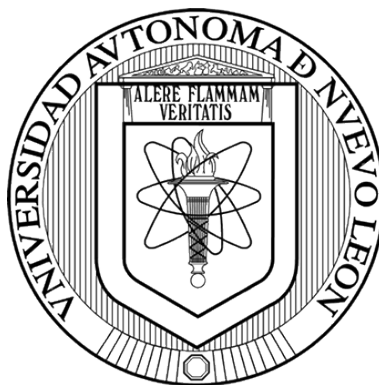


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOPARTÍCULAS DE Ag, CuO Y ZnO CONTRA BACTERIAS
FITOPATÓGENAS**

Por

MC. EDITH RAMOS CORTEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MANEJO Y ADMINISTRACIÓN DE
RECURSOS VEGETALES**

Mayo, 2018

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOPARTÍCULAS DE Ag, CuO Y ZnO CONTRA BACTERIAS
FITOPATÓGENAS**

Comité de Tesis

Dr. Jorge Luis Hernández Piñero
Presidente

Dr. Rahim Fouroughbakhch Pournavab
Secretario

Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar
Vocal 1°

Dra. Alejandra Rocha Estrada
Vocal 2°

Dr. Efrén R. Robledo Leal
Vocal 3°

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOPARTÍCULAS DE Ag, CuO Y ZnO CONTRA BACTERIAS
FITOPATÓGENAS.**

Comité de Tesis

Dr. Jorge Luis Hernández Piñero

Director

Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar

Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Una de las mejores experiencias que me dejó mi transcurso en este Doctorado, fue el haber conocido a excelentes personas, las cuales actualmente forman una parte importante en mi vida y agradezco a cada una de ellas, principalmente:

A todos los **Doctores, compañeros, técnicos y administrativos** de este programa de Doctorado, muchos de los cuales son ahora gratamente mis amigos. Gracias por hacer más amena mi estancia y por todo su apoyo en mi experimento de tesis.

Al **Dr. Jorge Luis Hernández Piñero**. Gracias por confiar en mí y haberme aceptado como su alumna, por su apoyo, por sus enseñanzas a nivel académico y de la vida misma, gracias especialmente por su amistad.

Al departamento de Plásticos en la Agricultura, del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), muy especialmente al **Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar** y todo su equipo de trabajo. Muchas Gracias por todo el apoyo que recibí durante mi estancia, por su confianza, sus enseñanzas, por compartir sus anécdotas, por sus consejos y por brindarme su amistad. Durante mi estancia en CIQA conocí a personas extraordinarias, muchas de las cuales tengo la dicha de seguir conservando su amistad y agradezco a cada uno de ellos.

A mi **familia y amigos**, son los pilares de mi vida. Gracias a cada uno de ellos porque de alguna u otra forma han contribuido en mí para poder lograr esta meta y ser la persona que actualmente soy.

Y sobre todo agradezco a **Dios** por permitirme llegar hasta este momento con salud y por poner a personas maravillosas en mi camino...

DEDICATORIA

*Dedico este logro a la persona que estuvo conmigo durante todo este tiempo, mi amado esposo **José Carlos Urquiza Quiroga**, no tengo palabras para agradecerte todo el apoyo, paciencia, entusiasmo e interés que siempre mostraste por mi trabajo de tesis, fue tanto lo que hiciste por mí que hasta aprendiste técnicas de laboratorio y de cultivos en invernadero, siendo tú un Licenciado en Administración de Empresas. Durante este tiempo aprendimos muchas cosas juntos y crecimos como pareja.*

Estaré siempre infinitamente agradecida contigo...

*Lo dedico también a mis Padres y hermana: Sra. **Leonila Cortez Urué**, Sr. **Francisco Ramos Esparza** y Srita. **Jazmín Ramos Cortez***

Han sido un gran ejemplo para mí y gracias a todo el apoyo que me brindaron en este tiempo, he podido concluir con esta meta.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Agronanotecnología.	3
2.2 Problemática ambiental en la agricultura actual.....	4
2.3 Cepas fitopatógenas de importancia agrícola.....	4
2.3.1 <i>Pseudomonas syringae</i>	4
2.3.2 <i>Clavibacter michiganensis</i>	5
2.4 Efecto adverso de los agroquímicos agrícolas.....	6
2.5 Nanopartículas metálicas y su mecanismo de acción antimicrobiano.....	6
2.6 Nanopartículas de Ag.	9
2.7 Nanopartículas de CuO.....	9
2.8 Nanopartículas de ZnO.....	10
2.9 Nanopartículas en los tejidos vegetales.	11
2.10 Síntesis de nanopartículas metálicas en plantas vivas.	14
2.11 Mecanismos de defensa de las plantas ante la presencia de NPs metálicas y fitopatógenos.	15
2.11.1 Especies reactivas de oxígeno.....	15
2.12 <i>Medicago sativa</i> como planta modelo.....	17
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS.....	19

V. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	19
5.1 Objetivo general.	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Área de estudio.....	20
6.2 Material Biológico.....	20
6.3 Nanopartículas metálicas.....	20
6.4 Bioensayo I. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	21
6.4.1 Preparación del inóculo bacteriano.....	21
6.4.2. Preparación de los tratamientos con NPs.....	22
6.4.3 Siembra de las bacterias por difusión en agar.....	22
6.5 Bioensayo II. Ensayos de toxicidad en semillas de <i>M. sativa</i>	24
6.5.1 Ensayos de viabilidad (vigor y germinación) en semillas de <i>M. sativa</i>	24
6.6 Bioensayo III. Actividad antibacterial de las NPs de Ag, CuO, ZnO <i>in vivo</i>	26
6.6.1 Distribución de los tratamientos.	27
6.6.2 Establecimiento del experimento en invernadero.	27
6.6.3 Riego de las plantas.	29
6.6.4 Inoculación bacteriana.	30
6.7 Evaluación de los tratamientos <i>in vivo</i>	31
6.8 Cuantificación de la actividad enzimática (CAT, POD, APX).	32
6.8.1 Extracto proteico.....	32
6.8.2 Actividad enzimática CAT	34
6.8.3. Actividad enzimática de POD.....	35
6.8.4 Actividad enzimática de APX.....	37
6.9 Análisis estadístico.	38

6.9.1 Viabilidad (vigor y germinación)	38
6.9.2 Actividad antibacteriana de las NPs <i>in vivo</i>	39
6.9.3. Cuantificación de la actividad enzimática.	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	40
7.1 Bioensayo I. Antagonismo <i>in vitro</i> de las NPs.....	40
7.2 Bioensayo II. Determinación de vigor y germinación en semillas de <i>M. sativa</i> sometidas a los tratamientos con NPs.	46
7.3 Bioensayo III. Actividad antibacteriana <i>in vivo</i> de los tratamientos con NPs.....	48
VIII. CONCLUSIONES	60
IX. PERSPECTIVAS	61
X. BIBLIOGRAFÍA.....	63
XI. RESUMEN BIOGRÁFICO	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Alícuotas para la preparación de los tratamientos de NPs en las pruebas in vitro.	22
Tabla 2.- Distribución de los tratamientos para las pruebas <i>in vivo</i>	27
Tabla 3.- Resumen de procesamiento de casos NPs.	48
Tabla 4.- Tabla de contingencia INCIDENCIA*NPs	49
Tabla 5.- Prueba de ji-cuadrada para el factor Nanopartículas	49
Tabla 6.- Resumen de procesamiento de casos Bacterias.	50
Tabla 7.-Tabla de contingencia INCIDENCIA*Bacterias.....	50
Tabla 8.- Prueba de ji-cuadrada para el factor Bacterias.	51
Tabla 9.- Prueba de efectos entre sujetos para la variable Ascorbato peroxidasa.....	55
Tabla 10.- Prueba de efectos entre sujetos para la variable Catalasa.....	56
Tabla 11.- Prueba de efectos entre sujetos para la variable Peroxidasa.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mecanismo de acción de las nanopartículas metálicas en la célula bacteriana, en donde se destacan la producción de ROS, daño al ADN, a las proteínas y a la membrana celular.	8
Figura 3.- Efecto de NPs metálicas con actividad nutricional y no nutricional, así como su efecto contra hongos y bacterias causantes de enfermedades en cultivos agrícolas. (Tomado de Servin <i>et al.</i> , 2015).	14
Figura 4.- Esquema de los tratamientos in vitro.	23
Figura 5.- Aspersión de los tratamientos con las respectivas NPs metálicas.	29
Figura 6.- Infiltración del inóculo bacteriano en plantas de <i>M. sativa</i>	31
Figura 7.- Halos de inhibición en placas conteniendo la bacteria <i>C. michiganensis</i> en donde se confrontó con las NPs de Ag, CuO y ZnO. A) Control positivo, B) Control negativo, C) 4000ppm, D) 3000ppm, E) 2000ppm, F) 1000 ppm, G) 500 ppm, H) 250 ppm. Nota* El control negativo (B) para las NPs de Ag, fue el extracto puro de <i>Larrea tridentata</i>	40
Figura 8.- Halos de inhibición en placas con <i>P. syringae</i> ante las NPs de Ag, CuO y ZnO. A) Control positivo, B) Control negativo, C) 4000ppm, D) 3000ppm, E) 2000ppm, F) 1000 ppm, G) 500 ppm, H) 250 ppm. Nota* El control negativo (B) para las NPs de Ag, fue el extracto puro de <i>Larrea tridentata</i>	42
Figura 9.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs Ag contra <i>C. michiganensis</i>	43
Figura 10.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs Ag contra <i>C. michiganensis</i>	44
Figura 11.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs ZnO contra <i>C. michiganensis</i>	45
Figura 12.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs Ag contra <i>P. syringae</i>	45
Figura 13.- Comparación de medias, Tukey ($\alpha \leq 0.05$) para las pruebas de vigor en semillas de <i>M. sativa</i> sometidas a los tratamientos con NPs.	46
Figura 15.- Evaluación de los tratamientos en invernadero.	48
Figura 16.- Imagen del daño causado por <i>P. syringae</i> en plantas de <i>M. sativa</i>	52

Figura 17.- Porcentaje de reducción del daño ocasionado por <i>P. syringae</i>	53
Figura 18.- Porcentaje de reducción del daño ocasionado por <i>C. michiganensis</i>	54
Figura 19.- Porcentaje de reducción de la enfermedad a efecto de los tratamientos con NPs.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 19.- Actividad enzimática antioxidante en plantas de Medicago sativa expuestas a NPs CuO y ZnO.	58

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ag: Plata.

APX: Ascorbato peroxidasa.

CAT: Catalasa.

CuO: Óxido de Cobre.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ISTA: International Seed Testing Association.

NMs: Nanomateriales.

NPs: Nanopartículas.

NT: Nanotecnología.

POD: Peroxidasa.

ppm: Partes por millón (mg/k).

PVP: Polivinilpirrolidona.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

ZnO: Óxido de zinc.

RESUMEN

Diversas nanopartículas (NPs) metálicas tienen propiedades antimicrobianas, y ya son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, textil, electrónica, medicina y actualmente en la agricultura. Sin embargo, es muy poca la información que existe sobre el uso de dichas NPs en los cultivos agrícolas para la prevención y control de enfermedades ocasionadas por bacterias fitopatógenas, por lo tanto, decidimos evaluar el efecto antibacteriano que tienen las NPs de Ag, CuO y ZnO *in vitro* e *in vivo* contra dos de las cepas de mayor importancia agrícola; *Pseudomonas syringae* (Gram -) y *Clavibacter michiganensis* (Gram +). Para el experimento *in vivo*, se usó como planta modelo la especie *Medicago sativa*, ya que los antecedentes indican que esta es una planta acumuladora de metales pesados y además tiene la capacidad de biosintetizarlos en nanopartículas. El presente trabajo de investigación constó de 3 bioensayos: a) Pruebas de antagonismo *in vitro*, para determinar si las NPs utilizadas tienen efecto antibacterial contra *P. syringae* y *C. michiganensis*. b) Ensayos de germinación, para verificar a qué concentración las NPs utilizadas no causan fitotoxicidad en *M. sativa*. c) Ensayos de capacidad antibacterial *in vivo*, para determinar si la incorporación de NPs al interior de los tejidos vegetales aportan protección ante el ataque bacteriano. En este bioensayo se evaluó además la respuesta enzimática de las plantas, por lo que se analizó el contenido de catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX), para determinar si las NPs, bacterias o la interacción de ambos factores causan reacciones de estrés oxidativo en *M. sativa*.

ABSTRACT

Diverse metal nanoparticles (NPs) have antimicrobial properties, and are now widely used in the food industry, textiles, electronics, medicine, and in agriculture. However, there is very little information about the use of NPs in agricultural crops for prevention and control of diseases caused by phytopathogenic bacteria. Therefore, we decided to evaluate the antibacterial effect of Ag, CuO and ZnO NPs *in vitro* and *in vivo* against two of the most important agricultural strains: *Pseudomonas syringae* (Gram -) and *Clavibacter michiganensis* (Gram +). *Medicago sativa* plants were used as a model plant for the *in vivo* experiment, since previous reports indicate that this specie is a heavy metal accumulator and also has the ability to biosynthesize them in nanoparticles. Thus, the experiment consisted of 3 bioassays: a) Tests of *in vitro* antagonism, to determine if the NPs used have antibacterial effect against *P. syringae* and *C. michiganensis*. b) Germination tests, to verify at what concentration the NPs used do not cause phytotoxicity in *M. sativa*. c) Tests of the antibacterial capacity *in vivo*, to determine if the induction of NPs inside plant tissues provides protection against bacterial disease. In this bioassay the enzymatic response was also evaluated by determine concentrations of catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX), to define if NPs, bacteria or the interaction of both factors cause oxidative stress reactions in *M. sativa*.

I. INTRODUCCIÓN

El constante avance de la nanotecnología, así como sus aplicaciones en el mejoramiento de la agricultura (Agro Bionanotecnología) son una realidad del siglo XXI. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el sector agrícola es sin duda, las enfermedades de las plantas causadas por bacterias, hongos, insectos, nemátodos, fitoplasmas y virus. Las enfermedades provocadas por estas plagas causan pérdidas económicas al reducir los rendimientos potenciales, la calidad del producto y/o la vida útil de anaquel. Solo en los Estados Unidos se gastan más de US\$600 millones de dólares anualmente en fungicidas, en un intento por controlar dichos fitopatógenos (Mazzaglia *et al.* 2017). Es bien sabido que esas plagas son las predominantes en los campos agrícolas y también en sus productos, por lo que las NPs metálicas podrían tener un efecto clave para su control.

Uno de los avances más recientes de la “Nueva Revolución Verde” es el uso de NPs aplicadas a los cultivos agrícolas para aumentar su rendimiento, producción, optimizar los principios activos de los fertilizantes, herbicidas, pesticidas y como control ante el ataque de fitopatógenos. Estudios recientes señalan que las NPs neutralizan rápidamente la carga eléctrica superficial de la membrana bacteriana y cambia su permeabilidad, lo que finalmente conduce a la apoptosis. Además, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) previene el sistema de defensa antioxidante y causa daños fisicoquímicos a la membrana celular y a diversos organelos.

De acuerdo con información reciente los principales procesos causales de los efectos antibacterianos por las NPs son los siguientes: disrupción de la membrana celular bacteriana; generación de ROS; penetración de la membrana celular bacteriana por difusión pasiva o facilitada e inducción de efectos antibacterianos intracelulares, incluidas las interfaces con la replicación del ADN y la inhibición de la síntesis de proteínas (Aziz *et al.*, 2015, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Sin embargo, aún son escasas las investigaciones en cuanto a las técnicas de aplicación de las NPs, dosis, factores de riesgo, translocación y bioacumulación en los tejidos

vegetales, así como la respuesta bioquímica de las plantas ante la presencia de dichas NPs en sus tejidos. Es por ello que la Agro Bionanotecnología nos ofrece un amplio campo de oportunidades para investigar y tratar de dar respuesta a dichas incógnitas.

Este trabajo pretende contribuir con dichos estudios, teniendo como objetivo principal la disminución del impacto ambiental ocasionado por los pesticidas, mediante el uso de pequeñas dosis de NPs metálicas de Ag, ZnO y CuO, las cuales podrían ser usadas para la prevención o control de enfermedades ocasionadas por bacterias fitopatógenas; cabe señalar que el camino para lograr este objetivo es muy largo y este trabajo es sólo una modesta contribución a ello.

II. ANTECEDENTES

2.1 AgroNanotecnología.

La nanotecnología (NT) se define como el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas a escala nanométrica en el rango de 1-100 nm (1×10^{-9}) (Sharma, 2012). Este es un campo prometedor de investigación multidisciplinaria y tiene múltiples aplicaciones en áreas como electrónica, medicina, industria textil, farmacéutica, y sus aplicaciones prácticas en la industria agrícola y alimentaria están recibiendo atención hoy en día debido a los beneficios potenciales que los nanomateriales (NMs) ofrecen. Y es así como surge el término AgroNanotecnología, el cual se refiere a la aplicación de la NT en la agricultura, dichas aplicaciones incluyen fertilizantes para aumentar el crecimiento y rendimiento de las plantas, pesticidas para el manejo de plagas y enfermedades y sensores para monitorear la calidad del suelo y la salud de las plantas. Durante la última década, se han desarrollado varias patentes y productos que incorporan NMs en las prácticas agrícolas, por ejemplo, nanoplaguicidas, nanofertilizantes y nanosensores. El objetivo colectivo de todos estos enfoques es mejorar la eficiencia y la sostenibilidad de las prácticas agrícolas, al requerir menor cantidad de insumos y generar menos desechos que los productos y enfoques convencionales (Servin *et al.*, 2015).

Las estrategias tradicionales de protección de plantas a menudo resultan insuficientes, y la aplicación de plaguicidas de base química tiene efectos negativos en los ecosistemas, animales y los seres humanos, además de causar una disminución en la fertilidad del suelo. La Agronotecnología proporciona alternativas ecológicas y eficientes para el manejo de plagas y enfermedades, provocando un menor impacto ambiental, en comparación con los agroquímicos convencionales, mientras que las estrategias más prometedoras, en este escenario, son el uso de micro y nanomateriales para promover un ensamblaje más eficiente, como la liberación específica de principios activos (Mazzaglia *et al.*, 2017).

2.2 Problemática ambiental en la agricultura actual.

Las enfermedades de las plantas son causadas por virus, fitoplasmas, bacterias, hongos y nematodos; la infección y/o infestación resultante causa pérdidas económicas al disminuir el rendimiento, la calidad del producto y/o la vida útil. Patel *et al.* (2014) señalan que las micotoxinas afectan hasta el 25% de los cultivos alimentarios en todo el mundo. Las pérdidas anuales de cultivos agrícolas que resultan directamente de fitopatologías se calculan en miles de millones de dólares, solo en los Estados Unidos los esfuerzos para el control de patógenos a través de aplicaciones de fungicidas superan los \$ 600 millones de dólares por año (Mazzaglia *et al.*, 2017). Sin embargo, dadas las tensiones adicionales en la productividad agrícola previstas por una población mundial en expansión y un declarado cambio climático, las pérdidas económicas pueden ser una preocupación secundaria.

