

Efectividad *in vitro* de nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno combinadas con extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hongos fitopatógenos

Ernesto Cerna-Chávez¹
Antonio Orozco-Plancarte¹
Yisa María Ochoa-Fuentes^{1§}
Jerónimo Landeros-Flores¹
Diana Jasso de Rodríguez¹
Anselmo Hernández-Pérez²

1 Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro núm. 1923, col. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 844 6735367. (jabaly1@yahoo.com;antonioorozco25@outlook.es; jlanflo@correo.edu.mx; dianajassocantu@yahoo.com.mx).

2 Campo Experimental Uruapan-INIFAP. Av. Latinoamericana 1101, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60150. Tel. 443 1032688. (hernandez.anselmo@inifap.gob.mx).

§Autora para correspondencia: yisa8a@yahoo.com

Resumen

El uso de las nanopartículas en la agricultura abre la oportunidad al desarrollo de agroproductos con esta tecnología, orientados al control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de nanopartículas de dióxido de silicio (NPs SiO₂) y grafeno (NPs-Graf) mezcladas con extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* (EcBa) sobre el desarrollo micelial y formación de estructuras reproductivas de *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum* y *Alternaria alternata*. Para la prueba de efectividad biológica, se utilizó la técnica de medio envenenado y bajo un diseño completamente al azar de dos dosis (D_E 70 y D_E 90) y un testigo absoluto con 20 repeticiones por cada tratamiento. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y prueba de medias Tukey (*p*# 0.05). Se calcularon las dosis efectivas mediante análisis Probit. El tratamiento que presentó mejor efecto inhibitorio fue NPs SiO₂ + EcBa, ya que logró inhibir el crecimiento de micelio y disminuyó la producción de estructuras reproductivas (esporas y esclerocios) de 84% hasta 100% con dosis bajas en *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum* y *Alternaria alternata*, seguido de NPs Graf + EcBa, EcBa a mayor dosis obtuvieron de 83.7 a 100% de inhibición, respectivamente.

Palabras clave:

agronanotecnología, bacterias benéficas, nanofungicidas.



Introducción

El uso de la nanotecnología (NT) reviste gran importancia en la agricultura por sus múltiples aplicaciones, ampliando las posibilidades de desarrollo de agro productos como nanofertilizantes, nanoherbicidas y nanopesticidas, que mejoren el rendimiento en los cultivos y protejan el medio ambiente (Lira-Saldivar *et al.*, 2018). El silicio poroso nanoestructurado tiene importantes propiedades, ya que se pueden modificar sus características ópticas, químicas y eléctricas para el desarrollo de sensores químicos y biológicos (Ríos *et al.*, 2020).

La eficiencia del silicio poroso se ha probado para el desarrollo de medicamentos, ya que, estas moléculas pueden introducirse en las nanopartículas (NPs) de silicio funcionando como acarreadores de fármacos (Santos *et al.*, 2014). Las nanopartículas de silicio, tienen el potencial de revolucionar la tecnología existente utilizada en la agricultura y la biotecnología vegetal, estas pueden proporcionar alternativas ecológicas y tener soluciones concretas para problemas, como los relacionados con malezas, patógenos, sequía y productividad (Rastogi *et al.*, 2019).

Por otra parte, el óxido de grafeno es un material derivado del carbón, el cual se presenta como una lámina de grafeno la cual pudiese ser funcional con diferentes grupos oxigenados, como el hidroxilo, epoxi y carbonilo los cuales están presentes en las estructuras del grafeno ocasionando que este sea muy hidrofílico (Lira-Saldivar *et al.*, 2018). Al ser una lámina bidimensional, delgada y en forma de estructura de panal, le brinda notables propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y de barrera. Siendo los nanocompuestos basados en grafeno un área de investigación candente en la última década. Por estas razones, ha sido el objetivo de innumerables esfuerzos de investigación, el incorporar grafeno en polímeros para diseñar nanocompuestos (Smith *et al.*, 2019).

Estudios han revelado el papel del grafeno en la actividad antimicrobiana, sentando las bases para su uso en el control de patógenos al presentar diferentes actividades antimicrobianas, incluidas antibacterianas, antifúngicas y propiedades antivirales (Almardani *et al.*, 2019). De los reportes publicados con el tema de las NPs, destacan los siguientes: el uso de nanoformulaciones de plaguicidas para el control de *Phenacoccus solenopsis* (Elabasy *et al.*, 2020).

NPs de cobre sobre el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Verticillium dahliae*, *Neofusicoccum* sp. y *Fusarium oxysporum*) (Pariona *et al.*, 2018). El grafeno en nanoformulaciones con fungicidas, presentó una capacidad inhibidora contra *Fusarium graminearum*, sobre el crecimiento, la biomasa micelial y la germinación de esporas (Wang *et al.*, 2021).

Por otro lado, los hongos fitopatógenos son un factor limitante en la producción de cultivos, ya que reducen significativamente el rendimiento causando daños a plantas y frutos, entre estos se encuentran *Fusarium oxysporum* comprende más de 120 cepas conocidas o formas especiales. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* causa marchitez en el tomate. La marchitez por *Fusarium* es una enfermedad destructiva del tomate en varios países del mundo y es de gran preocupación para los productores debido a su gran pérdida de producción (Malandrakis *et al.*, 2018). Mientras que *Rhizoctonia solani* es un hongo más virulento y ampliamente distribuido en el suelo, que causa graves pérdidas de rendimiento de papas en todo el mundo ocasiona daños; por ejemplo, en tallos y raíces (Kiptoo *et al.*, 2021).

