

EFFECTO DE PELÍCULAS AGRÍCOLAS ACTIVAS CON ANTIMICROBIANOS BASE NANOTECNOLOGÍA CONTRA EL CRECIMIENTO DE HONGOS Y ALGAS

Ángel Vargas- Ramírez¹, Miguel A. Waldo-Mendoza¹, Erika A. Rivera-Paz¹
Jorge Olivera-Martínez², M.A. González-Lozano³, Zoe V. Jurado-Quñones^{1,*}

¹ Innovación y Desarrollo en Materiales Avanzados A. C., Grupo POLYnnova, Carr. San Luis Potosí-Guadalajara 1510, Nivel 3, Local 12, Lomas del Tecnológico, San Luis Potosí, S.L.P., México. C.P. 78211.

² A. Schulman de México SA de CV, Av. CFE 730, Zona. Industrial del Potosí, San Luis Potosí, S.L.P., México, C.P. 78090.

³ Departamento de Ciencia de Materiales, Facultad de Ciencias Químicas, UJED, Avenida Veterinaria S/N

* E-mail: zoe.vineth@schulman.com

RESUMEN

Las películas agrícolas activas con aditivos antimicrobianos están diseñadas para controlar la proliferación de microorganismos que invaden la superficie, por ejemplo; el crecimiento de algas y hongos, así mismo, al ser estos microorganismos fuentes de alimento para las moscas y mosquitos, también se ayuda a prevenir la contaminación del cultivo derivada de la transmisión de agentes patógenos.

La principal contribución de este trabajo fue entender el efecto de aditivos antimicrobianos basados en nanopartículas de plata metálica sobre la inhibición de algas y el efecto complementario fungistático con el uso de iones de cinc. Las pruebas microbiológicas del alga *Chlamydomonas reinhardtii* se reportan como el porcentaje de inhibición, haciendo una comparación entre el resultado obtenido de una película sin aditivo antimicrobiano contra 4 diferentes películas antimicrobianas activas. La determinación de la resistencia de la superficie de película agrícola al crecimiento de hongo fue evaluada basados la norma ASTM G-21.

Las películas denominadas en referencia al masterbatch antimicrobiano comercial empleado, como; POLYBATCH PNOVA L (activo plata), POLYBATCH PNOVA SZ (activo plata), POLYBATCH PNOVA AZ (activo plata y cinc), y POLYBATCH PNOVA SZ FUN (activo plata y cinc), presentaron los siguientes resultados: Todas las películas con el antimicrobiano mantienen una resistencia mecánica a la tensión – elongación cercana al valor de la película testigo. Al tratar las películas a envejecimiento acelerado en una cámara QUV, a las 1200 h las películas con el activo plata y cinc, también conservaron una estabilidad estructural similar a la película testigo. Finalmente, al evaluar el porcentaje retenido de elongación en las películas envejecidas a 2400 h observamos que no ocurre una afectación de las propiedades mecánicas mayor al 50%, siendo la película agrícola PNOVA AZ la que presentó mayor degradación, correspondiente al 64.69%.

La evaluación del crecimiento del alga mostro una inhibición del 99.3% con la película PNOVA L y 98.8% con PNOVA SZ. Adicionalmente las películas activadas con cinc no presentaron crecimiento de hongos, mientras que película testigo mostro presencia de hongos a la 4 semana del tratamiento.

INTRODUCCIÓN

Durante años, el hombre ha tratado de proporcionar algún método con el cual se pueda proveer alimentos derivados de la tierra, sin que éstos fueran afectados por las condiciones ambientales, esto lo llevó a crear la plasticultura que conocemos hoy en día. La plasticultura, no es otra cosa más que modificar el ambiente mediante películas plásticas, estructuradas de tal forma que confinan un espacio con un clima apropiado para el

óptimo desarrollo de una plantación. Adicionalmente con el uso de la plasticultura también se puede proteger de algunos insectos y enfermedades causadas por microorganismos.

Por ejemplo, el consumo mundial de plástico para película invernadero hoy rebasa las 5 millones de toneladas [1], y estas películas plásticas han dejado de ser una simple cubierta tradicional siendo ahora un elemento tecnológico, diferenciado según la zona climática donde son requeridas. Ya que ahora las características de éste elemento deben cumplir con las exigencias del mercado y ser capaces de ajustarse a los cambios climáticos extremos, optimizar las condiciones de proceso, alargar la estación para el crecimiento, reducir enfermedades en las patatas, entre otras.

