



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**Aplicación *in vitro* de bacteriófagos como controladores biológicos para *Ralstonia solanacearum* en cultivos de banano de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.**

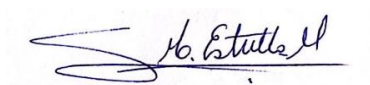
**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado/a en Microbiología**

**PAULA EMILIA CUEVA FALCONI**

Quito, 2024

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la señorita PAULA EMILIA CUEVA FALCONI ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



---

Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez  
Directora de la Disertación  
Quito, 11 de Julio de 2024

## **DEDICATORIA**

A Dios, mi familia, amigos, docentes y colegas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por impulsarme a seguir mis sueños y enseñarme a ser una buena persona.

Agradezco enormemente la oportunidad de realizar el estudio con el apoyo brindado por Biosiembra Nature's Lab, empresa que, gracias a su interés y colaboración con materiales y cepas de estudio, facilitó el trabajo. Así mismo a Teresa Guerrero quién forma parte de esta institución, por sus sugerencias, revisiones e impulsos en la elaboración de este escrito. Agradezco a Margarita Estrella, quién es mi tutora y pudo gestionar un espacio en la universidad para realizar la experimentación *in vitro*. De esta manera también agradezco a los responsables de Sala de Preparaciones de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme acceso al uso de equipos y materiales. Además, extiendo mi agradecimiento a el personal de limpieza de la Facultad, por estar al pendiente del orden y seguridad del espacio de trabajo.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

UFC: Unidad Formadora de Colonias.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>CERTIFICACIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
OBJETIVO GENERAL:.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	14
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1 CURVAS DE CRECIMIENTO.....	16
4.2 INFECCIÓN CON BACTERIÓFAGOS.....	16
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
5.1 RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO Y RECUENTO DE COLONIAS.....	17
5.1.1 CEPA 102-3 (SUELO DE BANANERA) .....	17
5.1.2 CEPA 094-2 (PSEUDOTALLO DE BANANO) .....	17
5.1.3 CEPA 095-2 (PSEUDOTALLO DE BANANO) .....	19
5.2 RESULTADOS DE LA INFECCIÓN CON BACTERIÓFAGOS.....	20
<b>6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS, LISTA DE TABLAS Y LISTA DE ANEXOS

- Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa 102\_3 de *R. solanacearum* considerando los valores promedio de  $DO_{600\text{ nm}}$  (Y), con respecto al tiempo (X). La curva determinada por la  $DO_{600\text{ nm}}$  empieza por la fase de latencia, del tiempo cero (0) hasta las primeras 5 horas; la fase exponencial empieza a la hora 5 hasta la hora 24; la fase estacionaria de la hora 24 a la hora 30 y finalmente después de la hora 30 empieza la fase de muerte. .... 17
- Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa 102\_3 respecto al tiempo (X) y promedio de número de colonias (UFC/mL) (Y). La fase de latencia abarca del tiempo cero (0) a 5 horas; el tiempo exponencial de la hora 5 a la 25; la fase de latencia de la hora 25 a la 29 y a partir de la hora 29 empieza la fase de muerte. .... 17
- Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa 094\_2 respecto al tiempo (X) y promedio de número de colonias (UFC/mL) (Y). La fase de latencia abarca desde el tiempo cero (0) a 9 horas; la fase exponencial empieza a partir de las 9 horas hasta las 23 horas; la fase estacionaria empieza de la hora 23 a la 28 y la fase de muerte a partir de las 28 horas. .... 20
- Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa 094\_2 respecto al tiempo (X) y promedios de la densidad óptica (D.O) (Y). La curva determinada por la densidad óptica empieza por la fase de latencia del tiempo cero (0) hasta las primeras 5 horas; la fase exponencial empieza desde la hora 5 hasta la hora 24; la fase estacionaria de la hora 24 a la hora 27 y finalmente después de la hora 27 empieza la fase de muerte. .... 19
- Figura 5. Curva de crecimiento de la cepa 095\_2 respecto al tiempo (X) y número de colonias (Y). En esta cepa, la fase de latencia abarca desde el tiempo cero (0) a 8 horas; la fase exponencial empieza a partir de la hora 8 hasta las 20 horas; la fase estacionaria empieza de la hora 20 a la hora 26 y la fase de muerte a partir de las 26 horas. .... 21
- Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa 095\_2 respecto al tiempo (X) y densidad óptica (Y). La curva determinada por la densidad óptica empieza por la fase de latencia del tiempo cero (0) hasta las primeras 3 horas; la fase exponencial empieza desde la hora 3 hasta la hora 23; la fase estacionaria de la hora 23 a la hora 27 y finalmente después de la hora 27 empieza la fase de muerte. .... 20
- Tabla 1: Promedios del conteo en placa de UFC de las cepas 102\_3, 094\_2 y 095\_2 en cada una de las fases de la curva de crecimiento, evaluadas en muestras con tratamientos y sin tratamiento: Recuento en la caja del número de UFC en 100  $\mu\text{L}$ , donde la fase de latencia no requirió dilución y las fases exponencial, estacionaria, muerte requirieron una dilución de 10 – 2 para un conteo adecuado ..... 20

## 1. RESUMEN

La producción de banano en el Ecuador ocupa 165 080 hectáreas y cubre el 29% del mercado internacional siendo viable durante todo el año, lo que beneficia a productores y consumidores. Además, su aporte nutricional lo convierte en un alimento básico en la dieta diaria de ecuatorianos y de personas de varios países alrededor del mundo. Estos cultivos son afectados por distintos agentes fitopatógenos como hongos, virus y bacterias. Uno de ellos, *Ralstonia solanacearum*, causante de la enfermedad del Moko, se debe evitar en todo cultivo por su fácil propagación en grandes extensiones de terreno, aunque el control de la enfermedad se basa en pesticidas y químicos que pueden generar resistencia bacteriana y perjudicar las características propias del suelo. Se desea sustituir este tipo de plaguicidas con la implementación de bio controladores como son los bacteriófagos, los cuales infectan a *Ralstonia solanacearum* evitando su desarrollo tanto en suelo como en pseudotallo de manera amigable con el suelo y el personal de las plantaciones. Por lo anterior, evaluar el efecto *in vitro* de los bacteriófagos para su posterior aplicación en fincas como tratamiento es de suma importancia. En el presente trabajo se evaluaron tres cepas de *R. solanacearum*, dos obtenidas de pseudotallo y una del suelo de fincas bananeras de Santo Domingo de los Tsáchilas; donde mediante curvas de crecimiento, se observa la fase de la curva en la que se evidencia una infección eficaz. Únicamente la cepa de suelo obtuvo una disminución de colonias del 100% al usar bacteriófagos en fase de latencia, donde es imprescindible su control, ya que esta fase puede durar tiempos prolongados, hasta empezar a desarrollarse. Las cepas de pseudotallo no registraron una disminución al usar bacteriófagos. Esto se podría dar por distintos sistemas de resistencia que posee *R. solanacearum* por lo que la investigación de estos sistemas dará mayor claridad a los mecanismos que puede generar *R. solanacearum* a bacteriófagos. Estudios de bacteriófagos para *R. solanacearum* aislada de tomate se han realizado en México, Colombia y España. Sin embargo, la evaluación en banano es nula en estas regiones al igual que en el Ecuador, por lo que esta investigación puede aportar al inicio del control biológico de esta enfermedad.

