



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Evaluación de cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro* como alternativa de uso en la producción orgánica**

Paredes Loyola, Jéssica Paola

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera

Biotecnóloga

PhD. Flores Flor, Francisco Javier

Sangolquí, 28 de agosto del 2023



## Tesis Jessica Paredes.txt

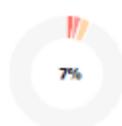
### Scan details

Scan time:  
August 26th, 2023 at 12:23 UTC

Total Pages:  
39

Total Words:  
9592

### Plagiarism Detection



#### Types of plagiarism

Types of plagiarism	Percentage	Words
Identical	2%	191
Minor Changes	1.9%	184
Paraphrased	3.1%	294
Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



#### Text coverage

- AI text
- Human text



Francisco Javier Flores Flor  
FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR

.....  
PhD. Flores Flor, Francisco Javier  
Tutor del proyecto



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

#### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Evaluación de cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro* como alternativa de uso en la producción orgánica" fue realizado por la Srta. Paredes Loyola Jéssica Paola, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 26 de agosto del 2023

 Firmado electrónicamente por:  
FRANCISCO  
JAVIER FLORES  
FLOR

.....  
Flores Flor, Francisco Javier

C. C. 1713443479



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Paredes Loyola, Jéssica Paola**, con cédula de ciudadanía n° 1726957598, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación de cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro* como alternativa de uso en la producción orgánica** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 26 de agosto del 2023**

**Paredes Loyola Jéssica Paola**

C.C. 1726957598



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Paredes Loyola, Jéssica Paola**, con cédula de ciudadanía n° 1726957598, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación de cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro* como alternativa de uso en la producción orgánica** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 26 de agosto del 2023**

**Paredes Loyola Jéssica Paola**

C.C. 1726957598

### **Nota aclaratoria**

El presente trabajo de investigación constituye un estudio de laboratorio inicial y requerirá futuros estudios de validación en campo, por tanto, no puede considerarse una alternativa de control para la plaga *Ralstonia solanacearum* raza 2, cuyo único método de control aprobado, al momento en el país, es el que se especifica en la resolución 0072 “Plan de acción para el control de *Ralstonia solanacearum* raza 2”.

### **Dedicatoria**

A mi familia, mi raíz y por ende la que me sostiene en cada momento de la vida. Gracias, por tanto, gracias por creer en mí y apoyarme.

## Agradecimientos

Al laboratorio de Fitopatología en AGROCALIDAD Tumbaco y a su excelente personal por haberme abierto las puertas y apoyarme en este proceso del proyecto de titulación, agradeciendo especialmente al Ing. Jairo Guevara por sus enseñanzas acerca de la materia quien nunca nos negó su amplio conocimiento sobre la misma.

A las personas que conocí durante este proceso, Ing. Hernando regalado, Patricia Garrido quienes siempre tuvieron palabras para guiarme, su gran liderazgo es un ejemplo a seguir, a Nadin quien estuvo en el laboratorio y muchas veces ayudó con mis actividades, ha sido una gran compañera.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y sus docentes quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarnos para ser los mejores profesionales posibles.

A mis padres Ángel e Isabel y hermanos Bryan y John quienes siempre fueron un apoyo en todos los sentidos, gracias por creer en mí, esto es para ustedes.

A los amigos que esta aventura me dejó, gracias por el regalo de su presencia. A Rose, Sebastián, Stefy, Stephanie y Stephanie por estar desde el principio, a Gabriela, Francisco, Mary, Zas, Naty, Oscar y Victor por acompañarme hasta el final. A mis amigos incondicionales Gabriel y Jona, gracias por seguir aquí. La presencia de todos es una bendición. Que sepan que he aprendido de mis errores y me he superado, que no olvidaré ninguna de las conversaciones ni las risas ni cada valioso momento vivido, guardo en mi corazón cada acción, cada palabra y cada lugar. Gracias por todo.

