

SOLICITUD DE PATENTE NC2016/0001633

TITULO: MÉTODO PARA EL CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA MARCHITEZ BACTERIANA EN PLÁTANO EMPLEANDO UN COLOIDE-CATION DE PLATA

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención:

La invención concierne al campo de la agricultura. En particular, la invención se refiere a una suspensión de cationes de plata que elimina la marchitez bacteriana producida por *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de plátano y el mal de panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano. Asimismo, la invención se refiere al producto y al método de producción.

Estado de la técnica anterior

En las últimas décadas en Colombia la bacteria *Ralstonia solanacearum* y el hongo *Fusarium oxysporum* han infectado gran parte de la zona productora de plátano y banano, debido a la fácil propagación de estos microorganismos, que son considerados fitopatógenos altamente agresivos; lo que representa un problema económico y social (Hayward 1995; Castañeda *et al* 2005).

Uno de los métodos que han sido utilizados anteriormente para tratar de controlar esta enfermedad ha sido la aplicación de glifosato en las plantas enfermas, después se cubre la planta fumigada con un plástico transparente con filtro UV; esto provoca la muerte de la planta y de la bacteria (Patricio *et al* 2005), pero no es conveniente para la producción por el efecto que tiene sobre el suelo. Otro

método utilizado es el uso de lixiviado del compost de plátano que se produce de forma económica en las fincas y se puede utilizar como bioplaguicida en 75 días, pero no se ha demostrado que sea efectivo (Toomey 2004). Para contrarrestar el efecto de estas enfermedades también se han utilizado técnicas que hacen uso de formaldehidos, sales y otros para desinfectar de forma rápida los suelos y se usan insecticidas para el control de transmisores (DIRECCIÓN NACIONAL DE MEDIO AMBIENTE, 2002). Estas prácticas no son eficaces para la erradicación de estas enfermedades y no son rentables para la producción agrícola.

Otras estrategias de manejo y mitigación de daños de estas enfermedades consisten en la utilización de material semilla sano, detección a edades tempranas, erradicación de todas las plantas ubicadas en un radio de 5 a 10 m a partir del foco inicial y cuarentena durante al menos seis meses (Belalcazar&Merchan, 1991; Álvarez *et al* 2008), lo que tampoco es rentable para la producción agrícola.

En general, el control de estas enfermedades es limitado debido a la falta de tecnologías efectivas de manejo. Los únicos mecanismos de control a disposición de los agricultores son el uso de semilla limpia, desinfección de calzado y herramientas en el momento del deshoje, erradicación de plantas con síntomas de la enfermedad y marcación de los sitios afectados. Todos ellos recomendados por instituciones como el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) y el CIAT (Mesa y Triviño, 2007).

El uso de nanopartículas (NPs) para la mejoría de semillas y plantas es una práctica con la que se han obtenido resultados positivos, como los presentados por Elikagaienet *al* (2012), que muestran el potencial de los nanomateriales en la mejora de la germinación de semillas y crecimiento, así como en la protección de plantas, en la detección de patógenos y en la detección de residuos de pesticidas y herbicidas.

Por ejemplo, Morones *et al* (2005) reportó cambios morfológicos y estructurales de bacterias después de ser tratadas con compuestos de plata. En las micrografías que presenta, se muestran los daños a la membrana celular y a algunos elementos del citoplasma. No se ha podido determinar si la plata tiene uno o varios blancos de ataque; sin embargo, se piensa que su alta reactividad con compuestos de azufre hace que reaccione con enzimas, que contienen éste elemento y que se ubican en la membrana, responsable de la respiración y del control de intercambio de materiales. En la reacción, la membrana pierde permeabilidad, la bacteria deja de respirar y muere.

Por otro lado Zhenget *al* (2005) estudió los efectos de NPs de TiO_2 sobre el crecimiento de semillas de espinaca. Este autor informó que las semillas tratadas con estas NPs produjeron plantas que tenían un 73 % más de peso en seco, tres veces mayor tasa fotosintética y aumento del 45 % en la formación de Clorofila, en comparación con un grupo control.

Por su parte Lin y Xing (2007) evaluaron la fitotoxicidad de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y nanomateriales de óxido de Al_2O_3 , ZnO, Al y Zn y su impacto en las tasas de germinación en rábano, canola, raigrás, lechuga, maíz y pepino. Ellos encontraron que las concentraciones más altas (2000 mg/L) de tamaño nanométrico de Zn (35 nm) y ZnO (20 nm) inhiben la germinación en raigrás y maíz, respectivamente, afectando significativamente la elongación de las raíces. Así mismo, Sudheer *et al* (2011) valoró la inhibición del crecimiento de cinco diferentes tipos de bacterias por la acción de NPs de plata.

