

## Aplicación de materiales híbridos en pera (*Pyrus communis L.*) contaminada con fuego bacteriano

Morales Irigoyen Erika Elizabeth<sup>1</sup>, Franco Hernández Marina Olivia<sup>1</sup>, Santana Cruz Alejandra<sup>2</sup>, Flores Moreno Jorge Luis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI),  
Av. Acueducto s/n, Col. Barrio La Laguna Ticomán, GAM, México, D.F. CP 07340.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Departamento de Ciencias Básicas.  
Avenida San Pablo No. 180. Colonia Reynosa Tamaulipas, México D.F. CP 02200.

sca@correo.azc.uam.mx

Fecha de aceptación: 31 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2013

### RESUMEN

Una de las causas de las pérdidas post-cosecha se debe a enfermedades que producen los microorganismos. El fuego bacteriano, es una enfermedad causada por la bacteria fitopatógena *Erwinia amylovora* que ataca principalmente a manzanas y peras. Para el control de esta enfermedad se utilizan dosis excesivas de antibióticos comerciales como la estreptomycin; sin embargo, ya se han aislado cepas resistentes. Con el fin de encontrar un control eficaz, se propone la síntesis de materiales híbridos (MI) asociando un hidróxido doble laminar (HDL) y un antibiótico como molécula biológicamente activa (MBA). El objetivo de este trabajo consistió, por un lado en la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los materiales híbridos contra la bacteria fitopatógena *Erwinia amylovora* y por otro estudiar el efecto de la aplicación de estos mismos materiales en peras (*Pyrus communis L.*) infectadas con la enfermedad de fuego bacteriano.

**Palabras clave:** fuego bacteriano, fitopatógeno, *Erwinia amylovora*, hidróxidos dobles laminares, materiales híbridos, pera (*Pyrus communis L.*)

### ABSTRACT

One cause of post-harvest losses is due to microorganisms. Fire blight is a disease caused by the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* attacks mainly apples and pears. To control this disease excessive doses of commercial antibiotics such as streptomycin are used; however, already they have been isolated resistant strains. In order to find effective control, the synthesis of hybrid materials (MI) it proposes associating a layered double hydroxide (HDL) and an antibiotic as a biologically active molecule (MBA). The objective of this study was, firstly *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of the hybrid materials against phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* and secondly study the effect of the application on pears (*Pyrus communis L.*) infected with fire blight.

**Key words:** fire blight, phytopathogenic, *Erwinia amylovora*, layered double hydroxide, hybrid materials, pears (*Pyrus communis L.*)

## INTRODUCCIÓN

Una cantidad importante de los alimentos producidos en los países en desarrollo se pierden después de la cosecha. Las causas de estas pérdidas, que algunas estimaciones sitúan entre el 15 y hasta el 50% (Wilson y Lawrence, 1985), son diversas; figuran entre ellas, la recolección inadecuada, los daños físicos y la contaminación por microorganismos. Esta última causa, es un factor importante, debido a la rápida proliferación de las bacterias. Esta contaminación se genera comúnmente por contacto con agua infectada o con bacterias del suelo (FAO, 1987), provocando enfermedades como el fuego bacteriano, causada por *Erwinia amylovora*, y que es considerada como la más devastadora de frutales de pepita en algunos países de Europa y Norteamérica y de manzanos y perales en México. Se manifiesta desde antes de la cosecha atacando la mayoría de las partes de las plantas (flores, brotes, hojas, ramas y tronco). Sin embargo, ataca con mayor atención a los frutos. La bacteria penetra a través de las heridas previas produciendo exudados bacterianos en los órganos afectados (Palacio *et al.*, 2008).

Durante muchos años, con la finalidad de controlar los patógenos causantes de enfermedades de las plantas, se han utilizado productos o agentes químicos que entre otros ocasionan efectos negativos como son: desarrollo de resistencia en los patógenos y daños a la salud y al medio ambiente (Baños, 2006). Por lo que, hay un creciente interés en la investigación de otras alternativas menos nocivas, como es el caso de la aplicación de extractos vegetales (Hernández *et al.*, 2007) y el uso de microorganismos antagonistas (Baños, 2006).