Durante décadas se han usado varios métodos para tratar de controlar los patógenos, siendo el uso de fungicidas y pesticidas los más comunes, los cuales tienen algunos inconvenientes (Vanathi *et al.* 2016), por lo que las NPs pueden tener un papel clave para su control (Prasad *et al.* 2017). Sin embargo, en la actualidad el uso y empleo de la NT en el campo agrícola se encuentra en la etapa “infantil” (Chaudhary *et al.*, 2017) y es clara la necesidad de educar a los agricultores y sus familias sobre el uso apropiado de los plaguicidas para mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos sin dañarlos, ni al medio ambiente (Nishant y Upadhyay, 2016).

2.3 Cepas fitopatógenas de importancia agrícola.

2.3.1 *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae es una bacteria Gram negativa, que se clasifica en patovares según su especificidad de hospedador. Este patógeno es capaz de persistir sobre semillas secas y restos vegetales, activándose durante el proceso de germinación. Puede también sobrevivir epifíticamente en la superficie de las hojas, o penetrar en ellas a través de aperturas naturales como estomas o heridas, y crecer activamente en el apoplasto de la misma, causando en este caso la enfermedad. *P. syringae* se transmite

por contacto directo entre plantas y a través del agua de lluvia o riego. La infección por este patógeno determina pérdidas económicas importantes pudiendo afectar gravemente tanto la producción neta como la calidad del producto obtenido (Beuzón, 2014).

Gran número de bacterias Gram negativas son patógenas para los animales y plantas. Estas bacterias son taxonómicamente diversas e infectan una gama de hospederos. Sin embargo, independientemente del hospedero que infectan, la mayoría de las bacterias patógenas usan el sistema de secreción tipo III (T3SS) para aprovechar las células anfitrionas. La maquinaria T3SS es una estructura supramolecular filamentosa que proporciona un canal a través del cual las proteínas efectoras de tipo III (T3E) son secretadas en las células anfitrionas para manipular las respuestas de defensa del hospedero contra las bacterias. La primera estructura filamentosa asociada a T3SS fue descubierta en *P. syringae*, fitopatógeno con un amplio rango de hospedadores que incluye varias especies de cultivos (Galán *et al.*, 2014; Büttner, 2016).

Varios estudios han demostrado que las proteínas efectoras de bacterias patógenas están dirigidas a compartimentos subcelulares específicos en las células, donde alteran las propiedades fisiológicas de la célula y suprimen la inmunidad innata (Aung *et al.*, 2017).

2.3.2 *Clavibacter michiganensis*.

Clavibacter michiganensis es un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico. Se transmite por semilla infectada y posteriormente penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátodos de las hojas. El marchitamiento marginal de folíolos es uno de los primeros síntomas en plantas de todas las edades, posteriormente aparecen estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del peciolo hasta el punto que se une con el tallo, ya que la bacteria es un invasor sistémico de tejidos del floema, médula y corteza. En las bacterias Gram positivas la secreción de proteínas hacia el exterior celular requiere del transporte a través de una sola membrana. Produce colonias mucoides de color naranja después de 3 días de incubación en medio B de King a temperaturas de hasta 34 °C (Oh Eom-Ji *et al.*, 2016; Borboa-Flores *et al.*, 2009).

2.4 Efecto adverso de los agroquímicos agrícolas.

Las formulaciones tradicionales de plaguicidas, pesticidas, herbicidas y fertilizantes actualmente en uso, por lo general tienen ingredientes activos con baja solubilidad en agua y, como tales, la disponibilidad para cultivos específicos puede ser bastante baja. Por necesidad, el productor debe usar volúmenes y cantidades mayores de estas formulaciones para controlar eficazmente los patógenos y obtener un rendimiento aceptable. Además, las formulaciones de plaguicidas basadas en fertilizantes y metales actualmente en uso están sujetas a lixiviación, precipitación por componentes del suelo y volatilización.

El resultado final ha sido un enfoque altamente ineficiente que no asegura el control adecuado de patógenos y la buena fertilización de las plantas, pero además resulta económicamente muy costoso para el productor y los agroecosistemas. La pregunta clave entonces es si la solubilidad y la efectividad de estas formulaciones agroquímicas podrían mejorarse mediante el uso de aditivos o incorporando NPs, así como también usando a estas mismas como ingredientes activos (Naderi y Danesh-Shahraki, 2013). Los NMs tienen propiedades significativamente diferentes de sus contrapartes de tamaño micrométrico, pudiendo interactuar de manera diferente con otros productos químicos en relación con su tamaño (Liu *et al.*, 2018).

2.5 Nanopartículas metálicas y su mecanismo de acción antimicrobiano.

2.5.1 Síntesis de Nanopartículas metálicas.

Los NMs tienen un porcentaje mayor de átomos en su superficie lo cual conduce a una superficie de alta reactividad. Por lo tanto, los NMs tienen importancia significativa en las ciencias básicas y aplicadas (Sirelkhatim *et al.*, 2015). Se han desarrollado varios métodos químicos y físicos para la síntesis de NPs y hay una serie de enfoques más nuevos que buscan metodologías más "respetuosas con el medio ambiente" como la biosíntesis mediante la utilización de extractos de plantas (Mittal, 2013).

Los métodos tradicionales de síntesis química a menudo confían en la reducción química en una fase líquida, ya que esto permite un mayor control sobre la estructura y el rendimiento (Charitidis *et al.*, 2014). Los agentes reductores más comunes incluyen

ácido cítrico, hidroxilamina, celulosa, peróxido de hidrógeno, carbonato de sodio e hidróxido de sodio, y con frecuencia se agregan agentes estabilizadores para promover la dispersión y la distribución uniforme del tamaño de partícula utilizando alcohol polivinílico y poliacrilato de sodio.

La síntesis de NPs de óxido metálico como ZnO, CeO₂, TiO₂, CuO y Al₂O₃, normalmente se hace mediante técnicas basadas en la fase de vapor (Comini, 2013). Las técnicas hidrotermales están viendo un uso creciente debido a un mayor control de las propiedades y la pureza del producto. También se pueden usar varias técnicas físicas para la síntesis de NMs, siendo los enfoques comunes la ablación con láser, la deposición química en fase de vapor (CVD), la reducción sonoquímica, los líquidos supercríticos y la radiación gamma (Charitidis *et al.*, 2014).

Es importante señalar que dada la sensibilidad de muchos cultivos a los metales pesados y solventes comunes a estos protocolos de síntesis, es claramente importante considerar y reconocer el potencial de impactos toxicológicos significativos de las impurezas de NPs y tal vez más importante, es caracterizar adecuadamente el material antes de su uso en la agricultura. Para proteger la salud humana y establecer los posibles efectos antagónicos de una amplia gama de NMs, un creciente número de investigaciones se han centrado en la evaluación de la toxicidad de las NPs normalmente utilizadas en la industria (Du *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2017). Además, diversos autores señalan que la contaminación causada por residuos agroquímicos también puede reducirse cuando se utilizan nanoformas de óxido de metal, lo que disminuye las consecuencias ambientales adversas (Liu *et al.*, 2017; Phogat *et al.*, 2016).

2.5.2 Actividad antimicrobiana

Los factores que influyen en las actividades antimicrobianas de las NPs incluyen la dimensión, morfología, el tipo de partículas y la cristalinidad. Como resultado, hay una intensa investigación por parte de los investigadores para sintetizar NPs para diversas aplicaciones (Oladipo *et al.*, 2017). El mecanismo de acción antimicrobiano de las NPs generalmente se considera de pocos prototipos, como el estrés oxidativo y el

daño celular, la liberación de iones metálicos o los mecanismos no oxidativos (Wang *et al.*, 2017). Las NPs metálicas ejercen citotoxicidad dependiendo de la carga en la superficie de la membrana, por supuesto, la eficacia de los efectos nanotóxicos de las NPs depende de la estructura de la pared celular objetivo, por lo que la nanotoxicidad puede estar acreditada a la interacción electrostática entre las NPs con la membrana y su acumulación en el citoplasma (Aziz *et al.*, 2016; Patra y Baek, 2017).

De acuerdo con la investigación actual, los principales procesos causales de los efectos antibacterianos de las NPs son los siguientes: disrupción de la membrana celular bacteriana; generación de ROS; penetración de la membrana celular bacteriana por difusión pasiva o facilitada e inducción de efectos antibacterianos intracelulares, incluidas las interfaces con la replicación del ADN y la inhibición de la síntesis de proteínas (Aziz *et al.*, 2015, 2016; Wang *et al.*, 2017), tal y como se muestra en la Figura 1.

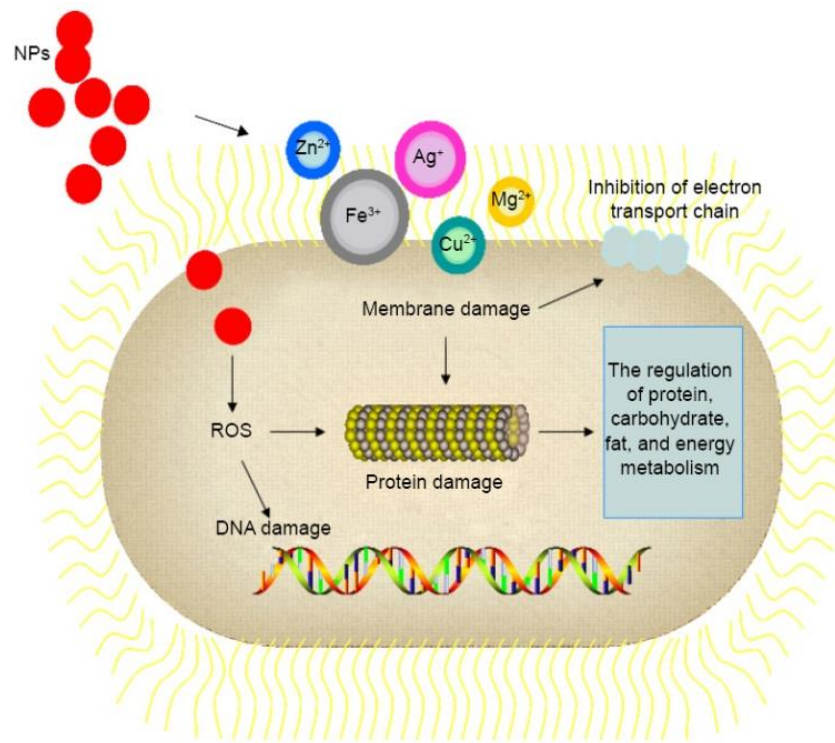


Figura 1.- Mecanismo de acción de las nanopartículas metálicas en la célula bacteriana, en donde se destacan la producción de ROS, daño al ADN, a las proteínas y a la membrana celular.

2.6 Nanopartículas de Ag.

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. De todos estos usos, uno de los más importantes es su empleo como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos. Desde la antigüedad se empleaban vasijas de plata para almacenar agua o vino, ya que se consideraba que preservaba sus condiciones sanitarias (Monge, 2009).

Como ya se ha mencionado, existen diferentes tipos de NPs metálicas con eficacia antimicrobiana, sin embargo las NPs de Ag son las más efectivas (Tareq *et al.*, 2017). Estas NPs se han usado ampliamente en la producción de celdas solares y baterías, como catalizadores en reacciones químicas, bioetiquetado, también se utilizan en el tratamiento de quemaduras, como materiales dentales, en telas, tratamiento de agua y sobre todo, como agentes antimicrobianos.

Tareq, F. K., Fayzunnesa, M., & Kabir, M. S. (2017). Antimicrobial activity of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against food and agricultural pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 109, 228-232.

Las NPs de Ag se han sintetizado con éxito mediante extractos de plantas (Lateef *et al.*, 2016a, b, c), bacterias (Priyadarshini *et al.*, 2013; Lateef *et al.*, 2015a, b, c) hongos (Lateef y Adeeyo, 2015), e incluso empleando telarañas y nidos de avispas (Lateef *et al.*, 2016e, f, g). La eficacia antimicrobiana de las NPs Ag se debe a su capacidad de ionizarse en medio acuoso a iones de plata con acción antimicrobiana pronunciada (Choi *et al.*, 2008). Se ha señalado además que NPs Ag de tamaño entre 1 a 10 nm se unen a la membrana celular de las bacterias, provocando modificaciones en la permeabilidad y en la respiración bacterial y pueden penetrar al interior de la bacteria dañando compuestos que poseen grupos funcionales basados en azufre o fósforo, como por ejemplo el ADN (Monge, 2009).

2.7 Nanopartículas de CuO.

El cobre es un micronutriente esencial incorporado en muchas proteínas y metaloenzimas, teniendo una función importante en la salud y nutrición de las plantas.

Las NPs Cu debido a sus propiedades únicas son más eficientes que las partículas de Cu de tamaño micro en su actividad y funcionamiento (Kasana *et al.*, 2016). Los compuestos de Cu tienen propiedades multifuncionales con aplicaciones prometedoras como antibacterianos, antivirales y antifúngicos. El Cu en su forma de NPs ha sido ampliamente utilizado en diversas aplicaciones industriales y comerciales. Otras investigaciones corroboran el efecto inhibitorio de las NPs CuO contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, donde el menor tamaño de las NPs está correlacionado con su actividad antimicrobiana (Azam *et al.*, 2012).

Debido a la actividad antimicrobiana, dichas NPs están encontrando nuevas aplicaciones en la agricultura, la salud y la industria alimentaria. Sin embargo, hay una creciente preocupación con respecto al uso indiscriminado de estas, ya que pueden causar efectos tóxicos en las plantas y otros organismos vivos si no se usan en dosis convenientes (Kasana *et al.* 2016), además es preocupante su transferencia en los diferentes niveles tróficos (Park *et al.*, 2018).

Park, H. G., Kim, J. I., Chang, K. H., Lee, B. C., Eom, I. C., Kim, P., Yeo, M. K. (2018). Trophic transfer of citrate, PVP coated silver nanomaterials, and silver ions in a paddy microcosm. *Environmental Pollution*, 235, 435-445.

2.8 Nanopartículas de ZnO

El ZnO es una clase de óxidos metálicos inorgánicos disponibles y exhibe una amplia gama de nanoestructuras. La capacidad fotocatalítica y fotooxidante contra especies químicas y biológicas se utiliza para caracterizar estos óxidos metálicos (Sirelkhathim, 2015). La Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. Ha reconocido que el ZnO es seguro (Delavary, 2014). Las ventajas de las partículas de ZnO son las propiedades de bloqueo UV a bajo costo, alta actividad catalítica, gran superficie, aspecto blanco y sus notables aplicaciones en el campo de la medicina y la agricultura (Kairyte, 2013). Recientemente el ZnO se ha utilizado ampliamente en la remediación ambiental y la actividad antibacteriana (Kuriakose, 2013).

Las NPs ZnO muestran una actividad antibacteriana significativa en un amplio espectro de especies bacterianas exploradas por un gran cuerpo de investigadores. El ZnO está siendo investigado actualmente como un agente antibacteriano en microescala y nanoescala, ya que puede interactuar con la superficie bacteriana y/o entrar a la célula, y posteriormente muestra distintos mecanismos de acción bactericida (Sirelkhatim *et al.*, 2015).

Las NPs de CuO y ZnO ofrecen un buen potencial como fertilizantes, ya que son microelementos esenciales para las plantas y proporcionan metales biodisponibles, pero también pueden ser utilizadas como pesticidas. Estas NPs en dosis de ≥ 10 ppm cambian la producción de metabolitos clave implicados en la protección de las plantas. Estas formulaciones se pueden integrar en las prácticas de desarrollo agrícola para garantizar un menor impacto ambiental en la producción de cultivos (Anderson *et al.*, 2017).

2.9 Nanopartículas en los tejidos vegetales.

Las investigaciones fisiológicas han demostrado que las NPs pueden entrar en las hojas de las plantas a través de los estomas y las estructuras de la cutícula. Se cree que esta entrada o comportamiento de absorción puede ser más rápido y eficiente para NPs de diámetro más pequeño. Además, se sabe que las NPs de óxidos metálicos se translocan más eficazmente que los elementos correspondientes a nivel micro y que esta mayor capacidad de transporte existe en el xilema y en el floema (Wang *et al.*, 2012).

En el trabajo reportado por Wang *et al.* (2013) en plantas de sandía, se evaluó la translocación hoja a raíz de las NPs después de una aplicación foliar a base de aerosol; los resultados mostraron porcentajes significativamente más altos de Ti, Mg y Zn derivados de NPs (5.45, 21.2 y 13.9%, respectivamente) en los tejido de raíz, en comparación con una solución de NPs aplicada a las hojas (1.87, 8.13 y 5.74%, respectivamente). Los autores sugirieron que las NPs asperjadas más pequeñas de TiO₂, MgO y ZnO con un diámetro de 27, 35 y 45 nm, respectivamente, penetraron a los estomas de manera más eficaz que las partículas más grandes con diámetros de 150, 623 y 1,020 nm, respectivamente.

Raliya y Tarafdar (2013) biosintetizaron NPs ZnO mediante secreciones extracelulares de *Aspergillus fumigatus* TFR-8 y aplicaron las NPs como una pulverización foliar sobre plantas de frijol. Los autores informaron aumentos significativos en una serie de parámetros fisiológicos: biomasa, longitud del tallo/raíz, área de la raíz, contenido de clorofila y las enzimas que movilizan, aunque es importante destacar que la proteína residual del extracto fúngico actuó como un agente de cobertura y aumentó significativamente la estabilidad de la partícula. Es por eso que la consideración de factores como el tamaño de las partículas, concentración, agregación, especies vegetales y el método de aplicación, influirán en gran medida en la absorción foliar de las NPs empleadas (Wang *et al.*, 2013).

Curiosamente, aunque no se pudo encontrar una comparación de las vías de aplicación en la literatura, hay razones claras para prever que las aspersiones foliares a escala nanométrica tendrían una mayor eficacia que el tratamiento basado en el suelo, tanto para la inhibición de los patógenos como para una mejor nutrición vegetal. Dada la gran variedad de interacciones de elementos NPs con los componentes del suelo, la relativa falta de tal complejidad con el tratamiento foliar y la movilidad mejorada documentada de las NPs dentro de las plantas, se puede predecir una mayor eficacia mediante aplicación foliar y las futuras investigaciones deberían explorar este potencial (Servin *et al.*, 2015). La Figura 2 muestra las posibles vías de entrada, translocación y biotransformación de varios tipos de NPs en un sistema vegetal.