Palabras clave: Bacteriófagos, Banano, Bio control, *Ralstonia solanacearum*, Curva de crecimiento.

## 2. ABSTRACT

Banana production in Ecuador occupies 165,080 hectares and covers 29% of the international market, making it viable throughout the year, which benefits producers and consumers. In addition, its nutritional value makes it a staple in the daily diet of Ecuadorians and people from many countries worldwide. Different phytopathogenic agents such as fungi, viruses, and bacteria affect these crops. *Ralstonia solanacearum*, which causes Moko disease, should be avoided in all crops because of its easy spread over large land areas. However, disease control is based on pesticides and chemicals that can generate bacterial resistance and damage the soil's characteristics. It is desired to replace this type of pesticide with the implementation of bio-controllers such as bacteriophages, which infect *Ralstonia solanacearum*, preventing its development both in soil and in pseudostems in a friendly way with the soil and the plantation personnel. Therefore, evaluating the in vitro effect of bacteriophages for their subsequent application on farms as a treatment is of utmost importance. In the present work, three strains of *R. solanacearum* were evaluated, two obtained from pseudotallo and one from the soil of banana farms in Santo Domingo de los Tsáchilas, where, employing growth curves, the phase of the curve in which an effective infection is evidenced is observed. Only the soil strain obtained a 100% decrease in colonies when using bacteriophages in the latency phase, where its control is essential since this phase can last for extended periods until it begins to develop. The pseudostem strains did not show a decrease when using bacteriophages. This could be due to the different resistance systems that *R. solanacearum* possesses, so investigating these systems will clarify the mechanisms that *R. solanacearum* can generate in bacteriophages. While studies on bacteriophages for *R. solanacearum* isolated from tomatoes have been conducted in Mexico, Colombia, and Spain, banana crops in these regions and in Ecuador have not been evaluated. Therefore, this research can contribute to initiating biological control of this disease in banana crops.

Keywords: Bacteriophages, Banana, Biocontrol, *Ralstonia solanacearum*, Growth curve.

### 3. INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país que se destaca por la exportación de banano y plátano, musáceas consideradas el cuarto alimento más importante. El sector destina más de 165 080 hectáreas a estos cultivos, cubriendo el 29% del mercado internacional (Asociación de Exportadores de Banano de Ecuador, 2021). A nivel de país el consumo per cápita por año de banano es de 2,5 kilos en promedio durante el 2022 y el plátano que llega a los 30 kilos de acuerdo con la Asociación de Exportadores de Banano de Ecuador (2021).

La producción de plátano y banano es viable durante todo el año, lo que beneficia de manera considerable a los productores y consumidores. Además, su aporte nutricional es reconocido en todo el mundo por sus consumidores, por sus niveles de potasio y su capacidad anticancerígena, convirtiéndose así en un alimento básico en la dieta diaria, no solo de ecuatorianos, sino también en varios países alrededor del mundo (AGROCALIDAD, 2020).

Los cultivos de plátano y banano se han visto afectados por diversos patógenos como: el virus del mosaico de las Brácteas (BBrMV), *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* causante de la marchitez bacteriana del plátano, *Mycosphaerella fijiensis* hongo que genera mancha foliar, *Fusarium oxysporum* que causa el Mal de Panamá, entre otras enfermedades. Algunas de estas enfermedades son controlables al momento y otras han resultado en pérdidas totales de las plantas afectadas, como es el caso de la enfermedad del Moko causada por un microorganismo del Filo Betaproteobacteria, orden Burkholderiales del género *Ralstonia*. La especie causante de esta enfermedad en este cultivo es *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*). Es un bacilo Gram negativo, de metabolismo oxidativo; sus colonias pueden ser distinguidas en cultivo a base de cloruro de Trifeniltetrazolio-TTC. Álvarez et al. (2015) mencionan que las colonias características son de color blanco con centros rosados, lisas, irregulares redondas, mucoides, debido a la abundante producción de polisacáridos extracelulares, son virulentas, afectando fuertemente el sistema vascular de la planta infectada (Álvarez et al., 2015; Senasica, 2014).

La enfermedad del Moko, causada por *R. solanacearum*, tiene una distribución geográfica bastante diseminada alrededor del mundo, aunque se ha distinguido una mayor afección en Centro y Sur América (AGROCALIDAD, 2022). Según la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD, esta enfermedad se propaga fácilmente porque *R. solanacearum*, además de estar presente en la planta hospedera principal, también se la puede encontrar en el suelo de las plantaciones, malas hierbas, agua de riego y herramientas de cultivo, por lo que su propagación se facilita en grandes extensiones (AGROCALIDAD, 2022),

El control fitosanitario de la misma, dispuesto por la entidad reguladora AGROCALIDAD (2022) considera la importancia que representa el cultivo de musáceas en el país, por la gran superficie cultivada y la alta generación de empleo, ingresos y divisas que genera. Las medidas consideradas de importancia son la detección temprana de la enfermedad y el aviso inmediato a la entidad. La misma fuente señala varias medidas de control, de gran importancia ya que garantizan que la enfermedad no llegue a tener una expansión masiva por estos cultivos. Así mismo, fuertes sanciones se aplican a los agricultores que incumplan dichas medidas dadas inclusive, por la Asamblea Nacional Constituyente (2017).