Como se mencionó, dentro de una película agrícola se pueden controlar las condiciones de crecimiento de los cultivos y ser de alguna manera un especie inocuo. Sin embargo, dependiendo de la región, las películas agrícolas pueden contaminarse con microorganismos como bacterias, líquenes, hongos, pero en definitiva el alga es uno de los más comunes a encontrar sobre la superficie invernadero en condiciones de mucha humedad [2].

El alga, es un microorganismo eucarionte de naturaleza vegetal frecuentemente encontrado en agua o en ambientes con un alto contenido de humedad y que es capaz de realizar el proceso de fotosíntesis como lo hacen las plantas, ya que dicho microorganismos tiene dentro clorofila, que ayuda a convertir la energía solar en energía química. Su pared celular está compuesta por celulosa y/o xilosa o manosa y en ciertas ocasiones quitina. El problema más relevante que se atribuye al crecimiento de este microorganismo, es sobre todo, para los plásticos agrícolas invernadero, ya que se depositan en la superficie y obstruyen la entrada de luz solar impidiendo que los cultivos realicen una gama de procesos relacionados con la fotosíntesis, balance energético, entre otros.

Otro microorganismo que puede interferir en el óptimo funcionamiento de una película agrícola, es el moho [3]. El moho es un tipo de hongo filamentoso eucarionte heterótrofos que crece en la superficie de diversos objetos. Se caracterizan por tener un aspecto algodonoso, su pared es de consistencia rígida y compuesta principalmente de hemicelulosa y quitina, contando además con una membrana que rodea el protoplasma. Son capaces de crecer longitudinalmente y ramificarse, siendo la mayoría de ellos sin color viéndolos al microscopio, pero vistas en conjunto se observan blancas y con ligeros tonos de color. Algunos otros poseen pigmento pardo oscuro. También interfieren con la entrada de luz y adicionalmente por la excreción de algunos de sus metabolitos fomentan la degradación de la misma película [2,4].

Hoy, se ha tratado de implementar diferentes estrategias para impedir el crecimiento de estos y otros microorganismos en diferentes superficies. Una excelente opción es el uso de partículas con dimensión nanométrica, ya que abarcan una gran superficie con poca cantidad y no interfieren en propiedades ópticas.

Se han estudiado que las nanopartículas de CuO, ZnO, TiO₂, Ag, CeO₂ y SiO₂, tienen gran efectividad contra el crecimiento de microorganismos, por lo que muchos de los nuevos materiales aplicados a tecnologías agrícolas llevan embebidas nanopartículas de este tipo. No obstante, no todas las nanopartículas son efectivas en el mismo porcentaje de inhibición para todos los microorganismos [5]. Por ejemplo, algunos tipos de hongo son más susceptibles a las nanopartículas de óxido de zinc. De la misma manera nanopartículas de plata presentan capacidad antimicrobiana selectiva, este ion metálico es liberado interfiriendo con la permeabilidad de la membrana e inhibiendo algunas reacciones metabólicas [6].

Se sabe que la plata se ha utilizado desde tiempos remotos para inhibir el crecimiento microbiano y cuenta con una gran toxicidad para con los microorganismos y una baja para las células de mamífero [7]. El mecanismo de acción va desde daños superficiales, como la interferencia de la respiración celular, la permeabilidad de la

membrana hasta daños internos como la degradación en DNA [8]. También se ha reportado que las nanopartículas de plata generan radicales libres en los microorganismos, inhibiendo las funciones celulares, generando así estrés oxidativo [9]. Otro efecto inhibitorio ocurre por la posible liberación de iones metálicos sobre la superficie de la célula [6].

