

## Velocidad de crecimiento de hongos fitopatógenos tratados con terapia fotodinámica antimicrobiana

Growth speed of phytopathogenic fungi treated with antimicrobial photodynamic therapy

Juan Carlos Ramírez Granados\*, César Díaz Pérez y Andrea N. Cabrera Coronado

Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato.  
jcramirez@ugto.mx\*

### Resumen

La población mundial actual es cercana a 7900 millones de personas y satisfacer sus necesidades alimentarias de manera sostenible y con calidad es un gran reto. Muchos de los alimentos que consumen las personas dependen directa o indirectamente de la agricultura. Sin embargo, la productividad de los cultivos es afectada por múltiples agentes externos tales como climas adversos, suelos con deficiencias de nutrientes, insectos, bacterias, hongos y otros microorganismos patógenos. Para maximizar el rendimiento de los cultivos es común el uso de agroquímicos tales como fertilizantes, pesticidas, herbicidas y fungicidas que favorecen el desarrollo de las plantas. Sin embargo, el uso incorrecto de los agroquímicos puede representar un riesgo para la biodiversidad y la seguridad alimentaria de las personas; y por lo tanto deben estar bajo estricta supervisión. Por esta razón, se están desarrollando tratamientos alternativos que sean eficientes y seguros para las plantas, animales y personas; y que al mismo tiempo permitan altos rendimientos en los cultivos. Una de estas alternativas es la Terapia Fotodinámica antimicrobiana para inhibir microorganismos fitopatógenos. En este trabajo se propone el uso de la Terapia Fotodinámica para tratar hongos que afectan a algunos de los principales cultivos en México. Para esto, se analizó la velocidad específica máxima de crecimiento de muestras de hongos tratadas con terapia fotodinámica y azul de metileno. Se encontró que la terapia fotodinámica es una alternativa viable para inhibir el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos y que su efecto es dependiente de la concentración del fotosensibilizante.

**Palabras clave:** Terapia Fotodinámica, hongo fitopatógeno, antimicrobiano, plantas.

### Introducción

La población mundial está en constante ascenso y pasó de 6100 millones de personas en el año 2000 a cerca de 7900 millones en el 2023. Este crecimiento en la población mundial plantea retos cada vez más complejos y uno de ellos es la necesidad de satisfacer los requerimientos alimentarios de todas las personas. En la actualidad, la mayoría de las personas incluyen en su dieta una amplia variedad de alimentos que se obtienen directa o indirectamente de las actividades agrícolas. Producir la suficiente cantidad de insumos agrícolas para las personas y animales no es una tarea fácil debido a que la productividad de los cultivos es afectada por una gran cantidad de factores y agentes externos tales como los climas adversos, suelos con deficiencias de nutrientes o no aptos para la agricultura, insectos plaga, bacterias, hongos y otros microorganismos patógenos que impiden o merman el desarrollo de las plantas. La agricultura moderna comúnmente hace uso de una amplia variedad de agroquímicos efectivos tales como los fertilizantes, pesticidas, herbicidas y fungicidas para maximizar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, el uso incorrecto de los agroquímicos y sus efectos colaterales pueden representar un riesgo para la biodiversidad y la seguridad alimentaria de las personas; por eso deben estar bajo estricta supervisión. Por estas razones, en las últimas décadas se han estado desarrollando tratamientos alternativos que sean más seguros para las plantas, los animales y las personas; y que al mismo tiempo mantengan altos los rendimientos de los cultivos. Una de las alternativas para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos es la Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDa) que consiste en la aplicación de una sustancia que normalmente no tiene actividad citotóxica, pero que bajo la radiación luminosa y en presencia de oxígeno producen especies reactivas que ocasionan la muerte de las células objetivo (Moreno *et al.*, 2007 & Marioni, 2017). Las principales ventajas de la Terapia Fotodinámica son su selectividad y que no genera resistencia debido a que actúa de manera local (Gilaberte *et al.*, 2012). Aquí se empleó la Terapia Fotodinámica con azul de metileno (AM) como fotosensibilizador para analizar su efecto antifúngico sobre los hongos *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Rizoctonia sp.* y *Colletotrichum sp.* a través de la evaluación de su velocidad de crecimiento.