Para el control de la enfermedad del Moko del banano se registra el uso de pesticidas, que, con el uso continuo en el tiempo, generan resistencias bacterianas, lo que perjudica a los agricultores dificultando el control de la enfermedad (AGROCALIDAD, 2022). Además, se sugiere el uso de agroquímicos, los que perjudican al suelo y a la salud de los consumidores por su uso indiscriminado (Asamblea Nacional Constituyente, 2017). Por lo que, desarrollar técnicas biológicas efectivas contra esta bacteria fitopatógena es de crucial importancia para los investigadores, en beneficio de los agricultores de plátano y banano y de quienes los consumen, evitando así pérdidas económicas a grandes y pequeños bananeros, agricultores que aportan de manera importante a la economía del país.

Una alternativa, poco conocida, es el uso de bacteriófagos como bio controladores de la enfermedad, los cuales son virus que infectan bacterias, ocasionando la lisis de la pared de la bacteria hospedera, es decir, la muerte de ésta (Gill et al, 2003). Este método de control requiere experimentación para ensayar su eficacia frente a *R. solanacearum* específicamente en cultivos de banano, ya que se han evidenciado únicamente estudios en

cultivos de tomate, con resultados favorables en su aplicación para bio control (Hernández et al, 2005).

Estudios de bacteriófagos para *R. solanacearum* aislada de cultivos de plátano y de tomate se han realizado en México, Colombia y España (Chavarro y Angel, 2006). Sin embargo, en Ecuador, esta forma de control biológico para la enfermedad del Moko del banano, no ha sido reportada, por lo que la investigación y aplicación de bacteriófagos ayudará a las múltiples plantaciones bananeras del país para combatir este tipo de plagas.

En este contexto, la presente investigación analizará las curvas de crecimiento de tres cepas de *R. solanacearum* aisladas de pseudotallo de banano y del suelo de fincas bananeras de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, bajo condiciones controladas de temperatura e incubación, para determinar en cuál de las fases de la curva de crecimiento *R. solanacearum* es más susceptible a ser infectada con bacteriófagos y si estos infectan en su totalidad o ralentizan el crecimiento del fitopatógeno.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad inhibitoria de virus bacteriófagos *in vitro* contra cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas del suelo y pseudotallo en plantaciones de banano en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Describir los rangos de tiempo en los que se alcanzan las distintas fases de la curva de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*.
- Evaluar la fase de crecimiento en la que los bacteriófagos son más infectivos a *Ralstonia solanacearum* en condiciones controladas de laboratorio.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación se realizó curvas de crecimiento de tres cepas de *Ralstonia solanacearum* considerando la densidad óptica (DO) y el conteo de colonias en placa en relación con el tiempo. Posterior a ello con el resultado de las curvas se infectó con bacteriófagos a *R. solanacearum* en tiempos específicos de acuerdo con cada una de las fases de crecimiento determinadas.

El material biológico utilizado en esta investigación. fue proporcionado por Biosiembra Nature's Lab.

Las cepas bacterianas evaluadas fueron obtenidas de plantaciones de banano de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas:

- Cepa 102\_3 aislada del suelo de hacienda bananera.
- Cepa 094\_2 aislada de pseudotallo de banano.
- Cepa 095\_2 aislada de pseudotallo de banano.

Los bacteriófagos fueron obtenidos de diferentes suelos de fincas bananeras de la región costera del Ecuador. Además, para garantizar los resultados obtenidos en el presente trabajo, todo el procesamiento fue realizado bajo condiciones asépticas y con equipos de protección personal.

### 4.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

En la primera parte de la investigación se realizó curvas de crecimiento para poder evaluar el tiempo de cada fase de la curva para tres cepas de *Ralstonia solanacearum*, y determinar en qué fase son susceptibles a la infección por bacteriófagos según la metodología descrita por Yang et al. (2017). Las curvas de crecimiento se parten de un cultivo de *R. solanacearum* en agar nutritivo suplementado con 0,25% de extracto de levadura y 0,5% de sacarosa grado alimenticio (NASYE) (Gill et al., 2003), luego se inoculó 5 mL de caldo nutritivo con la bacteria en estudio y se incubó a 30 °C durante la noche, hasta llegar al día siguiente a una densidad óptica igual a 1.0 ( $DO_{600\text{ nm}} = 1.0$ ). Después se añadió 150  $\mu\text{L}$  del cultivo anterior a 50 mL de caldo nutritivo, se incubó con agitación (120 rpm)

por 24 h a 30 °C y se midió la densidad óptica cada hora a partir del tiempo 0. El ensayo se realizó por triplicado (Gill et al., 2003; Yang et al., 2017)

Adicionalmente, se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mL de suspensión (UFC/mL) de *Ralstonia solanacearum* en NASYE, empleando solución fisiológica (NaCl 0.85 %) estéril como diluyente. Las siembras se realizaron por el método de extensión con perlas de cristal, permitiendo la distribución uniforme del inóculo bacteriano en el medio. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C y se realizó el recuento de colonias a las 24, 48 y 72 horas (Gill et al., 2003; Yang et al., 2017).

## 4.2 INFECCIÓN CON BACTERIÓFAGOS

A partir de una suspensión de bacteriófagos multiplicados en *Ralstonia solanacearum*, se obtuvieron los bacteriófagos libres de la bacteria hospedadora para posteriormente infectar a las bacterias en estudio. Para esto, se centrifugó dos veces la suspensión de bacteriófagos por 20 min a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 36 o 4000 rpm; evitando el sedimento y recuperando el sobrenadante, el cual se filtró a través de una membrana filtrante de 0,22 µm de poro.

A partir de un cultivo de *R. solanacearum* en 5 mL de caldo nutritivo con una densidad óptica mayor o igual a 1.0 (DO<sub>600 nm</sub>), se inoculó 500 µL en 50 mL de un nuevo caldo nutritivo y a partir de ahí se identificó el tiempo que corresponde a cada fase de la curva de crecimiento para iniciar con la infección usando el filtrado de fagos. En cada fase de la curva, identificadas como latencia, exponencial, estacionaria y de muerte; se tomó una alícuota de 1 mL de medio con *R. solanacearum* y se colocó en 10 mL de caldo nutritivo, adicionando 500 µL del filtrado de fagos, siendo la proporción bacteriófago 2:1 al momento de la infección. La mezcla se incubó 24 horas a temperatura ambiente (25 °C) para garantizar la infección por parte del fago en caso de que la bacteria sea susceptible. Posteriormente se sembró 100 µL en medio NASYE por el método de extensión. El recuento de las colonias se realizó a las 24, 72 y hasta las 120 horas para visualizar la presencia de colonias resistentes.