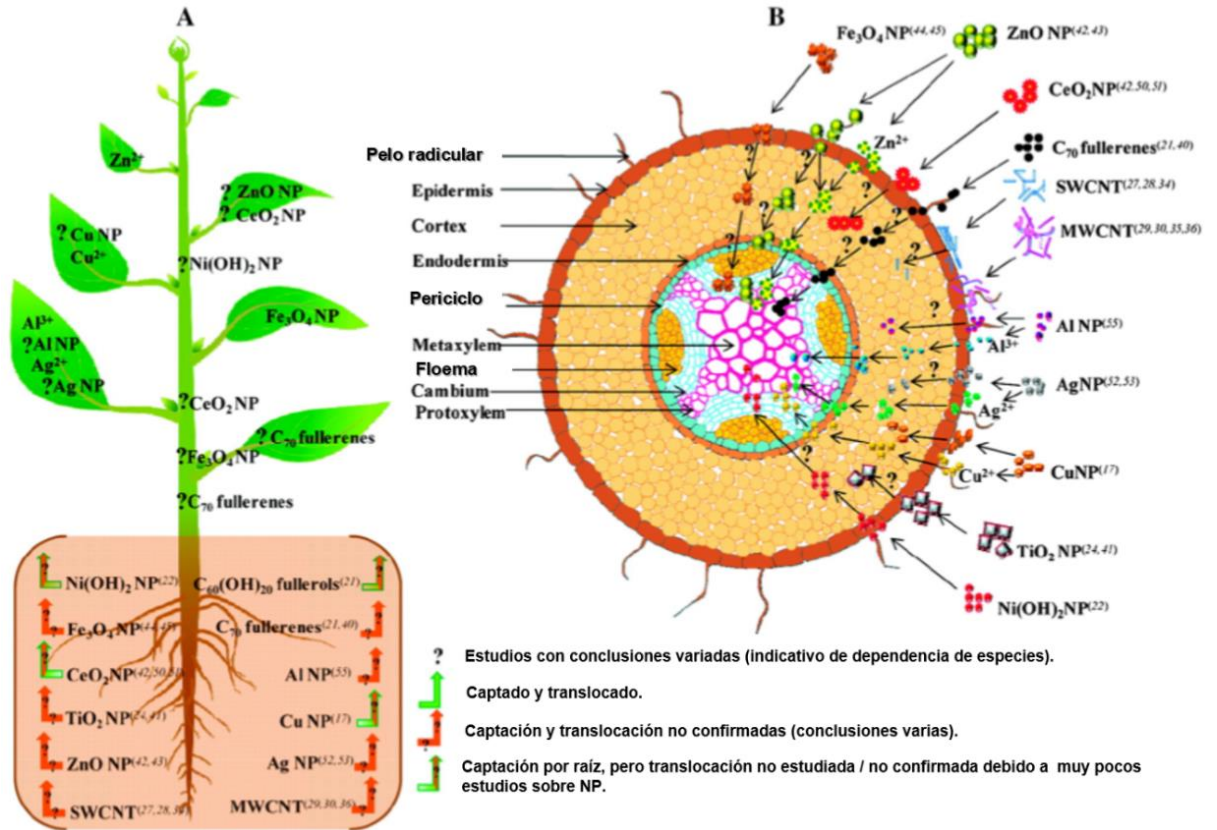


Figura 2.- Vías de entrada por hojas y raíces, translocación y biotransformación de varias nanopartículas metálicas y derivadas del carbono en un sistema de planta. **a) Planta que muestra la captación selectiva y la translocación de NPs;** **b) sección transversal de la zona de absorción de la raíz que muestra la interacción de NPs diferenciales en la exposición.** (Tomado de Rico *et al.*, 2011).

La información generada sobre el uso de NPs metálicas es abundante, mostrando el efecto de las mismas como nutrientes de plantas y su actividad antimicrobial contra hongos y bacterias fitopatógenas. La Figura 3 muestra un resumen esquemático de la recopilación de investigaciones realizadas con diversos tipos de NPs en cultivos bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*.

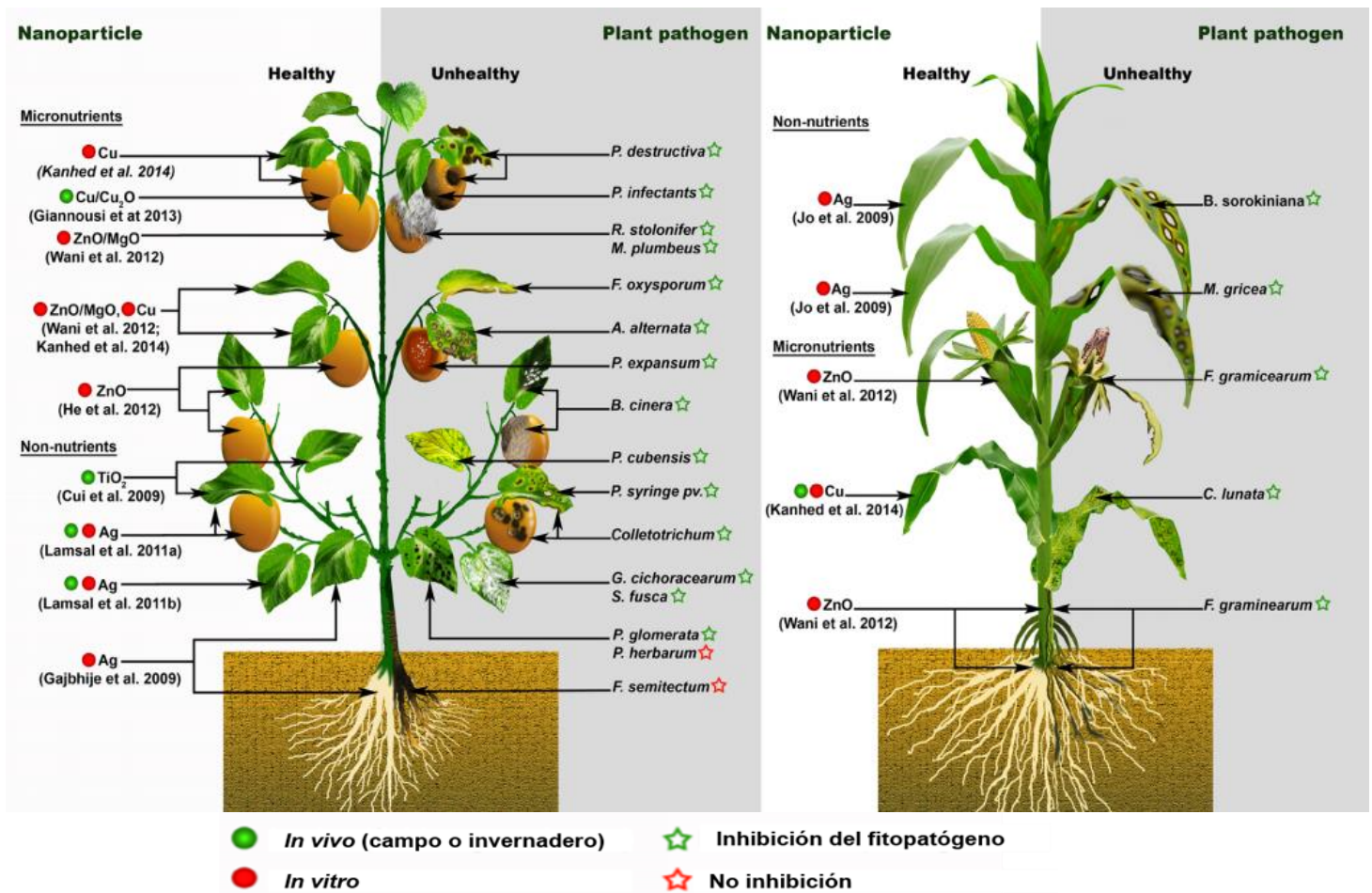


Figura 3.- Efecto de NPs metálicas con actividad nutricional y no nutricional, así como su efecto contra hongos y bacterias causantes de enfermedades en cultivos agrícolas. (Tomado de Servin *et al.*, 2015).

2.10. Síntesis de nanopartículas metálicas en plantas vivas.

Muy poco se ha explicado hasta ahora, sobre el mecanismo que utilizan las plantas para reducir los compuestos metálicos en NPs. Una mejor comprensión de los

mecanismos del proceso, mejorará la capacidad de controlar y modular el proceso de las NPs en las plantas vivas (Marchiol, 2012).

Datos publicados por Haverkamp *et al.* (2011) demostraron que el proceso de formación de NPs en plantas de *Brassica juncea* está significativamente influenciado por la fuente del metal así como del pH. Entre las diversas categorías de compuestos sintetizados en plantas que tienen actividades biológicas potentes, los fitoquímicos (productos metabólicos primarios y secundarios, como antioxidantes, flavonoides, flavonas, isoflavonas, catequinas, antocianidinas, isotiocianatos, carotenoides, polifenoles), son conocidos como un recurso natural importante para la síntesis de NPs metálicas (Park *et al.*, 2011). Se ha publicado una gran cantidad de trabajos sobre la biosíntesis de NPs utilizando los fitoquímicos contenidos en los extractos de varias especies de plantas (Haverkamp *et al.*, 2011). Por el contrario, no es muy claro aún este proceso en las plantas vivas.

2.11 Mecanismos de defensa de las plantas ante la presencia de NPs metálicas y fitopatógenos.

Las plantas que se encuentran bajo una infección por patógenos o en contacto con agentes extraños, generan una gran cantidad de ROS. Las principales enzimas en el sistema enzimático antioxidante de una planta incluyen SOD, CAT, APX y GPX. Los estudios han demostrado que las ROS son una molécula de señal importante en el crecimiento normal de las plantas, desempeñan un papel significativo en el proceso de desarrollo y participan en las respuestas intracelulares, moleculares, bioquímicas y fisiológicas de una planta. En particular, tienen una función importante en los procesos de respuestas de defensa y muerte celular programada (Gruissem *et al.*, 2012).

2.11.1 Especies Reactivas de Oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son compuestos que se derivan de la molécula oxígeno (O₂) por reducción química parcial. En este grupo se incluyen al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido cuando el O₂ es reducido con dos electrones y

las formas reactivas de oxígeno, que abarcan a los superóxidos ($O_2\bullet$) y al radical hidroxilo ($HO\bullet$) (Helaine y Hagerman, 2006).

Durante el crecimiento normal de las plantas, la generación y eliminación de ROS es un estado de equilibrio dinámico, sin embargo, cuando la producción de ROS es mayor que la eliminación, las ROS se acumulan en las células y causan estrés oxidativo, y cuando la producción es demasiado grande inducen que una planta sufra lesiones auto infligidas. Procesos como la fotosíntesis y la respiración, así como la regulación de producción de ROS con propósitos de defensa, han sido descritos como mecanismos esenciales para la adaptación de plantas a ecosistemas terrestres, debido a la liberación de oxígeno, impactando los procesos de evolución de la vida en el planeta (Delauxa *et.al.*, 2012).

Las moléculas ROS son altamente tóxicas cuando se acumulan en las células ya que pueden dañar ADN, proteínas y lípidos. Sin embargo, se ha comprobado que las ROS son esenciales en procesos de crecimiento y desarrollo, movimiento de estomas, e interacciones planta-microorganismos (Ramírez-Gómez, 2012). En el proceso de adaptación a los ecosistemas terrestres, las plantas enfrentaron muchos tipos de estrés, incluyendo el ataque de comunidades de microorganismos del suelo. Las interacciones planta-microorganismos han mostrado diversas respuestas en la planta, en términos de los niveles de ROS y se ha podido determinar su importante papel en la resistencia de las plantas a patógenos, encontrándose que la planta eleva sus niveles de ROS cuando es atacada por patógenos (Fase I) y luego mantiene niveles moderados de producción de ROS (Fase II) (Ramírez-Gómez, 2012).

El inicio de los procesos de defensa de las plantas frente a una posible infección o colonización por microorganismos, requiere de un diálogo molecular entre los organismos involucrados en el cual se debe considerar: 1) Percepción de los patrones MAMPs (patrones moleculares asociados a microorganismo) del microorganismo por los receptores de reconocimiento (PRRs) de la planta ó 2) Percepción de las proteínas efector-específicos del patovar microbiano por los receptores inmunes de la planta (Spoel y Dong, 2012) . Un mecanismo de adaptación de plantas, es su habilidad de

reconocer y responder rápidamente frente a un posible invasor mediante respuestas de defensa. Las respuestas gen-gen se observan cuando un patógeno con un gen dominante de virulencia (V) es reconocido por una planta con un gen dominante de resistencia (R); en interacciones incompatibles el hospedero es resistente, pero en las compatibles no hay reconocimiento gen-gen, entonces el patógeno es virulento y el hospedero susceptible.

2.12 *Medicago sativa* como planta modelo.

M. sativa L. (alfalfa) es una leguminosa forrajera multianual de una buena calidad y alta productividad, con un alto contenido de proteína cruda (16% a 22%) y que en los últimos años está creciendo su interés para su uso en nutrición humana. Es parcialmente resistente al estrés salino, siendo esta característica que sea de gran interés agronómico (Martínez *et al.*, 2015). De acuerdo a la literatura, las especies vegetales más estudiadas en referencia a la interacción con NPs metálicas son *M. sativa* y *Brassica juncea*, ambas consideradas como especies modelo, y la última como hiperacumuladora de metales pesados (Marchiol, 2012).

M. sativa L. es considerada como una especie fitorremediadora de Cd, Cr, Cu y Zn (Peralta-Videa *et al.*, 2004). Pero además diversos estudios demuestran que esta especie tiene la capacidad de formar NP de Au en el interior de sus tejidos en condiciones *in vivo* (Stegemeier *et al.*, 2015; Starnes *et al.*, 2010; Gardea *et al.*, 2002). Es por esa razón que *M. sativa* es la especie vegetal seleccionada para trabajar en este experimento.

III. JUSTIFICACIÓN

Es clara la necesidad que tiene el sector agrícola de producir cultivos de buena calidad, a bajo costo y sin provocar un alto impacto ambiental. Lamentablemente cumplir con estas metas requiere de costosos tratamientos para la fertilización y control de fitopatologías, pero más allá de los altos costos económicos, lo realmente alarmante son los daños ambientales que provocan. Actualmente nos encontramos en la llamada “Era de la Nanotecnología”, cuando el uso de los NMs es aplicado mundialmente en un gran número de industrias, entre ellas la agrícola y de alimentos. La NT aplicada en plantas (Agro Nanotecnología) es una ciencia innovadora y se encuentra en sus inicios, por lo cual, ofrece un amplio campo de investigación.

Es por ello, que surgió el interés por el estudio y aplicación de NPs metálicas en los cultivos agrícolas, enfocándonos en la prevención de fitopatologías bacterianas, y así tratar de disminuir el uso de los pesticidas tradicionales. Para lo cual, en este trabajo de investigación utilizamos tres de las principales NPs antimicrobianas Ag, CuO y ZnO, y las pusimos a prueba bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* contra dos de las cepas más devastadoras a nivel mundial: *P. syringae* y *C. michiganensis*, usando para las pruebas *in vivo* a una de las plantas modelo más estudiadas en este tema que es *M. sativa*.

IV. HIPÓTESIS

La presencia de nanopartículas metálicas en los tejidos vegetales incrementa la resistencia de las plantas al ataque y los efectos nocivos de fitopatógenos microbianos.

V. OBJETIVOS DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general.

Determinar la factibilidad de inducir la biosíntesis o absorción de nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas en los tejidos vegetales y su acción fitosanitaria.

5.2 Objetivos específicos.

- a) Evidenciar que las NPs de Ag, CuO y ZnO tienen actividad antibacterial *in vitro* contra las cepas bacterianas *P. syringae* y *C. michiganensis*, mediante ensayos de antagonismo.
- b) Evaluar la capacidad de *M. sativa* para tolerar diferentes concentraciones de las NPs metálicas, mediante pruebas de germinación.
- c) Determinar la capacidad antibacterial de las NPs de Ag, CuO, ZnO, cuando se encuentran en el interior de los tejidos vegetales (*in vivo*), mediante ensayos en invernadero.
- d) Evaluar la actividad enzimática (CAT, POD y APX) en la especie *M. sativa* (previamente tratada), para determinar la presencia de ROS, las cuales podrían ser indicadoras de estrés oxidativo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio.

Este estudio se realizó en las instalaciones del departamento de Plásticos en la Agricultura, del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Blvd. Enrique Reyna No. 140, Col. San José de los Cerritos, 25294 Saltillo, Coah., México. Latitud: 25.45 91 92 Longitud: -100.96 79 28. Parte del trabajo experimental también se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México Latitud: 25.724247 | Longitud: -100.316371.

6.2 Material Biológico.

Para este experimento se utilizó como planta modelo la especie vegetal *M. sativa*, para lo cual, se utilizaron semillas declaradas con un 95% de germinación y un porcentaje de pureza del 99% según las especificaciones proporcionadas por el proveedor. Se utilizaron además dos cepas bacterianas; *Pseudomonas syringae* (Gram -) y *Clavibacter michiganensis* (Gram +), las cuales fueron proporcionadas por el cepario con el que cuenta dicho Centro de Investigación (CIQA).

6.3 Nanopartículas metálicas.

Las NPs de ZnO y CuO fueron adquiridas de la empresa Nanostructured and Amorphous Materials Inc., con las siguientes características: 99% de pureza, morfología esférica y tamaño promedio de 20 nm para las NPs de ZnO y de 30 a 50 nm para las NPs de CuO. En cuanto a las NPs de Ag, estas fueron biosintetizadas mediante un extracto del arbusto de gobernadora (*Larrea tridentata*), en los laboratorios del CIQA y proporcionadas por esa institución. Dichas NPs fueron caracterizadas por microscopia de transmisión de electrones (TEM), modelo TITAN.

6.4 Bioensayo I. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Esta prueba fue indispensable para verificar que las NPs utilizadas realmente tienen actividad antibacteriana contra *P. syringae* (Gram -) y *C. michiganensis* (Gram +), cabe señalar que usamos una bacteria Gram - y una Gram +, es importante resaltarlo ya que las NPs podrían actuar de diferente manera, debido a la diferencia fisiológica de la pared de dichas cepas; siendo más compleja la de la bacteria Gram negativa.

Las pruebas se hicieron para cada una de las NPs. Las cepas bacterianas fueron sometidas a concentraciones de 4000, 3000, 2000, 1000, 500 y 250 ppm de cada una de las NPs. Se usó como control positivo un bactericida de uso agrícola, cuyo nombre comercial es Finalbacter y sus sustancias activas son: Clorhidrato de Oxitetraciclina, Gentamicina, sulfato de Oxitetraciclina, Sulfato de Gentamicina. Como control negativo se utilizó agua desionizada estéril para el caso de los tratamientos de NPs de CuO y ZnO y para los tratamientos con NPs de Ag se usó como control negativo el extracto puro de *L. tridentata*. La siembra de las bacterias se hizo en cajas Petri estériles mediante la técnica de difusión en agar KB marca Sigma-Aldrich, esta prueba se hizo por triplicado. Los detalles del bioensayo se describen a continuación:

6.4.1 Preparación del inóculo bacteriano

Se prepararon inóculos bacterianos de *P. syringae* y *C. michiganensis* a una concentración de 1×10^6 UFC en caldo KB marca Sigma-Aldrich, para lo cual, a partir de un inóculo fresco (16 horas de incubación), se hizo el conteo de células con una Cámara de Neubauer marca Hausser Scientific, se hicieron diluciones hasta llegar a la concentración deseada, ajustando dicha concentración con solución salina al 0.85%, la cual se preparó pesando 0.85 gr de NaCl grado reactivo marca Sigma-Aldrich diluidos en 100 ml de agua destilada, la solución salina fue previamente esterilizada en autoclave. Esto se hizo para cada una de las cepas bacterianas.