Descripción de la invención

Se trata de un producto para uso agrícola únicamente. En particular, la invención se refiere a una suspensión de cationes de plata, obtenida por un método electroquímico. Este coloide-cación de plata contribuye a incrementar los rendimientos productivos, ya que elimina la marchitez bacteriana producida por *R. solanacearum* en el cultivo de plátano y el mal de panamá causado por el hongo

F. oxysporum en el cultivo de banano. Este texto se refiere al producto y al método de producción.

Aunque hay estudios como el de Khaydaron *et al* (2009), sobre un método electroquímico para la fabricación de NPs de plata suspendidas en agua, de tamaños entre 2 y 20 nm de diámetro, tanto los parámetros de crecimiento como el comportamiento de las variables reportadas por estos autores son diferentes a los descritos en el presente documento.

Si bien se han utilizado suspensiones de NPs de plata sintetizadas por reducción química para atacar la bacteria *R. solanacearum*, como lo reporta Chen *et al* (2016), tanto las características de la solución, como la forma de aplicación y las plantas tratadas son diferentes a las referidas en este escrito. Mientras que el citado estudio se hizo con plantas de tabaco, cultivadas en materas y expuestas a este microorganismo, el producto coloide-cación plata fue probado directamente sobre la bacteria y sobre el hongo en condiciones de laboratorio y en campo sobre cultivos de plátano y banano infectados con *R. solanacearum* y *F. oxysporum*, respectivamente.

La aplicación que reportan estos autores involucra el rociado de la raíz de las plantas con una suspensión en agua de NPs de tamaño entre 10 y 100 nm, con adición de un agente surfactante o tensoactivo (polisorbato 80). Esto difiere del procedimiento de aplicación del coloide-cación de plata, en que el producto, también en forma de suspensión, se aplica con jeringa sobre el tallo de las plantas. En este caso las NPs de Ag (crecidas por el método electroquímico descrito), de tamaño entre 14 y 24 nm (Figura 1), están suspendidas en agua destilada sin el uso de tensoactivos.

El equipo usado para la fabricación del producto en cuestión incluye un par de electrodos, un ánodo y un cátodo de plata (99.9% de pureza) que se conectan a una fuente de voltaje continua; éstos se sumergen en un medio líquido (agua destilada) que se mantiene a una temperatura entre 80 y 90 °C. La suspensión del “coloide – cación de plata” en el agua se genera mediante la aplicación de una corriente eléctrica continua, de comportamiento diferente al descrito en el artículo de Khaydaron *et al*, en el que se alcanza una corriente de saturación cambiando la

polarización de los electrodos. En nuestra descripción, entre el ánodo y el cátodo se mantiene una diferencia de potencial de entre 5 y 25 Voltios; esto hace que los electrodos se desgasten ligeramente por el desprendimiento de NPs de plata. A partir de la ley de Faraday, con la corriente que pasa a través de los electrodos puede determinarse la cantidad de partículas de plata producidas. De esta forma se puede determinar la concentración de estas NPs en función del voltaje empleado, de acuerdo con el volumen del medio líquido que se está utilizando.

En resumen, cabe destacar las siguientes diferencias:

- La síntesis de coloide-catión plata se hace a través de un método electroquímico, utilizando una fuente que suministra una diferencia de potencial constante entre los electrodos, (figura 2).
- La suspensión de NPs de plata no requiere de un tensoactivo.
- La aplicación se hace por inyección del coloide-catión plata sobre cada planta infectada y los efectos se probaron en plantaciones de plátano y de banano afectadas por la bacteria *R. solanacearum* o por el hongo *F. oxysporum*, respectivamente.
- No se presenta resistencia bacteriana al producto.

Mejor manera de ejecutar la invención

Para sintetizar el coloide – catión de plata se usa un proceso electroquímico mediante la aplicación de un voltaje DC de 5 a 25 V entre dos electrodos de plata, inmerso en un recipiente con agua destilada. Con este procedimiento se alcanza una concentración de plata en suspensión en el rango de 15-25 ppm.

El espectro germicida de la plata es específico para algunas bacterias, hongos y virus. La aplicación de la suspensión del coloide – catión de plata, generado por el proceso electroquímico, descrito en la presente solicitud de invención, es útil para contrarrestar la enfermedad de la marchitez bacteriana en plantas de plátano y el

mal de panamá, ya que elimina, erradica o inactiva la bacteria *R. solanacearum* y el hongo *F. oxysporum*.