Asimismo, entre los hongos que originan daños en la etapa de postcosecha, se encuentran *Colletotrichum acutatum* afectando, entre otros a los frutos de aguacate (Barroso *et al.*, 2021). *Alternaria alternata* el cual afecta severamente frutos de tomate particularmente, disminuyendo la calidad de este producto agrícola con pérdidas económicas considerables (Coromoto y Reyes, 2018). Con relación al control de estos patógenos comúnmente, se lleva a cabo mediante el uso de fungicidas químicos, los cuales ocasionan daños a la salud, contaminan el medio ambiente y generan resistencia en los microorganismos, como en el caso de los benzimidazoles, donde se han reportado numerosos casos de generación de resistencia en diversas formas especiales de *F. oxysporum* (Arie, 2019).

Debido a esto es necesario desarrollar estrategias ecológicamente amigables para el control de los hongos fitopatógenos. Se ha reportado el uso de bacterias antagonicas como: *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Las bacterias del grupo *Bacillus* son bien conocidos como productores de una amplia gama de compuestos antagonistas, como son los péptidos y lipopéptidos, compuestos policétidos, bacteriocinas y sideróforos (Fira *et al.*, 2018). Habe *et al.* (2017) indicaron que *B. subtilis* produjo lipopéptidos circulares como la surfactina e iturina, son considerados como compuestos antifúngicos que afectan a las células diana a nivel de membrana.

Existen escasos reportes científicos sobre la actividad fungicida del uso de NPs de silicio y grafeno, en combinación con *B. amyloliquefaciens*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de estos compuestos y el extracto bacteriano sobre el desarrollo micelial y formación de estructuras reproductivas de los hongos *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum* y *A. alternata in vitro*. Buscando una alternativa de manejo de enfermedades fúngicas con insumos de menor impacto ambiental, pero con alta efectividad.

Materiales y mtodos

Material biológico

Los hongos fitopatógenos *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, fueron aislados, purificados e identificados en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), los cuales se cultivaron en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA) (BD Bioxon[®]) para su posterior uso.

Preparación de extractos de *B. amyloliquefaciens* enriquecidos con NPs de dióxido de silicio (SiO₂) y grafeno (Graf)

Se utilizó la cepa de *B. amyloliquefaciens* (EcBa) previamente identificada en el laboratorio de Toxicología de la UAAAN, dicha cepa se la cual se cultivó en tubos inclinados con agar nutritivo (TM Media[®]) para su crecimiento. Posteriormente se prepararon 500 ml de medio de cultivo líquido para la producción de iturinas por fermentación mediante el procedimiento descrito por Mckeen *et al.* (1986). Se ajustó el pH a 6 y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 1 ml de suspensión bacteriana 1x10⁶ UFC, dejando en incubación a 30 °C y en agitación constante en una incubadora con agitación (150 rpm) por tres días. Transcurrido este tiempo se realizó el extracto, eliminando las bacterias por centrifugación a 5 000 rpm por 20 min y el uso de filtros de 0.22 µm de diámetro de poro (Linktor[®] Syringe filters). Una vez obtenido el extracto de EcBa se procedió a realizar los productos formulados con NPs de dióxido de silicio (NPs SiO₂) y grafeno (NPs Graf) proporcionadas por la empresa Culta, SA de CV (Ciudad Mante, Tamaulipas).

Para ello se mezclaron 2 g de NPs por cada 100 ml de extracto bacteriano, la solución se sonificó sumergiendo la sonda de ultrasonido (Branson[®] Sonifier 450 EUA) a 35% de potencia constante durante 10 min a una temperatura de 60 °C para su mejor dispersión, se conservó a 4 °C protegida de la luz.

Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs SiO₂ y Graf sobre el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos

Se utilizó el hongo *F. solani* para determinar la ventana biológica correspondiente al bioensayo uno de inhibición micelial, donde se evaluaron cinco tratamientos: extracto solo de *B. amyloliquefaciens* (EcBa), NPs SiO₂ y mezcladas en agua destilada estéril (NPs SiO₂ + H₂O), NPs SiO₂ f y mezcladas con extracto de *B. amyloliquefaciens* (NPs SiO₂ + EcBa) y NPs Graf y mezcladas en agua destilada estéril (NPs Graf + H₂O), NPs Graf y mezcladas con extracto de *B. amyloliquefaciens* (NPs Graf + EcBa) con nueve dosis (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 8, 16, 32 y 40 ml L⁻¹ y el testigo) por tratamiento, con 10 repeticiones.

Se usó la técnica del medio envenenado (Ochoa *et al.*, 2012), que consistió en colocar explantes de 0.5 cm de diámetro al centro de la caja Petri de 9 cm de diámetro, con cada fitopatógeno de interés y se incubaron a 25 ± 2 °C en oscuridad hasta que el crecimiento de micelio del testigo (solo PDA) alcanzó las medidas de la placa. El crecimiento micelial se midió cada 24 h con un vernier, los datos de crecimiento se usaron para calcular los porcentajes de inhibición mediante la siguiente fórmula: $(PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100)$. Donde: PICR= porcentaje de inhibición del crecimiento radial; R1= crecimiento micelial del testigo y R2= crecimiento micelial del tratamiento.

Con los datos obtenidos del PICR se calcularon las dosis (D_E 30, D_E 50, D_E 70 y D_E 90) mediante análisis Probit. Se realizó una prueba de efectividad biológica (bioensayo dos) usando las dosis recomendadas para (D_E 70 y D_E 90) de los tratamientos EcBa, NPs SiO₂ + EcBa, NPs Graf + EcBa y Testigo con 20 repeticiones (caja Petri) sobre los fitopatógenos *F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*.

Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de SiO₂ Y Graf sobre la producción de estructuras reproductivas de hongos fitopatógenos

Se realizó un tercer bioensayo, donde se evaluaron las dosis efectivas (D_E 30 y D_E 50 y D_E 70) de EcBa, NPs SiO₂ + EcBa, NPs Graf + EcBa y testigo con tres repeticiones para cada uno de los hongos fitopatógenos, usando la técnica medio envenenado (Ochoa *et al.*, 2012). Para esto a los 10 días posteriores a la siembra del hongo en la caja Petri, se adicionaron 5 ml de agua destilada estéril a la caja Petri. Se tomó una alícuota de 1 ml y se contaron las esporas por triplicado en una cámara de Neubauer en un microscopio óptico a 40X (Nikon® Japan 449193).

