

**EVALUACIÓN *in vitro* DE
NANOPARTÍCULAS DE SÍNTESIS VERDE
Y OTROS MÉTODOS BIORRACIONALES
PARA EL CONTROL DE *Pectobacterium
carotovorum* EN *Agave cupreata***

***In vitro* EVALUATION OF GREEN
SYNTHESIS NANOPARTICLES AND
OTHER BIORATIONAL METHODS FOR
THE CONTROL OF *Pectobacterium
carotovorum* IN *Agave cupreata***

García Núñez, H.G., J.M. Soria Díaz, A.M. Arzate Fernández, T.H. Norman Mondragón y E. De la Cruz Torres

EVALUACIÓN *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS DE SÍNTESIS VERDE Y OTROS MÉTODOS BIORRACIONALES PARA EL CONTROL DE *Pectobacterium carotovorum* EN *Agave cupreata*

In vitro EVALUATION OF GREEN SYNTHESIS NANOPARTICLES AND OTHER BIORATIONAL METHODS FOR THE CONTROL OF *Pectobacterium carotovorum* IN *Agave cupreata*



Evaluación *in vitro* de nanopartículas de síntesis verde y otros métodos biorracionales para el control de *Pectobacterium carotovorum* en *Agave cupreata*

In vitro evaluation of green synthesis nanoparticles and other biorational methods for the control of *Pectobacterium carotovorum* in *Agave cupreata*

Hilda Guadalupe García
Núñez, José Manuel Soria
Díaz, Amaury Martín Arzate
Fernández, Tomás Héctor
Norman Mondragón, Eulogio
De la Cruz Torres

EVALUACIÓN *in vitro* DE
NANOPARTÍCULAS DE
SÍNTESIS VERDE Y OTROS
MÉTODOS
BIORRACIONALES PARA
EL CONTROL DE
Pectobacterium carotovorum
EN *Agave cupreata*

In vitro EVALUATION OF
GREEN SYNTHESIS
NANOPARTICLES AND
OTHER BIORATIONAL
METHODS FOR THE
CONTROL OF *Pectobacterium*
carotovorum IN *Agave cupreata*

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 59: 213-224. Enero 2025

DOI:

10.18387/polibotanica.59.13

García-Núñez H.G.
Soria-Díaz, J.M.

Arzate-Fernández, A.M. Autor de correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx
<https://orcid.org/0000-0001-8603-0099>

Norman-Mondragón T.H.

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal Centro de Investigación de Estudios
Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas.
Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca
Kilómetro 15.5, El Cerrillo El Piedras Blancas, 50200 Toluca, Méx.

De la Cruz -Torres E. <https://orcid.org/0000-0002-6870-1765>

Radiobiología y Genética, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
Carretera Toluca - México s/n, 52750 La Marquesa, Méx.

RESUMEN: El género *Agave* tiene importancia cultural, social y económica debido a sus usos, destacando la producción de bebidas alcohólicas como el mezcal. Una de las principales especies utilizadas para este fin es *Agave cupreata*. Dentro de los problemas fitosanitarios que limitan su cultivo, se encuentra la pudrición blanda del cogollo causado por la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, que ocasiona pérdidas de más de 157 mil litros de mezcal por año. El uso indiscriminado de agroquímicos para su control conduce a la degradación de ecosistemas y a la resistencia genética de patógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto bactericida *in vitro* de métodos biorracionales tales como el uso de dos tipos de nanopartículas de plata (AsA-AgNPs y AsB-AgNPs) sintetizadas con extractos de *A. salmiana* así como el uso de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma lignorum*, comparándolos con un producto comercial (Agry-gent® Plus 800) para el control de *P. carotovorum*. Se evaluó el efecto bactericida *in vitro* de tres concentraciones de estos tratamientos en cultivos duales para el control de *P. carotovorum*, con tres repeticiones. El análisis estadístico, reveló que las nanopartículas de síntesis verde AsA-AgNPs a una concentración de 0.06 mg/mL fue el tratamiento más eficiente en el control de la bacteria fitopatógena.

Palabras clave: *Pectobacterium carotovorum*, pudrición blanda, métodos biorracionales, AsA-AgNPs, AsB-AgNPs, *Agave cupreata*.

ABSTRACT: The *Agave* genus has cultural, social and economic importance due to its uses, highlighting the production of alcoholic beverages such as mezcal. One of the main species used for this purpose is *Agave cupreata*. Among the phytosanitary problems that limit its cultivation is soft rot of the bud caused by the bacteria *Pectobacterium carotovorum*, which causes losses more than 157 thousand liters of mezcal per year. The indiscriminate use of agrochemicals for its control leads to the degradation of ecosystems and the genetic resistance of pathogens. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* bactericidal effect of biorational methods such as the use of two types of silver nanoparticles (AsA-AgNPs and AsB-AgNPs) synthesized with extracts of *A. salmiana* as well as the use of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma lignorum*, comparing them with a commercial product (Agry-gent® Plus 800) for the control of *P. carotovorum*. The *in vitro* bactericidal effect of three concentrations of these treatments was evaluated in dual

cultures for the control of *P. carotovorum*, whit three repetitions. The statistical analysis revealed that the AsA-AgNPs green synthesis nanoparticles at a concentration of 0.06 mg/mL was the most efficient treatment in controlling of the phytopathogenic bacteria.