6.4.2. Preparación de los tratamientos con NPs.

Para preparar los tratamientos de 4000, 3000, 2000, 1000, 500 y 250 ppm de las respectivas NPs. Se preparó una solución madre para cada una de las NPs, debido a que las cantidades a pesar son muy pequeñas. La solución madre tenía una concentración de 4000 ppm para lo cual, se pesaron 8 mg de las NPs correspondientes y se agregaron 2 ml de agua desionizada estéril. Esto se hizo en viales de vidrio de 3ml.

Las soluciones madre se pusieron a sonicar en un baño ultrasonido marca Branson durante 20 minutos. Cabe mencionar que las NPs no se disuelven, sólo quedan suspendidas, dispersas en la solución, es por ello que es necesario sonicar las veces que sea necesario para evitar que las NPs se sedimenten. De estas soluciones madre se tomaron las alícuotas correspondientes para llegar a las concentraciones deseadas. Tomando en cuenta que el volumen que se necesita para la prueba son 100 µL por tratamiento. Las alícuotas fueron las siguientes:

Tabla 1.- Alícuotas para la preparación de los tratamientos de NPs en las pruebas in vitro.

Tratamientos (ppm)	4000	3000	2000	1000	500	250
µL a tomar de la solución madre	100	75	50	25	12.5	6.3
µL de H ₂ O desionizada	0	25	50	75	87.5	93.7

6.4.3 Siembra de las bacterias por difusión en agar.

La preparación del agar se hizo de la siguiente manera: se pesaron 33g del agar KB marca Sigma-Aldrich y se disolvieron en 990 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1 L, se añadieron 10 ml de glicerol. La mezcla se llevó a esterilizar en una autoclave a 121 ° C por 15 minutos. El agar se dejó enfriar sin llegar a la solidificación y se mantuvo en baño maría hasta su uso.

Para hacer la siembra bacteriana se pusieron 100 µL del respectivo inóculo en cajas Petri estériles, con la ayuda de una micropipeta estéril y posteriormente se vierte el agar KB,

cuidando que no estuviera muy caliente, se mezcló el inóculo con el agar haciendo movimientos en 8 y se dejó solidificar aproximadamente 10 min. Cabe mencionar que todo el procedimiento se realizó en campana de extracción y con mechero, para tratar de mantener un ambiente lo más estéril posible.

Una vez solidificado se hicieron 5 “pozos” sobre el agar con la ayuda de un sacabocados (puntilla de 1 ml estéril) y en cada una de los pozos se pusieron las alícuotas correspondientes de los respectivos tratamientos, tal y como lo muestra la Figura 4.

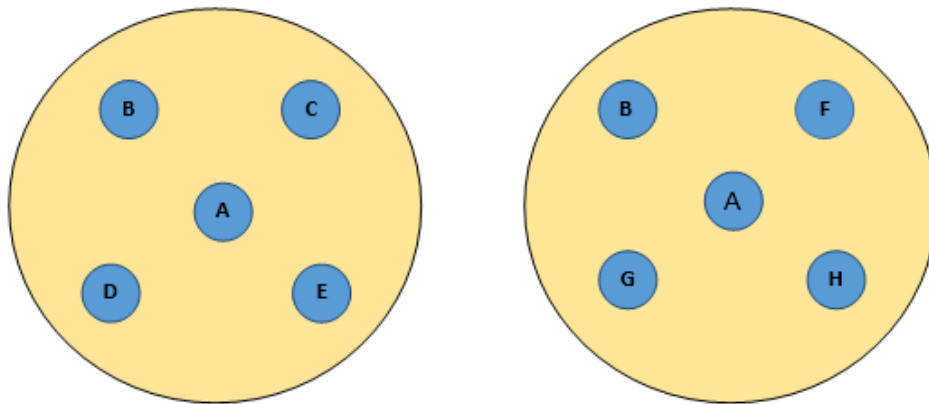


Figura 4.- Esquema de los tratamientos in vitro. A) Control positivo, B) Control negativo, C) 4000 ppm, D) 3000 ppm, E) 2000 ppm, F) 1000 ppm, G) 500 ppm, H) 250 ppm.

Estas pruebas se hicieron por triplicado, para cada una de las NPs y cada una de las cepas bacterianas. Una vez realizada la aplicación de los tratamientos y controles en cada una de las cajas Petri, se llevaron a incubar a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se midió el diámetro del halo de inhibición con un vernier digital modelo JEW95VC200. El porcentaje de inhibición se determinó con la ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Halo Tratamiento} - \text{Halo Blanco}}{\text{Halo Control} - \text{Halo Blanco}} * 100 \quad (1)$$

Al terminar el Bioensayo I y comprobar que las NPs metálicas utilizadas tienen propiedades antibacterianas *in vitro*, se continuó con el siguiente paso, el cual era determinar si dichas NPs causan fitotoxicidad en *M. sativa*.

6.5 Bioensayo II. Ensayos de toxicidad en semillas de *M. sativa*.

Era importante hacer un análisis previo para determinar si la especie *M. sativa* es tolerante a las NPs metálicas y a qué concentración. Tomando en cuenta que se pretendía introducir NPs a la planta desde su etapa fenológica inicial, mediante la imbibición de las semillas con los diferentes tratamientos de NPs correspondientes.

Además, debido a que se involucraron 3 tipos diferentes de NPs y dos cepas bacterianas, era importante determinar la concentración óptima con la que se trabajaría en las pruebas en invernadero. Por lo tanto, se hicieron ensayos de toxicidad con 3 concentraciones de las respectivas NPs. La dosis óptima es aquella que no provoca daño a la semilla, pero a su vez puede ser suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Aunque es importante señalar que esta concentración es relativa, ya que no se sabe con certeza cuál es la verdadera concentración que está entrando al tejido vegetal, en este caso a las semillas. Para determinar dichas pruebas se realizó el siguiente procedimiento:

6.5.1 Ensayo de viabilidad (vigor y germinación) en semillas de *M. sativa*.

Estas determinaciones de aspectos de fisiología de semillas se realizaron con base a las normas de la ISTA (2004), acorde al siguiente procedimiento:

6.5.1.1 Curva de imbibición.

Se comenzó por determinar la curva de imbibición, la cual es la primera etapa en la germinación y es el tiempo que tardan las semillas en lograr su capacidad máxima de absorción de agua. Por lo tanto, se pesaron 50 semillas de *M. sativa* en una balanza analítica modelo ABS-N/ABJ-NM y posteriormente, se utilizaron pinzas de disección estériles para colocar las semillas en cajas Petri estériles, sobre dos capas de papel filtro tipo Whatman 90 mm. Después, se añadieron 10 ml de agua desionizada estéril, dicho procedimiento se realizó por triplicado. Posteriormente se pusieron en una cámara bioclimática marca Equitec EGCS S, a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Se tomó el peso cada hora, hasta que las semillas llegaron a un peso constante, siendo este el tiempo de imbibición, el cual fue de 4 horas. Una vez

determinado el tiempo de imbibición se realizaron las pruebas de vigor y germinación en semillas sometidas a diferentes concentraciones de NPs.

6.5.1.2 Tratamientos de NPs para la imbibición de las semillas.

Los tratamientos fueron concentraciones de 50, 100 y 200 ppm de NPs de Ag y ZnO respectivamente y 50, 100 y 150 ppm de NPs CuO, a un volumen de 10 ml, utilizando agua desionizada estéril, las soluciones se pusieron a sonicar en viales de vidrio, en un sonicador de lanza modelo qsonica Q500-110, durante 20 min. La discrepancia entre las concentraciones con NPs ZnO, Ag y CuO se debe a la posible toxicidad que pueden causar las NPs de CuO durante la germinación.

Posteriormente, se utilizaron pinzas de disección estériles para colocar las semillas en cajas Petri estériles, sobre dos capas de papel filtro tipo Whatman 90mm. Después, se añadieron 10 ml de cada tratamiento a las unidades experimentales correspondientes. Posteriormente se pusieron en una cámara bioclimática marca Equitec EGCS 3S, a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, durante 4 horas, tiempo determinado en la curva de imbibición.

6.5.1.3 Germinación y vigor de semillas.

Una vez cumplido el periodo de imbibición en las semillas (4h), se pusieron 25 semillas de cada uno de los tratamientos entre dos hojas de papel anchor, el cual previamente fue humedecido con agua destilada estéril, enseguida se enrollaron y fueron llevados a la cámara de germinación con una temperatura de 25 ± 1 °C por 10 días, programada con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se hicieron 4 repeticiones en cada tratamiento. El vigor y la tasa de germinación se registraron a los 4 y 10 días respectivamente después de la siembra (según lo establecido en la ISTA, para esta especie). Los efectos de las NPs de Ag, ZnO y CuO en la germinación se midieron de acuerdo a Corral-Díaz *et al.* (2014); el vigor y la tasa de germinación se calcularon con las ecuaciones 1 y 2 respectivamente.

El vigor de las semillas se determinó a los cuatro días mediante la ecuación 2.

$$V \% = \frac{\text{Plántulas normales al cuarto día}}{\text{Número de semillas utilizadas en la prueba}} * 100 \quad (2)$$

Para determinar esta variable se sacaron los rollos de la cámara de crecimiento, y en condiciones lo más estériles posibles, fueron colocados sobre la mesa de trabajo previamente desinfectada, se desenrollaron y con la ayuda de pinzas de disección estériles, se hizo el conteo de las plántulas normales. Una vez hecho el conteo se volvieron a enrollar y se llevaron nuevamente a la cámara de crecimiento bajo las condiciones ya mencionadas.

Se consideraron plántulas normales aquellas que contaron con raíz y plúmula, con un tamaño dos veces mayor que el de la semilla, lo cual fue un indicador del vigor de la semilla. La tasa de germinación se cuantificó al décimo día después de la siembra y fue computada mediante la ecuación 3.

$$G\% = \frac{\text{Número total de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas utilizadas en la prueba}} * 100 \quad (3)$$

Para lo cual, al llegar el décimo día, se volvieron a sacar los rollos y nuevamente bajo condiciones de esterilidad, se abrieron para contar el número de semillas germinadas, estas eran las que tenían un desarrollo normal; plúmula y radícula de 2 cm aproximadamente y sin ninguna deformidad o indicativo de fitotoxicidad. Al comprobar que las semillas de *M. sativa* germinaron en todas las concentraciones, se procedió al Bioensayo III.

6.6 Bioensayo III. Actividad antibacterial *in vivo* de las NPs de Ag, CuO, ZnO.

Una vez determinada la actividad antibacterial *in vitro* de las NPs de Ag, CuO y ZnO y de haber comprobado que *M. sativa* es tolerante a dichas NPs (50, 100 y 150ppm), se procedió a evaluar la actividad de las NPs en plantas vivas de *M. sativa*.

Para lo cual, se trabajó con una sola concentración, es decir, la concentración óptima (anteriormente descrita), la cual fue de 100 ppm. El procedimiento utilizado se describe a continuación.

6.6.1 Distribución de los tratamientos.

Para esta prueba se tuvieron dos factores: Factor A: Nanopartículas de Ag, CuO y ZnO con tres niveles. Factor B: Bacterias *P. syringue* y *C. michiganensis*, con dos niveles y cada una con su respectivo control. De tal combinación surgieron los tratamientos que se describen en la tabla 2. Cada uno de los tratamientos con 4 repeticiones nos dio un total de 48 unidades experimentales.

Tabla 2.- Distribución de los tratamientos para las pruebas *in vivo*.

	Sin NPs	NPs Ag	NPs CuO	NPs ZnO
Sin bacteria	T1	T2	T3	T4
<i>P. syringae</i>	T5	T6	T7	T8
<i>C. michiganensis</i>	T9	T10	T11	T12

Las plantas del T1 no fueron asperjadas con NPs y no fueron inoculadas, o sea, fueron el tratamiento control absoluto. En cambio T2, T3 y T4 fueron plantas asperjadas y previamente imbibidas con las NPs correspondientes; es importante tener estos tratamientos para determinar si el daño apreciable es realmente a causa de la infección bacteriana o debido al efecto de las NPs. Los tratamientos T5 y T9 fueron plantas sin NPs pero inoculadas con su respectiva cepa bacteriana, estas plantas fueron los tratamientos de comparación para determinar si las plantas tratadas con NPs e inoculadas con los patógenos, disminuyeron la presencia de la enfermedad, el resto de los tratamientos fueron plantas tratadas con sus respectivas NPs e inoculadas con las diferentes cepas.

6.6.2 Establecimiento del experimento en invernadero.

Para dar inicio con las pruebas *in vivo*, se pusieron a imbibir en un volumen de 10 ml durante 4 h, semillas de *M. sativa* en soluciones de NPs de Ag, ZnO y CuO a una

concentración de 100 ppm respectivamente; el procedimiento para la imbibición fue descrito anteriormente en el Bioensayo II.

Transcurrido este tiempo las semillas se sembraron en macetas de 1 Kg con sustrato peat moss: perlita en una relación de 50: 50, habiéndose sembrado la cantidad necesaria de semillas para finalmente dejar solo 3 plántulas por maceta. La siembra se realizó en un invernadero de alta tecnología, propiedad del CIQA, ubicado en Saltillo Coah., y se mantuvieron en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad para su desarrollo. Las macetas se distribuyeron de un modo aleatorio, fueron previamente identificadas y se cubrieron con una tela de agribón para evitar el ataque de insectos.

Una vez desarrolladas las hojas verdaderas de las plántulas, estas se comenzaron a asperjar con los tratamientos de las NPs correspondientes, para lo cual se prepararon 100 ml de cada tratamiento (Ag, ZnO y CuO) a una concentración de 100 ppm, la preparación se hizo de la siguiente manera:

6.6.2.1 Preparación de los Tratamientos de NPs para aspersión.

Se pesaron 10 mg de las NPs correspondientes en una balanza analítica modelo ABS-N/ABJ-NM y se agregaron a 100 ml de agua desionizada, la suspensión se hizo en viales de vidrio y se le agregaron dos gotas de un surfactante de uso agrícola marca BIONEX*30.9 SL, las soluciones se pusieron a dispersar durante 20 min, en un sonicador de lanza modelo qsonica Q500-110. Luego se agregó el surfactante para romper la tensión superficial al momento de asperjar y así lograr que las hojas queden cubiertas en su totalidad por la suspensión.

6.6.2.2 Aspersión de los Tratamientos.

Las suspensiones con los respectivos tratamientos se deben de usar inmediatamente después de ser dispersadas, ya que como se mencionó anteriormente, las NPs no se disuelven y al paso del tiempo se precipitan, por lo tanto es importante que sean sonicadas las veces que sean necesarias durante su aplicación.

Las suspensiones con los tratamientos se pusieron en atomizadores y las plántulas se asperjaron tanto en el haz, como en el envés, tratando de cubrir toda la superficie de las hojas (Figura 5). Esto se realizó tres veces por semana durante las mañanas, considerando la hora donde posiblemente los estomas se encuentran más abiertos. Las plantas se dejaron en el invernadero dos meses para su desarrollo y posterior inoculación. Cabe señalar que aunque la aplicación fue con soluciones de 100 ppm tres veces por semana, durante dos meses, no se sabe con certeza la concentración exacta de NPs que realmente estuvieron entrando a las plantas.



Figura 5.- Aspersión de los tratamientos con las respectivas NPs metálicas.

6.6.3 Riego de las plantas.

El riego se aplicó de 3 a 4 veces por semana, dependiendo de la humedad del sustrato, y una vez por semana se regaban con solución nutritiva conteniendo micro y macro nutrientes, esto para evitar que las plantas presentaran síntomas de deficiencia nutricional y pudiera confundirse con daño por las NPs o las cepas inoculadas.

6.6.4 Inoculación bacteriana.

Quince días antes de la inoculación bacteriana las plantas se pasaron a un bioespacio con malla sombra para su aclimatación, ya que la inoculación bacteriana se realizó en un invernadero especial para pruebas fitopatológicas. Las plantas de *M. sativa* al cumplir dos meses de desarrollo fenológico fueron inoculadas con las cepas bacterianas de *P. syringae* y *C. michiganensis* respectivamente, acorde a los tratamientos previamente descritos, esto se hizo mediante la técnica de infiltración (Nalimova *et al.*, 2008).

6.6.4.1 Preparación del inóculo bacteriano.

Se prepararon inóculos bacterianos de *P. syringae* y *C. michiganensis* a una concentración de 1×10^6 UFC en caldo KB marca Sigma-Aldrich, para lo cual a partir de un inóculo fresco (16 horas de incubación), se realizó el conteo de células con una Cámara de Neubauer marca Haussner Scientific, luego se hicieron diluciones hasta llegar a la concentración deseada, ajustando dicha concentración con solución salina al 0.85%, la cual se preparó pesando 0.85 gr de NaCl grado reactivo marca Sigma-Aldrich diluidos en 100 ml de agua destilada, la solución salina fue previamente esterilizada en autoclave. Esto se hizo para cada una de las cepas bacterianas.

6.6.4.2 Infiltración de los inóculos bacterianos en las hojas de *M. sativa*.

Las plantas fueron infiltradas con la ayuda de una jeringa de 1ml, aplicando 100 µl del inóculo correspondiente en 9 hojas por planta (abajo, en medio y arriba). Las plantas testigo se infiltraron con una mezcla de caldo KB y solución salina al 0.85% a la misma concentración que el inóculo, pero sin la cepa bacteriana. Una vez aplicados los tratamientos se trató de mantener un ambiente óptimo para la proliferación bacteriana, con alta humedad relativa. Posteriormente se dejó transcurrir un período de 15 días para observar los síntomas ocasionados por la infección bacteriana.



Figura 6.- Infiltración del inóculo bacteriano en plantas de *M. sativa*.

6.7 Evaluación de los tratamientos *in vivo*.

Para evaluar el daño bacteriano en las plantas y poder determinar si los tratamientos con NPs fueron efectivos, se realizó una evaluación mediante una escala arbitraria no paramétrica, ya que las observaciones de este experimento no se ajustan a las suposiciones del análisis de varianza (muestras independientes, poblaciones normales y varianzas iguales), por lo que fue imposible realizar una comparación de los tratamientos utilizando las distribuciones t y/o F.

Por lo antes mencionado, en este experimento no se cuantificó el porcentaje de daño del área foliar en las plantas, en este caso se estableció una escala arbitraria con grados o valores de daño en el rango de 0 al 5. La escala empleada fue la siguiente:

0: Sin daño o infección.

1: Presencia de necrosis y/o clorosis sólo en el punto de la inoculación.

- 2: La necrosis y/o clorosis afectó únicamente a la hoja inoculada.
- 3: La necrosis y/o clorosis se expandió sólo a los tejidos cercanos.
- 4: La necrosis y/o clorosis se presentó en toda la planta.
- 5: Muerte total de la planta.

Para proceder a dicha evaluación se contó con el apoyo de 10 personas ajenas al experimento, pero con conocimiento en el área agrícola, los cuales fueron los evaluadores. Las plantas estaban identificadas con números del 1 al 36 sin ningún dato sobre cuál tratamiento era. A los evaluadores se les proporcionó una hoja de evaluación y pasaron uno por uno a observar cada una de las plantas, y aplicando su criterio dieron el valor correspondiente en el rango de 0 a 5.