En los hongos *F. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, las esporas se transfirieron a tubos de ensayo y se homogenizaron en un vortex, Se tomaron 20 µl de la suspensión y contaron como anteriormente se ha descrito (Barroso *et al.*, 2021). Para el caso de *R. solani*, se realizó un conteo de esclerocios. En este caso la caja Petri se dividió en cuatro cuadrantes y se contabilizaron los esclerocios en un microscopio estereoscopio (Olympus® SZ2-LGB).

Diseño experimental

En la inhibición micelial (bioensayo uno), se utilizó un diseño completamente al azar en cada tratamiento con seis dosis: EcBa (2.5, 5, 8, 16, 32 y 40 ml L⁻¹) y en NPs SiO₂ + EcBa, NPs Graf+ EcBa, NPs SiO₂ + H₂O y NPs Graf + H₂O (1, 2.5, 5, 8, 16, 32 ml L⁻¹) más un testigo (0 ml L⁻¹) PDA sin tratamiento como control absoluto, cada dosis tuvo 10 repeticiones, dando un total de 70 unidades experimentales por cada tratamiento evaluado sobre *F. solani*, respectivamente.

En las pruebas de efectividad biológica (bioensayo dos), se usó un diseño completamente al azar para cada hongo fitopatógeno (*F. solani*, *R. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*), evaluando las dosis efectivas D_E 70 y D_E 90, más un testigo (0) con 20 réplicas, dando un total de 60 unidades experimentales por cada tratamiento evaluado (EcBa, NPs SiO₂ + EcBa, NPs Graf + EcBa).

En cuanto a la producción de estructuras reproductivas (bioensayo tres), se realizó en un diseño completamente al azar de tres dosis efectivas: 1= D_E 30, 2= D_E 50, 3= D_E 70 y un testigo (0) con tres observaciones, dando un total de 12 unidades experimentales por cada tratamiento y hongo fitopatógeno evaluado.

Análisis de datos

En las variables evaluadas se utilizó un diseño completamente al azar en cada tratamiento. Se utilizó un análisis de varianza y comparación de medias de la diferencia mínima significativa por Tukey ($p \leq 0.05$) usando el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0. En la

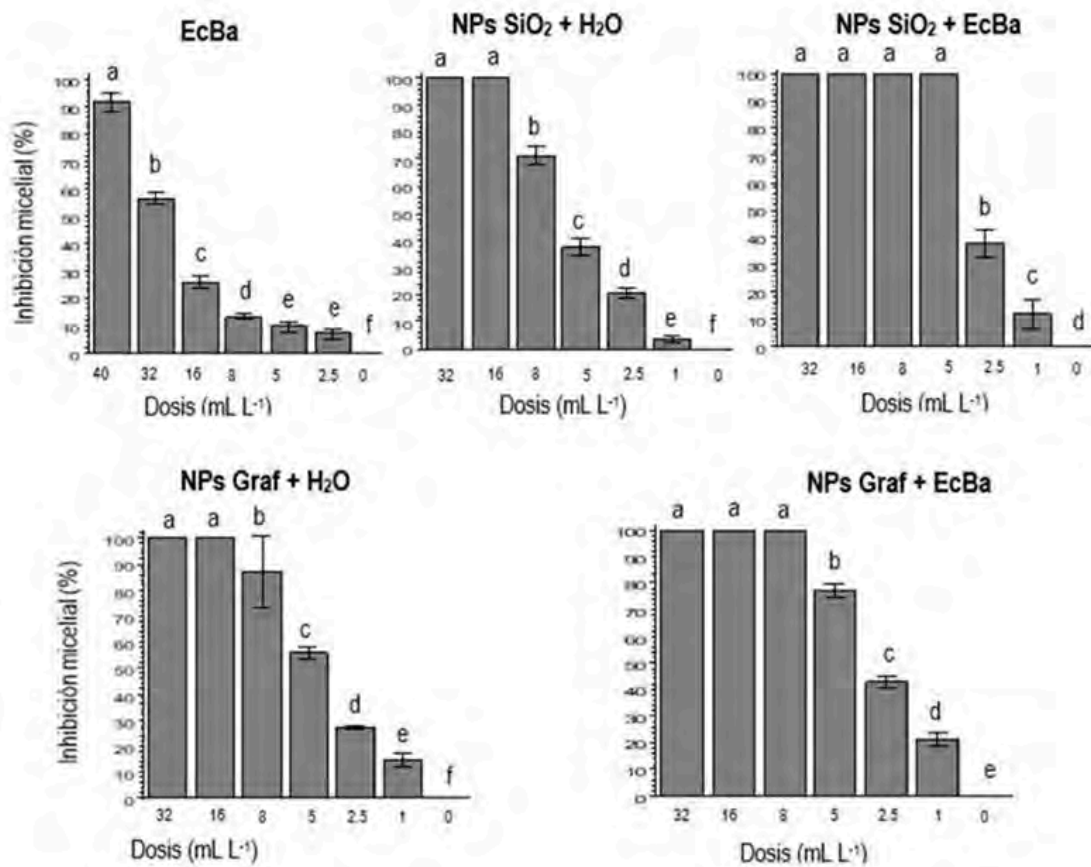
determinación de las dosis efectivas, se usaron los datos de PICR obtenidos por medio de la fórmula y se calcularon las dosis por análisis Probit con el mismo programa estadístico.

Resultados y discusión

Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de SiO₂ y Graf sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Los resultados del bioensayo 1 (ventana biológica) con el hongo *F. solani*, Los tratamientos con NPs mostraron efecto inhibitorio a partir de 1 a 40 ml L⁻¹ (Figura 1). El tratamiento NPs SiO₂ + EcBa mostró 100% de inhibición micelial en las concentraciones de 5 a 32 ml L⁻¹, seguido del tratamiento NPs Graf + EcBa con inhibiciones de 100 a las concentraciones de 8 a 32 ml L⁻¹, mientras que los tratamientos NPs SiO₂ + H₂O y NPs Graf + H₂O mostraron efecto inhibitorio de 100% en las concentraciones 16 y 32 ml L⁻¹.