## Metodología

En este estudio se aplicaron tres tratamientos de Terapia Fotodinámica antimicrobiana a muestras de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Rizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp. Estos hongos fitopatógenos fueron seleccionados debido a su alta capacidad para infectar a diferentes huéspedes y por el gran daño que pueden causar en cultivos de todo el país. Los tratamientos de terapia fotodinámica consistieron en rociar a las muestras de los hongos seleccionados con soluciones fotosensibilizadoras y su posterior exposición a la radiación luminosa con el propósito de producir especies reactivas de oxígeno que inactivan a los microorganismos. La diferencia entre estos tratamientos de TFDa radica en que los fotosensibilizadores fueron disoluciones acuosas de azul de metileno con concentraciones distintas: 3%, 5% y 10% (Lifeder, 2019). Cabe mencionar que cada uno de los tres tratamientos aplicados a las 4 cepas fitopatógenas fueron realizados por triplicado. Por esta razón, de las doce muestras disponibles de cada hongo, tres muestras fueron usadas como control, otras tres para el tratamiento de TFDa con AM al 3%, otras tres para el tratamiento con AM al 5% y finalmente otras 3 muestras para el tratamiento de con AM al 10%.

Para cultivar las muestras de hongos empleadas en estos experimentos se preparó medio de cultivo de papa dextrosa y agar (PDA) disolviendo 19 g de agar en 500 mL de agua de acuerdo con la formulación del fabricante BD Bioxon®. El mezclado de la disolución con el medio PDA se llevó a cabo en una placa de agitación y calentamiento a 85 °C y 400 rpm durante 10 min, para después esterilizar la disolución en una autoclave a 15 psi y 121°C durante 15 min. La disolución con medio PDA fue vaciada en 48 cajas Petri estériles de 100x15 mm que se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego, se procedió a sembrar doce inóculos de cada hongo fitopatógeno en el mismo número de cajas Petri usando una campana de flujo laminar. Estos inóculos fueron incubados a 30 °C durante 4 días para que los micelios se desarrollaran y adquirieran un tamaño inicial, Figura 1.

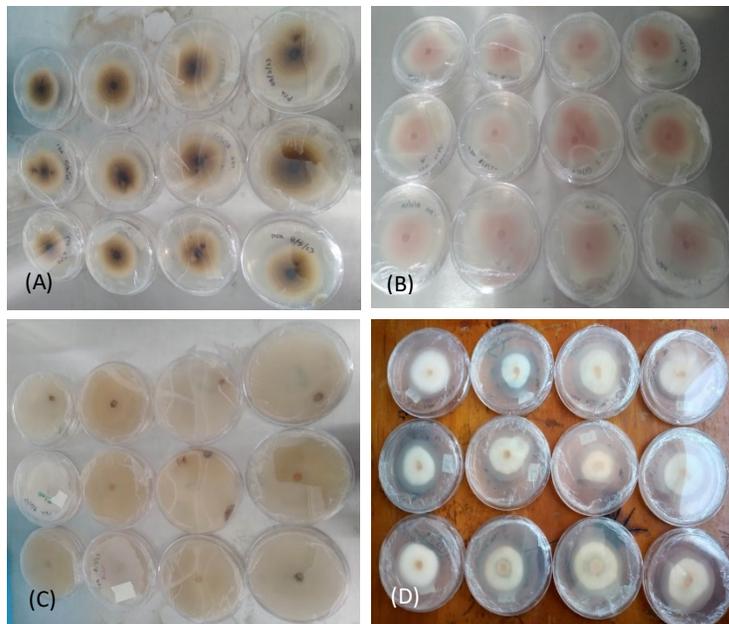


Figura 1. Cajas Petri con muestras de (A) *Alternaria* sp., (B) *Fusarium* sp., (C) *Rizoctonia* sp. y (D) *Colletotrichum* sp.  
Fuente: Elaboración propia.

Después de los primeros cuatro días de crecimiento inicial se midió el diámetro del micelio de las muestras. De las doce muestras de cada hongo, tres muestras fueron usadas como control, otras tres fueron asperjadas por única ocasión con 0.5 mL de AM al 3% (Chaparro *et al.*, 2019), otras tres muestras fueron asperjadas con AM al 5% y finalmente otras 3 muestras fueron rociadas con AM al 10%, Figura 2. Este procedimiento se repitió para las cuatro cepas de hongos seleccionadas para estos experimentos.