Key words: *Pectobacterium carotovorum*, soft rot, biorational methods, AsA-AgNPs, AsB-AgNPs, *Agave cupreata*.

INTRODUCCIÓN

En el Continente Americano se reportan 211 especies de *Agave*, el 75% (159) prosperan en México (García-Mendoza *et al.*, 2019). Según Olvera-Vargas *et al.* (2022), el agave, también conocido como maguey, posee un valor ambiental, agroecológico, económico y sociocultural evidenciado por la utilización de hasta 48 especies para la producción de bebidas fermentadas y destiladas (tequila, mezcal y pulque). Para la producción del mezcal sobresalen 14 especies de las cuales destacan *Agave angustifolia*, *A. cupreata*, *A. potatorum*, *A. karwinskii* y *A. marmorata* (Jesús, 2018). El *A. cupreata* es una planta que alcanza la madurez sexual entre 7 y 15 años y no se reproduce vegetativamente. Además, sus poblaciones están siendo diezmadadas debido a que los individuos maduros se cosechan justo antes de su floración, para producir el mezcal en destilerías artesanales, lo cual evita la reproducción de la especie y la pone en peligro de extinción (Avenida-Arzate *et al.*, 2015). Aunado a esto, también se han incrementado sus problemas fitosanitarios causados por hongos, bacterias, nematodos e insectos. Una de las bacterias que más impacto tiene es *Pectobacterium carotovorum* que causa la pudrición blanda del cogollo en agave y su capacidad de permanecer latente en tejido infectado dificulta su manejo (SAGARPA, 2017). Aquino-Bolaños *et al.* (2020) estimaron que de 203 millones de plantas de *Agave tequilana* cultivadas, el 22.3% se encontraban dañadas en diferentes grados de afectación por esta bacteria. El principal control de *P. carotovorum* es la aplicación de productos químicos entre ellos fungicidas y bactericidas como son Cupravit (oxicloruro de cobre), Hidrocob77 (hidróxido de cobre), Mancoseb (Dietilditiocarbamato), Carbendazin (Bencimidazol), Agrigreen 800 (Sulfato de gentamicina + Clorhidrato de oxitetraciclina) que controlan e inhiben el crecimiento de esta bacteria con gran eficiencia. Sin embargo, el uso indiscriminado de productos químicos para el manejo y control de patógenos ha provocado problemas, tales como resistencia genética, alteraciones de los ecosistemas, aparición de nuevas plagas, movilidad en el ambiente y finalmente riesgo para la salud humana (Rashid *et al.*, 2013).

Por ello, es importante emplear estrategias que no dañen la salud humana y que sean más amigables con el ambiente y eficientes para el control de patógenos de importancia agrícola mundial. Entre este tipo de estrategias se encuentran los métodos biorracionales, tales como la utilización de nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales tienen aplicaciones antimicrobianas y pueden ser sintetizadas empleando métodos de síntesis verde que utilizan agentes reductores biológicos como extractos de plantas. Martínez *et al.* (2024), mostraron la eficiencia de la inhibición de *Bacillus licheniformis*, mediante el uso nanopartículas de plata (AgNPs) de síntesis verde utilizando extractos de *Agave salmiana*.

Otro método biorracional para el control de *P. carotovorum* es la aplicación de microorganismos benéficos con capacidad antagonica, tales como la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo *Trichoderma lignorum* que se les conoce como agentes de biocontrol debido a que poseen un crecimiento y desarrollo acelerado, pueden tolerar condiciones ambientales extremas y son capaces de parasitar, controlar y destruir hongos, bacterias, nematodos y otros fitopatógenos utilizando diferentes estrategias como resultado de su metabolismo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto bactericida *in vitro* de dos tipos de nanopartículas de plata (AsA-AgNPs y AsB-AgNPs) sintetizadas con extractos de *A. salmiana*, así como el uso de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma lignorum*, comparándolos con un producto comercial (Agrigreen® Plus 800) para el control de *P. carotovorum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico, utilizado como tratamientos biorracionales en este estudio fue:

- Inóculo *in vitro* de *Pectobacterium carotovorum* aislado en medio Papa Dextrosa Agar (PDA). A partir de esta muestra se preparó una solución bacteriana a una concentración a 3×10^8 UFC.
- Las nanopartículas de plata (AsA-AgNPs y AsB-AgNPs) sintetizadas con de extractos de *Agave salmiana*. Para la biosíntesis de los dos tipos de nanopartículas se utilizó 1×10^{-3} mol/L de nitrato de plata y extractos acuosos de *Agave salmiana* a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ como agente reductor, de acuerdo a la metodología propuesta por (González-Pedroza *et al.*, 2021). El extracto acuoso se obtuvo a diferentes temperaturas tal como se muestra en la tabla 1, se filtró con tubos de 30 k Amicon Ultra-15 Centrifugal filter devices, a 300 rpm durante 10 min. Luego, se obtuvo el extracto crudo a partir del mismo con el uso de presión reducida. Las diferencias registradas en la síntesis de AsA-AgNPs y AsB-AgNPs fueron la temperatura de obtención y la exposición a la radiación UV (tabla 1). Una vez obtenidos ambos tipos de AgNPs, la muestra fue preparada a partir de una alícuota colocada en una rejilla de cobre, dejando secar a temperatura ambiente para posteriormente ser analizada y finalmente se determinaron sus características morfológicas y el diámetro de partícula (nm). Para esto se realizó un análisis espectroscópico UV-Vis a fin de monitorear la formación de AgNPs utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (espectrofotómetro VE-5100UV, VELAB EE. UU.), en un rango de 200 a 800 nm, en modo de absorción, según lo reportado por (Martínez *et al.*, 2024). Posteriormente con ayuda de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (número de serie JEOL-JEM-2010 TEM) y el software imageJ, se caracterizaron las propiedades estructurales de los sistemas nanoparticulados tomando en cuenta la distribución, morfología y tamaño de partículas.

Tabla 1. Condiciones físicas de síntesis de AgNPs
Table 1. Physical conditions for synthesis of AgNPs

Muestras	Temperatura	Tiempo de exposición a radiación UV	Porcentaje de plata y extracto de <i>A. salmiana</i> (V: V)
<i>AsA-AgNPs</i>	93°C	5 min	3:5
<i>AsB-AgNPs</i>	25°C	1 min	3:5

- Inóculo *in vitro* de *Trichoderma lignorum* en PDA, donado por el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX).
- Bacillus subtilis*, aislada del biofungicida comercial Baktillis® (Biokrone), con 1×10^{12} UFC/mL. Posteriormente se aisló en medio de cultivo PDA, se incubaron a 28°C durante un período de 48 horas.
- Agry-gent® Plus 800, como producto bactericida comercial, con sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina como ingredientes activos. Para cada uno de los métodos biorracionales y el bactericida comercial se determinaron tres concentraciones experimentales para las pruebas *in vitro* para el control de *P. carotovorum* utilizando agua destilada estéril como diluyente, tal como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de los tratamientos biorracionales y químico para las pruebas *in vitro*.
Table 2. Concentrations of the biorational and chemical treatments for *in vitro* tests.

Tratamiento	Concentración
T ₁ = AsA-AgNPs	[C ₁ : 0.04, C ₂ : 0.06, C ₃ : 0.08 mg/mL]
T ₂ = AsB-AgNPs	[C ₁ : 0.04, C ₂ : 0.06, C ₃ : 0.08 mg/mL]
T ₃ = <i>Trichoderma lignorum</i>	[C ₁ : 3×10^6 , C ₂ : 6×10^6 , C ₃ : 9×10^6 Conidios]
T ₄ = <i>Bacillus subtilis</i>	[C ₁ : 2×10^7 , C ₂ : 4×10^7 , C ₃ : 6×10^7 UFC]
T ₅ = Sulfato de gentamicina + Clorhidrato de oxitetraciclina (Agry-gent® Plus 800)	[C ₁ : 6, C ₂ : 7, C ₃ : 8 mg/L]
T ₆ = Control negativo	Agua destilada estéril

Evaluación de la patogenicidad de *P. carotovorum*

Para determinar la patogenicidad de *P. carotovorum* se usaron plantas de *A. cupreata*; y como control positivo plantas de *Aloe vera* y de *Haworthia arachnoidea* como control negativo. Se disectaron tres hojas de cada planta y se lavaron con jabón y agua abundante, después se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min y luego en alcohol al 70% durante 2 min y en seguida se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se hizo una incisión de 1.0 cm en cada hoja y con un asa bacteriológica se inoculó 0.05ml de *P. carotovorum* a una concentración de 1×10^6 UFC, en dos de las tres hojas de cada especie, dejando la restante como control a la cual se le colocó 0.5mL de agua destilada estéril; las muestras inoculadas se incubaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente durante un periodo de 96 h, durante este periodo se registró la sintomatología observada. Cabe mencionar que de esta prueba se hicieron tres repeticiones. Posteriormente se hicieron preparaciones microscópicas y tinción Gram de *P. carotovorum*, las cuales se observaron en un microscopio óptico BOECO a 100X.

Evaluación *in vitro* del control de los tratamientos hacia *P. carotovorum*

Se evaluó el efecto bactericida *in vitro* de los tratamientos (Tabla 2) sobre *P. carotovorum*. Se sembró *P. carotovorum* en extensión en cajas Petri con medio PDA y enseguida, en forma de cuadrante sobre la superficie del medio de cultivo, se colocaron cuatro discos de 6 mm de papel filtro estéril (Whatman No. 2), tres discos previamente impregnados con cada una de las concentraciones a evaluar (durante 5 minutos) y un disco impregnado con agua destilada estéril como control. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento, las muestras se incubaron a 28°C por 96 h, con un vernier digital, marca Steren se midió el diámetro del halo de inhibición (mm) resultante del efecto bactericida de cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo trifactorial donde: el factor A fueron los tratamientos, el factor B las concentraciones y el factor C los días de medición del halo, esto con la finalidad de evaluar el efecto bactericida sobre *P. carotovorum* de los cinco tratamientos (con sus respectivas concentraciones), sus tres repeticiones y un control ($p \leq 0.05$). Los datos obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza usando Statgraphics versión 5.0; y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación múltiple de medias.