## Índice de contenido

Reporte de verificación de contenido .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Nota aclaratoria.....	6
Dedicatoria .....	7
Agradecimientos .....	8
Índice de contenido.....	9
Índice de tablas.....	13
Índice de figuras.....	14
Abreviaturas.....	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Formulación del problema .....	18
Justificación del problema.....	20
Objetivo General .....	21
Objetivos específicos .....	21
Hipótesis.....	21
Capítulo II: Marco Teórico .....	22
<i>Bacteria Ralstonia solanacearum</i> .....	22

	10
Nomenclatura y Taxonomía .....	22
Distribución geográfica .....	23
Hospederos .....	24
Marchitez bacteriana .....	24
Biología y Ecología .....	25
Cultivo y aislamiento.....	26
Métodos de identificación bacteriana .....	27
Observación visual .....	28
Microscopía .....	28
Observación Morfológica.....	28
Pruebas Bioquímicas.....	29
Pruebas Serológicas .....	29
Pruebas Moleculares.....	30
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....	31
Difusión en disco .....	31
Métodos de dilución.....	31
Producción orgánica .....	33
Productos químicos permitidos en la producción orgánica .....	34
Capítulo III: Metodología.....	36
Instituciones participantes.....	36
Productos a utilizar.....	36
Caldo Bordelés® .....	36
Kopercup®.....	36

	11
Phyton® .....	37
Azufrol® .....	37
Ácido piroleñoso .....	37
Aislamiento de la bacteria .....	37
Identificación de la bacteria .....	38
Pruebas bioquímicas .....	38
Pruebas Serológicas .....	38
Pruebas moleculares .....	40
Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana .....	42
Difusión por disco en agar .....	42
Microdilución en caldo .....	43
Macrodilución en caldo .....	45
Capítulo IV: Resultados .....	47
Aislamiento de la bacteria .....	47
Identificación de las cepas bacterianas .....	48
Pruebas bioquímicas .....	48
Prueba ELISA .....	49
Pruebas moleculares .....	50
Pruebas de inhibición bacteriana .....	51
Difusión por disco .....	51
Microdilución en caldo .....	52
Macrodilución en caldo .....	54
Capítulo V: Discusión .....	60

Capítulo VI: Conclusiones .....	66
Capítulo VII: Recomendaciones .....	67
Referencias .....	68

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Taxonomía de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	22
<b>Tabla 2</b> Etapas de diagnóstico de <i>R. solanacearum</i> mediante la prueba de inmunoensayo DAS-ELISA.....	40
<b>Tabla 3</b> Primers utilizados en la amplificación de fragmentos específicos de <i>R. solanacearum</i> .....	41
<b>Tabla 4</b> Ciclos para la reacción en cadena de la polimerasa.....	41
<b>Tabla 5</b> Características bioquímicas más importantes para <i>R. solanacearum</i> .....	49
<b>Tabla 6</b> Resultado de las absorbancias a 650 nm de las pruebas ELISA realizadas con el Kit “ <i>Ralstonia solanacearum</i> Reagent Set” de agdia .....	50
<b>Tabla 7</b> Concentración mínima inhibitoria de los productos utilizados. ....	53
<b>Tabla 8</b> Dosis usadas para los ensayos de macrodilución en caldo de los diferentes productos .....	54
<b>Tabla 9</b> Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Kopercup.....	56
<b>Tabla 10</b> Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Caldo bordelés.....	57
<b>Tabla 11</b> Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Phytón .....	58
<b>Tabla 12</b> Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Ácido piroleñoso .....	59
<b>Tabla 13</b> Concentraciones mínimas bactericidas de los compuestos probados .....	59

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Distribución geográfica de la presencia o ausencia de <i>R. solanacearum</i> en cada país.....	23
<b>Figura 2</b> Esquema de diluciones en microplacas para ensayo de inhibición bacteriana. ....	44
<b>Figura 3</b> Esquema de diluciones en placas para ensayo de macrodilución.....	46
<b>Figura 4</b> Muestras de banano y plátano con síntomas de presentar <i>R. solanacearum</i> .....	47
<b>Figura 5</b> Características morfológicas de <i>R. solanacearum</i> en diferentes tipos de agar .....	48
<b>Figura 6</b> Electroforesis del producto PCR .....	50
<b>Figura 7</b> Zonas de inhibición producidas por los productos frente a <i>R. solanacearum</i> .....	51
<b>Figura 8</b> Número de ensayos en los que se generó zonas de inhibición (en agar nutritivo) para cada producto a una concentración de 100 mg/mL. ....	52
<b>Figura 9</b> Microplaca con ensayos de microdilución con TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) después de 24 horas de incubación.....	53
<b>Figura 10</b> Población bacteriana en valores log <sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Kopercup.....	55
<b>Figura 11</b> Población bacteriana en valores log <sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Caldo bordelés .....	56
<b>Figura 12</b> Población bacteriana en valores log <sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Phyton. ....	57
<b>Figura 13</b> Población bacteriana en valores log <sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Ácido piroleñoso. ....	58

### Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGROCALIDAD: Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

AN: Agar Nutritivo

ANOVA: Análisis de varianza

BL: Blanco

CAB: Capture Antibody

CABI: Centre for Agricultural Bioscience International

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CN: Control Negativo

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

GEB: General Extract Buffer

h: Hora

KOH: Hidróxido de Potasio

mL: Mililitros

NaCl: Cloruro de sodio

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

SMSA: Medio Selectivo de Sudáfrica

t: Tiempo

TTC: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

TZC: Medio de Tetrazolio de Kelman

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

## Resumen

La agricultura orgánica en Ecuador está en auge debido a la creciente demanda internacional, especialmente con productos de exportación como el banano. Sin embargo, este cultivo enfrenta la amenaza de la enfermedad del *Moko*, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* Filotipo II. En Ecuador, la agricultura orgánica guiada por la resolución 0099 de AGROCALIDAD prohíbe el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos, en cambio permite el uso de ciertos compuestos basados en cobre, azufre y ácidos orgánicos. Se seleccionaron 5 productos que cumplen con estas condiciones: Kopercup® (oxicloruro de cobre), Caldo bordelés® (linoleato de cobre), Azufrol® (azufre), Phytton® (sulfato de cobre pentahidratado) y Ácido piroleñoso (pirolisis de biomasa vegetal) y se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad antimicrobiana contra *R. solanacearum*. Primero, se aisló la bacteria utilizando los medios TZC, SMSA y Agar nutritivo y se identificó mediante pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares. Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana incluyeron Difusión por disco, microdilución y macrodilución en caldo. La difusión en disco reveló zonas de inhibición en Kopercup y Phytton. Luego, se determinaron las concentraciones de producto que producen inhibición mediante microdilución colorimétrica. Los resultados mostraron que Kopercup tenía una CMI de 1,5 mg/mL, Caldo bordelés de 3 mg/mL, Azufrol no mostró CMI en las dosis probadas, Phytton de 5 mg/mL y Ácido piroleñoso de 19 mg/mL. El ensayo de macrodilución en caldo permitió establecer concentraciones mínimas bactericidas (CMB). Kopercup, Caldo bordelés y Phytton resultaron ser bactericidas desde sus respectivas CMIs, el ácido piroleñoso solo mostró efectividad bactericida a una concentración 4 veces su CMI. En resumen, los ensayos *in vitro* indican que cuatro de los cinco productos probados son eficaces como inhibidores y bactericidas contra *R. solanacearum*. Esto ofrece posibles alternativas orgánicas para combatir esta enfermedad y promover la sostenibilidad en la agricultura ecuatoriana.

*Palabras clave:* Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida, Identificación bacteriana, Susceptibilidad antimicrobiana.

### Abstract

Organic agriculture in Ecuador is booming due to growing international demand, especially for export products such as bananas. However, this crop faces the threat of Moko disease, caused by the bacterium *Ralstonia solanacearum* Phylum II. In Ecuador, organic agriculture guided by AGROCALIDAD Resolution 0099 prohibits the use of synthetic fertilizers and pesticides, but allows the use of certain compounds based on copper, sulfur and organic acids. Five products were selected that meet these conditions: Kopercup® (copper oxychloride), Bordeaux® broth (copper linoleate), Azufrol® (sulfur), Phytan® (copper sulfate pentahydrate) and Pyrolean acid (pyrolysis of plant biomass) and antimicrobial susceptibility tests were carried out against *R. solanacearum*. First, the bacteria were isolated using TZC, SMSA and Nutrient Agar media and identified by biochemical, serological and molecular tests. Antimicrobial susceptibility methods included Disc diffusion, microdilution and broth macrodilution. Disk diffusion revealed zones of inhibition in Kopercup and Phytan. Then, inhibition-producing product concentrations were determined by colorimetric microdilution. The results showed that Kopercup had an MIC of 1.5 mg/mL, Bordeaux broth 3 mg/mL, Azufrole did not show MIC at the doses tested, Phytan of 5 mg/mL and Pyroleanic acid of 19 mg/mL. The broth macrodilution assay allowed establishing minimum bactericidal concentrations (MIC). Kopercup, Bordeaux Broth and Phytan were found to be bactericidal from their respective MICs, Pyrolean acid only showed bactericidal effectiveness at a concentration 4 times its MIC. In summary, the *in vitro* tests indicate that four of the five products tested are effective as inhibitors and bactericides against *R. solanacearum*. This offers possible organic alternatives to combat this disease and promote sustainability in Ecuadorian agriculture.