MATERIALES Y MÉTODOS

Fabricación de películas

Se fabricaron 4 películas plásticas con los antimicrobianos POLYBATCH PNOVA L (activo plata), POLYBATCH PNOVA SZ (activo plata), POLYBATCH PNOVA AZ (activo plata y cinc), y POLYBATCH PNOVA SZ FUN (activo plata y cinc). Los compuestos bases plata fueron usados a una concentración de 300 ppm y los fúngicos fueron complementados con 600 ppm (PNOVA SZ FUN) y 900 ppm (PNOVA AZ) de activo base zinc, también se fabricó una película testigo. Se usó resina de polietileno de baja densidad (LDPE) típicamente utilizado para fabricación de películas plásticas (MFI = 2.0). Todas las películas plásticas tienen un espesor de 1 milésima de pulgada, y además se les adicionó un aditivo anti UV (HALS) requerido para películas plásticas de aplicación agrícola.

Se usó una máquina piloto de extrusión Cast Film (COD 05CF), bajo un perfil de temperatura de 170°– 190°C, de acuerdo a la metodología interna del laboratorio (MO-058-08) de la empresa A. Schulman de México (certificado en A2LA).

Para verificar el efecto del uso del aditivo antimicrobiano en la estabilidad mecánica y el grado de envejecimiento (degradación) de las películas, se realizaron pruebas mecánicas de pérdida de Tensión y Elongación, antes y después de la exposición en cámara QUV, de acuerdo a la metodología ASTM D882, usando un equipo Instron con celda de carga de 100 N, modelo 4467. El tratamiento de envejecimiento acelerado se realizó en una cámara Weathermetro QUV modelo QUV/SE irradiando con un ciclo de exposición de 8 h UV y 4 h de condensación a una temperatura de 60°C, bajo la norma ASTM G154-12. La fuente de radiación de luz ultravioleta se originó usando una lámpara UVA-340 con una potencia de Irradiación= 0.89 W/ m²/nm, el estudio se prolongó hasta las 2400 horas.

Determinación de susceptibilidad anti-hongo

El crecimiento de los hongos se evaluó bajo la metodología indicada en la norma ASTM G-21. Las muestras fueron puestas en una superficie de nutrientes de sales de agar (preparación de acuerdo a la norma), y posteriormente esparcidas con una mezcla de una suspensión de 5 tipos de hongos: *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* y *Aureobasidium pullulans*. Los micronutrientes presentes en el agar proveen todos los elementos necesarios para su crecimiento de las especies fúngicas durante 74 días (28 – 30°C; > 85% humedad relativa), que es el tiempo durante el cual se lleva a cabo la incubación y la evaluación del crecimiento de hongos. La prueba se lleva a cabo por triplicado.

Inhibición del alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Se hizo un pre-inoculo de *C. reinhardtii* en 1 L de medio HSM. El cultivo se incubó en una cámara de luminiscencia a 23 °C. El cultivo fue aireado continuamente para obtener una concentración constante de CO₂ en el medio de cultivo.

La película fue cortada en cuadros de 5x5 y colocadas dentro de cajas Petri, previamente esterilizadas. Luego fueron inoculadas con 5 µL del pre-inoculo y 10 mL de medio de cultivo, por ultimo fueron encubadas en la

cámara de luminiscencia por 7 días, tomando muestra del crecimiento cada semana. Este experimento se realizó por triplicado con cada una de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas mecánicas

Todas las películas con el antimicrobiano mantienen una resistencia mecánica a la tensión – elongación cercana al valor de la película testigo.

Posteriormente se realizaron pruebas de tensión-elongación sobre las películas plásticas tratadas en condiciones de intemperismo acelerado para determinar el tiempo en el cual se conserva la estabilidad estructural de la película agrícola, ya que se considera que cuando la película ha perdido más del 50% de la tensión-elongación original, ésta está degradada y es inadecuada para que continúe su funcionalidad en el campo. En referencia a las condiciones de envejecimiento aplicadas en laboratorio se hace la siguiente analogía para las condiciones de degradación en campo (100 h laboratorio = 1 mes en campo).

En la Figura 1 podemos ver que con el tratamiento de envejecimiento a las 1200 h las películas con el activo plata y cinc también conservaron una estabilidad estructural similar a la película testigo.

Finalmente, al evaluar el porcentaje retenido de elongación en las películas envejecidas a 2400 h observamos que no ocurre una afectación de las propiedades mecánicas mayor al 50%, siendo la película agrícola PNOVA AZ la que presentó mayor degradación, correspondiente al 64.69%.