En particular, como control químico para atacar el fuego bacteriano se utilizan antibióticos comerciales en dosis excesivas. Este uso inapropiado de compuestos químicos ha generado la aparición de cepas de *Erwinia amylovora* cada vez más resistentes.

Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar técnicas novedosas que ofrezcan ayudar a reducir y/o combatir las enfermedades producidas por bacterias fitopatógenas. Con este fin, se propone, la síntesis de materiales híbridos capaces de liberar moléculas biológicamente activas.

Los materiales híbridos consisten en la asociación de hidróxidos dobles laminares (HDL), que son estructuras formadas por láminas de hidróxidos metálicos cargadas positivamente estabilizadas con aniones en la región interlamina. La presencia de grupos hidroxilo en las superficies de sus láminas y los aniones intercambiables los hace compuestos ideales para preparar productos de funcionalización o hibridación con moléculas biológicamente activas, obteniendo así nuevos materiales utilizados como materiales biológicamente compatibles, catalizadores, materiales para remediación ambiental, vectores de genes y vehículos farmacéuticos para diferentes principios activos como antibióticos, antiinflamatorios y anticancerígenos (Andrade *et al.*, 2013).

Por esto, los materiales híbridos han atraído especial atención debido a sus propiedades químicas y físicas como vehículos para la liberación de principios activos que ayudan a transportarlos al sitio de interés controlando la dosificación.

Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo por un lado evaluar *in vitro* la actividad biocida del material híbrido y por otro estudiar el efecto de la aplicación de estos mismos materiales en peras infectadas con fuego bacteriano.

## METODOLOGÍA

### Material Biológico

Se utilizaron peras (*Pyrus communis L.*) que fueron adquiridas en el mercado de abasto local, sin pre-tratamiento biocida. Se seleccionaron 15 frutos de aproximadamente 30 g cada uno sin lesiones o infección aparente y se separaron 5 muestras por tratamiento (control positivo, control negativo y

muestra problema). Se utilizó una cepa bacteriana de *Erwinia amylovora* proporcionada por la Unidad Profesional de Biotecnología (UPIBI).

### Material híbrido

El hidróxido doble laminar ( $ZnAl-NO_3$ ) se sintetizó vía coprecipitación de la urea (Inayat *et al.*, 2011). Los cationes  $Zn^{2+}$  y  $Al^{3+}$  precipitan en forma de HDL mediante la hidrólisis de la urea a  $90^\circ C$ , durante 10 horas y a partir de una solución de nitratos. Se adicionó  $NH_4NO_3$  que proporcionó iones  $NO_3^-$  en la solución con la finalidad de evitar la intercalación de los iones  $CO_3^{2-}$ , provenientes de la hidrólisis de la urea. El material híbrido preparado consistió en la asociación de un hidróxido doble laminar (HDL) como matrices inorgánicas y aniones provenientes de ácido nalidíxico como molécula biológicamente activa (MBA). Se utilizó un hidróxido doble laminar ZnAl y aniones orgánicos de ácido nalidíxico.

### Análisis *in vitro* de materiales híbridos contra *Erwinia amylovora*

La prueba *in vitro* del efecto de los materiales híbridos contra *Erwinia amylovora*, se realizó mediante la técnica de sensibilidad bacteriana (Bailey *et al.*, 1991; Konemam *et al.*, 2004). Se utilizaron sensidiscos de 6 mm que fueron impregnados con una concentración de  $0.025 \text{ mg}/\mu\text{L}$  de suspensión de material híbrido en agua destilada.

Para realizar los tapetes bacterianos se utilizó una suspensión bacteriana de *Erwinia amylovora* ( $1.5 \times 10^8$  UFC, según escala nefelométrica). La suspensión se aplicó con hisopo estéril sobre agar Müller Hinton contenido en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Los sensidiscos previamente impregnados se colocaron sobre estos tapetes y se incubaron a  $28 \pm 2^\circ C$ , durante 24 h. Se midieron los halos de inhibición y se reportaron en mm.