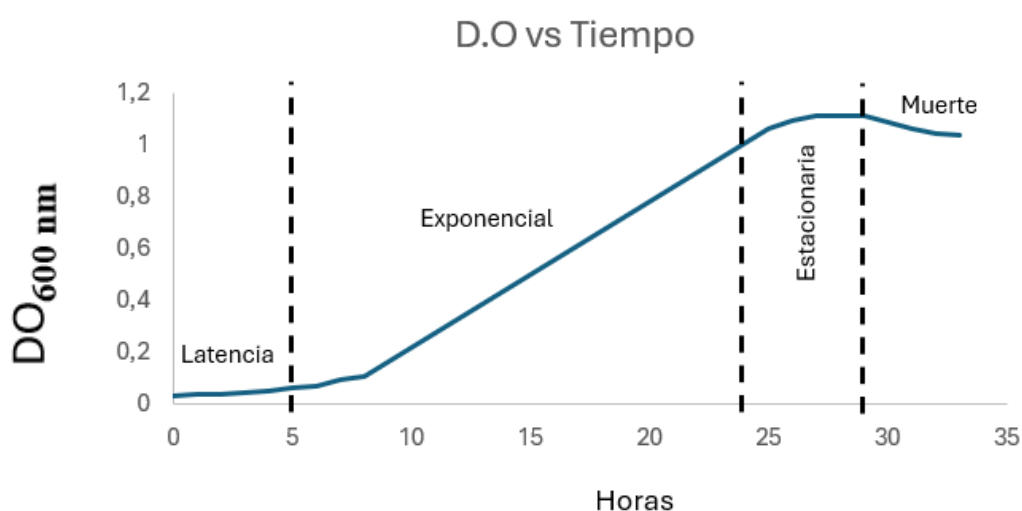
## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO Y RECuento DE COLONIAS.

A continuación, se presentan los resultados como el promedio de los datos obtenidos en las curvas de crecimiento de *R. solanacearum* realizadas por triplicado, tanto para densidad óptica, como para número de colonias en UFC/mL.

#### 5.1.1 CEPA 102\_3 (SUELO DE BANANERA)

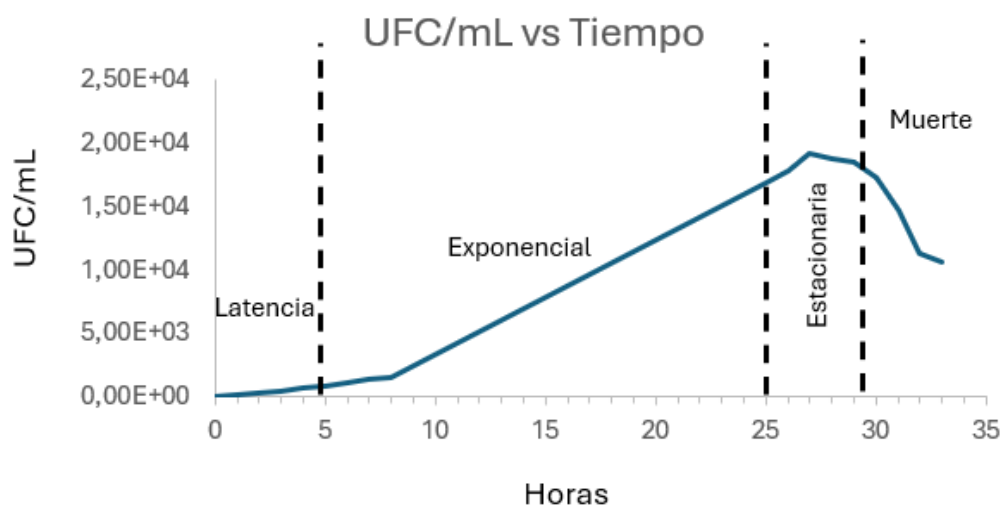
La Figura 1 muestra los rangos de tiempo en los que se alcanzó cada fase de la curva de crecimiento de la cepa 102\_3 de *R. solanacearum*, que fue aislada de una mezcla de suelos de fincas bananeras. Esta curva se realizó considerando la  $DO_{600\text{ nm}}$  del cultivo bacteriano medida a intervalos de 1 hora. Se observa que la fase de latencia se desarrolla durante las primeras 5 horas de cultivo; la fase exponencial, de 5 a 24 horas; la fase estacionaria, de 24 a 30 horas, y finalmente la fase de muerte a partir de las 30 horas de cultivo.



**Figura 1.** Curva de crecimiento de la cepa 102\_3 de *R. solanacearum* considerando los valores promedio de  $DO_{600\text{ nm}}$  (Y), con respecto al tiempo (X). La curva determinada por la  $DO_{600\text{ nm}}$  empieza por la fase de latencia, del tiempo cero (0) hasta las primeras 5 horas;

la fase exponencial empieza a la hora 5 hasta la hora 24; la fase estacionaria de la hora 24 a la hora 30 y finalmente después de la hora 30 empieza la fase de muerte

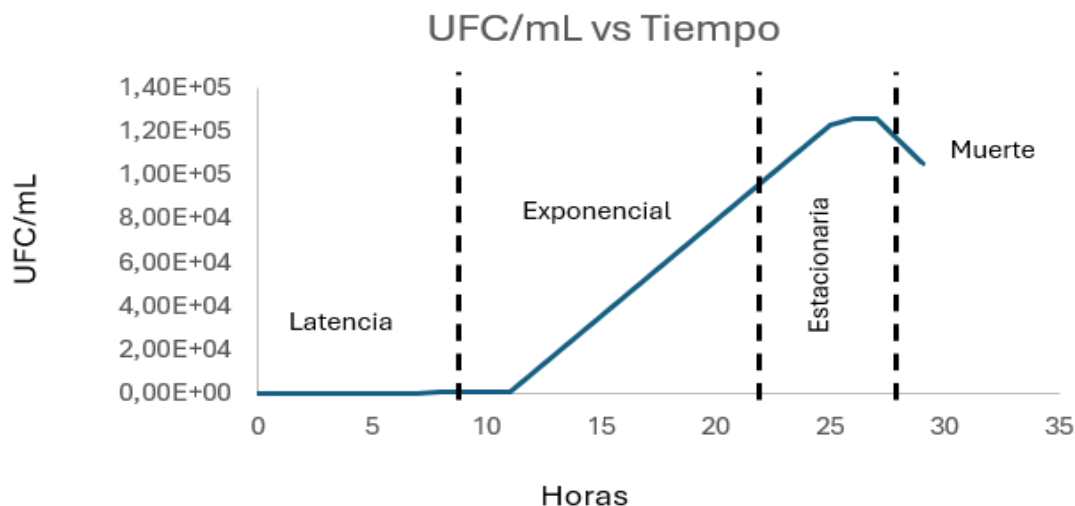
La Figura 2 muestra los rangos de tiempo en los que se alcanzó cada fase de la curva de crecimiento de la cepa 102\_3 de *R. solanacearum*, que fue aislada de una mezcla de suelos de fincas bananeras. Esta curva se realizó considerando el contaje en placa de número de UFC/mL del cultivo bacteriano, inoculado a intervalos de 1 hora. Se observa que la fase de latencia se desarrolla durante las primeras 5 horas de cultivo; la fase exponencial, de 5 a 25 horas; la fase estacionaria, de 25 a 29 horas, y finalmente la fase de muerte a partir de las 29 horas de cultivo.



**Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa 102\_3 respecto al tiempo (X) y promedio de número de colonias (UFC/mL) (Y).** La fase de latencia abarca del tiempo cero (0) a 5 horas; el tiempo exponencial de la hora 5 a la 25; la fase de latencia de la hora 25 a la 29 y a partir de la hora 29 empieza la fase de muerte.

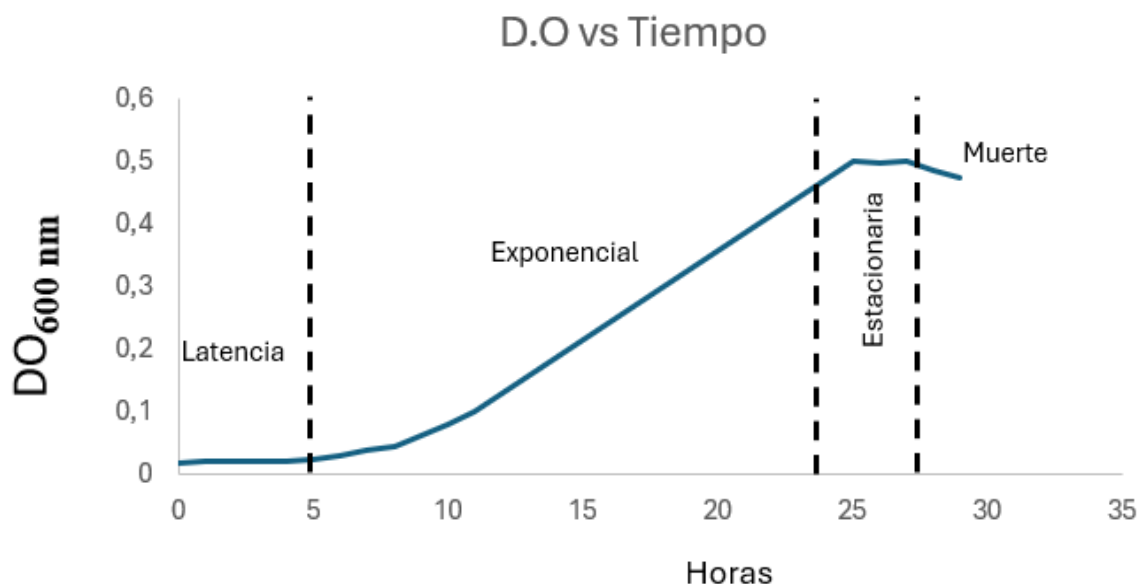
### 5.1.2 CEPA 094\_2 (PSEUDOTALLO DE BANANO)

La Figura 3 muestra los rangos de tiempo en los que se alcanzó cada fase de la curva de crecimiento de la cepa 094\_2 de *R. solanacearum*, que fue aislada pseudotallos enfermos de fincas bananeras. Esta curva se realizó considerando el contaje en placa de número de UFC/mL del cultivo bacteriano, inoculado a intervalos de 1 hora. Se observa que la fase de latencia se desarrolla durante las primeras 9 horas de cultivo; la fase exponencial, de 9 a 23 horas; la fase estacionaria, de 23 a 28 horas, y finalmente la fase de muerte a partir de las 28 horas de cultivo.



**Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa 094\_2 respecto al tiempo (X) y promedio de número de colonias (UFC/mL) (Y).** La fase de latencia abarca desde el tiempo cero (0) a 9 horas; la fase exponencial empieza a partir de las 9 horas hasta las 23 horas; la fase estacionaria empieza de la hora 23 a la 28 y la fase de muerte a partir de las 28 horas.

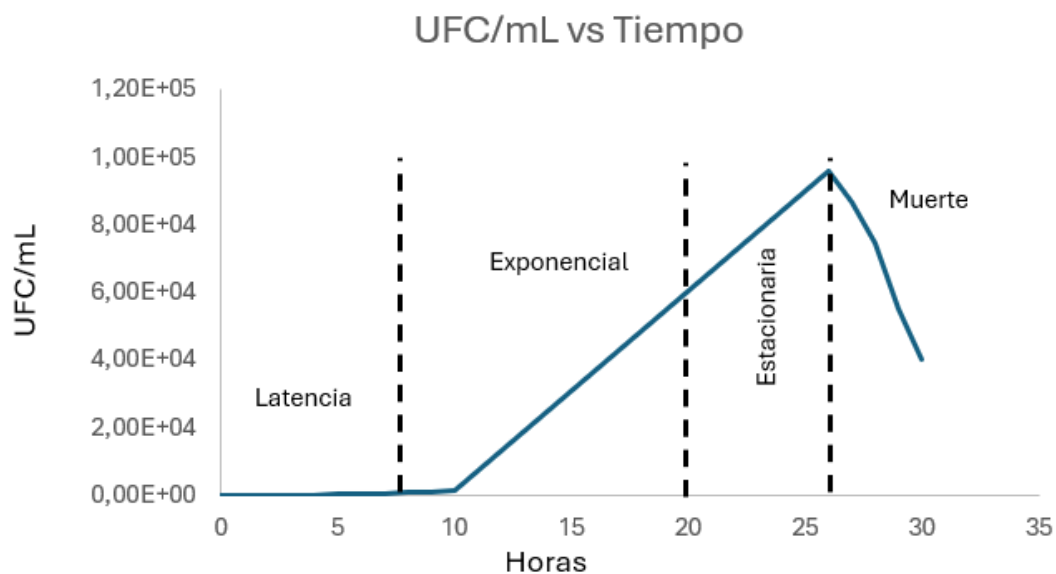
La Figura 4 muestra los rangos de tiempo en los que se alcanzó cada fase de la curva de crecimiento de la cepa 094\_2 de *R. solanacearum*, que fue aislada de pseudotallos de fincas bananeras. Esta curva se realizó considerando la  $DO_{600\text{ nm}}$  del cultivo bacteriano medida a intervalos de 1 hora. Se observa que la fase de latencia se desarrolla durante las primeras 5 horas de cultivo; la fase exponencial, de 5 a 24 horas; la fase estacionaria, de 24 a 27 horas, y finalmente la fase de muerte a partir de las 27 horas de cultivo.



**Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa 094\_2 respecto al tiempo (X) y promedios de la densidad óptica (D.O) (Y).** La curva determinada por la densidad óptica empieza por la fase de latencia del tiempo cero (0) hasta las primeras 5 horas; la fase exponencial empieza desde la hora 5 hasta la hora 24; la fase estacionaria de la hora 24 a la hora 27 y finalmente después de la hora 27 empieza la fase de muerte.

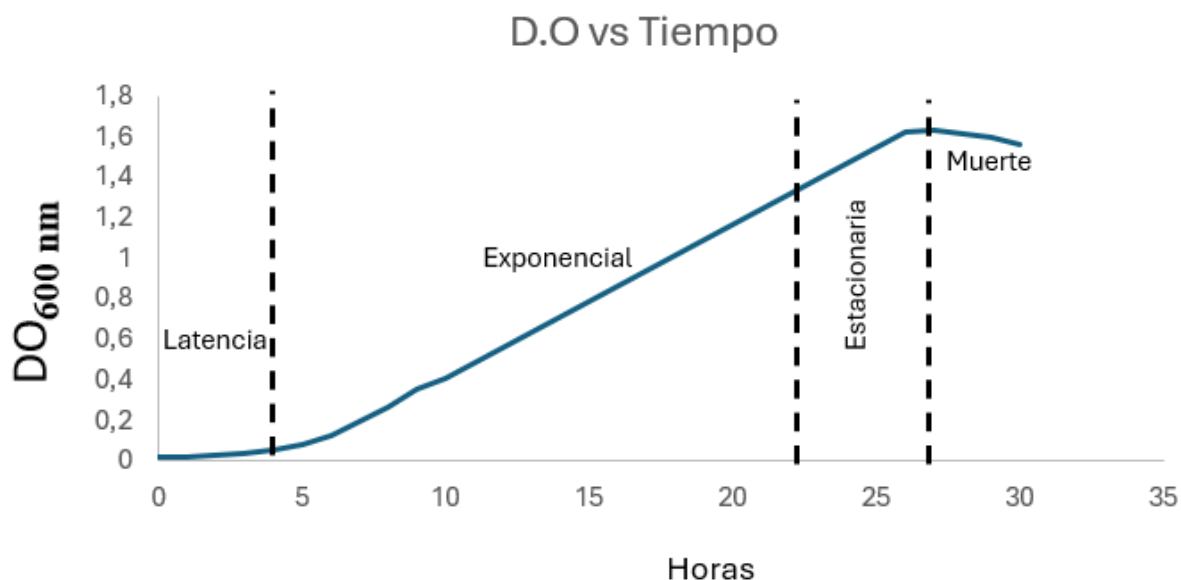
### 5.1.3 CEPA 095\_2 (PSEUDOTALLO DE BANANO)

La Figura 5 muestra los rangos de tiempo en los que se alcanzó cada fase de la curva de crecimiento de la cepa 095\_2 de *R. solanacearum*, que fue aislada de pseudotallos enfermos de fincas bananeras. Esta curva se realizó considerando el contaje en placa de número de UFC/mL del cultivo bacteriano, inoculado a intervalos de 1 hora. Se observa que la fase de latencia se desarrolla durante las primeras 8 horas de cultivo; la fase exponencial, de 8 a 20 horas; la fase estacionaria, de 20 a 26 horas, y finalmente la fase de muerte a partir de las 26 horas de cultivo.



**Figura 5. Curva de crecimiento de la cepa 095\_2 respecto al tiempo (X) y número de colonias (Y).** En esta cepa, la fase de latencia comprende desde el tiempo cero (0) a 8 horas; la fase exponencial, a partir de la hora 8 hasta las 20 horas; la fase estacionaria, de la hora 20 a la hora 26 y la fase de muerte a partir de las 26 horas.

La Figura 6 muestra los rangos de tiempo en los que se alcanzó cada fase de la curva de crecimiento de la cepa 095\_2 de *R. solanacearum*, que fue aislada pseudotallos enfermos de fincas bananeras. Esta curva se realizó considerando la  $DO_{600\text{ nm}}$  del cultivo bacteriano medida a intervalos de 1 hora. Se observa que la fase de latencia se desarrolla durante las primeras 3 horas de cultivo; la fase exponencial, de 3 a 23 horas; la fase estacionaria, de 23 a 27 horas, y finalmente la fase de muerte a partir de las 27 horas de cultivo.



**Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa 095\_2 respecto al tiempo (X) y densidad óptica (Y).** La curva determinada por la densidad óptica empieza por la fase de latencia desde el tiempo cero (0) hasta las primeras 3 horas; la fase exponencial empieza desde la hora 3 hasta la hora 23; la fase estacionaria de la hora 23 a la hora 27 y finalmente después de la hora 27 empieza la fase de muerte.

Con los tiempos alcanzados en las curvas de crecimiento se obtuvo la información sobre el tiempo en el que se deberá llevar a cabo la infección con los bacteriófagos, para así determinar su efectividad en cada una de las fases en las tres cepas. De esta manera, en la fase de latencia la infección se realizó entre las 4 y 5 horas; en la fase exponencial entre las 17 y 18 horas; en la fase estacionaria entre 24 y 25 horas y en la fase de muerte a las 32 horas.

## 5.2 RESULTADOS DE LA INFECCIÓN CON BACTERIÓFAGOS

La evaluación de la infección de *R. solanacearum* con la mezcla de bacteriófagos se realizó por triplicado. Para cada cepa y cada fase de la curva de crecimiento se empleó una suspensión con fagos y bacteria, y otra únicamente con bacteria como testigo. Se realizó las siembras por el método de extensión y se obtuvo el promedio de UFC/mL que crecieron en cada fase de la curva de crecimiento, para determinar si hubo o no disminución de UFC/mL entre las muestras a las 24, 48 y 120 horas de incubación como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1: Promedios del contaje en placa de UFC de las cepas 102\_3, 094\_2 y 095\_2 en cada una de las fases de la curva de crecimiento, evaluadas en muestras con tratamientos y sin tratamiento:** Recuento en la caja del número de UFC en 100  $\mu$ L tras 120 horas de incubación, donde la fase de latencia no requirió dilución, mientras que las fases exponenciales, estacionarias y de muerte precisaron una dilución de  $10^{-2}$  para un contaje adecuado.