*Key words:* Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, Bacterial identification, Antimicrobial susceptibility.

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

El complejo de especies *R. solanacearum* tiene un rango de más de 200 especies vegetales pertenecientes a 53 familias botánicas diferentes. Esta bacteria está muy extendida en zonas tropicales, subtropicales y templadas cálidas de todo el mundo, pero especialmente los cultivos tropicales y subtropicales son susceptibles. A nivel mundial, los cultivos más importantes son: tomate, tabaco, berenjena, patata, plátano, banano y heliconia, entre otras. Muchas arvenses son huéspedes alternativos del patógeno tales como: *Solanum cinereum* (en Australia), *Solanum nigrum* y en casos raros, *Galinsoga parviflora*, *G. ciliata*, *Polygonum capitata*, *Portulaca oleracea* y *Urtica dioica*, han sido reportadas como malezas hospedantes silvestres primarios para la raza 3, *Solanum nigrum* y *S. dulcamarason* (Osdaghi, 2020).

Este microorganismo se transmite generalmente por el suelo, su diseminación en la planta es a través de las raíces y se mueve a través del xilema, una vez dentro del tejido aumenta la densidad del patógeno, efecto promovido por la expresión de genes de virulencia y producción de exopolisacaridos (determinantes de la patogenicidad) causando la enfermedad letal conocida como marchitez bacteriana; por lo general, las secciones transversales del tallo presentan un exudado bacteriano viscoso, también se puede evidenciar colonización bacteriana en el fruto de banano y tubérculo de papa. La bacteria sobrevive en el medio ambiente, principalmente en plantas reservorio, suelo y agua (Osdaghi, 2020; Álvares et al. 2010).

La detección e identificación de *R. solanacearum* se entrelazan conceptual y metodológicamente a la patogénesis y epidemiología, por lo que es necesario detectar primero su presencia antes de aislar e identificar rigurosamente una cepa, cabe mencionar que las muestras de suelo y agua típicamente tienen poblaciones bajas de la bacteria y no todas las células pueden crecer in vitro. Los cultivos puros de *R. solanacearum* no son difíciles de identificar, existen medios de cultivos semiselectivos y pruebas fisiológicas que pueden descartar rápidamente organismos relacionados (Blomme et al., 2017).

La prevención de propagación de la enfermedad se ha logrado, en algunos casos, mediante la aplicación de estrictas prácticas de saneamiento profiláctico. En regiones o campos donde *R. solanacearum* no está presente, la primera línea de defensa es evitar el uso de tejido propagativo contaminado, el control de las aguas superficiales, prohibiendo el uso de cursos de agua contaminados para el riego, exigiendo que los afectados de las granjas desinfectan la maquinaria y las instalaciones de almacenamiento, permiten la sanidad en los cultivos. Donde *R. solanacearum* es endémica, el mejor control cultural es la rotación de cultivos, una ventaja adicional es la reducción de la presencia de nematodos que ataquen a cultivos susceptibles (Osdaghi, 2020). Otros controles culturales tales como: el uso de enmiendas del suelo (compost, bagazo, polvo de cascarilla de arroz), fertilizantes inorgánicos u otro material como el polvo de concha de ostra, pueden modificar las comunidades microbianas nativas del suelo para suprimir el tamaño o la actividad de la población de *R. solanacearum*. La desinfestación del suelo, la eliminación de plantas enfermas y cercanas, así como la eliminación de la flor masculina y el embolsado de racimos de frutas permiten el control. Los productos químicos comerciales y antibióticos generalmente son ineficaces para controlar la enfermedad, una excepción puede ser la fumigación con cloropicrina sola o combinada con otros fumigantes o con solarización permiten el control (Scala et al., 2018).