### Efecto de la exposición de materiales híbridos en peras infectadas con fuego bacteriano

Para determinar el efecto de la adición del material híbrido sobre la pera contaminada se propuso el siguiente procedimiento:

- **Selección de muestras**

- Se seleccionaron 15 peras de aproximadamente 30 g cada una, de apariencia similar sin lesiones ni infección aparente.
- Las peras se desinfectaron por inmersión en solución de agua destilada, al 2% de cloro y 2% de Antibenzil<sup>®</sup>, durante 3 h.

- **Control negativo**

- Se tomaron 5 frutos, se atomizaron con 1 mL de agua y se colocaron en un recipiente de vidrio de 5 compartimientos, el recipiente se desinfectó previamente.

- **Control positivo**

5 frutos se atomizaron con 1 mL de agua y se infectaron con  $10 \mu\text{L}$  de solución bacteriana de *Erwinia amylovora* ( $1.5 \times 10^8$  UFC, escala nefelométrica).

- **Muestra problema**

- 5 frutos se atomizaron con 1 mL de material híbrido disperso en agua. Los frutos se infectaron con  $10 \mu\text{L}$  de suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC, escala nefelométrica) y se colocaron en un recipiente de vidrio de 5 compartimientos.
- Los recipientes con las muestras se colocaron en un cuarto a temperatura ambiente, sin corrientes de aire. Se tomó evidencia fotográfica en 3 intervalos de tiempo: 1, 3 y 4 días, para observar la evolución de la enfermedad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización del material híbrido

En la Figura 1, se observa el difractograma de Rayos-X del HDL o sólido de partida y en la Figura 2 el patrón DRX del material híbrido, se observa que el HDL presenta para la distancia interlamilar  $d003$ , en la posición  $9.86$  ( $2\theta$ ) que caracteriza los aniones  $\text{NO}_3^-$  presentes en la región interlamilar. En el difractograma del material híbrido se observa una  $d003$  en la posición  $4.02$  ( $2\theta$ ) acompañado de un segundo y tercer pico de difracción en  $8.02$  y  $12.0$  ( $006$  y  $009$  respectivamente) que corresponden a los armónicos de la distancia interlamilar del plano de difracción  $003$ . No se observa el pico característico del anión  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, se presentan los picos de la difracción característica del óxido de zinc, pertinentes con el método de síntesis.

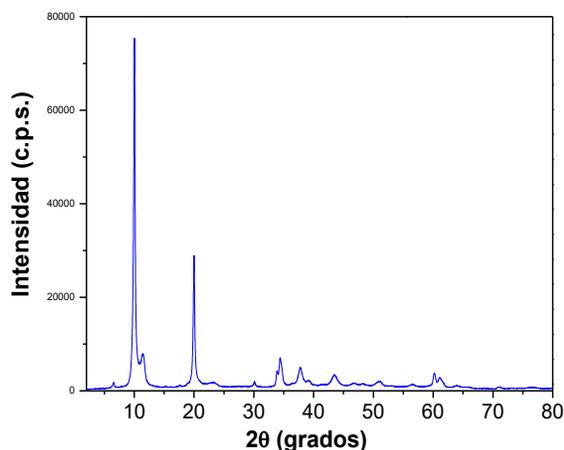


Figura 1. Patrón DRX del sólido de partida, matriz ZnAl con aniones  $\text{NO}_3^-$