CEPA	FASE DE CRECIMIENTO	CON TRATAMIENTO (UFC/mL)	SIN TRATAMIENTO (UFC/mL)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (120 horas)
------	---------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------------------

	Latencia	0,00	$4,40 \times 10^2$	100 %
	Exponencial	$3,33 \times 10^3$	$2,50 \times 10^4$	$88,65 \pm 1,5$ %
102_3	Estacionaria	$1,00 \times 10^3$	$2,20 \times 10^4$	$94,07 \pm 1,9$ %
	Muerte	$3,33 \times 10^2$	$1,30 \times 10^4$	$96,29 \pm 6,4$ %
	Latencia	$1,57 \times 10^2$	$1,83 \times 10^2$	$14,50 \pm 5,7$ %
	Exponencial	$5,23 \times 10^4$	$6,70 \times 10^4$	$19,86 \pm 3,8$ %
094_2	Estacionaria	$1,17 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$	$2,38 \pm 4,3$ %
	Muerte	$7,10 \times 10^4$	$9,93 \times 10^4$	$25,78 \pm 4,1$ %
	Latencia	$9,67 \times 10^1$	$1,30 \times 10^2$	$25,50 \pm 6,7$ %
	Exponencial	$6,33 \times 10^4$	$6,47 \times 10^4$	$1,90 \pm 4,8$ %
095_2	Estacionaria	$1,16 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$	$30,40 \pm 5,3$ %
	Muerte	$4,40 \times 10^4$	$4,60 \times 10^5$	$39,78 \pm 5,1$ %

Tras evaluar la infección de *R. solanacearum* con bacteriófagos empleando el método de recuento bacteriano en placa (UFC/mL), se observó que después de 120 horas la cepa 102\_3 tuvo una inhibición del 100 % en la fase de latencia y porcentajes mayores al 90 % en el resto de las fases de crecimiento, lo que demostró un buen control por los bacteriófagos. Esta cepa fue obtenida del suelo de fincas bananeras de Santo Domingo de los Tsáchilas. Por otro lado, las cepas de pseudotallos infectados (095\_2 y 094\_2) no mostraron porcentajes de inhibición mayores al 40%, lo que demuestra que son menos susceptibles a ser infectadas por la mezcla de bacteriófagos empleada.

## 6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la cepa de suelo 102\_3 demuestran un 100 % de inhibición en su fase de latencia, en concordancia con Labrie et al. (2010), los cuales mencionan que, en fase de latencia la bacteria es joven y contiene menos exopolisacáridos haciéndola susceptible a la inhibición con fagos, ya que la producción de exopolisacáridos en bacterias es considerado un mecanismo de resistencia. Por lo que, para el control adecuado de la enfermedad del Moko es importante determinar la fase de la curva de crecimiento donde los bacteriófagos son más infectivos evitando la dispersión de la bacteria en las plantaciones bananeras. Además, Botella et al. (2020) describe a la fase de latencia como el momento más beneficioso para controlar a *Ralstonia solanacearum* ya que puede mantenerse en latencia por largos períodos de tiempo al encontrarse en condiciones no favorables, en agua o suelo, donde permanecen hasta recibir estímulos que las activen.

La disminución de inhibición de la infección con bacteriófagos en las cepas 094\_2 y 095\_2 obtenidas de pseudotallo fue menor al 40 % en todas las fases. Sin embargo, el porcentaje más alto de inhibición se presentó en la fase de muerte. Caycedo et al. (2021) indican que esto a lo mejor no es por efecto de los bacteriófagos, sino que se podría deber a que, al entrar en su fase de muerte, las condiciones del medio donde se encuentran las bacterias ya son desfavorables, generando una disminución de UFC espontánea.

Aunque en este estudio, las tres cepas evaluadas de *R. solanacearum* se desarrollaron después de las 120 horas a pesar de la adición de bacteriófagos, esto puede deberse a posibles mecanismos de resistencia además de la formación de exopolisacáridos. Dy et al. (2014) sugieren que los sistemas de resistencia a fagos mediados por bacterias deben estudiarse individualmente en condiciones de laboratorio, dado que se pueden presentar múltiples sistemas anti-fagos para así restringir una amplia variedad de bacteriófagos.

Las relaciones entre bacteriófagos y bacterias generan una interacción competitiva, suficiente para inhibir la infección y reproducción de los fagos, descritos como un proceso evolutivo que ocasiona una diversidad genómica en la bacteria (Wolf y Koonin, 2013). Esta diversidad puede basarse en varios sistemas de defensa del complejo de especies de *R.*

*solanacearum* (RSSC), dependiendo de la familia. Además de, las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente Inter espaciadas (CRISPR), que, se asocian a

una proteína (Cas), generando cambios genéticos específicos que eviten la infección de los bacteriófagos en la bacteria (Castillo et al., 2020).

Es importante recalcar que no se evidencian estudios previos en cuanto a la aplicación de campo con bacteriófagos en plantas de banano con la enfermedad del Moko. Sin embargo, Álvarez et al. (2019) probaron aplicar bacteriófagos contra *R. solanacearum* a través de agua de regadío en diferentes suelos, obteniendo resultados beneficiosos pues los fagos resistieron temperaturas desde 4 °C hasta 30 °C. Por otro lado, Hernández et al. (2019) utilizaron bacteriófagos  $\Phi RSP$  ante la marchitez bacteriana del tomate (*R. solanacearum*), que, pese a no ser un cultivo similar al banano, los resultados que se obtuvieron fueron prometedores incluso con su aplicación en campo en bajas concentraciones y con una fácil difusión en el ambiente. De esta manera, la aplicación de bacteriófagos puede considerarse útil para la disminución de daños causados por agentes fitopatógenos. Además, se puede considerar como una alternativa a la utilización de productos químicos en la industria agrícola, debido a su alta tasa de supervivencia y capacidad lítica sobre el hospedador (Álvarez et al., 2019). Además, González et al. (2019), mencionan que el uso en el campo es sencillo debido a que pueden transferirse vía agua de una manera natural y sencilla, mediante regadío directo al suelo, sin la necesidad de encapsular ni añadir medios físicos, químicos. y/o biológicos para mantener la viabilidad hasta entrar en contacto con la bacteria que se desea controlar. También asevera que la producción de bacteriófagos utiliza una técnica sencilla, con costos reducidos y sin formulaciones complicadas para su aplicación. De esta manera se puede prevenir la enfermedad del Moko del banano, sin afectar las características propias del suelo y sin afectar la salud de sus consumidores.