Los ensayos de patrones de sensibilidad y resistencia de los microorganismos cambian constantemente ya que muchos microorganismos han desarrollado resistencia incluso a los antibióticos más nuevos. Dado que los patrones de susceptibilidad son impredecibles, es necesario probar los patógenos aislados frente a los agentes antimicrobianos apropiados. Los ensayos que determinan la concentración más baja del biocida que inhibirá el crecimiento del organismo se conoce como concentración inhibitoria mínima (CMI) aplicados a los antibiogramas permiten establecer dosis adecuadas para el control de los microorganismos. (Schwalbe et al., 2007).

## Justificación del problema

La letalidad y persistencia de *R. solanacearum* (bacteria cosmopolita) presente en una amplia gama de huéspedes (250 especies) de importancia económica (papa, banano, plátano, tabaco, tomate, etc.) distribuidos en extensas zonas geográficas a nivel local, regional y mundial, provoca grandes pérdidas económicas en los países afectados. La severidad de la enfermedad promueve y exige la implementación de medidas de control y erradicación que permitan mantener la seguridad y protección de la soberanía alimentaria; la aplicación de estas medidas presentan múltiples desafíos tales como: la supervivencia de la bacteria en múltiples nichos ecológicos, la capacidad de presentar fuentes de inóculo en géneros arvenses, la incidencia y persistencia de la bacteria en residuos vegetales y en diferentes materiales, la carga genética que le permite promover resistencia, la aparición de diferentes razas y cepas del patógeno con virulencia variable en diferentes condiciones ambientales, la mínima acción de control que se obtiene mediante el uso de pesticidas, la importancia en la reducción de pesticidas residuales, el incremento de cultivos orgánicos que fomenten alternativas de control amigables con el ambiente, etc.

El Ecuador al ser considerado como el mayor productor y exportador de banano (con un área cosechada de 164085 ha y un total de 6684916.17 Tn de producción en el 2021), debe promover y ejecutar planes, programas e investigaciones que permitan encontrar medidas sanitarias de control que permitan el manejo adecuado de la marchitez bacteriana.

En el país, cuando se observa un cultivo con síntomas de la enfermedad *del Moko*, provocada por *R. solanacearum*, se activan los protocolos y se aplica la resolución técnica 0072 de AGROCALIDAD, “PLAN DE ACCIÓN PARA EL CONTROL DE *Ralstonia solanacearum* Raza 2”, este protocolo especifica una serie de pasos y productos a utilizar para controlar la enfermedad, sin embargo, este procedimiento se aplicará en cualquier tipo de cultivo, incluso si este es considerado como “orgánico”. Es importante encontrar productos que estén permitidos dentro de la agricultura orgánica y que sean tan o igual de buenos que los productos usados normalmente, para lograr esto es necesario empezar

desde ensayos *in vitro* donde se pueda observar a detalle la interacción del microorganismo frente a los antimicrobianos a probar.

### **Objetivo General**

Evaluar cinco productos comerciales para el control de *Ralstonia solanacearum in vitro*, como alternativa de uso en la producción orgánica.

### **Objetivos específicos**

- Aislar la bacteria *Ralstonia solanacearum* por el método de siembra por estría a partir de musáceas sintomáticas para obtener cultivos axénicos.
- Identificar la bacteria *Ralstonia solanacearum* por morfología, indicadores bioquímicos, inmunológicos y moleculares para asegurar su pureza.
- Evaluar *in vitro* la eficacia de los cinco productos para el control de *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

### **Hipótesis**

Al menos uno de los productos comerciales es efectivo para el control de *R. solanacearum*.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Bacteria *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al., 1996 emend. Safni et al., 2014 (EPPO, 2022). Es una bacteria en forma de bastón Gram negativa, su longitud varía entre 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ , es un organismo aeróbico con un penacho de flagelos polares, puede ser móvil o no. Es oxidasa y catalasa positiva, arginina dihidrolasa negativa y acumula polihidroxibutirato intracelular, algunas cepas reducen el nitrato a gas y el nitrato a nitrito, no crece por debajo de los 4 °C ni por encima de los 40 °C (Safni et al., 2014).

### Nomenclatura y Taxonomía

La bacteria *Ralstonia solanacearum* ha pasado por varios cambios en su nombre desde su aislamiento en 1914 por Erwin Smith quien la nombró como *Pseudomonas solanacearum*, en la actualidad gracias a las técnicas moleculares se la ha desvinculado de géneros como *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*, pasando a pertenecer al género *Ralstonia* denominado así por Yabuuchi y colaboradores en 1995 (Osdaghi, 2020).

