial effect due to the action of nZnO could be attributed to mechanical damage to cellular structures and the generation of oxidative stress due to the release of Zn<sup>2+</sup> ions, which can increase with the time of suspension in water. **Keywords:** Zinc oxide, nanostructures, antimicrobial, phytopathogen.

### Resumen

La mancha de fuego es una enfermedad del manzano causada por la bacteria *Erwinia amylovora*. En esta investigación se determinó el efecto antibacteriano sobre *E. amylovora* de dos nanoestructuras de óxido de zinc (nZnO): plaquetas (estructuras planas) y cuasi-redondas (estructuras redondeadas), cada una con vacancias de oxígeno (espacios vacíos en la estructura molecular) (cVo) y sin vacancias de oxígeno (sVo). Las nZnO se dispersaron en agua y se evaluó la capacidad de inhibición de crecimiento microbiano mediante el método de difusión en agar. Se consideraron dos tiempos de envejecimiento de las nZnO en la suspensión acuosa (1 y 15 días). Los resultados indican que todas las nZnO pueden inhibir el crecimiento de *E. amylovora*. Al día 1 la mayor inhibición de crecimiento ocurrió con nZnO cuasi-redondas (cVo) y al día 15 las plaquetas (cVo y sVo) fueron las más efectivas. El efecto antibacteriano por acción de nZnO podría atribuirse a daños mecánicos a estructuras celulares y generación de estrés oxidativo por liberación de iones de Zn<sup>2+</sup> el cual puede aumentar con el tiempo de suspensión en el agua. **Palabras clave:** Óxido de zinc, nanoestructuras, antimicrobiano, fitopatógeno

### Problemática

El uso intensivo de antibióticos sintéticos para combatir la mancha de fuego en el manzano ha generado cepas de *E. amylovora* resistentes a estas sustancias. Por lo que se requiere del desarrollo de tratamientos alternativos innovadores que permitan su control.

### Usuarios

Esta investigación incide en el sector agrícola de la producción de manzana y pera del estado de Chihuahua y otras regiones productoras de estos frutos en México. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER).

### Introducción

Los manzanos y peras se encuentran dentro de la familia de las rosáceas, siendo la manzana, la de mayor consumo a nivel mundial. En México, en el año 2020 se produjeron aproximadamente 714.203 toneladas de manzanas, las cuales aumentaron en un 14% en el siguiente año (SADER, 2021). El estado de

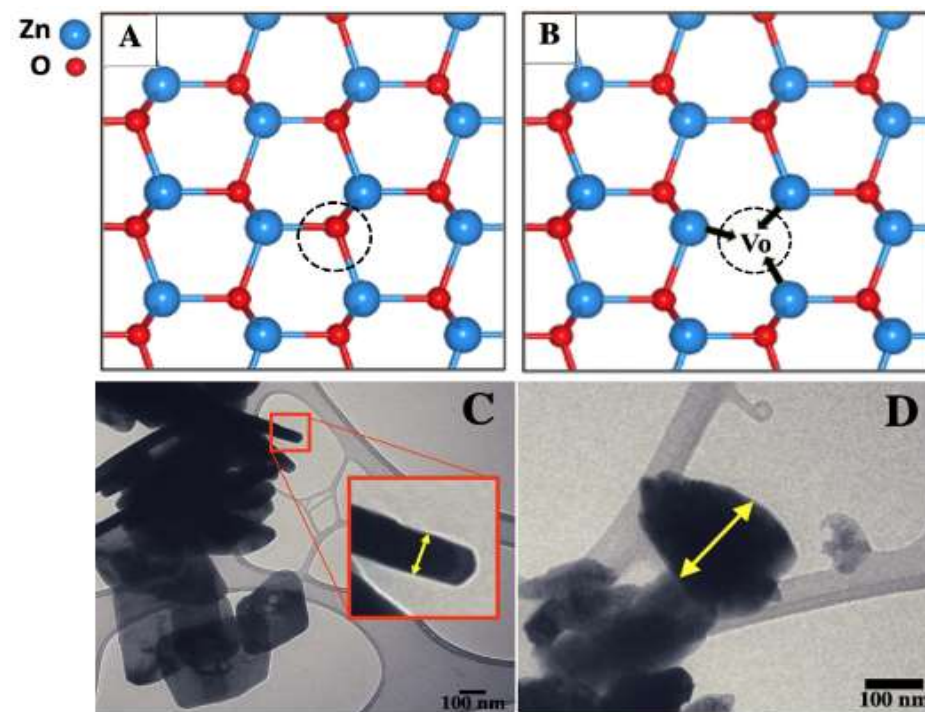


Figura 1. Representación gráfica de red cristalina de nZnO: A) sin vacancias de oxígeno (sVo) (círculo negro marca el lugar del oxígeno que se extrae), B) Ajuste de átomos con vacancia de oxígeno (cVo) modificada de Bhat et al. (2015). Micrografía MET en modo campo claro de las formas C) plaquetas y D) cuasi-redondas. Las líneas amarillas indican el grosor de las plaquetas (C) y cuasi-redondas (D).