RESULTADOS

Biosíntesis de las nanopartículas de plata con extracto de *Agave salmiana*

Las micrografías TEM de las AgNPs (Figura1) se obtuvieron a una concentración 3:5 de *Agave salmiana*. Para los dos tipos de nanopartículas AsA-AgNPs y AsB-AgNPs, se observaron formas cuasi esféricas con un tamaño que osciló entre ~1.3 y 65.2 nm ($X = 14.51$ nm, $\sigma = 15$ nm), y una media de 14.51, mientras que el tamaño de AsB-AgNPs osciló entre ~1.04 y 95.45 nm ($X = 20.80$ nm, $\sigma = 21$ nm).

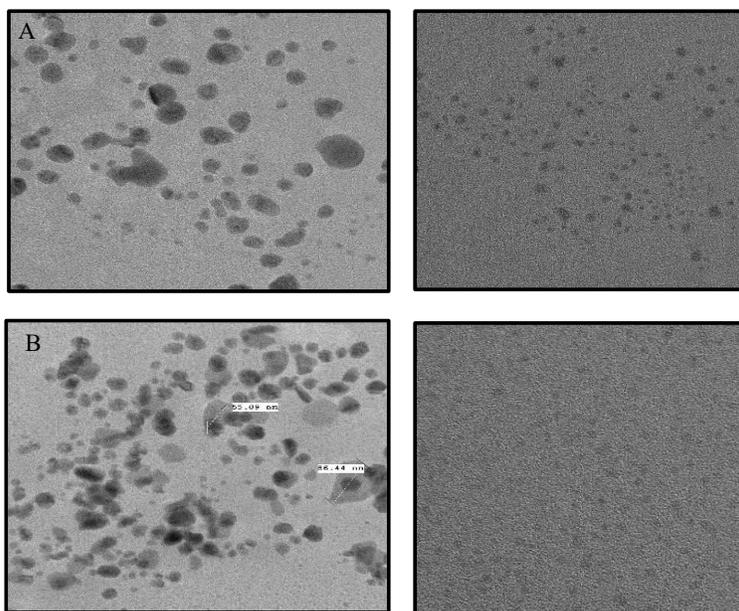


Figura 1. A) Microfotografías de la forma y tamaño (nm) de las nanopartículas sintetizadas a partir de extractos de *A. salmiana*, A) tipo A (AsA-AgNPs) y B) tipo B (AsB-AgNPs) de forma cuasi esféricas, obtenidas mediante TEM a 1000X.

Figure 1 A) Microphotographs of the shape and size (nm) of the nanoparticles synthesized from extracts of *A. salmiana*, A) type A (AsA-AgNPs) and B) type B (AsB-AgNPs) of quasi-spherical shape, obtained by TEM at 1000X.

Pruebas de patogenicidad de *P. carotovorum*

Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas para *A. cupreata* y *Aloe vera*, observándose la sintomatología característica de pudrición blanda a las 96 h después de la inoculación de las hojas con *P. carotovorum*, respectivamente (Figura 2, 1b y 2b). Las observaciones microscópicas 1c y 2c (100X) confirmaron la presencia de bacilos de forma abastionada con flagelos peritricos, sus colonias mostraron elevación convexa de color blanco cremoso, además esta bacteria resultó ser Gram negativa, estas características corresponden a *P. carotovorum*. Mientras que para *Haworthia arachnoidea* esta prueba fue negativa a la infección con por *P. carotovorum* ya que no se observó esa apariencia acuosa.



Figura 2. Sintomatología inducida por *P. carotovorum*: 1a, 2a, 3a, hojas de *A. cupreata*, *Aloe vera* y *Haworthia arachnoidea* (controles); 1b, hoja de *A. cupreata* con necrosis bacteriana acuosa color marrón, 2b hoja de *A. vera* con necrosis bacteriana acuosa color marrón y 3b hoja de *H. arachnoidea* sin necrosis acuosa; 1c y 2c bacilos Gram negativos de *P. carotovorum* y 3c sin presencia de bacteria.

Figure 2. Symptoms induced by *P. carotovorum*: 1a, 2a, 3a, leaves of *A. cupreata*, *Aloe vera* and *Haworthia arachnoidea* (controls); 1b, *A. cupreata* leaf with brown aqueous bacterial necrosis, 2b *A. vera* leaf with brown aqueous bacterial necrosis and 3b *H. arachnoidea* leaf without aqueous necrosis; 1c and 2c Gram negative bacilli of *P. carotovorum* and 3c without the presence of bacteria.