Figura 1. Efecto inhibitorio micelial de diferentes concentraciones de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de oxido de silicio y grafeno sobre *F. solani*. EcBa= extracto de *B. amyloliquefaciens*; NPs SiO₂ + EcBa= NPs de dióxido de silicio y mezcladas con EcBa; NPs SiO₂ + H₂O= NPs de dióxido de silicio y suspendidas en agua destilada estéril; NPs Graf + EcBa= NPs de grafeno y mezcladas con EcBa y NPs Graf + H₂O= NPs de grafeno y suspendidas en agua destilada estéril.



Con respecto al extracto bacteriano EcBa, se obtuvo 91.71% usando la concentración más alta (40 ml L⁻¹). La combinación de las NPs con el extracto de *B. amyloliquefaciens* se produjo un efecto sinérgico, el cual potencializa el efecto fungicida desde las concentraciones más bajas. Al respecto

podemos mencionar que las moléculas bioactivas de *B. amyloliquefaciens* son los lipopéptidos circulares de las familias de surfactina, iturina y fengicina, afectan a las células a nivel de membrana provocando una degradación física, causando la actividad inhibidora del crecimiento, además de inducir resistencia sistémica en las plantas y competir por nichos ecológicos con los patógenos vegetales (Ngalimat *et al.*, 2021).

En el caso de las nanopartículas de óxido de silicio, interrumpen funciones celulares como la diferenciación, aumento de la permeabilidad de la pared, desactivación de moléculas de proteínas y afectar el ciclo energético transmembrana (Derbalah *et al.*, 2018). Con relación a las nanopartículas de grafeno, estas inducen la alteración de la membrana celular, daña el ADN, influyó en las vías metabólicas energéticas para inactivar los microorganismos y También tiene actividad fotoquímica al causar estrés oxidativo (Fernando *et al.*, 2018).

Estos resultados concuerdan con Duan *et al.* (2021) donde reportan un efecto inhibidor (86.7, 84.2, 72.8 y 74%) sobre *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum* respectivamente. Por su parte Peng *et al.* (2022) reportaron que 50, 100 y 150 mg L⁻¹ de nanopartículas de óxido de silicio aumentaron la firmeza del rizoma de jengibre, la pérdida de agua aumentó de la actividad de enzimas antioxidantes, contenido total de fenólicos y flavonoides, además inhibió *Fusarium solani* impedir la penetración de hifas en las células.

Asimismo, El-Abeid *et al.* (2020) mencionan que nanopartículas de grafeno con cobre mencionan una mayor actividad antifúngica con solo 1 mg L⁻¹ que el fungicida convencional con 2.5 g L⁻¹. creando hoyos y poros en las membranas celulares de los hongos, lo que induce la muerte celular, para reducir la gravedad de las enfermedades del marchitamiento por *Fusarium*.

La finalidad de determinar las dosis inhibitorias (bioensayo 1), fue para conocer la cantidad del tratamiento para inhibir el desarrollo del fitopatógeno, similar a lo reportado por Ochoa *et al.* (2012) en donde se determinó la dosis efectiva media (ED₅₀). Por lo que, en este estudio se utilizaron los datos obtenidos de PICR para calcular las dosis efectivas (D_E) de los tratamientos (Cuadro 1). Se observó que el tratamiento NPs SiO₂ + EcBa mostró las concentraciones más bajas para controlar de manera *in vitro* a *F. solani* con D_E 30= 1.75 ml L⁻¹, D_E 50= 2.3 ml L⁻¹, D_E 70= 3.01 ml L⁻¹ y D_E 90= 4.46 ml L⁻¹, un efecto similar presentó el tratamiento NPs Graf + EcBa.

Cuadro 1. Determinación de dosis efectivas de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de oxido de silicio y grafeno sobre *F. solani*.

Tratamiento	Dosis efectiva	Dosis probable (ml L ⁻¹)	Limite fiducial inferior 95%	Limite fiducial superior 95%
NPs SiO ₂ + H ₂ O	D _E 30	3.58	3.36	3.79
	D _E 50	5.36	5.08	5.65
	D _E 70	8.03	7.57	8.56
	D _E 90	14.4	13.21	15.88
NPs SiO ₂ + EcBa	D _E 30	1.75	1.51	1.98
	D _E 50	2.3	2.03	2.59
	D _E 70	3.01	2.67	3.46
	D _E 90	4.46	3.84	5.44
NPs Graf + H ₂ O	D _E 30	1.46	0.93	2.05
	D _E 50	2.8	1.98	3.9
	D _E 70	5.4	3.88	8.03
	D _E 90	13.88	9.15	25.49
NPs Graf + EcBa	D _E 30	1.37	0.9	1.87
	D _E 50	2.33	1.69	3.17
	D _E 70	3.98	2.94	5.75
	D _E 90	8.59	5.92	14.98

Tratamiento	Dosis efectiva	Dosis probable (ml L ⁻¹)	Limite fiducial inferior 95%	Limite fiducial superior 95%
EcBa	D _E 30	15.51	13.16	17.58
	D _E 50	23.45	20.94	26.39
	D _E 70	35.46	31.03	42.53
	D _E 90	64.43	51.81	89.52

NPs SiO₂ + H₂O= NPs de dióxido de silicio y suspendidas en agua destilada estéril; NPs SiO₂ + EcBa= NPs de dióxido de silicio y mezcladas con EcBa, NPs Graf + H₂O= NPs de grafeno y suspendidas en agua destilada estéril; NPs Graf + EcBa= NPs de grafeno; y mezcladas con EcBa y EcBa= extracto de *B. amylolyquefaciens*,

Mientras que los tratamientos NPs SiO₂ + H₂O y NPs Graf + H₂O mostraron una D_E 90 de 14.4 y 13.88 ml L⁻¹ consideradas como dosis intermedias en comparación con la dosis más alta en EcBa, que presentó una D_E 90= 64.43 ml L⁻¹. Los resultados obtenidos difieren a los reportados por Lee *et al.* (2017) donde el extracto de *B. amylolyquefaciens*DA12 inhibió la germinación de *F. graminearum* con una tasa de inhibición del 83% a una concentración de 31.3 µg ml⁻¹ y del 100% a una concentración de 250 µg ml⁻¹. Es importante mencionar que no hay estudios científicos que aporten información sobre la determinación de dosis efectivas de extractos bacterianos con NPs de silicio y grafeno en la inhibición micelial de hongos fitopatógenos.