Chihuahua genera el 83% de la producción total nacional, seguido por Puebla, Durango y Coahuila (SADER, 2021). Entre las afecciones en la producción del manzano, está la provocada por la bacteria *E. amylovora* causante de la enfermedad conocida como "mancha de fuego" que afecta al manzano y a la fruta. El tratamiento más común para esta enfermedad es mediante la aplicación de antibióticos sintéticos, pero su uso intensivo, ha dado origen a cepas de bacterias resistentes a estos (de León Door et al., 2013). Una de las alternativas innovadoras para resolver esta problemática, es la aplicación de materiales a nanoescala (1-1000 nm), con propiedades antimicrobianas. El óxido de zinc en estructuras nanométricas (nanoestructuras) (nZnO) presenta propiedades antibacterianas según su forma, tamaño y defectos superficiales específicos. Cuando las nanoestructuras entran en contacto con las bacterias pueden generar daños mecánicos (ruptura de paredes celulares) y/o cambios fisicoquímicos (p.e., formación de especies reactivas de oxígeno-EROs) que conllevan a la muerte de las bacterias (Sirelkhatim et al., 2015). El ZnO cuenta con una estructura cristalina ordenada y empaquetada de átomos de Zn y O con patrones estables (Fig. 1 A), pero si se somete a tratamientos físicos (p.e., térmicos), se le pueden extraer átomos de O, generando un ajuste en la posición de los átomos restantes (Fig. 1 B), esto deja espacios en la red que se conocen como vacancias de oxígeno (Vo).

### Objetivos

Evaluar el efecto de nanoestructuras de óxido zinc (nZnO) con vacancias (cVo) y sin vacancias (sVo) de oxígeno sobre el crecimiento de *E. amylovora* en un medio de cultivo sólido.

### Materiales y Métodos

Se sintetizaron dos nZnO, plaquetas (Fig. 1C) y cuasi-redondas (Fig. 1D), por los métodos hidrotérmico y coloidal, respectivamente (Pariona et al., 2020). Las Vo se generaron en un horno tubular, a 600 °C por una h, con flujo continuo de 1L/min del gas 25% de Hidrógeno en balance Nitrógeno. De esa manera, se obtuvo un total de cuatro grupos nZnO: plaquetas i) sin Vo y ii) con Vo, y cuasi-redondas iii) sin Vo y iv) con Vo. La caracterización microestructural (forma y tamaño), composición elemental y presencia de Vo en las nZnO se realizó mediante las técnicas de difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión (MET) (Morales-Mendoza et al., 2019; Pariona et al., 2020). Por su parte, *E. amylovora* se obtuvo del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) (Cuauhtémoc, Chih.). *E. amylovora* se creció en caldo de cultivo Luria Bertani (LB) por 24 h a 28 °C (de León Door et al., 2013) antes de realizar las pruebas. La actividad antimicrobiana de las nZnO se evaluó en medio sólido mediante el método de disco de difusión en agar, en las que se midió el diámetro de inhibición de crecimiento alrededor del disco (método Kirby Bauer). Este

método consistió en embeber los discos de papel filtro (10 mm de diámetro) en una suspensión acuosa que contenía las nZnO en una concentración de 5000 ppm. Los discos embebidos se colocaron en la superficie de placas de agar previamente inoculadas con *E. amylovora* (100 µL de 1.65x10<sup>8</sup> UFC/mL). Los ensayos se realizaron con todas nZnO en suspensión acuosa a los días 1 y 15 (envejecimiento). Como control negativo se usó agua destilada y como control positivo se utilizó cloruro de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) que es conocido por su actividad antimicrobiana. Para notar la inhibición de crecimiento, las placas de agar con los discos se incubaron por 48 horas a 28 °C (Balouiri et al., 2016). Posteriormente, se midieron los halos de inhibición de crecimiento con programa ImageJ. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Los datos de inhibición se expresaron en milímetros (mm). Para determinar las diferencias estadísticas se realizó una ANOVA de una vía y una prueba a posteriori de Tukey HDS (p < 0.05).

### Resultados y Discusión

Las plaquetas sintetizadas midieron aproximadamente 50 nm de ancho y 450 nm de largo y las cuasi-redondas 100 nm (Fig. 1 C y D). En general, los