Evaluación del efecto antagónico *in vitro* de los tratamientos biorracionales

El análisis estadístico del efecto bactericida por tratamiento biorracional reveló que las nanopartículas tipo AsA-AgNPs presentaron un halo de inhibición de 1.97 mm, resultando más eficientes para el control del crecimiento *in vitro* de *P. carotovorum*, seguido del bactericida comercial Agry-gent® Plus 800 con el que se observó un halo de inhibición de 1.95 mm; mientras que con las nanopartículas tipo AsB-AgNPs mostraron un halo de 1.55 mm lo cual indica una eficiencia menor de control, así mismo *T. lignorum* y *B. subtilis* mostraron un halo de 1.29 mm, lo que indica una baja eficiencia en el control de *P. carotovorum* (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de medias del efecto bactericida de los tratamientos biorracionales.

Tratamiento biorracional	Halo de inhibición promedio (mm)*
AsA-AgNPs	1.97 ^a
Agry-gent® Plus 800	1.95 ^a
AsB-AgNPs	1.55 ^{ab}
<i>T. lignorum</i>	1.29 ^b
<i>B. subtilis</i>	1.29 ^b

*De tres repeticiones. Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos. Tukey $p \leq 0.05$

*Three repetitions. Values with the same letter are not statistically significant. Tukey $p \leq 0.05$

Los resultados de análisis estadístico del efecto bactericida de las concentraciones por tratamiento biorracional mostraron que las AsA-AgNPs, a una concentración de 0.06 mg/mL presentó un halo de inhibición 3.14 mm, siendo la mejor concentración de respuesta bactericida contra *P. carotovorum*. El Agry-gent® Plus 800, a una concentración de 0.008 mg/mL fue la segunda concentración de control hacia la bacteria en estudio. A esta misma concentración las AsB-AgNPs tuvieron el más alto halo de inhibición. Mientras que *T. lignorum* y *B. subtilis* presentaron su mejor halo de inhibición a una concentración de 3×10^6 conidios/mL y 4×10^7 UFC/mL, respectivamente. No hay un patrón de respuesta de los tratamientos biorracionales sobre la concentración utilizada para el control de *P. carotovorum*.

Tabla 4. Comparación de medias del efecto bactericida *in vitro* entre concentraciones de los tratamientos biorracionales aplicados para el control de *Pectobacterium carotovorum*.

Table 4. Comparison of means of the *in vitro* bactericidal effect between concentrations of the biorational treatments applied to control *Pectobacterium carotovorum*.

Tratamientos	Concentración	Halo de inhibición (mm)
AsA-AgNPs	0.04 mg/mL	0.88c
AsA-AgNPs	0.06 mg/mL	3.14 ^{a*}
AsA-AgNPs	0.08 mg/mL	0.74c
AsB-AgNPs	0.04 mg/mL	2.06b
AsB-AgNPs	0.06 mg/mL	1.20b
AsB-AgNPs	0.08 mg/mL	2.64 ^a
Agry-gent® Plus 800	0.006 mg/mL	1.47b
Agry-gent® Plus 800	0.007 mg/mL	1.74b
Agry-gent® Plus 800	0.008 mg/mL	2.67 ^a
<i>T. lignorum</i>	3×10^6 Conidios/mL	1.41b
<i>T. lignorum</i>	6×10^6 Conidios/mL	1.22c
<i>T. lignorum</i>	9×10^6 Conidios/mL	1.24c
<i>B. subtilis</i>	2×10^7 UFC/mL	0.98c
<i>B. subtilis</i>	4×10^7 UFC/mL	1.34b
<i>B. subtilis</i>	6×10^7 UFC/mL	1.32b

*De tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

*Three repetitions. Different letters indicate significant statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

En relación a los resultados de los halos de inhibición sobre el efecto bactericida de los tratamientos biorracionales, se observó un campo claro alrededor de los discos impregnados por las diferentes concentraciones indicado por una flecha de color naranja (Figura 3B, 3C y 3D).

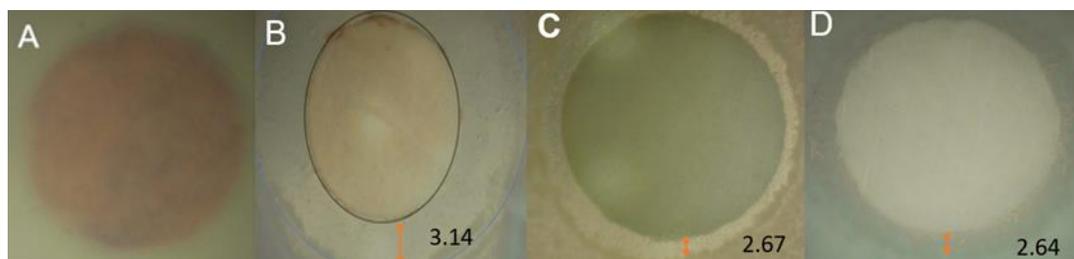


Figura 3. Halos de inhibición *in vitro* (mm) resultantes del efecto bactericida de las concentraciones más eficientes sobre *P. carotovorum*, comparadas con el tratamiento control: A) Control sin halo; B) AsA-AgNPs (0.06 mg/mL) con halo de 3.14 mm; C) Agry-gent® Plus 800 (0.008 mg/mL) con halo de 2.67 mm y D) AsB-AgNPs (0.08 mg/mL) con halo de 2.64.