En las pruebas de efectividad biológica de las dosis efectivas en el Cuadro 2 se muestran las diferencias significativas. Se observó que el tratamiento EcBa inhibió en un 100% a los cuatro hongos fitopatógenos con una D_E 90 (64.43 ml L⁻¹), el cual se observa en la Figura 2 (T1.2). El efecto inhibitorio prevaleció desde las primeras 24 h hasta 168 h.

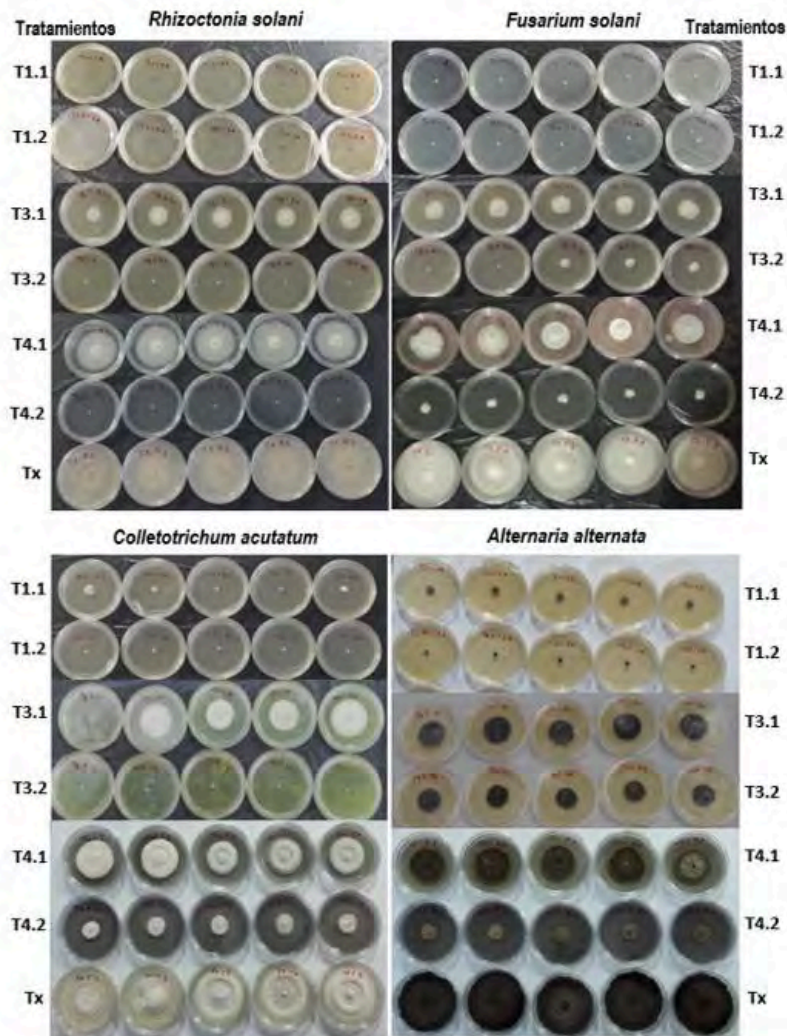
Cuadro 2. Prueba de efectividad biológica de las dosis efectivas de extractos de *B. amylolyquefaciens* con NPs de oxido de silicio y grafeno sobre el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos.

Tratamiento	Dosis efectiva	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>A. alternata</i>
Inhibición micelial (%)					
NPs SiO ₂ + EcBa	D _E 70	70.65 ^c	66.25 ^b	61.12 ^c	63.25 ^e
	D _E 90	90.71 ^b	100 ^a	95.06 ^a	72.68 ^d
NPs Graf + EcBa	D _E 70	70.46 ^c	19.65 ^c	44.71 ^d	50.4 ^f
	D _E 90	91.62 ^b	100 ^a	73.4 ^b	79.21 ^c
EcBa	D _E 70	100 ^a	100 ^a	93.87 ^a	83.75 ^b
	D _E 90	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Testigo	0	0 ^d	0 ^d	0 ^e	0 ^g

Media con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).



Figura 2. Actividad inhibitoria in vitro de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de oxido de silicio y grafeno sobre hongos fitopatógenos. T1.1 and T1.2= D_E 70 and D_E 90 of EcBa; T3.1 and T3.2= D_E 70 and D_E 90 of SiO₂ NPs + EcBa; T4.1 and T4.2= D_E 70 and D_E 90 de NPs Graf + EcBa y T= testigo.



Estos resultados difieren a los reportados por Ahumada *et al.* (2019) con extractos de *B. amyloliquefaciens*, presentó niveles de inhibición del 37.8 al 55.2% en diferentes cepas de *Fusarium*. Mientras que Maslennikova *et al.* (2023) muestran la inhibición de *R. solani* por la mezcla de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* la actividad inhibitoria del tratamiento con mezcla de bacterias sobre el hongo fue del 81%.