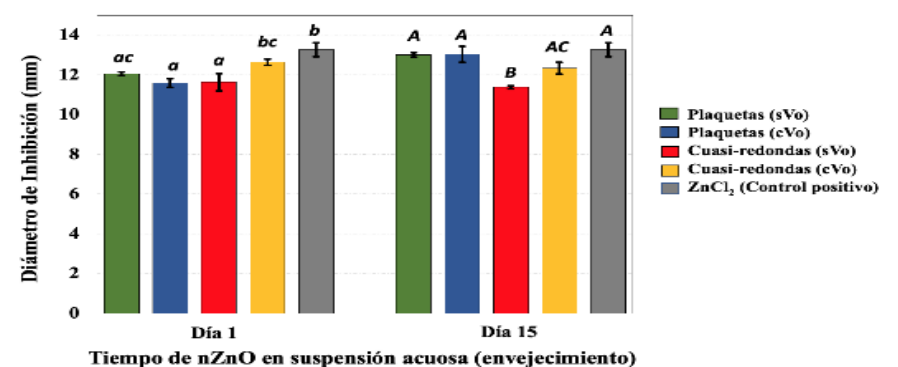


Figura 3. Diámetros de inhibición de crecimiento (en milímetros) de *E. amylovora* por efecto de nZnO y tiempo de envejecimiento de éstas en suspensión acuosa. El control negativo (agua destilada) no presentó inhibición de crecimiento. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes sobre las barras indican p<0,05 para el día 1 y 15 respectivamente. sVo: sin vacancias de oxígeno; cVo: con vacancias de oxígeno.

resultados indican que todas las nZnO provocan una inhibición de crecimiento de *E. amylovora*. En la Figura 2A y 2B se observa los halos de inhibición por las nZnO. Al día 1, el mayor halo de inhibición se generó con nZnO cuasi-redondas (cVo) (12.63 ± 0.15 mm) y al día 15 con plaquetas (cVo y sVo) (13.01 ± 0.1 y 13.01 ± 0.39 mm respectivamente). El tiempo de envejecimiento de las nZnO, en la suspensión acuosa, generó un incremento en los halos de inhibición de plaquetas; mientras que en las cuasi-redondas el comportamiento fue similar (Fig. 3). El control positivo (ZnCl<sub>2</sub>) en los dos tiempos presentó un halo de inhibición promedio de 13.27 ± 0.34 mm, cabe destacar que la concentración de este control fue 6.8 veces mayor (~34000 ppm) a las aplicadas con nZnO.

El control negativo no inhibió el crecimiento (0 mm de inhibición). Estos resultados son un indicativo del alto potencial antimicrobiano de las nZnO en un medio sólido. En investigaciones previas se ha indicado la actividad antimicrobiana de las nZnO depende de, tamaño, forma, concentración y defectos, atribuyéndoles cambios en las propiedades de la materia al incrementar la relación superficie/volumen en un material nanoparticulado (Prasanna and Vijayaraghavan, 2017). De acuerdo con los resultados, consideramos que la actividad de la forma cuasi-redondas (cVo) (día 1), puede deberse a la interacción física y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que se incrementa por acción de las Vo. Mientras que en las suspensiones envejecidas (15 días) podría estar relacionado principalmente con la ionización de ZnO en el agua, es decir, la liberación Zn<sup>2+</sup> que en la célula genera estrés oxidativo y finalmente la muerte celular (Deylam et al., 2021; Mendes et al., 2022).

### Conclusiones

Los resultados indican que la forma y el tiempo de envejecimiento de las nZnO pueden influir en la actividad antimicrobiana, esto es importante para conocer la estabilidad de las soluciones con nanoestructuras para futuras formulaciones antimicrobianas. Es necesario destacar que se requieren estudios complementarios para identificar el (los) mecanismo(s) exacto(s) por los cuales las nZnO evaluadas provocan la inhibición de crecimiento en *E. amylovora*.

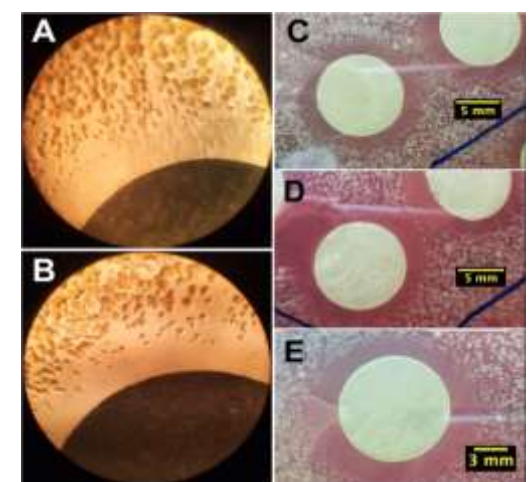


Figura 2. Micrografías de halos de inhibición generados por las nZnO en los días de envejecimiento en suspensión. Discos de papel filtro embebidos con nZnO A) cuasi-redondas cVo (1 día de suspensión), B) plaquetas cVo (15 días de suspensión), C) cuasi-redondas cVo (1 día de suspensión), y D) plaquetas cVo (15 días de suspensión), E) Control positivo con ZnCl<sub>2</sub>.

### Impacto Socioeconómico

El estudio de agentes alternativos para el tratamiento de patógenos en cultivos de manzano impactaría en un futuro en la reducción de pérdidas económicas y de costos, mediante el desarrollo de tratamientos novedosos, eficientes (alternativos, al uso de antibióticos convencionales de uso intensivo y con resistencia de los patógenos) en este sector agrícola.



Contacto PCTI:  
[hnolesco2008@hotmail.com](mailto:hnolesco2008@hotmail.com)