## 7. CONCLUSIONES

A pesar de que, en este estudio, los bacteriófagos no afectaron a todas las cepas, se obtuvieron resultados positivos de infección en la fase de latencia para la cepa 102\_3 de *Ralstonia solanacearum* obtenida del suelo de una finca bananera en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Por otro lado, los resultados de las cepas 094\_2 y 095\_2 obtenidos de pseudotallo, demostraron porcentajes bajos de infección, pero demuestran que si hubo efecto lítico de los bacteriófagos sobre estas cepas. De esta manera se concluye que

la evaluación de mezclas de fagos para *Ralstonia solanacearum*, junto con la identificación de

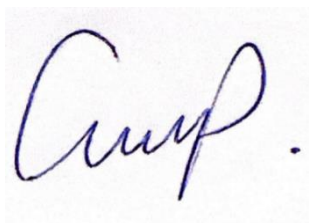
la fase del crecimiento bacteriano en la que es susceptible a estos agentes bicontroladores, es de suma importancia para futuras investigaciones y posterior desarrollo de alternativas biológicas en beneficio de los productores de banano, de la salud de los suelos, así como también de la salud de los consumidores. Estos resultados sugieren el complementar esta investigación con estudios genómicos de posibles mecanismos anti-fagos o de genes de resistencia que posea *R. solanacearum*, así se podrá desarrollar una prometedora alternativa biológica para la industria agrícola.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrocalidad. (2022). *Ralstonia solanacearum* race 2 (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996. Agrocalidad. Recuperado 11 de octubre de 2023, de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/foc51.pdf>
- Álvarez, B., López, M. M. y Biosca, E. G. (2019). Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 10(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02813>
- Álvarez, E., Pantoja, A., Gañan, L. y Ceballos, G. (2015). Current status of Moko disease and black sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them. Publicación CIAT N. 404. Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. [http://ciat-library.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/CURRENT\\_STATUS\\_OF\\_MOKO\\_DISEASE\\_AND\\_BLACK\\_SIGATOKA\\_IN\\_LAC\\_AND\\_OPTIONS\\_FOR MANAGING\\_THEM\\_final.pdf](http://ciat-library.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/CURRENT_STATUS_OF_MOKO_DISEASE_AND_BLACK_SIGATOKA_IN_LAC_AND_OPTIONS_FOR_MANAGING_THEM_final.pdf)
- Asamblea Nacional Constituyente. (2017). Ley Orgánica De Sanidad Agropecuaria. Boletín Oficial Del Estado, SAN-2017-0, 24.
- Asociación de Exportadores de Banano de Ecuador. (2021). Lanzamiento Oficial de la Primera Guía Culinaria del Banano.
- Botella, M., Suárez, T., Alfaro, A. y Siverio de la Rosa, F. (2022). Valoración de las medidas de erradicación de *Ralstonia solanacearum* en la isla de Tenerife. Informe técnico n° 2. GMR Canarias. 36 p.

- Castillo, J., A., Secaira, H., Maldonado, S. y Sarmiento, K. (2020). Diversity and Evolutionary Dynamics of Antiphage Defense Systems in *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, 11(May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00961>
- Caycedo, L., Corrales, L. y Trujillo, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94. Epub January 17, 2021. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Chavarro, E. y Angel, J. (2006). Establecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de *Ralstonia solanacearum* y diferenciación genética utilizando marcadores moleculares RAPD. *Revista Colombiana de Biotecnología*, VIII (1), 14–31.
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C. y Fineran, P. C. (2014). Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual Review of Virology*, 1(1), 307–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085500>
- Erdmann, S. LeMoine Bauer, S. y Garrett, A. (2014) Inter-viral conflicts that exploit host CRISPR immune systems of *Sulfolobus*. *Mol. Microbiol.* 91:900–17
- Gill J.J., Svircev A.M., Smith R. y Castle A.J. (2003). Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2133–2138.
- González, E., López, M. y Álvarez, B. (2019). Method for the Prevention and / or the Biological Control of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia Solanacearum*, Via the Use of Bacteriophages Suitable for This Purpose and Compositions Thereof. In *Instituto Valencia de Investigaciones Agrarias (IVIA)* (Vol. 2). <https://patents.google.com/patent/US10508266B2/en>
- Hernández, Y., Mariño, N., Trujillo, G. y Urbina de Navarro, C. (2005). Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(2), 185-194. Recuperado en 10 de noviembre de 2023, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182005000200008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000200008&lng=es&tlng=es).

- Hernández, J., Mastache A., Molina. A., Serrano, R. y Peña, C. (2019). *Estabilidad y capacidad inhibitoria del bacteriófago  $\Phi$ RSP*. 42(1), 13–19.
- Labrie, J., Samson, E. y Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Senasica. (2014). *Protocolo de diagnóstico Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al 1995*. 1995, 30 p.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728748/2.\\_PD.\\_Ralstonia\\_solanacearum\\_papa\\_fresca\\_0.0\\_2014.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728748/2._PD._Ralstonia_solanacearum_papa_fresca_0.0_2014.pdf)
- Wolf, Y. I y Koonin, E. V. (2013). Genome reduction as the dominant mode of evolution: prospects and Overviews. *BioEssays* 35, 829–837. doi: 10.1002/bies. 201300037
- Yang, L., Li, S., Qin, X., Jiang, G., Chen, J., Li, B., Yao, X., Liang, P., Zhang, Y. y Ding, W. (2017). Exposure to umbelliferone reduces *Ralstonia solanacearum* biofilm formation, transcription of type III secretion system regulators and effectors and virulence on tobacco. *Front. Microbiol.* 8:123

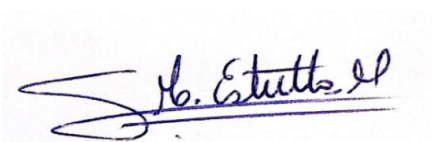


---

**Firma de la estudiante**

Paula Emilia Cueva Falconi

Quito, 12 de Julio de 2024



---

**Firma del director/a de disertación**

Sonia Margarita Estrella Vásquez

Quito, 12 de Julio de 2024

---

**Firma de la coordinadora de carrera**

Ph.D Diana Astorga García

Quito,