Figure 3. *In vitro* inhibition zones (mm) resulting from the bactericidal effect of the most efficient concentrations on *P. carotovorum*, compared to the control treatment: A) Control without halo ; B) AsA-AgNPs (0.06 mg/mL) with a halo of 3.14 mm; C) Agry-gent® Plus 800 (0.008 mg/mL) with a halo of 2.67 mm and D) AsB-AgNPs (0.08 mg/mL) with a halo of 2.64.

DISCUSIÓN

En relación a las pruebas de patogenicidad permitieron confirmar que la bacteria *P. carotovorum* afecta a *Agave cupreata* y las características coinciden con lo reportado por Amaya *et al.* (2021). Aunque, no se han reportado estudios *in vitro* para evidenciar la patogenicidad de *P. carotovorum* en esta especie de agave, nuestro estudio también concuerda con lo observado por Jiménez-Hidalgo *et al.* (2004) quienes confirmaron la presencia de lesiones cloróticas en el sitio de inoculación de *P. carotovorum* a los 15 y 20 días después, en plantas de *A. tequilana*.

En el presente estudio, los resultados de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 1) de la biosíntesis de las nanopartículas, revelaron que las AsA-AgNPs presentaron una forma cuasi esférica y un menor tamaño, en comparación con las AsB-AgNPs, esto se debe a que las primeras estuvieron a una mayor exposición de UV y a una temperatura mas alta, lo cual deriva en un alto potencial bactericida. Esto coincide con Martínez *et al.* (2024) quienes reportaron nanopartículas sintetizadas con extracto de *Agave salmiana* con tamaños entre ~1 y 50 nm ($X = 5,6$ nm, $\sigma = 6$ nm). Así mismo, (Iravani *et al.*, 2014) mencionan que la forma, el tamaño y la cantidad de nanopartículas tienen un efecto sobre el potencial antimicrobiano de las nanopartículas de plata. También coincide con lo que mencionan Martínez *et al.* (2024) respecto a que el tamaño de las nanopartículas metálicas garantiza una superficie de contacto significativamente más grande con el efluente bacteriano. Cabe destacar que, las AgNPs con tamaños inferiores a 10 nm son más tóxicas para las bacterias. Al penetrar en el citoplasma las AgNPs pueden interactuar con biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN. En ciertos casos, pueden interactuar con el sistema enzimático respiratorio, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilos (OH) y superóxido (O_2^-), que inducen estrés oxidativo y daños a proteínas y ácidos nucleicos, que conducen a la muerte del patógeno (Liao *et al.*, 2019; Santos y Barrios, 2022).

Además, Solís *et al.* (2019) afirman que las nanopartículas biogénicas de plata muestran una amplia distribución de tamaños y formas que varían de 2-75 nm diámetro empleando extractos vegetales en la obtención de AgNPs como agentes reductores, con mayor eficiencia en el control de patógenos. Así mismo, Solís *et al.* (2019) realizaron estudios sobre el efecto de las propiedades antimicrobianas de las AgNPs sintetizadas biológicamente con extracto acuoso de *Anona muricata* las cuales mostraron mayor efectividad en el control de *P. aeruginosa* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. albicans* en comparación con las AgNPs de síntesis química. Esto apoya nuestros resultados donde se demuestra que las nanopartículas de síntesis verde con extractos de *Agave salmiana* tipo A (AsA-AgNPs) tienen un efecto bactericida para el control de *P. carotovorum*. Probablemente se deba a la utilización del extracto de *A. salmiana* para recubrir a las nanopartículas ya que esto influye de manera positiva en la estabilidad de las mismas.

Por otra parte, en nuestros estudios quedó demostrado el efecto bactericida de los tratamientos biorracionales usando las nanopartículas tipo AsA-AgNP sobre esta bacteria Gram negativa que afecta al agave, lo cual coinciden con Ahmed *et al.* (2016) ya que ellos mostraron que las AgNPs sintetizadas a base de extractos acuosos de *Agave americana* poseen un potencial antimicrobiano significativo con un 96% de efectividad contra bacterias patógenas Gram negativas. Sin embargo, no coincide con lo reportado por Martínez *et al.* (2024) quienes realizaron estudios utilizando AgNPs sintetizadas con extractos de *A. salmiana* para el control de *Bacillus licheniformis* sin lograr el control de esta bacteria Gram positiva.