6.8 Cuantificación de la actividad enzimática (CAT, POD, APX).

Por último, se determinó la actividad enzimática de las plantas tratadas, con la finalidad de determinar si los tratamientos con NPs y/o bacterias provocaron algún tipo de estrés oxidativo en la planta. Las enzimas analizadas fueron: catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX); esto se realizó mediante el siguiente procedimiento:

6.8.1 Extracto proteico

Para comenzar se hizo un extracto proteico de acuerdo a la metodología reportada por Elavathi y Martin (2010). Se pesaron 500 mg de tejido vegetal (hojas), se envolvieron en papel aluminio e inmediatamente después se pusieron a congelar en nitrógeno líquido.

La muestra se maceró en un mortero frío con nitrógeno líquido, se añadió 0.1% de Polivinilpirrolidona marca Sigma durante la maceración. Posteriormente se pasó la muestra macerada a tubos eppendorf de 1.5 ml y se les agregó 1 ml de solución amortiguadora de extracción (buffer de fosfatos a 100 mM, pH 7 adicionado con EDTA 0.1 mM), la muestra se centrifugó a 1200 rpm a 4 °C, durante 5 min. Se recuperó el

sobrenadante con ayuda de una micropipeta e inmediatamente después fue analizado, siendo conservado en hielo durante su análisis.

6.8.1.1 Preparación del Buffer de extracción.

El Buffer de fosfatos 100 mM pH7 se compone de dos soluciones, A y B y de un aditivo Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 mM pH8. La preparación de cada una de ellas es la siguiente:

Solución A): (Monobásica) Se prepararon 150 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mM.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula: $g = (M)(PM)(L)$; $g = (\text{mol/L})(\text{gr/mol})(L)$

$$g = (0.1 \text{ mol/L})(137.99 \text{ gr/mol})(0.150 \text{ L})$$

$g = 2.069\text{g}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en 150 ml de agua desionizada.

Solución B): (Dibásica) Se prepararon 150 ml de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100mM.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula: $g = (M)(PM)(L)$; $g = (\text{mol/L})(\text{gr/mol})(L)$

$$g = (0.1 \text{ mol/L})(228.23 \text{ gr/mol})(0.150 \text{ L})$$

$g = 3.423\text{g}$ de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, en 150 ml de agua desionizada.

EDTA: Debido a que es una concentración muy pequeña y no es pesable, se preparó una solución stock de 0.25M en 1 ml. El EDTA es soluble en pH 8, por lo cual se preparó una solución de NaOH pH 8. Para preparar la solución stock se realizaron los siguientes cálculos:

$$g = (0.25 \text{ mol/L})(292.2 \text{ gr/mol})(0.001 \text{ L})$$

$g = 0.07305 \text{ g}$ de EDTA, en 1 ml de solución NaOH pH 8

Una vez preparadas todas las soluciones se procedió a mezclarlas hasta conseguir un pH 7, para ello el procedimiento fue el siguiente: Se colocó la solución B (dibásica) en una plancha de agitación y se tomó la medida del pH inicial con un potenciómetro modelo STAR A211 Thermo Scientific. Poco a poco se fue añadiendo la solución A (monobásica) para bajar el pH a 7. Una vez ajustado el pH a 7 se obtuvo un volumen

final de 200 ml al cual se le agregó 80µl de EDTA, la cantidad fue el resultado de aplicar la ecuación 4:

$$C_1V_1=C_2V_2 \quad (4)$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(0.1\text{mM})(200\text{ml})}{250 \text{ mM (Stock)}} = 0.08\text{ml o sean } 80 \mu\text{l}$$

6.8.2 Actividad enzimática CAT

Las muestras se prepararon en tubos eppendorf de 1 ml que contenían 15 µl del extracto proteico, 965µl de solución amortiguadora (pH 7, 50mM), luego se agitó en un agitador para tubos y se hizo reaccionar con 20 µl de H₂O₂ 0.5M, se agitó rápidamente e inmediatamente después se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de UV-vis a una longitud de onda de 240 nm, con intervalos de 10 s durante 1 min. Se siguió el patrón de descomposición de H₂O₂ en presencia de la enzima y esto es apreciable por la disminución en la absorbancia a 240 nm (Elavarthi y Martin, 2010).

6.8.2.1 Preparación de los reactivos para CAT

El Buffer de fosfatos 50mM pH7 se compone de dos soluciones, A y B. La preparación de cada una de ellas es la siguiente:

Solución A): (Monobásica) Se prepararon 150 ml de NaH₂PO₄•H₂O 50mM.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula: $g = (M) (PM) (L)$; $g = (\text{mol/L}) (\text{gr/mol}) (L)$

$$g = (0.05\text{mol/L})(137.99\text{gr/mol})(0.150\text{L})$$

$g = 1.034\text{g}$ de NaH₂PO₄•H₂O, en 150 ml de agua desionizada.

Solución B): (Dibásica) Se prepararon 150 ml de K₂HPO₄•3H₂O 50mM.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula: $g = (M) (PM) (L)$; $g = (\text{mol/L}) (\text{gr/mol}) (L)$

$$g = (0.05\text{mol/L})(228.23\text{gr/mol})(0.150\text{L})$$

$g = 1.711\text{g}$ de K₂HPO₄•3H₂O, en 150 ml de agua desionizada.

Una vez preparadas las soluciones se procedió a mezclarlas hasta conseguir un pH7, para ello el procedimiento fue el siguiente: Se colocó la solución B (dibásica), en una plancha de agitación y se tomó la medida del pH inicial con un potenciómetro modelo STAR A211 Thermo Scientific y poco a poco se fue añadiendo la solución A (monobásica) para bajar el pH a 7.

H₂O₂ 0.5M: Se utilizó peróxido de hidrógeno al 37% marca J. T. Baker, el cual tiene una concentración inicial de 12.79M. Para obtener la concentración deseada se utilizó la ecuación 5:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(0.5M)(1ml)}{12.79 M} = 39 \mu l \quad (5)$$

Es decir, se tomaron 39 μ l de peróxido de hidrógeno grado reactivo y se diluyeron en 961 μ l de Buffer de fosfatos 50mM pH7.

6.8.3. Actividad enzimática de POD

Se determinó conforme el método establecido por Kwak *et al.* (1995) para lo cual, las muestras se prepararon en tubos de ensaye de 5 ml, que contenían 15 μ l del extracto proteico, 2505 μ l de solución amortiguadora o buffer de fosfatos (pH 6, 100 mM) y 320 μ l de pirogalol al 5%. La muestra se agitó en un agitador para tubos y se hizo reaccionar con 160 μ l de H₂O₂ 0.147 M, se agitó rápidamente e inmediatamente después se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de UV-vis a una longitud de onda de 420 nm, con intervalos de 20s durante 1 min. La actividad de peroxidasa se definió como la cantidad de proteína necesaria para oxidar un μ mol de pirogalol por minuto ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.8.3.1 Preparación de los reactivos para POD

El Buffer de fosfatos 100mM pH6 se compone de dos soluciones, A y B. La preparación de cada una de ellas es la siguiente:

Solución A): (Monobásica) Se prepararon 150 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100mM.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula: $g = (M) (PM)(L)$; $g = (\text{mol/L})(\text{gr/mol})(L)$

$$g = (0.1\text{mol/L})(137.99\text{gr/mol})(0.150\text{L})$$

$g = 2.069\text{g}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en 150 ml de agua desionizada.

Solución B): (Dibásica) Se prepararon 150 ml de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100mM.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula: $g = (M) (PM)(L)$; $g = (\text{mol/L})(\text{gr/mol})(L)$

$$g = (0.1\text{mol/L})(228.23\text{gr/mol})(0.150\text{L})$$

$g = 3.423\text{g}$ de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, en 150 ml de agua desionizada.

Una vez preparadas las soluciones se procedió a mezclarlas hasta conseguir un pH7, para ello el procedimiento fue el siguiente: Se puso la solución B (dibásica), en una plancha de agitación y se tomó la medida del pH inicial con un Potenciómetro modelo Star A211 Thermo Scientific, poco a poco se fue añadiendo la solución A (monobásica) para bajar el pH a 6.

Pirogalol 5%: se prepararon 10 ml de pirogalol al 5%, para lo cual, se pesaron 0.5g del reactivo marca SIGMA y se disolvieron en 10 ml de Buffer de fosfatos 100mM pH6.

H₂O₂ 0.5M: Se utilizó peróxido de hidrógeno al 37% marca J. T. Baker, el cual tiene una concentración inicial de 12.79M. Para obtener la concentración deseada se utilizó la ecuación 6:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(0.147\text{M})(10\text{ml})}{0.5\text{M}} = 115\ \mu\text{l} \quad (6)$$

Es decir, se tomaron 115 μl de peróxido de hidrógeno del stock de 0.5M y se diluyeron en 9.885ml de Buffer de fosfatos 100mM pH6.

6.8.4 Actividad enzimática de APX

La actividad de esta enzima se determinó por el método descrito por Nakano y Asada (1981). Las muestras se prepararon en tubos eppendorf de 1 ml, que contenían 15 μl del extracto proteico, 885 μl de solución amortiguadora (50 mM pH 7) y 50 μl de ácido ascórbico 10 mM. La muestra se agitó en un agitador para tubos y se hizo reaccionar con 50 μl de H_2O_2 10 mM, se agitó rápidamente e inmediatamente después se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de UV-vis, siguiendo la disminución de la absorbancia a 290 nm debido a la oxidación del ascorbato en la reacción con intervalos de 20 s durante 1 min. La actividad se expresó como la cantidad de proteína que produce un mmol de ascorbato oxidado por minuto ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.8.4.1 Preparación de los reactivos para APX

El buffer de fosfatos 50 mM pH 7 se preparó de igual manera que como se indica en el apartado 6.8.2.1.

Ácido ascórbico 10mM: Se prepararon 5 ml, para lo cual se usó la siguiente fórmula:

$$g = (M)(PM)(L); \quad g = (\text{mol/L})(\text{gr/mol})(L)$$

$$g = (0.1\text{mol/L})(176.12\text{gr/mol})(0.005L)$$

$$g = 8.8\text{mg de ácido ascórbico, diluidos en 5 ml de buffer de fosfatos 50 mM pH 7}$$

H_2O_2 10mM: Se utilizó peróxido de hidrógeno al 37% marca J. T. Baker, el cual tiene una concentración inicial de 12.79M. Para obtener la concentración deseada se utilizó la ecuación 7.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} \quad (7)$$

$$V_1 = \frac{(0.01M)(5ml)}{0.5 M} = 100\mu l$$

Es decir, se tomaron 100 μ l de la solución Stock 0.5M de peróxido de hidrógeno y se diluyeron en 4.9ml de Buffer de fosfatos 50mM pH7.

Para determinar la actividad enzimática se utilizó la ecuación 8:

$$C = \frac{\Delta A}{\epsilon l} \quad (8)$$

Donde:

C = Concentración

ΔA = Absorbancia final-Absorbancia inicial

ϵ = Coeficiente de extinción

l = Longitud de la celdilla.

6.9 Análisis estadístico.

Debido a que este trabajo de investigación se realizó mediante diferentes bioensayos, cada uno de ellos presentaba diferentes condiciones: laboratorio (cámara de crecimiento) e invernadero, así como datos cuantitativos y cualitativos, por lo tanto, el análisis de resultados se realizó de manera distinta para cada ensayo, a continuación se describen los análisis estadísticos.

6.9.1 Viabilidad (vigor y germinación)

El experimento se estableció bajo un diseño completamente aleatorio con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones; el modelo general lineal fue $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$; en donde Y_{ij} es la variable de respuesta; μ = media general; α_i = efecto de las concentraciones de NPs; e_{ij} = error experimental. La unidad experimental consistió de un

rollo con 25 semillas. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de cuatro muestras. La diferencia estadística significativa entre muestras fue analizada a través de un análisis de varianza (ANVA) y la comparación de medias de los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) usando el programa SPSS Statistics, Versión 21.

6.9.2 Actividad antibacterial de las NPs *in vivo*.

Debido a que los datos de la variable para determinar la intensidad del daño de la enfermedad (Incidencia) en *M. sativa*, provienen de una escala arbitraria no paramétrica (escala del 0 al 5) y por lo tanto son datos cualitativos, se procedió a analizar dichos resultados mediante la prueba de ji-cuadrada (X^2). Y posteriormente, se realizó la prueba de Mann-Whitney para los casos en los que la hipótesis nula (H_0) fuera rechazada ($p \leq 0.05$). Los datos se analizaron con el programa SPSS Statistics, Versión 21.

6.9.3. Cuantificación de la actividad enzimática.

Los resultados respecto a la concentración de las enzimas CAT, POD y APX fueron expresados como la media \pm desviación estándar de tres muestras. La diferencia estadística significativa entre muestras fue analizada a través de un análisis de varianza (ANVA) y la comparación de medias de los tratamientos de acuerdo a la prueba de LSD ($\alpha \leq 0.05$) usando el programa SPSS Statistics, Versión 21, bajo un diseño completamente al azar, en donde los factores fueron: nanopartículas; con 4 niveles (sin NPs, NPs de Ag, ZnO y CuO) y bacterias; con 3 niveles (sin bacteria, *P. syringae* y *C. michiganensis*), con 12 tratamientos y 3 repeticiones, lo cual nos dio un total de 36 unidades experimentales.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Bioensayo I. Pruebas de antagonismo *in vitro*.

En la Figura 5 se muestran los resultados de inhibición de crecimiento de *C. michiganensis* ocasionados por las NPs de Ag, CuO y ZnO, en la cual podemos apreciar que claramente se formó un halo de inhibición en todos los tratamientos, incluso en los tratamientos conteniendo solo el extracto de *L. tridentata*.

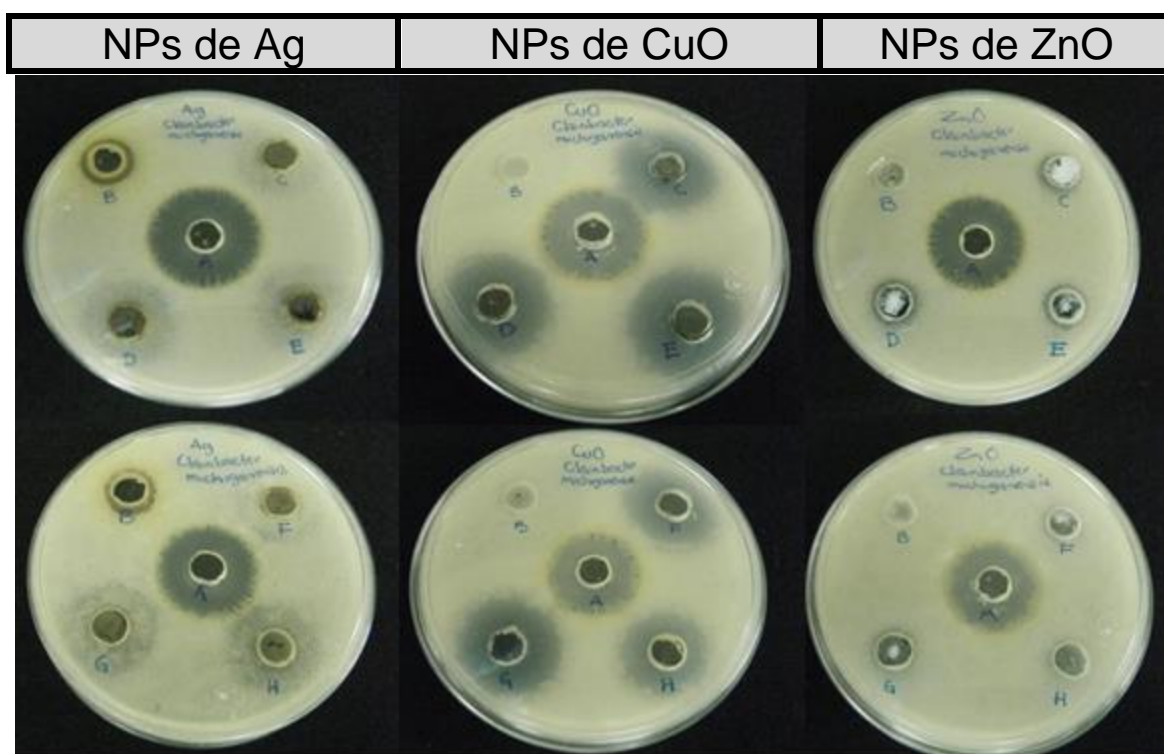


Figura 7.- Halos de inhibición en placas conteniendo la bacteria *C. michiganensis* en donde se confrontó con las NPs de Ag, CuO y ZnO. A) Control positivo, B) Control negativo, C) 4000ppm, D) 3000ppm, E) 2000ppm, F) 1000 ppm, G) 500 ppm, H) 250 ppm. Nota* El control negativo (B) para las NPs de Ag, fue el extracto puro de *Larrea tridentata*.

En el trabajo de Lira-Saldívar (2003) se reportó que las propiedades biocidas de *L. tridentata* han sido ampliamente estudiadas. Sus hojas contienen una espesa resina que se comporta como un antitranspirante debido a que forma una barrera que disminuye la transpiración. Los metabolitos secundarios de la resina entre los que destacan fenoles, lignanos y flavonoides, son defensas bioquímicas para repeler la agresión de animales

herbívoros, hongos y otros microorganismos, ya que no se conocen plagas, enfermedades o animales que ataquen esta planta.

Numerosos estudios han demostrado que los extractos de *L. tridentata* tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica; de igual manera, extractos y material vegetativo molido en polvo e incorporado al suelo han confirmado inhibir o controlar *in vivo* seis hongos en cultivos agrícolas. Algunos trabajos también han consignado el efecto nematicida o nematostático de *L. tridentata* contra nueve géneros de nematodos y repelencia en un insecto. Por otro lado, bioensayos con microorganismos que atacan a humanos han indicado que más de 45 bacterias son susceptibles a la resina de *L. tridentata* o sus constituyentes, algunas de ellas son: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, y *Proteus vulgaris* (Lira- Saldivar, 2003).

De manera similar, los resultados *in vitro* obtenidos con las NPs metálicas aquí estudiadas concuerdan con lo reportado por Lamsal *et al.* (2011ab), quienes evaluaron la actividad microbiana *in vitro* de las NPs de Ag contra *G. cichoracearum*, *S. fusca* y *Colletotrichum*, obteniendo como resultado un efecto inhibitorio. Así mismo, He *et al.* (2012) evaluaron la actividad de las NPs de ZnO contra *P. expansum* y *B. Cinera* obteniendo también resultados favorables de inhibición. Por su parte, Wani *et al.* (2012) evaluaron las NPs de ZnO contra *F. oxysporum* y *A. Alternata* los cuales también reportaron inhibición micelial. Kanhed *et al.* (2014) también reportó el efecto inhibitorio de NPs de Cu contra *P. destructiva*, encontrando que dichas NPs causan inhibición del crecimiento *in vitro*.

Es interesante observar las imágenes de la Figura 6, la que nos muestra que sólo las NPs de Ag mostraron un pequeño halo de inhibición ante *P. syringae*, la cepa fue resistente a los dos tipos de NPs; CuO y ZnO, en todas las concentraciones usadas, inclusive el halo causado por el control positivo fue mucho menor que el que presentó con *C. michiganensis*.