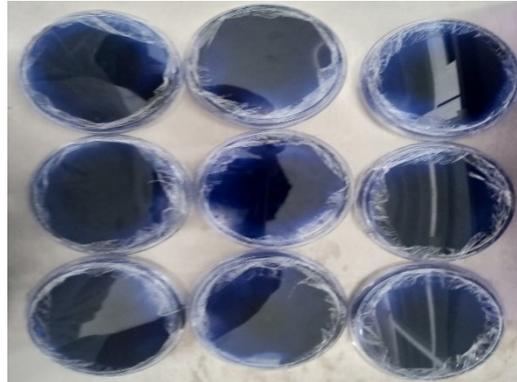


Figura 2. Cajas Petri con muestras de hongos rociados con azul de metileno.  
Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, todas las muestras de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Rizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp. fueron irradiadas con luz blanca artificial dentro de un contenedor en el que había una iluminancia de 4600 lx. Cada día, las muestras fueron irradiadas por periodos de 12 horas, seguidos de otras 12 horas de oscuridad. La irradiación de las muestras de hongos se prolongó durante 6 días y diariamente se midió el diámetro del micelio de las muestras para evaluar su crecimiento. Como los experimentos fueron realizados por triplicado, se calculó el diámetro promedio del micelio de las muestras a las que les fue aplicado el mismo tratamiento de terapia fotodinámica antimicrobiana.

## Resultados

Los resultados del diámetro promedio diario de los hongos de control y los tratados con TFDa se muestran en la Figura 3. En todos los casos se observó una disminución en la tasa de crecimiento de los hongos tratados con TFDa en comparación con las muestras de control, ya que en las cuatro cepas y para las tres concentraciones de AM se observó que las muestras tratadas con TFDa crecieron más lentamente que las muestras de control desde el día en que iniciaron los tratamientos. De hecho, los hongos dejaron de crecer después de un periodo de 3 a 6 días de ser tratados con TFDa. Además, se observó que el periodo para alcanzar la inactivación es dependiente de la concentración del fotosensibilizador. Por ejemplo, en los tratamientos con TFDa y AM al 10% se requirieron de 3 a 4 días para inactivar a los hongos; mientras que los tratamientos con AM al 3% requirieron de 5 a 6 días para lograr el mismo efecto.

Con los datos de las gráficas en la Figura 3 se obtuvieron las ecuaciones características de crecimiento de los hongos a través de la linealización de la cinética de Monod con el propósito de determinar la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y evaluar la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos tratados con TFDa. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) está definida por la Ec. 1,

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_s+S} \quad \text{Ec. 1}$$

donde S es la concentración del sustrato y  $K_s$  la constante de media velocidad. La Ec. 1 también puede linealizarse como se muestra en la Ec. 2.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max} \cdot S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad \text{Ec. 2}$$

Esta última ecuación puede interpretarse como una función lineal cuya ordenada al origen ( $b$ ) es  $1/\mu_{max}$  de acuerdo con la Ec. 3.

$$\mu_{max} = \frac{1}{b} \quad \text{Ec. 3}$$

Los resultados de la determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento de las muestras de hongos se muestran en la Tabla 1.