Al respecto, se ha estudiado que este tipo de síntesis verde es eficiente para el control de bacterias Gram negativas y Gram positivas, teniendo mejor acción en las Gram negativas. Esto debido a que la pared celular de las Gram negativas tiene un grosor de 2-7 nm y además contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática, inmediatamente después se encuentra una delgada capa de peptidoglicanos, seguidamente se encuentra la membrana externa, la cual es exclusiva de las células Gram negativas, la cual está conformada por una bicapa lipídica donde la parte interna está constituida por fosfolípidos y la externa por lipopolisacáridos (LPS). Mientras que en las Gram positivas tienen un grosor de 20-80 nm por lo tanto la pared celular es más gruesa, compuesta de varias capas de peptidoglucanos, conteniendo también una gran cantidad de ácidos teicoicos, polímeros de glicerol y ribitol (Rojas-Avelizapa *et al.*, 2020). Según Anandalakshmi *et al.* (2016), la acción bactericida de las nanopartículas de plata contra las bacterias Gram negativas ocurre cuando éstas poseen un

tamaño entre 1 y 10 nm. De acuerdo a lo anterior cabe destacar que el mecanismo antimicrobiano de las AgNPs consiste en la unión de estas nanopartículas en la superficie de la membrana celular bacteriana, afectando las funciones respiratorias de la célula y provocando la desnaturalización de la membrana, lo que causa la fuga del contenido celular y la eventual muerte de la célula. En relación a esto, (Monge, 2009) expresa que los estudios realizados para analizar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas biológicamente frente a microorganismos, han revelado mayor eficiencia en el control de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, que a diferencia de las bacterias grampositivas como el *Streptomyces aureus*, que posee una gruesa capa de peptidoglicanos y membrana plasmática, lo cual impide que las nanopartículas sintetizadas ingresen con facilidad al interior de la membrana (Villamizar y Monroy, 2015).

Por otra parte, la comparación estadística entre las concentraciones de cada tratamiento biorracional mostró diferencias significativas al encontrar que la dosis de 0.06 mg/ml de AsA-AgNPs, seguida del bactericida comercial Agry-gent® Plus 800 (0.008 mg/ml) y de AsB-AgNPs (0.08 mg/mL) (Tabla 4), fueron los tratamientos más eficientes en el control del crecimiento *in vitro* de *P. carotovorum*, al comparar el diámetro promedio de los halos de inhibición resultantes (3.15, 2.68 y 2.64 mm, respectivamente), en cambio para acción bactericida, las concentraciones de *T. lignorum* (3×10^6 conidios/mL) y *B. subtilis* (4×10^7 UFC/mL), originaron halos de inhibición con menor diámetro promedio (1.41 y 1.34 mm, respectivamente). Esto evidencia que, en relación a la concentración de los tratamientos biorracionales no hay un patrón que indique que entre mayor sea la concentración mayor es el control hacia la bacteria *P. carotovorum*.

En relación al efecto en el control de *P. carotovorum* por a la acción del bactericida comercial Agry-gent® Plus 800 este, resultó más efectivo que los agentes biológicos (*T. lignorum* y *B. subtilis*). Cabe mencionar que es un bactericida sistémico de amplio espectro de acción rápida para el control de la pudrición de cogollo del agave, causada por *Erwinia* sp. ahora clasificada como *Pectobacterium. carotovorum*.

Aunque se ha reportado la eficiencia de las especies de los géneros *Trichoderma* y *Bacillus* como agentes bactericidas, donde mencionan que la cepa de *B. subtilis* 9B14 tuvo una gran eficiencia contra *P. carotovorum*, con un halo de inhibición de 9.16 mm (García-Martínez *et al.* 2022), en nuestro estudio no resultaron con un alto potencial de control. .

Por otra parte, en relación a *Trichoderma*, Guerrero *et al.* (2017) mencionan que las cepas de la misma especie de *Trichoderma* spp. muestran diferentes grados de acción sobre el crecimiento de patógenos y también su mecanismo puede variar de un cultivo a otro.

CONCLUSIONES

El efecto bactericida de las nanopartículas de plata AsA-AgNPs, sintetizadas biológicamente con extractos de *Agave salmiana*, empleadas como tratamiento biorracional fue eficiente para el control del crecimiento *in vitro* de *Pectobacterium carotovorum*, lo que podría ser un método prometedor como un tratamiento ecológico y eficiente como posible sustituto del control químico.