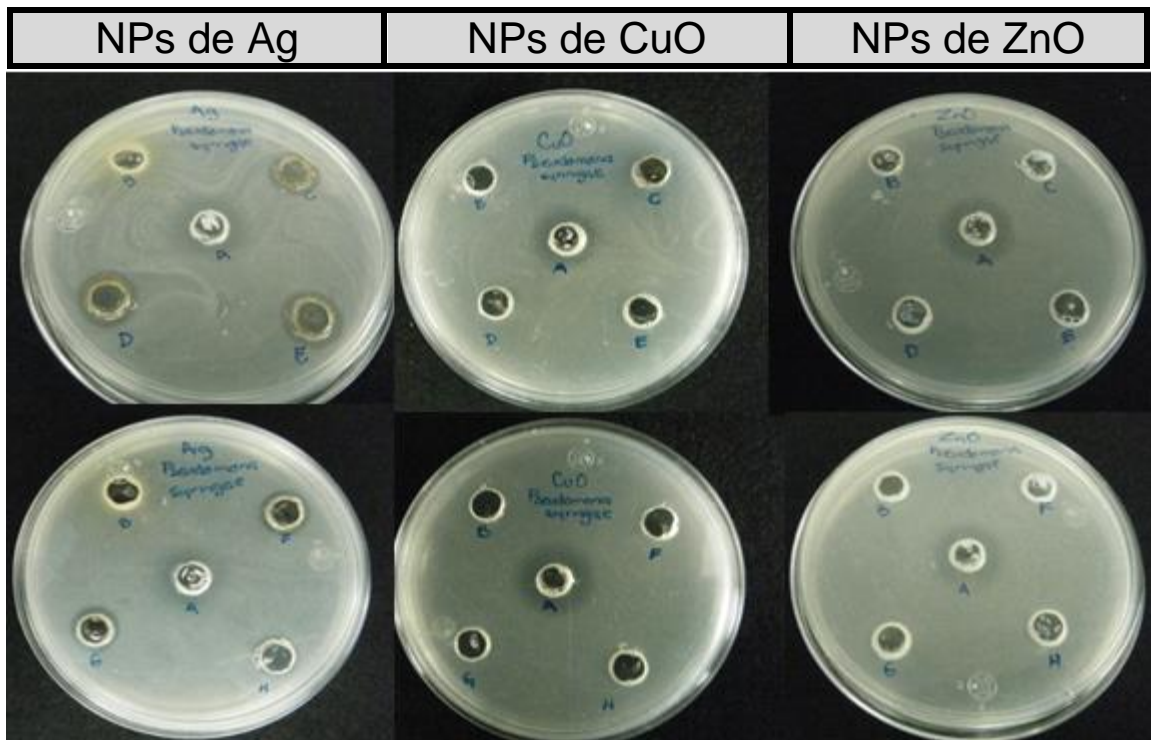


Figura 8.- Halos de inhibición en placas con *P. syringae* ante las NPs de Ag, CuO y ZnO. A) Control positivo, B) Control negativo, C) 4000ppm, D) 3000ppm, E) 2000ppm, F) 1000 ppm, G) 500 ppm, H) 250 ppm. Nota* El control negativo (B) para las NPs de Ag, fue el extracto puro de *Larrea tridentata*.

Es posible que el mayor efecto antibacteriano de las nanopartículas de CuO y ZnO contra *C. michiganensis*, pueda deberse a la morfología Gram (+) de dicha bacteria. Siendo notoriamente más susceptible a los tratamientos aplicados.

Las bacterias Gram negativas, como *P. syringae*, poseen una pared celular más compleja y estructurada con capas extras compuestas de lipopolisacáridos y proteínas, por lo que el agente tóxico toma mayor tiempo en penetrar hacia el protoplasma que en una bacteria Gram positiva, como *C. michiganensis*. Probablemente sea por esta causa que al día siguiente de las pruebas de antagonismo aún no se formaba halo de inhibición en las placas con *P. syringae*. Esto sugiere que las bacterias Gram negativas poseen una mayor resistencia al paso de nanopartículas o iones metálicos, por lo que se deberán presentar estrategias más rigurosas a la hora de aplicar métodos antibacteriales con nanopartículas metálicas cuando el agente infeccioso en la planta sea una bacteria Gram negativa.

Para determinar el porcentaje de inhibición, los valores del diámetro (cm), se sustituyeron en la ecuación antes mencionada (apartado 6.4.3 materiales y métodos). Se tomó como un 100% el diámetro del halo formado por el control positivo (Bactericida comercial de uso agrícola, de nombre comercial Finalbacter), para poder comparar su actividad y capacidad de difusión, contra la de los tratamientos con las respectivas NPs.

La figura 7 nos muestra el porcentaje de inhibición de los tratamientos con NPs de Ag contra la bacteria Gram positiva, *C. michiganensis*. Podemos ver que, a pesar de que el extracto de *Larrea tridentata* inhibe el crecimiento bacteriano de esta cepa, su actividad es menor que la de los tratamientos con NPs de Ag. Podemos apreciar además, que las concentraciones de 3000 y 2000 ppm presentaron un halo mayor que el formado por el control positivo. Es notorio también que estas NPs no mostraron una tendencia a aumentar su efectividad conforme aumenta su concentración. Al comparar esta figura con los resultados siguientes, nos hace pensar que, esta discrepancia de resultados es debido a que las NPs de Ag fueron biosintetizadas por medio de un extracto vegetal, y cuando ocurre esto el resultado es NPs de tamaño y forma no homogéneas (Hernández-Piñero *et al.* (2016). La caracterización de estas NPs indicaba valores que van de los 20 a 45nm. Aunque en general la inhibición obtenida por estas NPs fue muy buena ya que incluso las concentraciones de 250ppm tuvieron un porcentaje de inhibición, mayor al 80%.

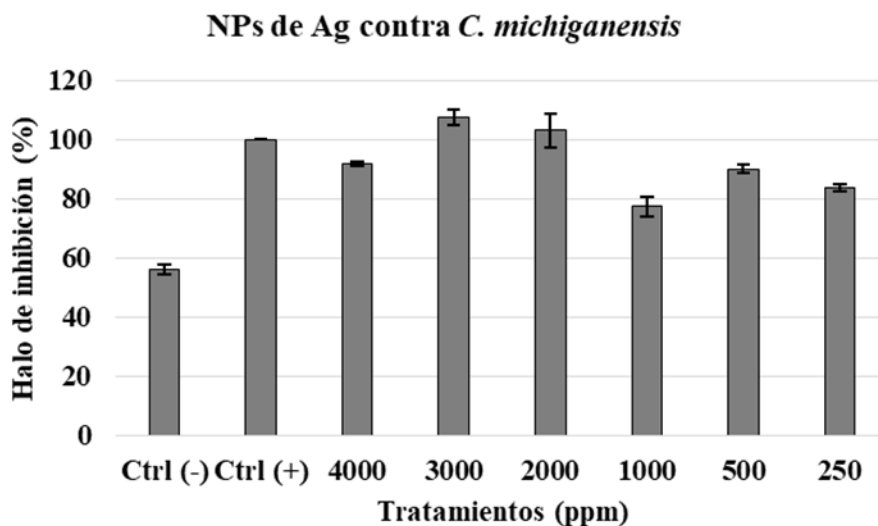


Figura 9.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs Ag contra *C. michiganensis*.

Los tratamientos más efectivos fueron sin duda las NPs de CuO, ya que como se aprecia en la Figura 8 los tratamientos de 4000, 3000, 2000, 1000 y 500ppm fueron superiores al bactericida comercial, inclusive las concentraciones de 250ppm presentaron valores cercanos al 100%, esto nos hace suponer que con una concentración muy pequeña de NPs de CuO podemos inhibir el crecimiento *C. michiganensis*.

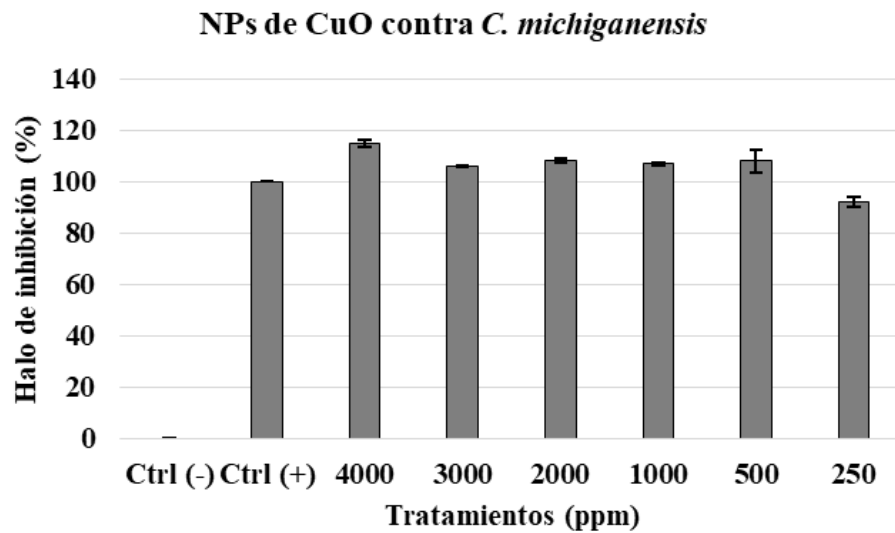


Figura 10.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs Ag contra *C. michiganensis*.

Las NPs de ZnO en cambio, fueron las menos efectivas, pero aun así, inhibieron el crecimiento bacteriano. No mostraron una tendencia muy marcada aunque fue notorio que la concentración con 250 ppm fue la que menos halo de inhibición presentó. Esto podría ser debido a su poca difusión por el agar, más sin embargo no se encontraron antecedentes sobre esto.

NPs de ZnO contra *C. michiganensis*

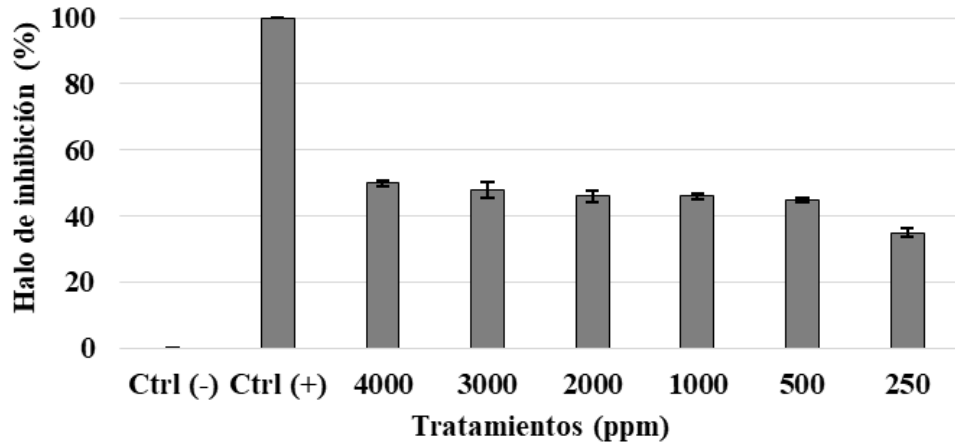


Figura 11.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs ZnO contra *C. michiganensis*.

Para el caso de la cepa *P. syringae*, sólo las NPs de Ag pudieron inhibir su crecimiento (Fig.10). Como ya se mencionó, esta bacteria presentó incluso mayor resistencia al bactericida comercial. Esto podría comprobar que la estructura Gram negativa, juega un papel importante en la permeabilidad y penetración de las NPs y agentes externos (Aziz *et al.* 2016; Patra y Baek 2017).

NPs de Ag contra *P. syringae*

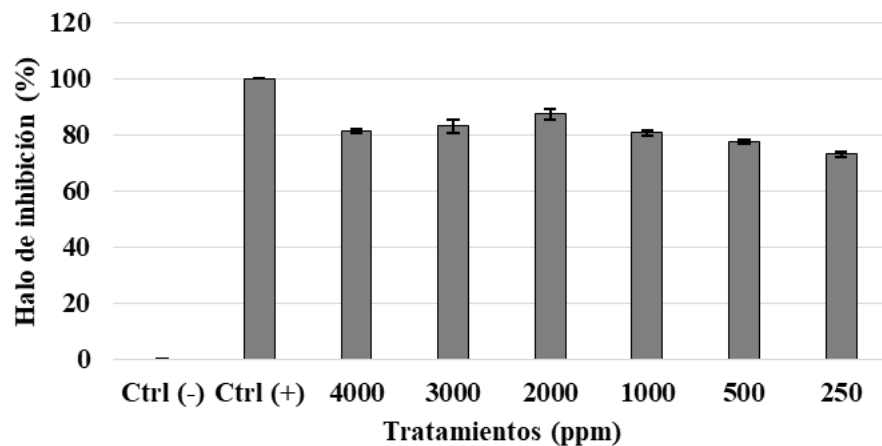


Figura 12.- Halos de inhibición de los tratamientos con NPs Ag contra *P. syringae*.

Algo muy importante que vale la pena señalar, es que, el comportamiento de las NPs (actividad antibacteriana) va a depender del medio donde se encuentren, es decir, líquido, sólido, tejido vegetal, así como de su tamaño, forma, concentración y tipo de bacteria al que sean expuestos (Azam *et al.* 2012). También hay que tener claro que estas NPs no son solubles, por lo tanto las concentraciones usadas podrían ser relativas, por lo cual es muy importante sonicar las soluciones las veces que sea necesario mientras se aplican los tratamientos.

7.2 Bioensayo II. Pruebas de viabilidad (vigor y germinación) en semillas de *M. sativa* sometidas a los tratamientos con NPs.

Los resultados indican que a 100 ppm de NPs de Ag, ZnO y CuO se incrementó el vigor y la germinación (Figura 11 y 12). Teniendo valores de incremento en 25% (70 ± 2.58) para las NPs de Ag; un 32% (74 ± 2.58) para las NPs de ZnO; y para las NPs de CuO de un 27% (71 ± 3.0) en vigor con respecto del control (56 ± 1.63). El porcentaje de germinación se incrementó un 44% (62 ± 2.58) para las NPs de Ag; un 56% (67 ± 2.52) para las NPs de ZnO y 33% en las NPs de CuO (57 ± 3.42), con respecto al control (43 ± 3.42). Sin embargo, a concentraciones más elevadas se observa inhibición en el desarrollo de estas variables asociadas con los caracteres de calidad fisiológica, posiblemente por un efecto fitotóxico.

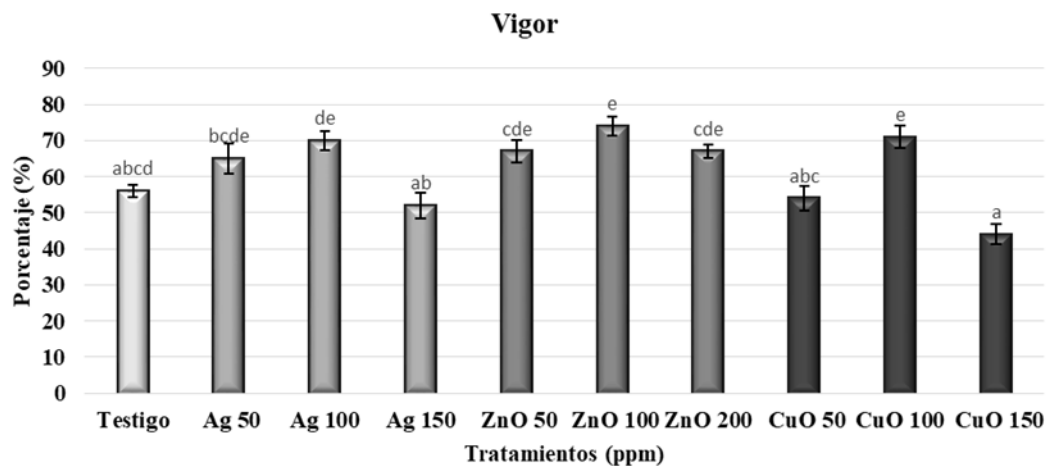


Figura 13.- Comparación de medias, Tukey ($\alpha \leq 0.05$) para las pruebas de vigor en semillas de *M. sativa* sometidas a los tratamientos con NPs.

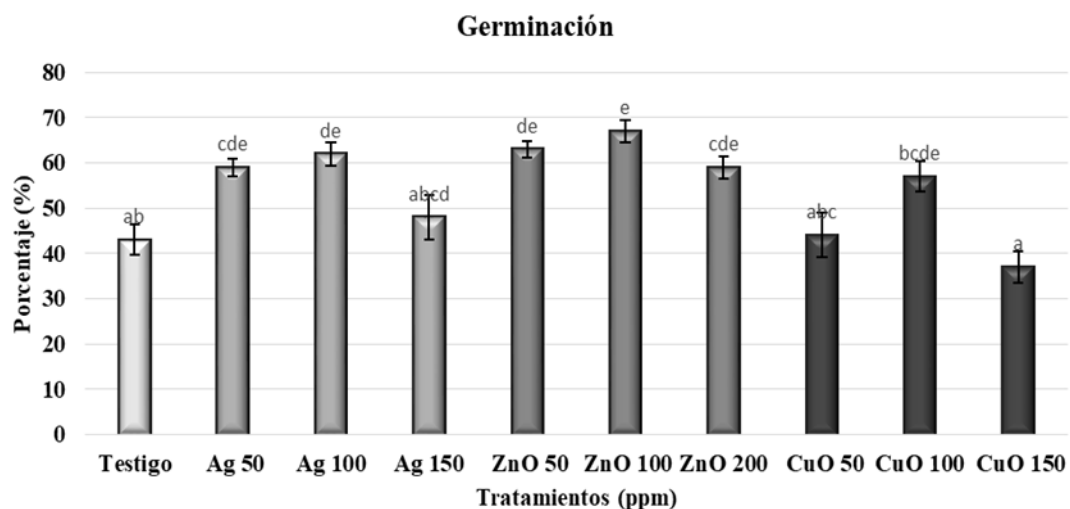


Figura 14.- Comparación de medias, Tukey ($\alpha \leq 0.05$) para las pruebas de germinación en semillas de *M. sativa* sometidas a los tratamientos con NPs.

Por lo anterior, se decidió utilizar la concentración de 100 ppm para el experimento en invernadero.

Se puede observar también que las NPs de ZnO a una concentración de 200ppm aumentaron el vigor y la germinación a diferencia de las NPs de Ag y CuO las cuales lo disminuyeron. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Zhao et al. (2013) quienes observaron que las NPs de ZnO tienen un efecto positivo en el desarrollo y cantidad de biomasa en cierto tipo de cultivos. No siendo así para las NPs de CuO, ya que el incremento en la concentración genera efecto fitotóxico (Ochoa, 2017).

7.3 Bioensayo III. Actividad antibacteriana de los tratamientos con NPs *in vivo*.



Figura 15.- Evaluación de los tratamientos en invernadero.