Autores como Es-Soufi *et al.* (2020) mencionan, que al evaluar el aislado contra siete cepas de *Colletotrichum acutatum*, mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del patógeno entre un 37 a 72%. Jia *et al.* (2023) mencionan que aislados de *A. alternata*, el porcentaje de inhibición a los siete días de incubación fue del 60.6 al 72.72%. Mientras que usando una D_E 90 (4.46 ml L⁻¹) de NPs SiO₂ + EcBa inhibió 100, 95.06, 90.71 y 72.68% a los fitopatógenos *R. solani*, *C. acutatum*, *F. solani* y *A. alternata*. Un efecto similar se observó con el tratamiento NPs Graf + EcBa que presentó 100, 91.62, 79.21 y 73.40% a *R. solani*, *F. solani*, *A. alternata* y *C. acutatum*, bajo una D_E 90 de 8.59 ml L⁻¹.

Por lo anterior, se demostró que las dosis del extracto de *B. amyloliquefaciens* con NPs de dióxido de silicio y grafeno, fueron menores en comparación con el extracto bacteriano solo, logrando un control similar y eficiente. En otras investigaciones se ha demostrado la actividad antifúngica de las NPs sobre los hongos fitopatógenos; por ejemplo, Koka *et al.* (2019) mencionaron que las NPs de MgO a 0.5 mg ml⁻¹ lograron una zona de inhibición en *A. alternata* de 16.33 mm en placa Petri aproximadamente de 18.14% y 14.33 mm y en *R. solani* 15.92%, si se comparan estas dosis con las utilizadas en la presente investigación donde se aplicaron 89.2 mg L⁻¹ ó 0.08 mg ml⁻¹ del tratamiento NPs SiO₂ + EcBa, se observó que al usar dosis muy bajas de dióxido de silicio, se obtuvieron excelentes porcentajes de inhibición micelial.

Por su parte, Pariona *et al.* (2018) indicaron que las NPs de cobre (NPs-Cu) presentaron un 87 y 90% de inhibición de crecimiento de micelio de *F. solani* con dosis de 0.75 y 1 mg ml⁻¹, respectivamente. Correa *et al.* (2018) señalaron un 100% de inhibición micelial en los hongos: *A. alternata*, *C. gloeosporoides*, *C. fragariae* y *Rhizopus stolonifer* usando NPs de quitosano y aceite esencial de tomillo (NPs-TEO-Np 3 y 5%).

Evaluación *in vitro* de extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de oxido de silicio y grafeno sobre la producción de estructuras reproductivas de hongos fitopatógenos

Los resultados de la producción de estructuras reproductivas de los hongos fitopatógenos mostraron una reducción significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 3). En general el tratamiento NPs SiO₂ + EcBa presentó los valores más bajos en la producción de conidios en *F. solani*, *R. solani* y *C. acutatum* con las tres dosis evaluadas (D_E 30, D_E 50 y D_E 70) con una inhibición de 96.89, 84.06, 92.45 y 89.28% en *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum*, *A. alternata*, respectivamente. Un efecto similar se observó con NPs Graf + EcBa con valores de inhibición de 82.17, 75.93, 86.79 y 96.54% en *F. solani*, *R. solani*, *C. acutatum*, *A. alternata*, bajo la dosis más alta (D_E 70), seguido del tratamiento EcBa, con respecto al testigo, en el cual los hongos produjeron alto número de conidias y esclerocios con 0% de inhibición.

Cuadro 3. Inhibición de estructuras reproductivas de hongos fitopatógenos con extractos de *B. amyloliquefaciens* con NPs de oxido de silicio y grafeno.

Tratamiento	D _E	<i>F. solani</i>		<i>R. solani</i>		<i>C. acutatum</i>		<i>A. alternata</i>	
		Es	In (%)	Escl	In (%)	Es	In (%)	Es	In (%)
NPs SiO ₂ + EcBa	D _E 30	1.49 ^c	78.29 ^{bc}	67.33 ^c	36.87 ^c	0.42 ^d	84.9 ^a	42.66 ^a	7.83 ^f
	D _E 50	0.64 ^c	90.69 ^{ab}	20 ^e	81.25 ^a	0.21 ^d	92.45 ^a	13.92 ^{ode}	69.93 ^{bc}
	D _E 70	0.21 ^c	96.89 ^a	17 ^e	84.06 ^a	0.32 ^d	88.68 ^a	4.96 ^f	89.28 ^a
NPs Graf + EcBa	D _E 30	4 ^b	41.86 ^d	89 ^b	16.56 ^d	2.34 ^{ab}	16.98 ^d	28.16 ^b	39.17 ^e
	D _E 50	0.9 ^c	86.82 ^{abc}	64 ^c	40 ^c	1.54 ^c	45.28 ^{bc}	18.72 ^c	59.56 ^d
	D _E 70	1.22 ^c	82.17 ^{bc}	25.66 ^{de}	75.93 ^{ab}	0.37 ^d	86.79 ^a	1.6 ^f	96.54 ^a
EcBa	D _E 30	3.3 ^b	51.93 ^d	88.33 ^b	17.18 ^d	1.76 ^{bc}	37.74 ^c	12.37 ^{de}	73.27 ^{bc}
	D _E 50	1.54 ^c	77.52 ^c	60 ^c	43.75 ^c	1.17 ^c	58.49 ^b	16.85 ^{cd}	63.59 ^{cd}
	D _E 70	1.06 ^c	84.49 ^{abc}	33.66 ^d	68.44 ^b	0.48 ^d	83.02 ^a	10.88 ^e	76.49 ^b
Testigo	0	6.88 ^a	0 ^e	106.66 ^a	0 ^e	2.82 ^a	0 ^e	46.29 ^a	0 ^g

Valores con letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$); Es= esporas x10⁶ ml⁻¹; Escl= esclerocios producidos en placa Petri y In (%)= porcentaje de inhibición de esporas.

Diversos compuestos antimicrobianos reducen la producción y germinación de esporas de los hongos fitopatógenos, lo que resulta beneficioso ya que limitan su reproducción y diseminación. En un estudio realizado por Ley *et al.* (2018) señalaron 88.15% de inhibición en la germinación de zoosporas de *Phytophthora capsici* usando *B. amyloliquefaciens*, quizá por esta razón el extracto usado disminuyó significativamente la producción de las estructuras reproductivas de los hongos.

zoosporas de *Phytophthora capsici* usando *B. amyloliquefaciens*, quizá por esta razón el extracto usado disminuyó significativamente la producción de las estructuras reproductivas de los hongos.