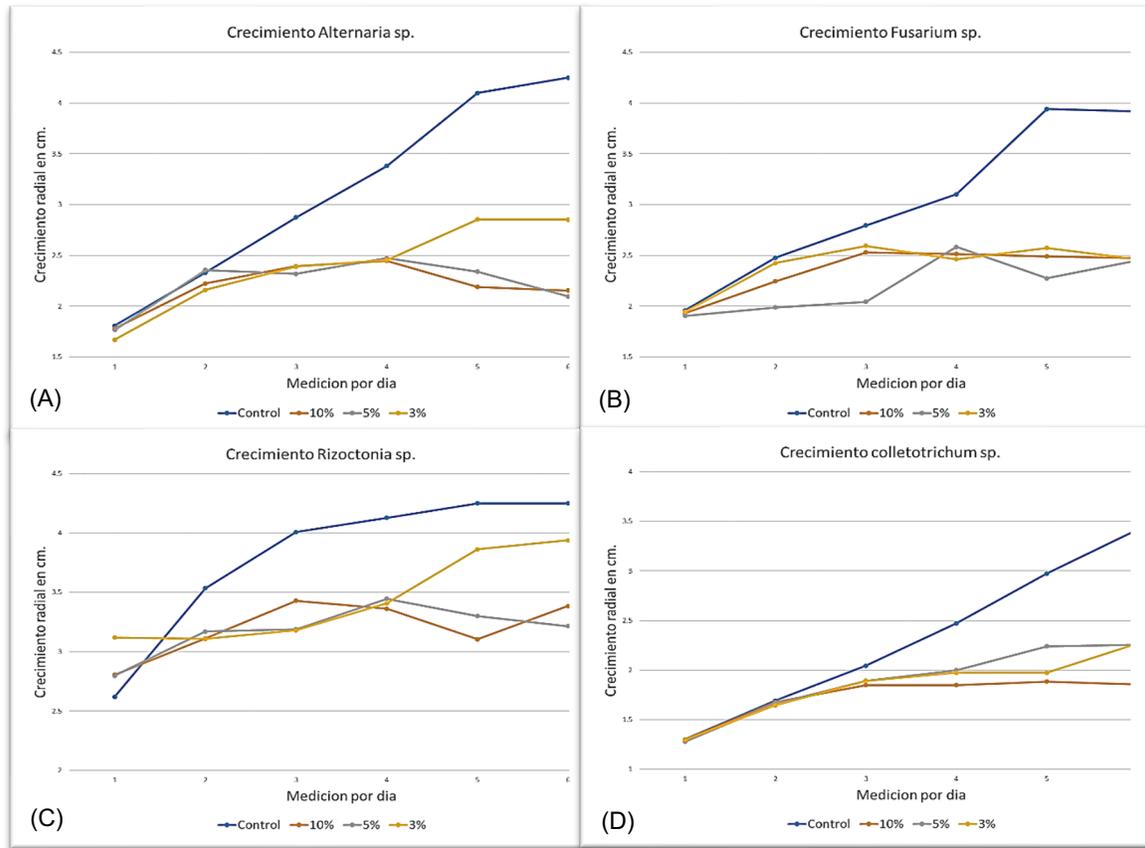


Figura 3. Diámetro promedio de muestras de hongos (A) *Alternaria sp.*, (B) *Fusarium sp.*, (C) *Rizoctonia sp.* y (D) *Colletotrichum* tratados con Terapia Fotodinámica antimicrobiana y azul de metileno al 3%, 5% y 10%.  
 Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 1.** Velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) para los hongos *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Rizoctonia sp.* y *Colletotrichum sp.* tratados con TFDa y azul de metileno.

Tratamiento	<i>Alternaria sp.</i>		<i>Fusarium sp.</i>		<i>Rizoctonia sp.</i>		<i>Colletotrichum sp.</i>	
	$\mu_{max}$ (cm/h)	Disminución (%)	$\mu_{max}$ (cm/h)	Disminución (%)	$\mu_{max}$ (cm/h)	Disminución (%)	$\mu_{max}$ (cm/h)	Disminución (%)
Control	0.76	---	0.6	---	0.36	---	1.20	---
TFDa con AM al 10%	0.50	34.4	0.5	21.6	0.35	5.6	0.72	40.4
TFDa con AM al 5%	0.49	35.5	0.6	11.7	0.34	5.4	0.82	31.7
TFDa con AM al 3%	0.63	16.9	0.5	25.3	0.06	0.8	0.80	33.4

Los resultados indican que los hongos tratados con TFDa y AM redujeron su  $\mu_{max}$ , y eventualmente dejaron de crecer, confirmando el efecto inhibitorio de los tratamientos.  
 Fuente: Elaboración propia.



## Conclusiones

La terapia fotodinámica antimicrobiana demostró tener efecto inhibitorio sobre los hongos *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Rizoctonia* sp. al detener su crecimiento en 3 días usando azul de metileno al 10%; mientras que en *Colletotrichum* sp. se necesitaron 5 días. También se encontró que el efecto inhibitorio de estos tratamientos antifúngicos es dependiente de la concentración del fotosensibilizante, ya que a mayor concentración hay mayor disminución en la velocidad máxima de crecimiento de los hongos, con excepción de *Fusarium* sp. Así pues, la terapia fotodinámica con el fotosensibilizador adecuado es una alternativa viable para el control de los hongos fitopatógenos con las ventajas de ser más selectiva que los tratamientos convencionales y de evitar la resistencia de los microorganismos.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra por el apoyo otorgado a este proyecto.

## Referencias

- Chaparro C. V., Cabanzo R. & Ospino E. M. (2014). Estudio de la adsorción de azul de metileno sobre óxido de grafeno. *Revista Colombiana de Materiales*, 5, 131-139. <https://doi.org/10.17533/udea.rcm.19442>
- Gilaberte Y., Paz-Cristobal M. P., Rezusta A. & Aspiroz C. (2012). Antimicrobial photodynamic therapy in dermatology. *Elsevier España* 27(5), 274–282. <https://doi.org/10.1039/B407622B>
- Lifeder (2019). Azul de metileno: características, preparación, usos. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/azul-de-metileno/>.
- Marioni J. (2017). Compuestos naturales fotosensibilizantes como potenciales agentes antifúngicos sobre biofilms. Tesis de doctorado en ciencias químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. <http://hdl.handle.net/11086/15506>
- Moreno Arias. G. A, Eng Luna A., Alvarado Delgadillo A. & Camps-Fresneda, A. (2007) Terapia fotodinámica. *Med. Cutan ibero-lat.-am.* 35(6), 255-268. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2007/mc076b.pdf>