La aplicación de la suspensión del coloide-cación de plata es eficaz para contrarrestar la infección provocada por la bacteria o el hongo en plantas de plátano o banano; evita la destrucción de la planta y lleva a la restauración de su estado funcional sin que se presente resistencia bacteriana, como sucede con los antibióticos.

El tratamiento con la suspensión de plata de plantas infectadas por la bacteria *R. solanacearum* o por el hongo *F. oxysporum* se hace aplicando el producto directamente en los haces vasculares de la planta con una jeringa. El efecto es de reducción del número de organismos patógenos que atacan a la planta, con lo que se conserva la planta viva y se permite un crecimiento vegetativo normal.

La aplicación de la suspensión de NPs de plata de concentración entre 10 y 20 ppm, se hace inyectando las plantas en horas de la mañana de acuerdo con los horarios normales de riego. Se inyectan tres dosis de 5 a 10 cm³ por cada planta infestada o con presencia de la marchitez bacteriana o mal de panamá; esto se hace en 3 partes diferentes del pseudotallo, de abajo hacia arriba. En total se habrán inyectado entre 15 y 30 cm³ por planta; este procedimiento se debe repetir un mes después, siempre y cuando la planta presente de nuevo los síntomas.

Para finalizar, la presente iniciativa proporciona un procedimiento y un producto para la regeneración de plantas que han sido afectadas por la bacteria *R. solanacearum* y el hongo *F. oxysporum*. La suspensión coloidal es inyectada a las plantas enfermas en tres partes del pseudotallo; este método es eficaz para proporcionar plantas rehabilitadas, libres de fitopatógenos.

Descripción de los dibujos

El aparato de síntesis y el producto según la invención son descritos a continuación con referencia a los dibujos adjuntos:

Figura 1

Difractograma de rayos X obtenido de las nanopartículas de plata de la suspensión.

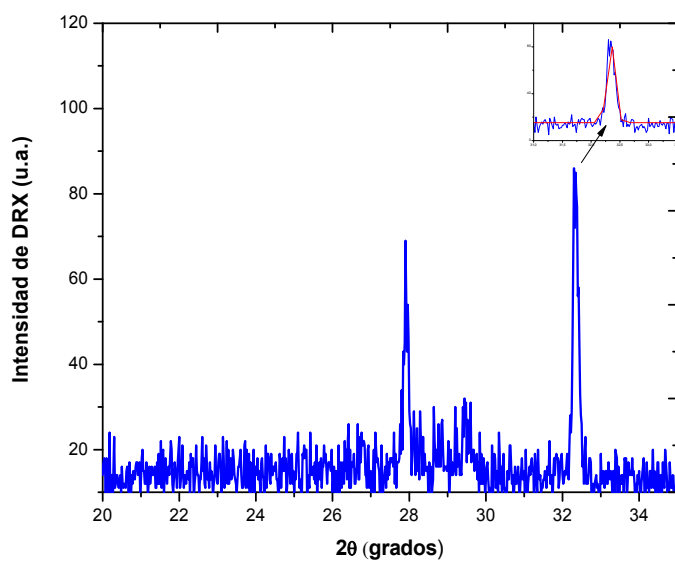


Figura 2 (anexa).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación del coloide-catión plata a través de un método electroquímico, que comprende las siguientes etapas:
 - Se aplica una diferencia de potencial continua, de entre 5 y 25 V, con una fuente de alimentación de corriente continua (figura 2) entre dos electrodos de plata pura (99.9 %).
 - Inmersión de los electrodos en agua destilada a temperatura entre 80 y 90 °C, dentro de una cubeta electrolítica.
 - La corriente aplicada y el tiempo del proceso se determinan a partir de la ley de Faraday de acuerdo con la concentración requerida de NPs de plata, teniendo en cuenta el volumen del medio líquido que se utilice.
 - Se obtiene una concentración entre 15 y 25 ppm de NPs de plata en la suspensión.
 - La suspensión se almacena en un recipiente de vidrio ámbar.

2. Coloide-catión de plata para aplicación en plantaciones de plátano o de banano, infestadas por *Ralstonia solanacearum* o por el hongo *Fusarium oxysporum*, que causan la marchitez bacteriana o el mal de panamá, según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:
 - Suspensión de NPs de plata con carga eléctrica positiva en agua destilada.
 - Baja concentración de 20 ppm, que permite la asimilación de la suspensión coloidal por inyección directa en el tallo de la planta de plátano o de banano.
 - Distribución de tamaño nanométrico de las partículas de plata, entre 14 y 24 nm (Figura 1), que reduce la cantidad de microorganismos generadores de las enfermedades marchitez bacteriana y mal de panamá.
 - Estable después de seis meses de almacenamiento.