Por su parte Jiao *et al.* (2021) mostraron en estudios *in vitro* con hongos del tabaco, que la inhibición de germinación de esporas se debe a los lipopéptidos antimicrobianos, especialmente la bacilomicina D y la fengicina. Mientras que Yan *et al.* (2020) determinaron que el componente con actividad antifúngica era el antibiótico lipopéptido iturina, esta puede inhibir el crecimiento de micelios y la germinación de esporas del hongo *C. gloeosporioides*. Induciendo un aumento de la permeabilidad de la membrana celular y una disminución del contenido de proteínas en la célula fúngica.

Conclusiones

Los extractos de *B. amyloliquefaciens* en combinación con las NPs (NPs SiO₂ + EcBa y NPs Graf + EcBa) fueron eficaces en el control *in vitro* de los hongos fitopatógenos evaluados, ya que se observó un efecto sinérgico. En general inhibieron el crecimiento de micelio y reduciendo la producción de las estructuras reproductivas (esporas y esclerocios), en este caso dentro de un rango de 84% a 100%. Por lo que estos tratamientos podrían considerarse como alternativa en el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Pero antes se recomienda evaluarlos bajo invernadero y condiciones de campo, para confirmar su efectividad.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Antonio Orozco Plancarte (Núm. CVU: 605454) para la realización de sus estudios de posgrado y a la empresa Culta, SA de CV por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

- 1 Alimardani, V.; Abolmaali, S. S. and Borandeh, S. 2019. Antifungal and antibacterial properties of graphene-based nanomaterials: a mini-review. *Journal of Nanostructures*. 9(3):402-413. Doi: 10.22052/JNS.2019.03.002.
- 2 Arie, T. 2019. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*. 44(4):275-281. Doi: 10.1584/jpestics.J19-03.
- 3 Ahumada, C. A.; Gallegos-Morales, G.; Hernández-Castillo, F. D.; Ochoa-Fuentes, Y. M.; Cepeda-Siller, M. y Castillo-Reyes, F. 2019. Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 6(16):45-55. Doi: <http://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843>.
- 4 Barroso, A. A. C.; Ochoa, F. Y. M.; Cerna, C. E.; Tucuch, P. M. A.; Olalde, P. V. y Robles, Y. L. 2021. Manejo *in vitro* de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 8(2):e3038-1-7. Doi:10.19136/era.a8n2.3038.
- 5 Coromoto, A. Y. y Reyes, I. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro*. 1(30):59-66.
- 6 Correa, P. Z. C.; Bautista, B. S.; Hernández, L. M. y Marquina, V. M. A. 2018. Evaluation of nanoformulations on *in vitro* development of fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 3(36):457-467.
- 7 Derbalah, A.; Shenashen, M.; Hamza, A.; Mohamed, A. and El Safty, S. 2018. Antifungal activity of fabricated mesoporous silica nanoparticles against early blight of tomato. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(2):145-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.05.002>.

- 8 Duan, Y.; Chen, R.; Zhang, R.; Jiang, W.; Chen, X.; Yin, C. and Mao, Z. 2021. Isolation, identification and antibacterial mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* QSB-6 and its effect on plant roots. *Frontiers of Microbiology*. 12:1-24. Doi: 10.3389/fmicb.2021.746799.
- 9 El-Abeid, S. E.; Ahmed, Y.; Daròs, J. A. and Mohamed, M. A. 2020. Reduced graphene oxide nanosheet-decorated copper oxide nanoparticles: a potent antifungal nanocomposite against fusarium root and wilt diseases of tomato and pepper plants. *Nanomaterials*. 10(1001):1-21. <https://doi.org/10.3390/nano10051001>.
- 10 Elabasy, A.; Shoaib, A.; Waqas, M.; Shi, Z. and Jiang M. 2020. Cellulose nanocrystals loaded with thiamethoxam: fabrication, characterization, and evaluation of insecticidal activity against *Phenacoccus solenopsis* tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Nanomaterials* (Basel). 10(4):788-1-13. Doi: 10.3390/nano10040788.
- 11 Es-Soufi, R.; Tahiri, H.; Azaroual, L.; Oualkadi, A.; Martin, P.; Badoc, A. and Lamarti, A. 2020. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. *Advances in Microbiology*. 10(3):82-94. Doi: 10.4236/aim.2020.103008.
- 12 Fernando, S.; Gunasekara, T. and Holton, J. 2018. Antimicrobial nanoparticles: applications and mechanisms of action. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*. 8(1):2-11. Doi: 10.4038/sljid.v8i1.8167.
- 13 Fira, D. J.; Dimki#, I.; Beri#, T.; Lozo, J. and Stankovi#, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnol*. 285:44-55. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.
- 14 Habe, H.; Toshiaki, T. and Tomohiro, I. 2017. Screening of a *Bacillus subtilis* Strain producing multiple types of cyclic lipopeptides and evaluation of their surface tension lowering activities. *Journal of Oleo Science*. 66(7):785-790.
- 15 Jia, Q.; Fan, Y.; Duan, S.; Qin, Q.; Ding, Y.; Yang, M.; Wang, Y.; Liu, F. and Wang, C. 2023. Effects of *Bacillus amyloliquefacien* XJ-BV2007 on growth of *Alternaria alternata* and production of tenuazonic acid. *Toxins*. 15(1):53. <https://doi.org/10.3390/toxins15010053>.
- 16 Jiao, R.; Cai, Y.; He, P.; Munir, S.; Li, X.; Wu, Y.; Wang, J.; Xia, M.; He, P.; Wang, G.; Yang, H.; Karunaratna, S. C.; Xiem, Y. and He, Y. 2021. *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 produces lipopeptides with promising biocontrol activity against fungal pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Frontiers in Cellular Infection and Microbiology*. 11:598999. Doi: 10.3389/fcimb.2021.598999.
- 17 Kiptoo, J. J.; Abbas, A.; Bhatti, A. M.; Usman, H. M.; Shad, M. A.; Umer, M.; Atiq, M. N.; Alam, S. M.; Ateeq, M.; Khan, M.; Peris, N. W.; Razaq, Z.; Anwar, N. and Iqbal, S. 2021. *Rhizoctonia solani* of potato and its management: A Review. *Plant Protection*. 05(03):157-169. Doi: 10.33804/pp.005.03.3925.
- 18 Koka, J. A.; Wani, A. H. and Bhat, M. Y. 2019. Evaluation of antifungal activity of magnesium oxide (MgO) and iron oxide (FeO) nanoparticles on rot causing fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9(2-s):173-178.
- 19 Lee, T.; Park, D.; Kim, K.; Lim, S. M.; Yu, N. H.; Kim, S.; Kim, H. Y.; Jung, K. S.; Jang, J. Y.; Park, J. C.; Ham, H.; Lee, S.; Hong, S. K. and Kim, J. C. 2017. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. *The Plant Pathology Journal*. 33(5):499-507. Doi: 10.5423/PPJ.FT.06.2017.0126.
- 20 Ley, L. N.; Márquez, Z. I.; Carrillo, F. J. A.; León, F. J.; Cruz, L. I.; García, E. R. S. and Allende, M. R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36(2):1-18. Doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-2.