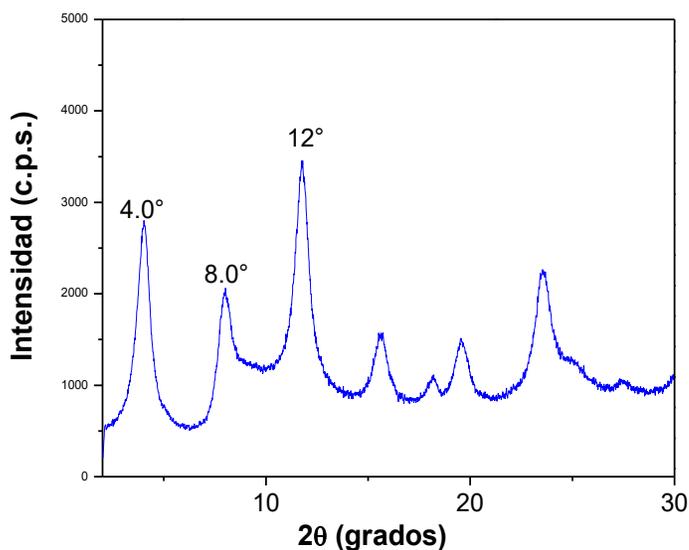


Figura 2. Patrón DRX del material híbrido.

### Análisis *in vitro* de materiales híbridos contra *Erwinia amylovora*

En la tabla 1 se presentan los resultados de la prueba *in vitro* del efecto de la exposición de los sólidos sobre la bacteria *Erwinia amylovora*, la prueba se realizó por cuadruplicado. El material de partida no presentó actividad bactericida, es decir, no formó halos de inhibición, en comparación con los halos formados por el nalidíxico en su forma sódica (MBA) y los inducidos por el material híbrido con halos de 38 y  $32.5 \pm 1$  mm, respectivamente. Se observaron halos de mayor diámetro formados por el material híbrido, lo que sugiere que la asociación del HDL con la MBA le confiere funcionalización a dicha matriz inorgánica.

Otra ventaja está representada por la cantidad de MBA, ya que se necesita menor concentración de antibiótico para la síntesis del material híbrido comparado con la necesaria en caso de utilizar el antibiótico de manera directa, como lo reportado por Villalobos *et al* (2005) quienes utilizaron soluciones de oxitetraciclina y estreptomocina al 0.5%, como bactericidas de *Erwinia sp.*, causante de la pudrición de bulbos de ajo almacenado, obteniendo halos de 40 y 29 mm respectivamente.