Recientemente, ha sido reclasificada por Safni et al., (2014) en tres genoespecies distintas: *R. solanacearum* (filotipo II), *Ralstonia pseudosolanacearum* (filotipos I y III) y *Ralstonia syzygii* (filotipo IV) (EPPO, 2022). En la Tabla 1 se describe el estado actual taxonómico de este microorganismo.

### Tabla 1

#### Taxonomía de *Ralstonia solanacearum*

Clasificación	Nombre
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	$\beta$ - Proteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Ralstoniáceas
Género	<i>Ralstonia</i>
Especie	<i>R. solanacearum</i>

*Nota.* Modificado de *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide, por García et al., (2019).

*Ralstonia solanacearum* era clasificada en cuatro Razas y estas dependían de la temperatura y de la zona en la que la bacteria se encontraba, estas a su vez estaban subclasificadas en biovares. En la actualidad una organización más refinada tiene bases moleculares, los datos obtenidos a partir del análisis filogenético de las secuencias de la región espaciadora intergénica (ITS) del ARNr 16S-23S y las secuencias parciales del gen de la endoglucanasa (egl) y las hibridaciones ADN-ADN demuestran que el complejo de especies de *R. solanacearum* comprende tres genoespecies (Safni et al., 2014).

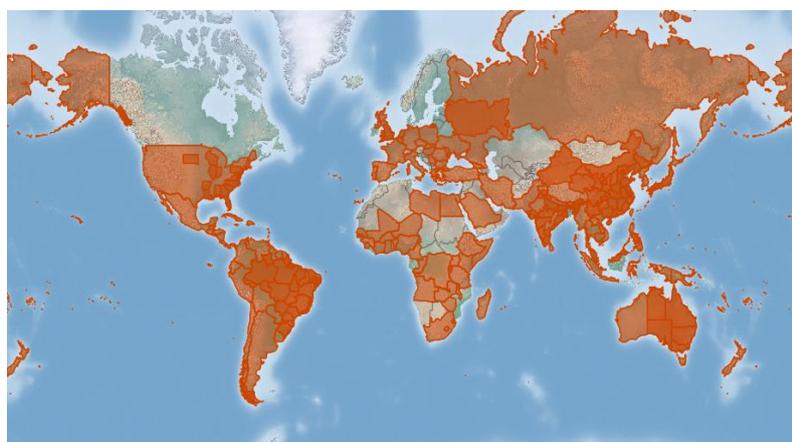
Los genotipos más importantes a nivel de patogenicidad son el Fiotipo IIB *sequevar* I, agente causante de la podredumbre parda de la papa, Fiotipo II con los genotipos IIA-24, IIB-3, IIB-4 y algunas cepas de IIA-41, IIA-53 y IIB-25 han sido descritas como las causantes de la enfermedad del Moko en *Musa* spp. y *Heliconia* (EPPO, 2022).

### **Distribución geográfica**

*R. solanacearum* está muy extendida en zonas tropicales, subtropicales y templadas cálidas de todo el mundo, su ocurrencia también ha sido reportada desde zonas templadas.

### **Figura 1**

*Distribución geográfica de la presencia o ausencia de R. solanacearum en cada país.*



*Nota.* La figura presenta mediante colores la distribución generalizada de *R. solanacearum* en los diferentes continentes. Tomado de *Ralstonia solanacearum* (*bacterial wilt of potato*) por E. Osdaghi, 2023, CABI Copyright 2023.

En América los países que presentan reportes de presencia generalizada de *R.*

*solanacearum* son: Brasil, Chile, Colombia, Bolivia Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela. En Ecuador la afectación en musáceas ha sido diagnosticada en las siguientes provincias; Bolívar, Carchi, Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Manabí, Napo, Orellana, Los Ríos, Pastaza, Santo Domingo de los Tsáchilas y Sucumbios (AGROCALIDAD, 2023).

### **Hospederos**

El complejo de especies de *R. solanacearum* es un grupo diverso de fitopatógenos que infecta un rango amplio de hospederos (más de 250 especies) y causan pérdidas devastadoras en todo el mundo (Safni et al., 2014) principalmente dicotiledóneas, miembros herbáceos de la familia *Solanaceae*, también afecta a algunas monocotiledóneas, malas hierbas, cultivos, arbustos y árboles. A nivel mundial, los cultivos más importantes son: tomate, tabaco, berenjena, papas, banano, plátano y heliconia (García et al., 2019).