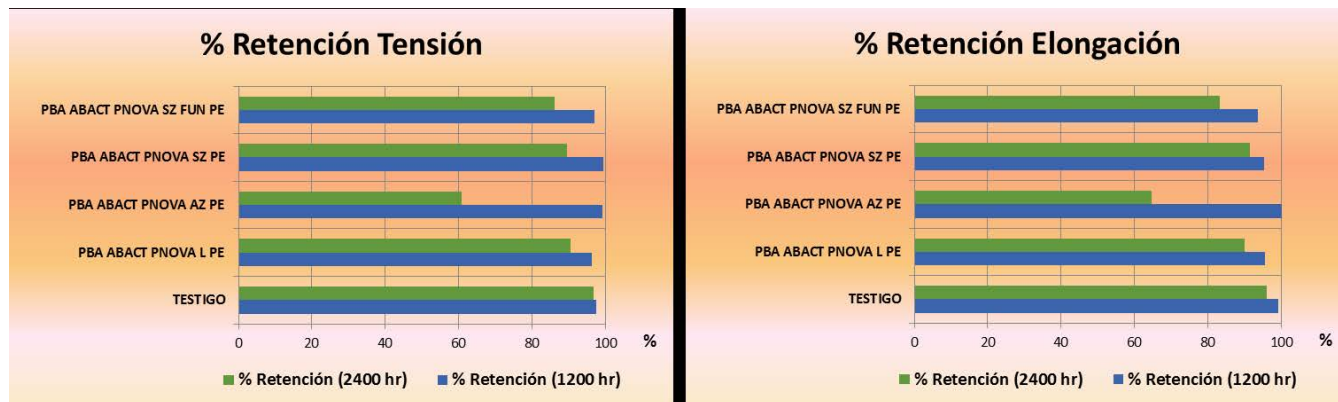


Figura 1. Resistencia mecánica en tensión-elongación de las películas agrícolas con espesor de 1 milésima de pulgada, con y sin los aditivos antimicrobianos.

Pruebas microbiológicas

La Tabla 1 nos indica el porcentaje de inhibición en el crecimiento de alga *C. reinhardtii* por efecto del contacto de películas, donde el activo plata es de naturaleza metálica y ésta se mantiene unida a dos tipos de sustratos cerámicos. Las películas mostraron alta efectividad contra el alga *C. reinhardtii*, siendo la película PNOVA L la que mostro el más alto porcentaje de inhibición (99.3%).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de alga *C. reinhardtii*

Película	Activo antimicrobiano	Concentración del aditivo	Porcentaje de inhibición
Película Testigo	Sin activo	-	-
PNOVA L	Plata	300 ppm	99.3%
PNOVA SZ	Plata	300 ppm	98.8%

Se ha demostrado que aditivos antimicrobianos base plata tienen un buen efecto en la inhibición de las bacterias y, que existen factores que pueden influir en su inhibición, por ejemplo; un factor es la diferencia de la pared celular, ya que las Gram positivas tienen un contenido de peptidoglicano (pared celular ~ 30-80 nm) y es mayor que las clasificadas como Gram negativa [10], y por esta razón existe una inhibición mayor por parte de la plata contra bacterias Gram negativas, ya que algunos iones liberados de la plata hacen daño a ciertas funciones metabólicas en la célula. En el caso de las algas, estas han sido menos estudiadas, sin embargo nosotros suponemos que son susceptibles a inhibirse similar a las bacterias, esto por tener estructuras biológicas similares. Los mecanismos relacionados con la inhibición microbiana de algunos metales ya sea en forma micro o nano, no ha sido esclarecida completamente, ya que los reportes que hoy en día se tienen mencionan mecanismos como el estrés oxidativo, la liberación de iones de algunos metales, entre ellos la plata, que afectan reacciones dentro y fuera de la célula, etc.

Por otro lado, los hongos tienen una pared formada por quitina, polipéptidos y polisacáridos complejos, en total el espesor de la pared consiste de 100 a 200 nm que tiene como función dar protección, transporte e inmunogenicidad a la célula. Esto hace que la célula fúngica sea estructuralmente más fuerte que la bacteria y el alga, diciendo esto, podemos asumir que el paso de los iones plata hacia dentro de la célula fúngica es más difícil, pudiendo afectar estructuras externas de la misma, pero sin detener en gran medida el crecimiento de ésta.