- 21 Lira-Saldivar, R. H.; Méndez, A. B.; Santos, V. G. y Vera, R. I. 2018. Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*. 28(2):9-24. Doi: 10.15174/au.2018.1575.
- 22 Malandrakis, A.; Daskalaki, E. R.; Skiada, V.; Paoadopoulou, K. K. and Kavroulakis. N. 2018. A *Fusarium solani* endophyte vs fungicide: compatibility in a *Fusarium oxysporum* f sp. radicis-lycopersici-tomato pathosystem. *Fungal Biology*. 122(12):1215-1221. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.10.003>.
- 23 Maslennikova, V. S.; Tsvetkova, V. P.; Shelikhova, E. V.; Selyuk, M. P.; Alikina, T. Y.; Kabilov, M. R. and Dubovskiy, I. M. 2023. *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* mix suppresses rhizoctonia disease and improves rhizosphere microbiome, growth and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Fungi*. 9(12):1142. <https://doi.org/10.3390/jof9121142>.
- 24 Mckeen, C. D.; Reilly, C. C. and Pusey, P. L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Ecology and Epidemiology*. 2(76):136-139.
- 25 Ngalamat, M. S.; Yahaya, R. S. R.; Baharudin, M. M. A.; Yaminudin, S. M.; Karim, M.; Ahmad, S. A. and Sabri, S. 2021. A Review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*. 9(3):614. Doi: 10.3390/microorganisms9030614.
- 26 Ochoa, Y. M.; Cerna, C. E.; Landeros, F. J.; Hernández, C. S. y Delgado, O. J. C. 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 81:69-73.
- 27 Pariona, N.; Hermida, M. L. A.; Martínez, E. A. I.; Sánchez, R. D.; Carrión, G.; López, L. D.; Rosas, S. G.; Rodríguez, H. B. y Duran, B. Z. 2018. Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. *Revista ECI Perú*. 2(15):109-116.
- 28 Peng, H.; Hu, H.; Xi, K.; Zhu, X.; Zhou, J.; Yin, J.; Guo, F.; Liu, Y. and Zhu, Y. 2022. Silicon nanoparticles enhance ginger rhizomes tolerance to postharvest deterioration and resistance to *Fusarium solani*. *Frontiers in Plant Science*. 13:143-816. Doi: 10.3389/fpls.2022.816143.
- 29 Rastogi, A.; Tripathi, D. K.; Yadav, S.; Chauhan, D. K. and Živ#ák, M.; Ghorbanpour, M.; El-Sheery, N. I.; Brestic, M. 2019. Application of silicon nanoparticles in agriculture. *3 Biotech*. 9(3):90. Doi: 10.1007/s13205-019-1626-7.
- 30 Ríos, E. A.; Vega, B. J. R.; Villegas, J. G. y Sánchez, J. A. 2020. Nanoestructuras de silicio en biomedicina y biotecnología. *Revista de Física Momento*. 60:18-40. Doi: 10.15446/mo.n60.78272.
- 31 Santos, H. A.; Bimbo, L. M.; Peltonen, L. and Hirvonen, J. 2014. Inorganic nanoparticles in targeted drug delivery and imaging. *targeted drug delivery: concepts and Design*. 571-613 pp. Doi: 10.1007/978-3-319-11355-5-18.
- 32 Smith, A. T.; LaChance, A. M.; Zeng, S. N.; Liu, B. and Sun, L. 2019. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. *Nano Materials Science*. 1(1):31-47. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.004>.
- 33 Wang, X.; Peng, F.; Cheng, C.; Chen, L.; Shi, X.; Gao, X. and Li, J. 2021. Synergistic antifungal activity of graphene oxide and fungicides against fusarium head blight *in vitro* and *in vivo*. *Nanomaterials (Basel)*. 11(9):2393. Doi: 10.3390/nano11092393.



Efectividad *in vitro* de nanopartículas de dióxido de silicio y grafeno combinadas con extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* contra hongos fitopatógenos

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 June 2024
Date accepted: 01 September 2024
Publication date: 29 December 2024
Publication date: Nov-Dec 2024
Volume: 15
Issue: 8
Electronic Location Identifier: e3140
DOI: 10.29312/remexca.v15i8.3140
Funded by: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Award ID: CVU: 605454

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

agronanotecnología

bacterias benéficas

nanofungicidas

Counts

Figures: 2

Tables: 3

Equations: 0

References: 33

Pages: 0