**Tabla 1.** Halos de inhibición (mm) de MI contra *E. amylovora*.

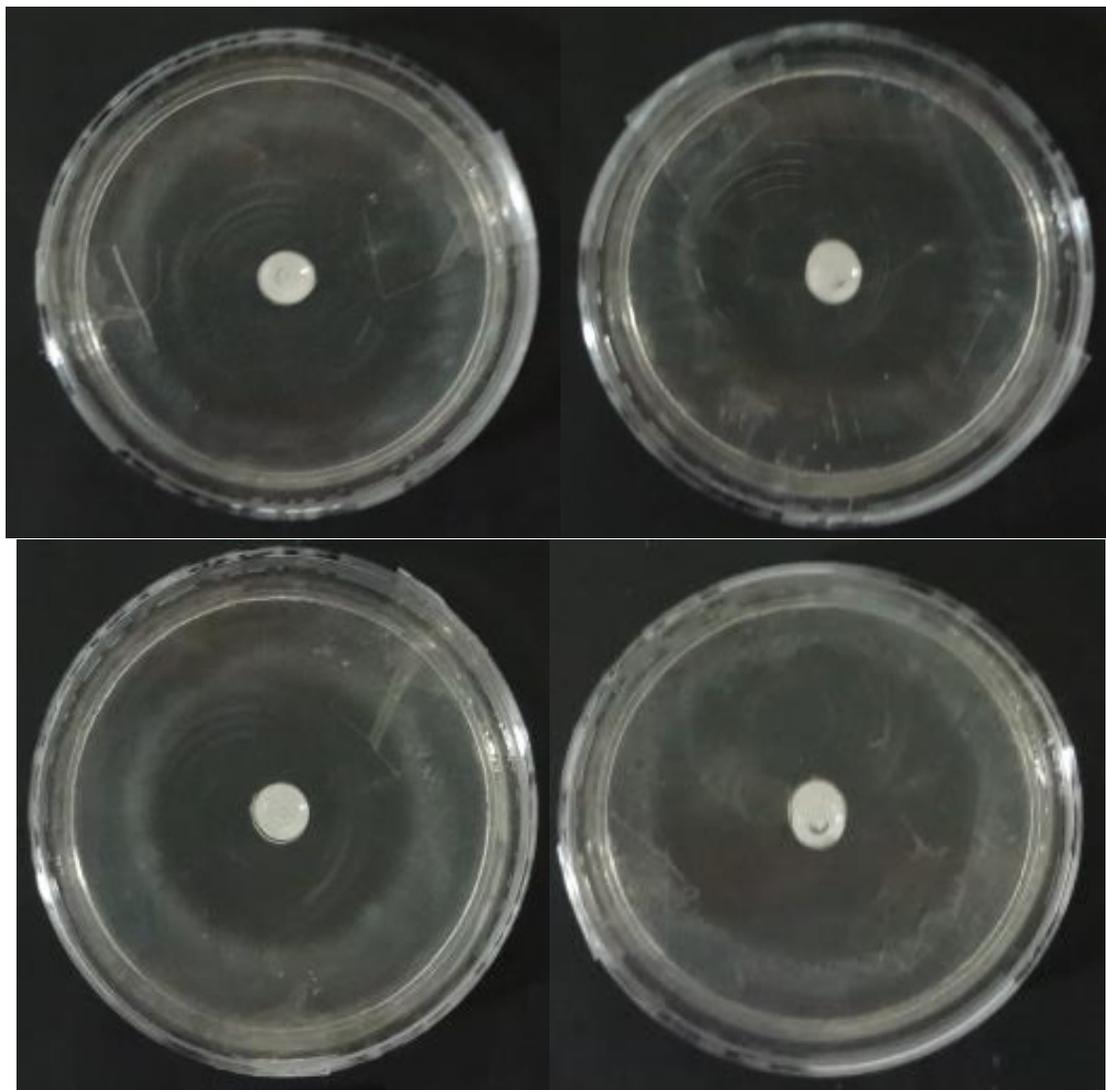
SÓLIDO	Halos de inhibición (mm)
HDL (MATRIZ)	-----
NAD <sup>+</sup>	38
MATERIAL HÍBRIDO	32.5±1