El análisis de ji-cuadrada para la intensidad de daño por enfermedad mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el factor Nanopartículas (Sin NPs, Ag, CuO y ZnO) y en factor Bacterias (Sin bacterias, *P. syringae* y *C. michiganensis*), por lo cual H_0 se rechaza, lo cual indica que, al menos un tratamiento actúa diferente. Los resultados del estadístico se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 3.- Resumen de procesamiento de casos NPs.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
INCIDENCIA * NANOS	470	97.9%	10	2.1%	480	100.0%

Tabla 4.- Tabla de contingencia INCIDENCIA*NPs

		NANOS				Total
		1	2	3	4	
INCIDENCIA 0	Recuento	28	38	33	32	131
	Recuento esperado	33.4	33.4	30.7	33.4	131.0
	% del total	6.0%	8.1%	7.0%	6.8%	27.9%
1	Recuento	22	20	33	45	120
	Recuento esperado	30.6	30.6	28.1	30.6	120.0
	% del total	4.7%	4.3%	7.0%	9.6%	25.5%
2	Recuento	31	25	10	19	85
	Recuento esperado	21.7	21.7	19.9	21.7	85.0
	% del total	6.6%	5.3%	2.1%	4.0%	18.1%
3	Recuento	34	32	31	24	121
	Recuento esperado	30.9	30.9	28.3	30.9	121.0
	% del total	7.2%	6.8%	6.6%	5.1%	25.7%
4	Recuento	5	5	3	0	13
	Recuento esperado	3.3	3.3	3.0	3.3	13.0
	% del total	1.1%	1.1%	0.6%	0.0%	2.8%
Total	Recuento	120	120	110	120	470
	Recuento esperado	120.0	120.0	110.0	120.0	470.0
	% del total	25.5%	25.5%	23.4%	25.5%	100.0%

Tabla 5.- Prueba de ji-cuadrada para el factor Nanopartículas

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	32.377 ^a	12	.001
Razón de verosimilitud	36.115	12	.000
Asociación lineal por lineal	7.731	1	.005
N de casos válidos	470		

a. 4 casillas (20.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3.04.

Tabla 6.- Resumen de procesamiento de casos Bacterias.

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
INCIDENCIA * BACTER	470	97.9%	10	2.1%	480	100.0%

Tabla 7.-Tabla de contingencia INCIDENCIA*Bacterias.

		BACTER			Total	
		1	2	3		
INCIDENCIA	0	Recuento	83	10	38	131
		Recuento esperado	44.6	44.6	41.8	131.0
		% del total	17.7%	2.1%	8.1%	27.9%
	1	Recuento	55	22	43	120
		Recuento esperado	40.9	40.9	38.3	120.0
		% del total	11.7%	4.7%	9.1%	25.5%
	2	Recuento	18	31	36	85
		Recuento esperado	28.9	28.9	27.1	85.0
		% del total	3.8%	6.6%	7.7%	18.1%
	3	Recuento	4	84	33	121
		Recuento esperado	41.2	41.2	38.6	121.0
		% del total	0.9%	17.9%	7.0%	25.7%
4	Recuento	0	13	0	13	
	Recuento esperado	4.4	4.4	4.1	13.0	
	% del total	0.0%	2.8%	0.0%	2.8%	
Total	Recuento	160	160	150	470	
	Recuento esperado	160.0	160.0	150.0	470.0	
	% del total	34.0%	34.0%	31.9%	100.0%	

Tabla 8.- Prueba de ji-cuadrada para el factor Bacterias.

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	185.690 ^a	8	.000
Razón de verosimilitud	207.658	8	.000
Asociación lineal por lineal	34.361	1	.000
N de casos válidos	470		

a. 3 casillas (20.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 4.15.

Una vez rechazada la H_0 para los dos factores, se procedió a realizar la prueba de Mann-Whitney, para determinar cuál de los tratamientos es el que está actuando diferente. Como resultado, los tratamientos de CuO y ZnO fueron significativamente diferentes al testigo. Y en el caso del factor bacterias, los dos tipos de bacterias presentaron diferencia significativa contra el testigo, siendo la de mayor severidad *P. syringae*. Lo cual comprueba que sí hubo infección (Figura 16).



Figura 16.- Imagen del daño causado por *P. syringae* en plantas de *M. sativa*.

Para determinar la eficacia de los tratamientos con NPs ante dichas cepas se realizó la prueba de Mann-Whitney, en la cual, se tomó como referencia al Tratamiento 5, el cual fue inoculado con *P. syringae* pero no fue tratado con ninguna de las NPs, así pues, se hizo la comparación de T5 (plantas con *P. syringae* - Sin NPs) contra T6 (*P. syringae* con NPsAg), T7 (*P. syringae* con NPsCuO) y T8 (*P. syringae* con NPsZnO) respectivamente. Los resultados indican que sólo hubo diferencia significativa con el tratamiento 8, es decir, las NPs de ZnO fueron el tratamiento que redujo significativamente la enfermedad (39%), como se muestra en la Figura 17.

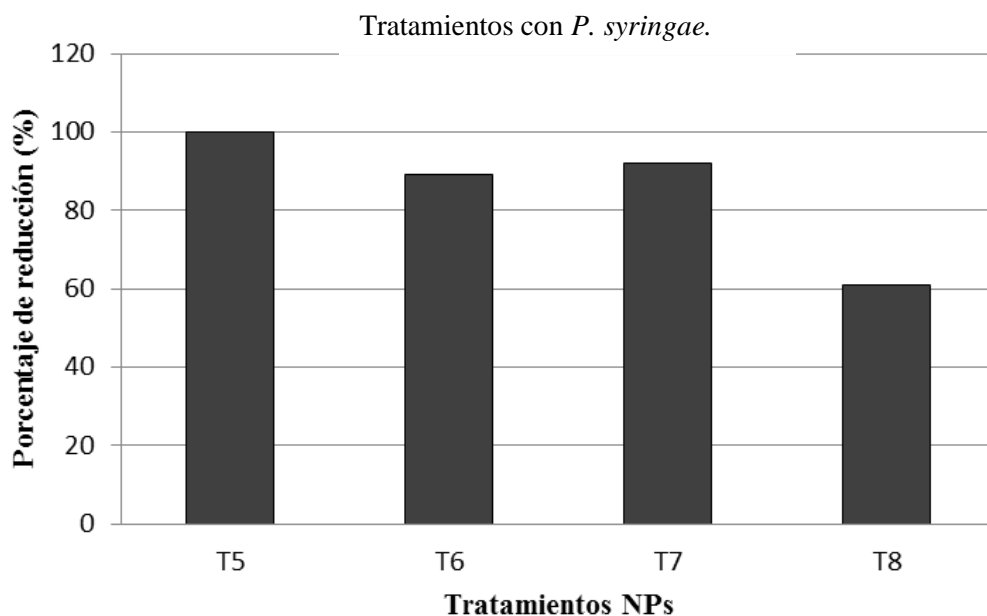


Figura 17.- Porcentaje de reducción del daño ocasionado por *P. syringae*.

*Los resultados se expresaron en porcentaje, tomando en cuenta los valores de incidencia otorgados por los evaluadores.

T5 se tomó como referencia, es decir 100%, T6 redujo un 10.6%, T7 un 7% y T8 fue el que más redujo la enfermedad con un 39%.

En cuanto a *C. michiganensis* se tomó como referencia al Tratamiento 9, el cual fue inoculado con *C. michiganensis* pero no fue tratado con ninguna de las NPs, así pues, se hizo la comparación de T9 (plantas con *C. michiganensis* - Sin NPs) contra T10 (*C. michiganensis* con NPsAg), T11 (*C. michiganensis* con NPsCuO) y T12 (*C. michiganensis* con NPsZnO) respectivamente. Los resultados indican que sólo hubo diferencia significativa con T11, es decir, las NPs de CuO fueron el tratamiento que redujo significativamente la enfermedad (52%) (Figura 18).

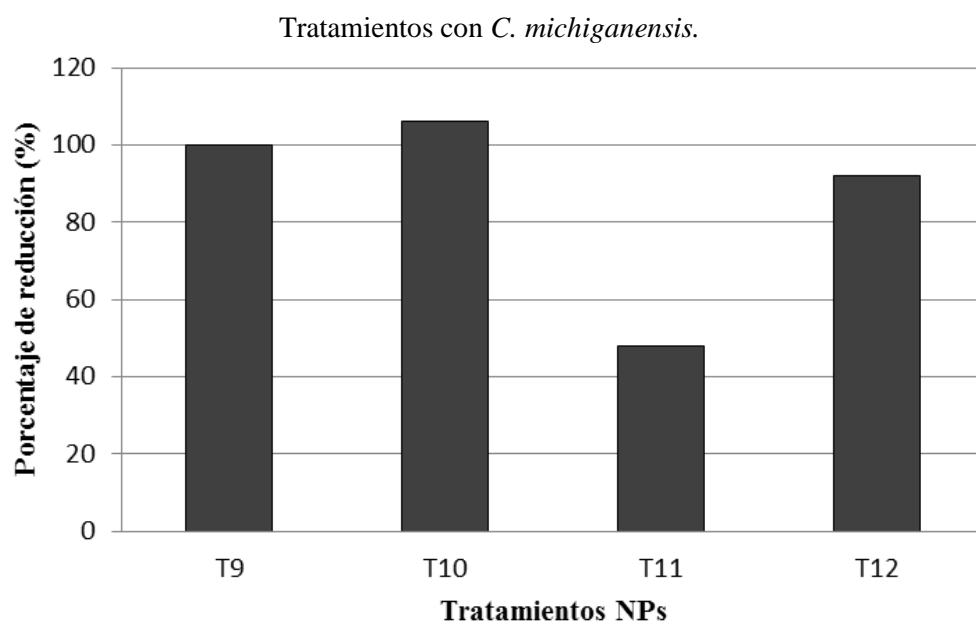


Figura 18.- Porcentaje de reducción del daño ocasionado por *C. michiganensis*.

T9 se tomó como referencia, es decir 100%, T10 no redujo la enfermedad, T12 un 8% y T11 fue el que más redujo la enfermedad con un 52%.

Se puede apreciar que las NPs de Ag, en cambio, no redujeron la enfermedad ante ninguna de las dos cepas bacterianas, esto podría deberse a lo ya mencionado; las NPs de Ag fueron biosintetizadas por medio de un extracto vegetal, y cuando ocurre esto el resultado es NPs de tamaño y forma no homogéneas (Hernández-Piñero *et al.* (2016). Esto podría ser un factor para que las NPs de Ag no hayan penetrado al interior de los tejidos vegetales.

Son muy pocos los estudios realizados usando NPs metálicas *in vivo*, sin embargo hay evidencia de que la aplicación de NPs metálicas en el área foliar disminuye la enfermedad ya sea bacteriana o fúngica, tal es el caso de Cui *et al.* (2009) quien aplicó NPs de TiO₂ en pepino y encontró que estas NPs redujeron la infección de *P. syringae* pv. Lachrymans y *P. cubensis* en un 69 y 91% respectivamente además de que dichas NPs aumentaron la actividad fotosintética. Giannousi *et al.* (2013) realizó estudios de campo con *Lycopersicon esculentum* expuesto a *Phytophthora infestans* y encontró que

el uso de NPs de Cu es más efectiva que el Cu no-nano actualmente disponible, 78.5% contra 57.8% respectivamente. Lamsal *et al.* (2011a) mostraron que las NP de Ag inhibieron la actividad de *Colletotrichum* spp. en ensayos de campo. Ambos documentos indican que las NP de Ag dañaron y penetraron la membrana celular, posteriormente reduciendo la infección.

Esto nos comprueba que las NPs metálicas se comportan de diferente manera dependiendo del tipo, agente patógeno y especie vegetal al que sean expuestas.

7.3.1 Actividad enzimática antioxidante.

En el Análisis de varianza se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las variables CAT y APX en la fuente de variación nanopartículas (Sin NPs, Ag, CuO y ZnO), sin embargo, en la fuente de variación bacterias, y en la interacción de tratamientos (NPs x bacterias) no se detectaron diferencias significativas. Lo anterior indica que sólo la aplicación de NPs, contribuyó en la generación de estrés oxidativo en la planta, a través de la generación de radicales libres ROS. Dichos resultados se muestran en las Tablas 9, 10 y 11.

Tabla 9.- Prueba de efectos entre sujetos para la variable Ascorbato peroxidasa.

Fuente	Suma de cuadrados Tipo III	df	Cuadrado medio	F	Sig.
Corrected Model	.144 ^a	11	.013	2.524	.028
Intercept	1.036	1	1.036	199.441	.000
NANO	.069	3	.023	4.436	.013
BACTERIAS	.000	2	.000	.048	.953
NANO *	.075	6	.012	2.394	.059
BACTERIAS					
Error	.125	24	.005		
Total	1.305	36			
Corrected Total	.269	35			

Tabla 10.- Prueba de efectos entre sujetos para la variable Catalasa

Fuente	Suma de cuadrados Tipo III	df	Cuadrado medio	F	Sig.
Corrected Model	.000 ^a	11	2.042E-005	2.430	.033
Intercept	.001	1	.001	141.400	.000
NANO	.000	3	3.712E-005	4.416	.013
BACTERIAS	1.209E-005	2	6.043E-006	.719	.497
NANO *	.000	6	1.687E-005	2.007	.104
BACTERIAS					
Error	.000	24	8.405E-006		
Total	.002	36			
Corrected Total	.000	35			

Tabla 11.- Prueba de efectos entre sujetos para la variable Peroxidasa.

Fuente	Suma de cuadrados Tipo III	df	Cuadrado medio	F	Sig.
Corrected Model	321.511 ^a	11	29.228	.896	.557
Intercept	12445.076	1	12445.076	381.620	.000
NANO	108.133	3	36.044	1.105	.366
BACTERIAS	166.016	2	83.008	2.545	.099
NANO *	47.362	6	7.894	.242	.958
BACTERIAS					
Error	782.669	24	32.611		
Total	13549.255	36			
Corrected Total	1104.179	35			

Una vez rechazada la hipótesis nula de igualdad, para el caso de CAT y APX, se procedió a realizar la comparación de medias, para lo cual se utilizó la Prueba de LSD ($\alpha \leq 0.05$).

En la Figura 19A se observa que al aplicar los tratamientos con NPs metálicas, se incrementó la actividad de catalasa, ya que los resultados indican que a una concentración de 100 ppm de NPs CuO y ZnO, se obtuvo un incremento de (0.008 ± 4.5 UI/ml y 0.007 ± 4.4 UI/ml) superando en 110.5 % y 84.2 % al control ($0.0038.2E-04$ UI/ml). Estos resultados indican que las dosis aplicadas de NPs Cu y ZnO en plantas de *M. sativa* estimularon el sistema de defensa antioxidante, ya que este es el primer efecto tóxico que se detecta cuando se suministran NPs a plantas (Ghosh *et al.*, 2016).

Esto nos hace suponer que las nanopartículas metálicas están entrando a la planta y causando estrés oxidativo, dichos resultados concuerdan con Hong (2015), quién encontró aumento de la actividad de ascorbato peroxidasa y disminución de la catalasa en plantas de *Medicago sativa* tratadas con NPs de CuO, tanto en raíz como en la parte aérea.

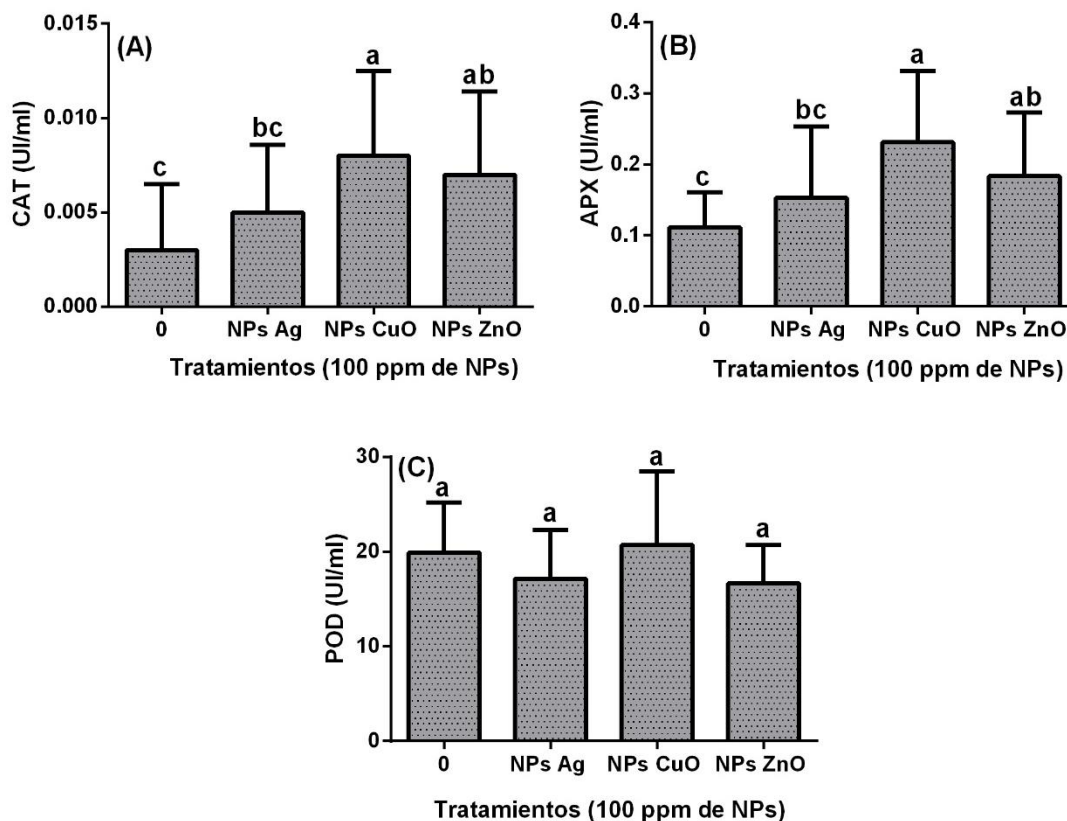


Figura 19.- Actividad enzimática antioxidante en plantas de *Medicago sativa* expuestas a NPs CuO y ZnO.

(A) Actividad catalasas (CAT), (B) Actividad ascorbato peroxidasa (APX), (C) Actividad de peroxidasas (POD). T1 = 0 ppm, T2 = 100 ppm de NPs Cu; T3 = 100 ppm de NPs ZnO. Los valores son promedio de cuatro repeticiones. Medias (n = 4), las barras representan el error estándar de la media, letras diferentes son estadísticamente diferentes LSD ($p < 0.05$).

El incremento en la actividad APX (Fig. 19B) fue similar al comportamiento de la actividad de CAT, ya que los resultados indican que la mayor actividad de esta enzima se registró con 100 ppm de NPs CuO, obteniendo un incremento de $(0.183 \pm 0.02 \text{ UI/ml})$, superando en 108 % al control $(0.111 \pm 0.01 \text{ UI/ml})$. Sin embargo, con las NPs ZnO también se registró un incremento del $(0.183 \pm 0.09 \text{ UI/ml})$ siendo 69.9 % mayor que el control $(0.111 \pm 0.5 \text{ UI/ml})$. Es importante mencionar que ambos materiales (NPs CuO y ZnO) generaron estrés oxidativo en las hojas de las plantas, sin embargo, la mayor actividad antioxidante se registró con las NPs CuO, este puede deberse al tipo de material, tamaño de partícula, características y las funciones específicas que ejerce cada mineral durante el desarrollo fisiológico de la planta.