En este estudio *Trichoderma lignorum* y *Bacillus subtilis* no fueron tan eficientes para el control *in vitro* de *Pectobacterium carotovorum* agente causal de la marchitez en agave.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACYT por el financiamiento otorgado de la beca de maestría para desarrollar la presente investigación, y al Dr. Raymundo Saúl García Estrada del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por la donación de la cepa de *P. carotovorum*.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, B., Shireen, f., Bashir, S., Kan, I., & azam, s. (2016). Síntesis verde, caracterización y evaluación biológica de AgNPs usando extracto acuoso de hojas de *Agave americana*, *Mentha spicata* y *Mangifera indica*. *IET nanobiotechnology*, 10(5), 281-287. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0053>
- Amaya Guerrero, A. P., Beltrán Pineda, M. E., & Alfonso Vargas, N. C. (2021). *Pectobacterium carotovorum*: agente fitopatígeno causante de la pudrición blanda en la papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2). https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1710
- Anandalakshmi, K., Venugobal, J., & Ramasamy, V. (2016). Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6, 399-408. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0449-z>
- Aquino-Bolaños, T., Sánchez-García, J. A., Ortíz-Hernández, Y. D., Hernández-Cruz, J., & Cortés-Martínez, C. I. (Junio de 2020). Portador y vector de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y su manejo a través de una base de hongos entomopatógenos en *Agave* sp. *Sociedad Entomológica de Florida*, 243-246.
- Avendaño-Arrazate, C., Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J., López-Gómez, P., & Barrios-Ayala, A. (2015). Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *FYTON*, 84: 148-162. <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.148>
- Díaz Acosta, E. M. (2018). Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión. *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 12(22) 89-99. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.60758>
- García Mendoza, A. J., Franco Martínez, S. I., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 126(e1461), 1-18. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- García-Martínez, D. C., Vázquez-López, A., Ayala-Escobar, V., Nava-Díaz, C., & Aranda-Ocampo, S. (2022). *Bacillus* y *Pseudomonas* fluorescentes de la rizosfera de agaves silvestres antagonistas contra bacterias pectinolíticas. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 9(1). <https://doi.org/10.19136/era.a9n1.3177>
- González Pedroza, M. G., Argueta Figueroa, L., García Contreras, R., Jiménez Martínez, Y., Martínez Martínez, E., Navarro-Marchal, S. A., . . . Boulaiz, H. (2021). Silver Nanoparticles from *Annona muricata* Peel and Leaf Extracts as a Potential Potent, Biocompatible and Low Cost Antitumor Tool. *Nanomaterials*, 11(5), 1273. <https://doi.org/10.3390/nano11051273>
- González Pedroza, M. G., Argueta Figueroa, L., García Contreras, R., Jiménez Martínez, Y., Martínez Martínez, E., Navarro Marchal, S. A., . . . Boulaiz, H. (2021). Silver Nanoparticles from *Annona muricata* Peel and Leaf Extracts as a Potential Potent, Biocompatible and Low Cost Antitumor Tool. *Nanomaterials*, 11(5), 1273. <https://doi.org/10.3390/nano11051273>
- Guerrero, R., Mónaco, C., Stocco, M., Consolo, V., Rolleri, J., & Guerrero, N. (2017). Aplicación de *Trichoderma harzianum* para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) En invernadero. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 6(3), 230-243. <https://doi.org/10.59410/RACYT-v06n03ep04-0087>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385-406. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26339255/>
- Jesús, H. L. (2018). Los Mezcales Mexicanos: la importancia. 179-205. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-8034.2018v20n2p179>
- Jiménez-Hidalgo, I., Virgen-Calleros, G., Martínez-de la Vega, O., & Vandemark, G. (2004). Identification and Characterisation of Bacteria Causing Soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*, 317-331.

Recibido:
7/mayo/2024

Aceptado:
17/diciembre/2024

- Liao, C. Z., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Propiedades bactericidas y citotóxicas de las nanopartículas de plata. *Internacional de ciencias moleculares*, 20(2), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Martínez Martínez, S. Y., Arzate Fernández, A. M., González Pedroza, M. G., García Núñez, H., & De la Cruz Torres, E. (2024). Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de tres especies de *Agave* para inhibir *Bacillus licheniformis*. *Polibotanica*, 58(29), 149-157. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.58.10>
- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: metodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química*, 105(1), 33-41. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2931286>
- Olvera-Vargas, L. A., Pardo-Núñez, J., & Aguilar-Rivera, N. (22 de marzo de 2022). Detección de *Agave angustifolia* y *Agave cupreata* con técnicas geomáticas en Guerrero, México. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, 23(2): e2241. doi:DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num2_art:2241
- Rashid, M., Chowdhury, M., & Sultana, N. (2013). In-vitro Screening of some Chemicals and Biocontrol Agents against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the Causal Agent of Soft Rot of Potato (*Solanum tuberosum*). *The Agriculturists*, 11(2), 1-9. <https://doi.org/10.3329/agric.v11i2.17480>
- Rojas-Avelizapa , N. G., Regalado-Infante , P. E., Dávila Lezama , M. d., Llarena Hernández , R. C., & Rojas-Avelizapa, L. I. (2020). Actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata contra bacterias fitopatógenas. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 1-7. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.173>
- SAGARPA. (2017). *Ficha técnica pudrición blanda del cogollo del agave*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación . Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244028/Ficha_Tcnica_Pectobacterium_carotovorum_en_agave_Versin_FINAL.pdf
- Santos Ruiz, P. A., & Barrios, L. N. (2022). Aplicación de pigmentos producidos por *Streptomyces coelicolor* en la síntesis de nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana. *Hechos Microbiológicos*, 13(1), 37-46. doi: <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v13n1a04>
- Solis, K. D., Palacios, J. E., Toledano, Y., Garibo, M. A., & Garibo, D. (2019). Síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto acuoso de *Annona muricata* y su efecto antimicrobiano. *Academia Journals*, 2481-2488. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/352196984_SINTESIS_DE_NANOPARTICULAS_DE_PLATA_A_PARTIR_DEL_EXTRACTO_ACUOSO_Annona_muricata_Y_SU_EFECTO_ANTIMICROBIANO
- Villamizar G, R., & Monroy P, L. (2015). Uso de Nanopartículas de plata en el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos. *@Limentech Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 13(1), 54-59. Obtenido de https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_206/recursos/general/02032016/alimentech.pdf