\*Media  $\pm$  desviación estándar, n=4

NAD<sup>+</sup> = Sal de nalidíxico

ZnAl-NAD= Material híbrido

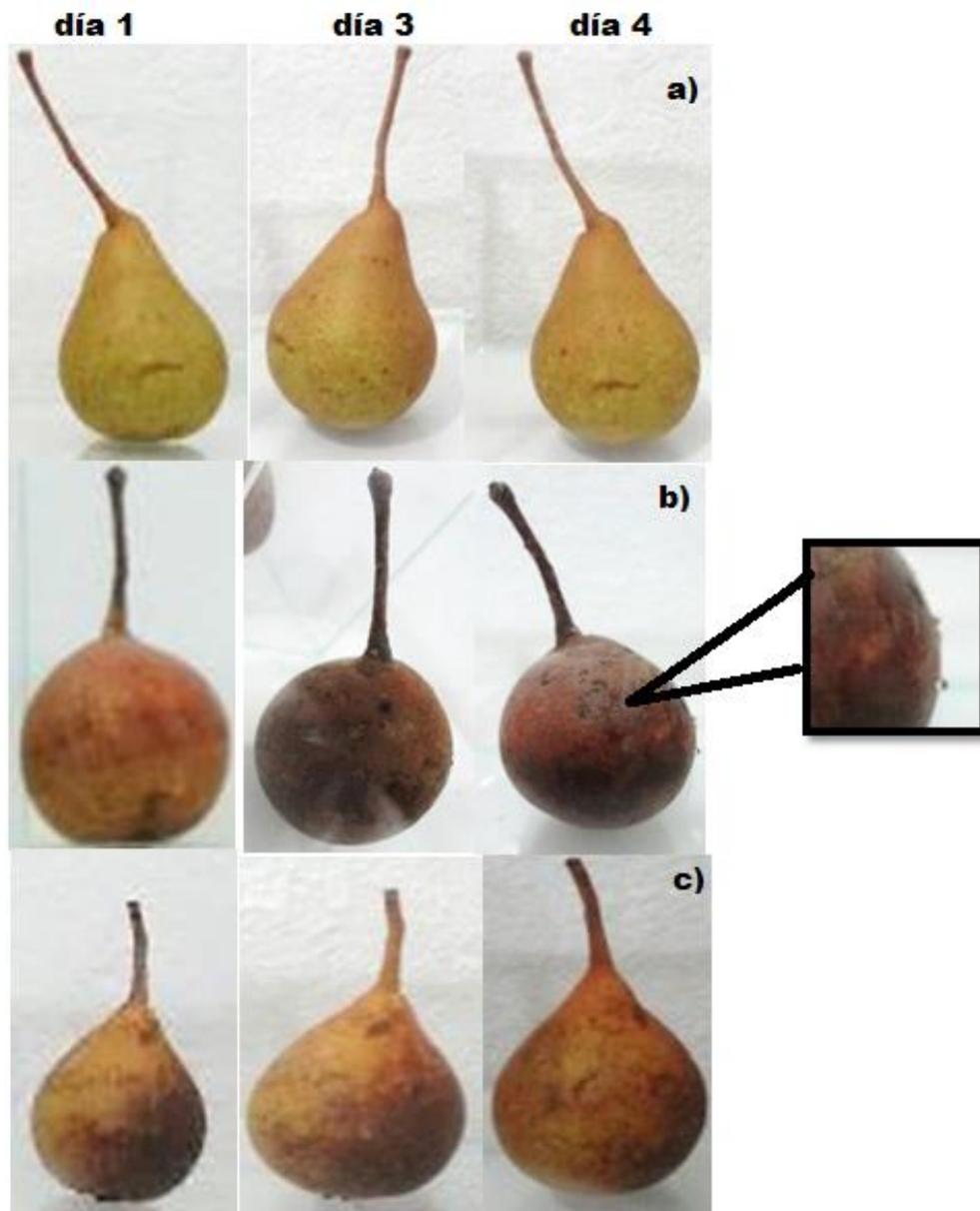
Los halos obtenidos en la prueba *in vitro* de sensibilidad bacteriana se pueden observar en la Figura 3, estos resultados sugieren la posibilidad de la aplicación de materiales híbridos a partir de una matriz inorgánica asociado a quinolonas como alternativa al uso de antibióticos comunes en frutos infectados con *E. amylovora*, por ejemplo la estreptomocina que representa el antibiótico utilizado con mayor frecuencia para atacar las enfermedades y lesiones producidas por esta bacteria, sin embargo, ya se han aislado cepas resistentes a este antibiótico, como lo demostraron reportes de Chacón *et al* (2011), quienes detectaron y aislaron una cepa resistente a la estreptomocina, realizando el primer reporte mediante técnicas moleculares de la resistencia de *E. amylovora* a la estreptomocina esto en la zona manzanera de Chihuahua, México.



*Figura 3. Prueba in vitro de sensibilidad bacteriana a la exposición de material híbrido, n=4.*

### **Efecto de la exposición de materiales híbridos en peras infectadas con fuego bacteriano**

En lo que respecta al efecto de la aplicación de materiales híbridos en peras enfermas con fuego bacteriano, en la Figura 4, se puede observar la evolución de dicha enfermedad a 1, 3 y 4 días de seguimiento, en a) se observan los frutos sanos que no fueron infectados con la bacteria en contraste con el resto de los frutos. En el inciso b se observan los frutos con la enfermedad más avanzada, se observaron también daños en la textura, apariencia y consistencia del fruto acompañado de aromas indeseables, también se observan exudaciones acuosas características de esta enfermedad, cabe señalar que estos no fueron tratados con material híbrido a diferencia de los del inciso c) que si bien muestran síntomas de la enfermedad, esta avanzó a menor velocidad, los frutos mostraron más consistencia y mejor apariencia, sin exudados bacterianos.