Por otra parte, los resultados indican que la actividad de POD no se vio afectado significativamente por la aplicación de tratamientos con NPs Ag, CuO y ZnO (Fig. 19C). Sin embargo, el tratamiento con 100 ppm de NPs CuO reveló la mayor actividad (20.681 ± 7.77 UI/ml), mientras que las actividades más bajas (19.912 ± 5.27 UI/ml y 16.653 ± 4.03 UI/ml) se mostraron en el control y 100 ppm de NPs ZnO.

VIII. CONCLUSIONES

Las NPs empleadas tienen un efecto diferencial dependiendo del tipo de bacteria utilizada, siendo todas más efectivas para la bacteria Gram positiva (*C. michiganensis*) en las pruebas *in vitro*. Lo cual comprueba que la morfología bacteriana es un factor determinante para la penetración de las NPs a través de la membrana. Sin embargo el comportamiento de las NPs metálicas fue diferente en condiciones *in vivo*. Lo cual supone que en condiciones *in vivo* intervienen otros factores como el propio mecanismo de defensa de las plantas y la movilidad de las NPs al entrar a los tejidos vegetales.

No se descarta la posibilidad de que estas NPs puedan ser empleadas en los cultivos agrícolas para la prevención o cura de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas, pero es importante señalar que existen muchas variantes que se pueden mejorar, como el tamaño de las NPs, la forma de aplicación, la concentración empleada la cual puede variar dependiendo del cultivo utilizado, la efectividad bactericida de las NPs depende también del tipo de cultivo y del fitopatógeno al que son expuestas.

Este trabajo de investigación da la pauta a nuevas investigaciones, ya que faltan muchos estudios por hacer para poder comprender el mecanismo de acción de las NPs y su interacción al entrar en los tejidos vegetales, así como también, los posibles efectos tóxicos al ser consumidas por los humanos.

IX. PERSPECTIVAS

El campo de la nanotecnología está creciendo rápidamente y, más allá de los resultados ya alcanzados, está lleno de perspectivas prometedoras, tiene el potencial de revolucionar la agricultura y los sistemas alimentarios. Aunque la agroindustria apenas comienza a explorar sus aplicaciones, la nanotecnología ha demostrado un gran potencial con nuevas herramientas para el tratamiento molecular de enfermedades, el control de malezas y la capacidad de las plantas para absorber nutrientes. Esta es una estrategia innovadora de administración de agroquímicos, con el fin de mejorar la efectividad de la distribución de pesticidas y fertilizantes reduciendo el daño colateral.

Muchas de las firmas de empresas agroquímicas más importantes del mundo llevan a cabo actividades sobre el desarrollo de formulaciones que contienen nanopartículas que pueden disolverse en el agua de forma más eficaz que las existentes, aumentando así su actividad. Otros productos emplean suspensiones de partículas a nanoescala, que pueden ser base de agua o de aceite y contienen suspensiones uniformes de nanopartículas de pesticidas o herbicidas. Está claro que estos sistemas requieren un ajuste sofisticado para que su funcionamiento se sincronice con el ciclo de los patógenos, con la etapa fenológica de las malezas, evitando así las barreras biológicas del objetivo. También podría ser posible desarrollar un agroquímico que contenga diferentes sustancias para diferentes funciones (protección de plantas, fertilización, hormonas, etc.) y encapsularse por separado para evitar las interacciones entre ellos y la degradación.

De esta manera, las nanopartículas pueden servir como balas mágicas que contienen herbicidas, productos químicos o genes, que se dirigen a partes de plantas particulares para liberar su contenido. Por otra parte, los nano-fertilizantes podrían liberar los nutrientes a la vez que evitan que se conviertan prematuramente en formas químicas / gaseosas que no pueden ser absorbidas por las plantas. Esto se puede lograr evitando que los nutrientes interactúen con el suelo, el agua y los microorganismos, y liberando nutrientes solo cuando pueden ser internalizados directamente por la planta.

Hasta ahora la formación de NPs en plantas vivas se ha observado solo en oro, plata, cobre, una aleación de oro, plata y cobre y óxido de zinc. Las ciencias de las plantas podrían contribuir significativamente a explorar a fondo el potencial de la fitosis sintetizadora de NPs metálicas.

Es fundamental comprender mejor el papel de los parámetros físicos y químicos que modulan el proceso; sin embargo, varios aspectos de la fisiología de las plantas involucrados en el fenómeno deben ser aclarados. Desde un punto de vista fisiológico, una vez que los iones metálicos han sido transportados a las raíces de las plantas, quedan algunas preguntas por responder. Hasta la fecha no está claro qué determina la cantidad de metal que se deposita como NP en los tejidos vegetales y, especialmente, si hay un límite superior para esto. Hasta el momento, los investigadores han realizado estudios sólo en algunas especies de plantas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson A, McLean J, Jacobson A, Britt D. 2017. CuO and ZnO Nanoparticles Modify Interkingdom Cell Signaling Processes Relevant to Crop Production. *Journal of Agricultural and Food*. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01302.
- Aung K, Xin X, Mecey C, He SY. 2017. Subcellular localization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato effector proteins in plants. *Methods in Molecular Biology*. 1531: 141–153.
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Memic A. 2012. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram positive and negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 3527-3535.
- Aziz N, Faraz M, Pandey R, Sakir M, Fatma T, Varma A. 2015. Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: synthesis, antibacterial and photocatalytic properties. *Langmuir*. 31, 11605–11612.
- Aziz N, Pandey R, Barman I, Prasad R. 2016. Leveraging the attributes of *Mucor hiemalis*-derived silver nanoparticles for a synergistic broad-spectrum antimicrobial platform. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1984.
- Beuzón CR. y Ruiz-Albert J. 2014. Sistema de secreción Tipo III en la interacción de *Pseudomonas syringae* con la planta. *Microbiología molecular*. 58:130-132. <http://www.semicrobiología.org>.
- Borboa-Flores J, Rueda-Puente EO, Acedo-Felix E, Ponce JF, Cruz M, García-Ortega AM. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista de Fitotecnología mexicana*. 32(4): 319-326.
- Charitidis CA, Georgiou P, Koklioti MA, Markakis V. 2014. Manufacturing nanomaterials: from research to industry. *Manufacturing Review*. 1(11):1–19.
- Chaudhary D, Kumar R, Kumari A, Rashmi Jangra R. 2017. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Significance in Sustainable Agriculture. In: Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R. (eds). *Probiotics in Agroecosystem*. Springer, Singapore. 93-115.
- Comini E. 2013. Integration of metal oxide nanowires in flexible gas sensing devices. *Sensors* 13(8):10659–10673.
- Corral-Diaz B, Peralta-Videa JR, Alvarez-Parrilla E, Rodrigo-García J, Morales MI, Osuna-Avila P, Niu G, Hernandez-Viezcas JA, Gardea-Torresdey JL. 2014. Cerium oxide nanoparticles alter the antioxidant capacity but do not impact tuber ionome in *Raphanus sativus* (L). *Plant Physiology and Biochemistry*. 84, 277-285.

- Cui H, Zhang P, Gu W, Jiang J. 2009. Application of anatasa TiO₂ sol derived from peroxotitanic acid in crop diseases control and growth regulation. *Nano Science and Technology Institute*. 2:286–289.
- Delaux P, Nanda AK, Mathé C, Sejalon-Delmas N, Dunand C. 2012. Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic*. 14(1): 49– 59.
- Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sadraei J. 2014. *in vitro* Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): *Iranian Journal of Parasitology*. 9(1):6-13.
- Du W, Tan W, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, Ji R, Yin Y. 2017. Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: Physiological and biochemical aspects. *Plant Physiology and Biochemistry*. 110, 210–225.
- Elavarthi S y Martin B. 2010. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Plant Stress Tolerance*. 273-280.
- Galán JE, Lara-Tejero M, Marlovits TC, Wagner S. 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual Review of Microbiology*. 68: 415–438.
- Gardea-Torresdey JL, Parsons JG, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani HE, Santiago P, Yacaman MJ. 2002. Formation and Growth of Au Nanoparticles inside Live Alfalfa Plants. *Nano Letters* 2,(4) 397-401.
- Ghosh M, Jana A, Sinha S, Jothiramajayam M, Nag A, Chakraborty A, Mukherjee A. 2016. The effect of ZnO nanoparticles in plants: cytotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research*. 807, 25-32.
- Giannousi K, Avramidis I, Dendrinou-Samara C. 2013. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. *RSC Advances*. 3(44):21743–21752.
- Gruissem W, Lee CH, Oliver M, Pogson B. 2012. The global plant council: Increasing the impact of plant research to meet global challenges. *Journal of Plant Biology*. 55: 343-348.
- Haverkamp RG. 2011. Silver nanoparticles produced by living plants and by using plant extracts. In: I.A. Golubev (ed.) *Handbook of phytoremediation*. Nova Publ., New York, USA. Pp 691-707.
- He LL, Liu Y, Mustapha A, Lin MS. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiology Research*. 166(3):207–215.

- Helaine MA. y Hagerman AE. 2006. Oxidative stress, exercise and Aging. Editorial Imperial College Press. 173.
- Hernández-Piñero JL, Terrón-Rebolledo M, Foroughbakhch R, Moreno-Limón S, Melendrez MF, Solís-Pomar F, Pérez-Tijerina E. 2016. Effect of heating rate and plant species on the size and uniformity of silver nanoparticles synthesized using aromatic plant extracts. *Applied Nanoscience*. 6:1183–1190 DOI 10.1007/s13204-016-0532-0.
- Hong J, Zhao L, Rico CM, Keller A, Adeyeye A, Gardea-Torresdey JL. 2015. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmenta. Science.Processes Impacts*. 17, 177-185.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2014. International Rules for Seed Testing. Zurich, Switzerland. By Michael Muschick, Zürichstrasse 50 P.O. Box 308 8303 Bassersdorf CH- Switzerland. 243.
- Kairyte K, Kadys A, Luksiene Z. 2013. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension: *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 128: 78–84.
- Kanhed P, et al. 2014. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters*. 115:13–17.
- Kasana RC, Panwar NR, Kaul RK, Kumar P. 2016. Copper Nanoparticles in Agriculture: Biological Synthesis and Antimicrobial Activity. *Nanoscience in food and agriculture*. 23, 129-143.
- Kuriakose S, Bhardwaj N, Singh J, Satpati B, Mohapatra S. 2013 Structural, optical and photocatalytic properties of flower-like ZnO nanostructures prepared by a facile wet chemical method. *Beilstein Journal Nanotechnology*. 4: 763– 770.
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Lui JR. 1995. Acidic peroxiases from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry*. 39(5), 981-984.
- Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS. 2011a. Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology*. 39(3):194–199.
- Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS. 2011b. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. *Mycobiology* 39(1): 26–32.

- Lateef A, Adeeyo AO. 2015. Green synthesis and antibacterial activities of silver nanoparticles using extracellular laccase of *Lentinus edodes*. *Notulae Scientia Biologicae* 7:405-411.
- Lateef A, Azeez MA, Asafa TB, Yekeen TA, Akinboro A, Oladipo IC, Azeez L, Ajibade SE, Ojo SA, Gueguim-Kana EB, Beukes LS. 2016a. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using a pod extract of *Cola nitida*: antibacterial, antioxidant activities and application as a paint additive. *Journal of Taibah University of Science* 10:551-562.
- Lira-Saldivar R H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades Biocidas de la Gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.) Coville). *Revista Mexicana de Fitopatología*. (21):214-222.
- Liu J, Dhungan B, Cobb GP. 2018. Environmental behavior, potential phytotoxicity, and accumulation of copper oxide nanoparticles and arsenic in rice plants. *Environmental and Toxicology Chemistry*. 37, 11-20.
- Marchiol Luca. 2012. Synthesis of metal nanoparticles in living plants. *Italian Journal of agronomy*. 7, 274-282.
- Martínez R, Nebot E, Porres JR, Kapravelou G, Del Moral A, Talbi C, Bedmar EJ, López-Jurado M. 2015. *Medicago sativa* L: mejora y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional por coinoculación bacteriana. *Nutricion Hospiytalaria*. 32(6):2741-2748.
- Mazzaglia A, Fortunati E, Kenny JM, Torre L, Balestra GM. 2017 Nanomaterials in Plant Protection. *Nanotechnology in Agriculture and Food Science*. 113-134.
- Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*. 31(2):346–356.
- Monge M. 2009. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química*. 105(1), 33–41.
- Naderi MR, Danesh-Shahraki A. 2013. Nanofertilizers and their roles in sustainable agriculture. *International Journal of Agriculture and Crop Science*. 5(19):2229–2232.
- Nakano Y, y Asada K. 1981. Hydrogen Peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22, 867-880.
- Nalimova SM, Oliveira HN, Viana FC. 2008. Recobrado de *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* a partir de semillas de tabaco infectadas. *Fitosanidad* (on line). Fecha de consulta: 01 de Marzo de 2017. Disponible en:<<http://ww.redalyc.org/articulo.oa?id=209115562004>> ISSN 1562-3009.

- Nishant N, y Upadhyay R. 2016. Interventions in Handling of Pesticides in Agriculture: A Review. *Journal of Agriculture and Environmental Science*. 5.
- Ochoa L., Medina-Velo A., Barriosb A.C., Bonilla-Bird J.N., Hernandez-Viezcas J.A., Gardea-Torresdey J.L.: Modulation of CuO nanoparticles toxicity to green pea (*Pisum sativum* Fabaceae) by the phytohormone indole-3-acetic acid. *Sci. Total Environ*. 513–524 (2017).
- Oh Eom-Ji, Chungyun Bae, Han-Beoy Lee, In Sun Hwang, Hyok-In Lee, Mi Chi Yea, Kyu-Ock Yim, Seungdon Lee, Sunggi Heu, Jae-Soon Cha, Chang-Sik Oh. 2016. *Clavibacter michiganensis subsp. capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, 4065–4070 DOI 10.1099/ijsem.0.001311.
- Oladipo IC, Lateef A, Azeez MA, Asafa TB, Yekeen TA. 2017. Green Synthesis and Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles using Cell Free-Extracts of *Enterococcus* species. *Notulae Scientia Biologicae*. 9(2):196-203. DOI: 10.15835/nsb929938.
- Park Y, Hong YN, Weyers A, Kim YS, Linhardt RJ. 2011. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*. 5:69-78.
- Patel N, Desai P, Patel N, Jha A, Kumar H.G. 2014. Agronanotechnology for Plant Fungal Disease Management: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3:71-84.
- Patra JK, y Baek KH. 2017. Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its anticandidal and antioxidant effects. *Frontiers in Microbiology*. 8, 167.
- Peralta-Videa JR, de la Rosa G, Gonzalez JH, Gardea-Torresdey JL. 2004. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research*. 8,679–685 doi:10.1016/S1093-0191(03)00040-6.
- Phogat N, Khan S, Shankar S, Ansary A, Uddin I. 2016. Fate of inorganic nanoparticles in agriculture. *Advanced Materials Letters*. 7, 03-12.
- Prasad R, Bhattacharyya A, Nguyen D. 2017. Nanotechnology in sustainable agriculture: Recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1014.
- Raliya R, Tarafdar JC. 2013. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agricultural Research*. 2(1):48–57.

- Ramírez-Gómez M y Rodríguez Alia. 2012. Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: a review. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14, 271-284.
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. 2011. Interacción de nanopartículas con plantas comestibles y sus posibles implicaciones en la cadena alimentaria *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 3485-3498.
- Servin A, Elmer W, Mukherjee A. 2015. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*. 17:92.
- Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A. 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*. 7, 219-242.
- Spoel SH, Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 12: 89– 100.
- Srivastava M, Pandey S, Shahid M, Singh A, Kumar V, Trivedi S. 2016. Nanotechnology and agriculture: a review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 10(2), 1055.
- Starnes D, Jayjain A, Sahi S, 2010. In planta engineering of gold nanoparticles of desirable geometries by modulating growth conditions: an environment-friendly approach. *Environ. Sci. Technol*. 44:7110-7115.
- Stegemeier JP, Schwab F, Colman BP, Webb SM, Newville M, Lanzirotti A, Winkler C, Wiesner MR, Lowry GV. 2015. Speciation Matters: Bioavailability of Silver and Silver Sulfide Nanoparticles to Alfalfa (*Medicago sativa*) *Environmental Science & Technology*. 49 (14), pp 8451–8460 DOI: 10.1021/acs.est.5b0114.
- Taran M, Rad M, Alavi M. 2017. Antibacterial Activity of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles Biosynthesized by *Bacillus* sp. FU4: Optimization of Experiment Design. *Pharmaceutical Sciences*, 23. 198-206. doi: 10.15171/PS.2017.30.
- Tripathi DK, Singh S, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S. 2017. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 110, 167–177.
- Vanathi P, Rajiv P, Sivaraj R. 2016. Synthesis and characterization of Eichhornia-mediated copper oxide nanoparticles and assessing their antifungal activity against plant pathogens. *Bulletin of Materials Science*. 39: 1165. <https://doi.org/10.1007/s12034-016-1276-x>.

- Wang L, Hu C, Shao L. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. 12, 1227–1249.
- Wang WN, Tarafdar JC, Biswas P. 2013. Nanoparticle synthesis and delivery by an aerosol route for watermelon plant foliar uptake. *Journal of Nanoparticle Research* 15(1):1–13.
- Wang Z, Xie X, Zhao J, Liu X, Feng W, White JC, Xing B. 2012. Xylem-and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental Science & Technology*. 46(8):4434–4441.
- Wani AH, Shah MA. 2012. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(3):40–44.
- Zhao L, Sun L, Hernández-Viezcás JA, Hong J, Gardea-Torresdey JL. 2013. Influence of CeO₂ and ZnO Nanoparticles on Cucumber Physiological Markers and Bioaccumulation of Ce and Zn: A Life Cycle Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 11945-11951.

XI. RESUMEN BIOGRÁFICO

Edith Ramos Cortez

Candidata para el Grado de:

Doctor en Ciencias con orientación en Manejo y Administración de Recursos Vegetales.

Tesis: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE Ag, CuO Y ZnO *IN VITRO* E *IN VIVO* CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

Campo de estudio: Biología, agrícola, química.

Datos personales: Nacida en Gómez Palacio Durango, el 6 de Agosto de 1986, hija del Sr. Francisco Ramos Esparza y la Sra. Leonila Cortez Urué.

Educación: Egresada de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA), de la Universidad Autónoma Chapingo, 2010-2011. Grado obtenido; Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), 2004-2009. Grado obtenido; Químico Farmacéutico Biólogo.

Experiencia Profesional: Auxiliar en proyecto de fitorremediación en Tsay Keh Dene, British Columbia, Canadá.

Asistente de investigación en el Departamento de Biodiesel, en Olds College, Alberta Canadá.

Estancia se estudios en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coah. En el departamento de Plásticos en la agricultura.

Analista de microbiología en “El Danés” Gómez Palacio, Dgo.

Analista de metales pesados en muestras de agua y suelo en Servicios de Ingeniería y consultoría ambiental (SICA), Monterrey, Nuevo León.