En la evaluación del crecimiento del hongo a partir de las 2 semanas del estudio, se observó una invasión mayor al 60% de contaminación en la superficie del material tomado como control (papel filtro). En el caso de la película agrícola identificada como Testigo, ésta a partir de las 4 semanas presentó solo trazas del crecimiento de hongos, aproximadamente menor al 10% de la cubierta, mientras que las películas PNOVA AZ y PNOVA SZ FUN mostraron resistencia al crecimiento a lo largo de la evaluación (12 semanas).

El cinc se ha utilizado desde años atrás por sus excelentes propiedades antisépticas. En microbiología se ha reportado que los óxidos metálicos en presencia de medios acuosos pueden liberar iones que no tienen un efecto sobre ácidos nucleicos y que este óxido no tiene efectos dañinos hacia células de mamífero, debido a su baja solubilidad. También se sabe que para que un hongo filamentoso pueda crecer sobre una superficie, el medio ambiente en el que se encuentre debe ser el óptimo, y una condición obligada es el contenido de humedad del medio. Por lo tanto, en presencia de humedad, la proliferación de hongos se puede dar, pero puede controlarse con la presencia de óxido de cinc por la liberación de iones. Adicionalmente, inhibe bacterias que son fuente de carbono (materia orgánica) que puede servir de alimento para los hongos.

CONCLUSIONES

Se demostró que las películas plásticas con los antimicrobianos POLYBATCH PNOVA L (activo plata), POLYBATCH PNOVA SZ (activo plata) presentaron buen desempeño en la inhibición del crecimiento de algas y

adicionalmente las películas POLYBATCH PNOVA AZ (activo plata y cinc), y POLYBATCH PNOVA SZ FUN (activo plata y cinc) también favorecen la inhibición del crecimiento de hongos.

El activo antimicrobiano no presentó afectación de la resistencia mecánica en tensión- elongación de las películas estudiadas. En condiciones de envejecimiento acelerado la degradación fue similar a la de la película agrícola sin antimicrobiano y únicamente aditivada con estabilizador de luz UV, por lo que se demostró que los antimicrobianos no fueron reactivos contra los estabilizadores de luz UV. Las películas envejecidas a 2400 h fueron las que ligeramente presentaron una disminución en su resistencia mecánica, sin embargo no ocurre una afectación mayor al 50% de la tensión-elongación original, lo cual cumple con la consideración de que el plástico agrícola es adecuado para que continúe su funcionalidad en el campo.

Debido a las condiciones ambientales que generan proliferación de algas y hongos, el uso de los productos POLYBATCH PNOVA antimicrobianos pueden ser útiles para aplicaciones agrícolas como: película invernadero, post-cosecha, túnel, acolchado, malla, tubería, accesorios para tutoreo.

Específicamente vemos de mayor interés el uso de estos compuestos en película invernadero, principalmente porque evita la acumulación de materia orgánica que afecta paso de luz necesario para la fotosíntesis del cultivo, sin afectar otras propiedades críticas (ópticas y mecánicas) que obliguen a reemplazar el plástico antes del período destinado (2-3 años).

LITERATURA CITADA

- Pérez, J.P.G. La industria del plástico en México y el mundo. Comercio exterior 64, 6 - 9 (2014).
- INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA (2a ed.). (Euned).
- Luna Pabello, D.V. Manual de practicas basicas para el estudio de la microbiologia ambiental de agua y suelo. (Universidad Nacional Autonoma de Mexico - Facultad de química.; 2011).
- Enrique, E. Materiales de cubierta para invernaderos. Cuadernos de estudios agroalimentarios, 71-88p (2012).
- Ren, G. et al. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. International journal of antimicrobial agents 33, 587-590 (2009).
- Panagiotis Dallas, V.K.S., Radek Zboril Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic phas, applications, and perspectives. Advances in Colloid and Interface Science 166, 119-135 (2011).
- Yen, H.-J., Hsu, S.-H. & Tsai, C.-L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. Small 5, 1553-1561 (2009).
- Bishara S. Atiyeh, M.C., Shady N. Hayek, Saad A. Dido Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. Burns 33, 139-148 (2007).
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F.o. & Popovic, R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. Ecotoxicology and Environmental Safety 78, 80-85.
- Jiménez S. Alfonso., Genética molecular bacteriana. Biología fundamental. Volumen 7. Reverte (1982).