**Figura 4.** Día 1, 3 y 4 de observación de peras seleccionas como a) control negativo, b) control positivo y c) peras enfermas y tratadas con material híbrido (muestra problema).

## CONCLUSIONES

Se sintetizó material híbrido, asociando la matriz ZnAl con aniones de ácido nalidíxico como molécula biológicamente activa.

En la prueba *in vitro* de sensibilidad antibacteriana, la matriz o sólido de partida no mostró efecto biocida contra *Erwinia amylovora*.

En la prueba *in vitro* los materiales híbridos presentaron actividad biocida contra *Erwinia amylovora*.

La aplicación de material híbrido en peras infectadas con fuego bacteriano, retrasó la aparición de los síntomas de la enfermedad como son daños en la textura, pudrición, olores desagradables y exudados bacterianos, esto comparado con peras sin tratamiento.

El material híbrido puede utilizarse como agente bactericida, para contrarrestar las pérdidas post-cosecha de frutos de pera (*Pyrus communis* L.).

El material híbrido puede utilizarse en peras, como agente bactericida alternativo al uso de los antibióticos utilizados frecuentemente de manera indiscriminada y que por ende han provocado resistencia en la bacteria *Erwinia amylovora*, como es el caso particular de la estreptomina.

## REFERENCIAS

Andrade-Guel M., Díaz L., Cortés D. (2013). Materiales nanoestructurados como vehículo para la liberación de principios activos. *Avances en Química*, 8: 171-177.

Bailey S., Finegold S., Baron E. (1991). Diagnóstico microbiológico. 1ª Ed. Médica Panamericana, p. 190-209.

Baños-Bautista, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología postcosecha*. 8: 1-6.

Chacón A. R., Reyes I. B., Prieto M. G., Martínez R., Gómez s.R., Legarreta R. (2011). Manejo de *Erwinia amylovora* con Aceite Esencial de Orégano (*Lippia berlandieri*) y Estudio de Resistencia a Estreptomina en Árboles de Manzano cv. 'Golden Delicious'. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29: 119-132.

FAO (1987). Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. Parte I. Serie: Tecnología Post-cosecha 6. Recuperado el 14 de Agosto del 2014 de <http://www.fao.org/3/a-x5055s/index.html>

Hernández M., Guilló N., Valdés F., Reyes-Labarta J. (2009). Utilización de hidrotalcitas en la producción de biodiesel. III Jornadas sobre la enseñanza de la química. Química para un mundo sostenible. Asociación de Químicos de la comunidad Valenciana. Valencia, España, O29-1. Depósito legal: U-3482-2009.

Inayat A., Klump M., Schwieger W. (2011). *Applied Clay Science*. 51: 452-459.

Komeman E., Winn W., Allen S., Janda W., Procop G., Screckenberger P. (2004). Diagnóstico microbiológico. 1ª Ed. Médica Panamericana, p. 565-620.

Palacio A., Cambra M., López M., Ordax M., Peñalver J., Gorris M., Cambra M., Marco-Noales E., Llop P., Biosca E., Roselló M., Montesinos E., Llorente I., Badosa E., Cabrefiga J., Bonaterra A., Ruz L., Moragrega C., Francés J., y Díaz C. (2008). El fuego bacteriano: la enfermedad. En: El fuego Bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Palacio A. y Cambra M. (editores). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, p. 13-48.

Villalobos C., Jaime O., Torres J. (2005). "Control químico de *Erwinia sp.* Causante de Pudrición en bulbo de ajo almacenado".

Wilson L., Lawrence P. (1985). Potential for Biological Control of Postharvest Plant Diseases. *Plant Disease*. 69: 375-378.