- Preparado sin ningún tensoactivo ni estabilizante.
- La síntesis del coloide-cación plata o suspensión de NPs de plata en agua destilada, se hace sin uso de tensoactivos o estabilizantes, a través de un procedimiento electroquímico.
- Sintetizado por un método electroquímico amigable con el medio ambiente.
- La administración del coloide-cación plata a las plantas de plátano o de banano, se hace en dosis entre 5 y 15 mL.
- No se presenta desarrollo de resistencia bacteriana.

Bibliografía

- Álvarez Restrepo J. A; Rodríguez Gaviria P. A; Marín Montoya M. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. Printed in Brazil: Copyright by the Brazilian Phytopathological Society. Tropical Plant Pathology, 2008. vol.33, 3, 197-203.
- Belalcázar, C.S., Merchán, V.V. Efecto de la época y el grado de defoliación sobre la producción. p 77-85. In: Belalcázar, C.S., Buriticá, C.P., Torregroza, C.M., Toro, M.J., Jaramillo, G.O., Baena, A.H., Valencia, M.J.T.:.. Generación de tecnología para el cultivo y producción rentable de plátano en la zona central cafetera colombiana. Creced Quindío, ICA Armenia, Regional Nueve. Informe Técnico. 1991. Armenia, Quindío, Colombia.
- Castañeda D; Espinosa JA. Comportamiento e impacto de la enfermedad de moko en la zona de Urabá (Colombia), en las últimas tres décadas y media y propuesta de un índice de riesgo de la enfermedad. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín; 2005, 58:2587-2599.
- Chen Juanni, Li Shili, Luo Jinxiang, Wang Rongsheng, and Ding Wei. Enhancement of the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Phytopathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum* by Stabilization. Journal of Nanomaterials, Volume 2016. 1 de enero de 2016. Pág. 1-15.
- Dirección nacional de medio ambiente. Proceso de eliminación del Bromuro de metilo en Uruguay. Uruguay: Comisión Técnica Gubernamental de Ozono, 2002. 23 p.
- Elikagaien N; Segurtasunarako, Fundazioa E. La nanotecnología en la industria alimentaria: Nanotecnología alimentaria. Fundación vasca para la seguridad alimentaria, Noviembre. La aplicación de las nuevas tecnologías en la industria alimentaria, 2012.
- Elikagaien N; Segurtasunarako, Fundazioa E. La nanotecnología en la industria alimentaria: Nanotecnología alimentaria. Fundación vasca para la seguridad alimentaria, Noviembre. La aplicación de las nuevas tecnologías en la industria alimentaria, 2012.

- Hayward, A.C. Research on bacterial wilt: a perspective on international linkages and access to the literature, p. 1-8. In C. Allen, P. Prior & A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. 1995. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.
- Khaydaron R. A., Khaydarov R. R., Gapurova O., Estrin Y., Scheper T.. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. Journal of Nanoparticle Research. 2009; 11, 5, 1193–1200.
- Lin, D; Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollut, 2007. 150, 243e250.
- Mesa L; Triviño V. Evaluación microbiológica y físico-química de lixiviados de descomposición de residuos de plátano (*Musa AAB*) y su efecto sobre Moko. Tesis B.Sc. Biología. Universidad del Quindío. Armenia, Colombia, 2007. 25 p.
- Morones, J; Elechiguerra, J; Holt, A; Kouri, K; Ramirez, J; Yamacan, J. The bacterial effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005; 16, 2346-53.
- Patricio F, R; Almeida I, M; Santo A. S; Cabral O; Tessariolin J; Sinigaglia C; Berian L, O; Rodrigues N, J. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. Fitopatologia Brasileira, 2005. 30: 475-481.
- S. SudheerKhan, AmitavaMukherjee, N. Chandrasekaran. 2011. Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. Elsevier. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 87 129– 138.
- ToomeyGerry. Campaña de Colombia para salvar del moko a los plátanos. Escritor científico. Diciembre. Green Ink Publishing ServicesLtd, 2004. e-mail g.toomey@cgnet.com; tel.1-819-827-1426.
- Zheng, L; Hong, F; Lu, S; Liu, C; Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biol. Trace Elem. Res, 2005. 104, 83e91.