### **Marchitez bacteriana**

A finales del siglo XIX se describió un padecimiento de marchitez en algunas plantas como tabaco, papa, plátano y el maní en Estados Unidos, esta era conocida como “enfermedad del limo” Smith había demostrado en 1896 que el microorganismo responsable era la bacteria denominada por él como *Bacillus solanacearum* (ahora *Ralstonia solanacearum*). Fue descubierta en zonas sub tropicales pero en años posteriores se fueron encontrando nuevas cepas en diferentes regiones del mundo (Scala et al., 2018).

*R. solanacearum* tiene una amplia gama de hospederos y los síntomas pueden variar dependiendo de la especie infectada, sin embargo, existen características generales que comparten el complejo huésped-microorganismo, estas son: marchitamiento y amarillamiento de las hojas jóvenes, exudado bacteriano de color blanco en tallo, rizoma o tubérculo recién cortado debido a la alta densidad celular que genera en la planta. En general, las temperaturas más cálidas por encima de los 28 °C promueven un desarrollo más rápido de los síntomas que las temperaturas más frías (Osdaghi, 2020).

En el caso de las Musáceas un síntoma claro es la podredumbre seca marrón en los frutos, en las plantas jóvenes y de crecimiento rápido, las hojas más jóvenes se vuelven de

color verde pálido o amarillo y se marchitan, el pseudotallo presenta una decoloración vascular marrón (EPPO, 2022).

Uno de los modos de transmisión de la bacteria entre países es por material vegetativo contaminado o con infecciones latentes. El Fiotipo II, que causa la enfermedad Moko del banano, es transmitida por insectos y tiene potencial para propagarse rápidamente. Otra forma es mediante vectores mecánicos como herramientas de poda o de uso general (Osdaghi, 2020).

La enfermedad se presenta en cualquier estado fisiológico de la planta, se puede desarrollar descendentemente por causa de daños mecánicos con utensilios infectados o por ataque de insectos a los racimos o se puede producir de forma ascendente cuando *R. solanacearum* penetra el sistema radical por heridas (Nuñez, 2021).

El marchitamiento de la planta comienza cuando la densidad bacteriana aumenta en toda la planta ocasionando un taponamiento de los haces vasculares y provocando que no llegue suficiente agua a las hojas, esto sucede debido al polisacárido extracelular de *R. solanacearum* que posee una alta masa molecular, además existen factores contribuyentes como las altas densidades de microorganismos, las tálides y gomas producidas por las plantas y los subproductos de la degradación del patógeno de la pared celular de las plantas (Blomme et al., 2017).

### **Biología y Ecología**

La mayoría de las bacterias fitopatógenas están estrechamente asociadas con sus hospederos vivos y temporalmente en restos de plantas hospedantes infectadas.

Sobreviven por períodos relativamente breves en el suelo u otros ambientes donde compiten con poblaciones saprofitas activas. *R. solanacearum* es una de las pocas bacterias patógenas de plantas para las que existe evidencia de supervivencia en el suelo (los niveles elevados de enfermedad se expresaron en suelos arcillosos con alta capacidad de retención de agua). Se ha demostrado que muchas malezas son huéspedes alternativos que mantienen una fuente continua de inóculo para el patógeno entre cultivos (Osdaghi, 2020).

*R. solanacearum* normalmente ingresa a través de las raíces, se mueve sistémicamente a través del xilema y causa síntomas de marchitez que a menudo son letales, las infecciones latentes son muy importantes en la diseminación de patógenos; en el cultivo de banano el sitio principal de infección es el racimo floral debido a que los vectores son insectos. Cuando el ingreso es a través de heridas o estomas, permite que la bacteria se mueven a través de los haces vasculares, un proceso que se acelera a temperaturas más altas; la velocidad de movimiento también depende de la parte de la planta colonizada; a esto le sigue la colonización del xilema, donde las bacterias se adhieren por atracción polar a las paredes de los vasos, posteriormente se localizan en sitios preferenciales del mesófilo, se considera que el bloqueo de los vasos por bacterias es la causa principal del marchitamiento (García et al., 2019).

La enfermedad es más grave a temperaturas de 24 a 35 °C y rara vez se encuentra cuando la temperatura media en invierno desciende por debajo de los 10 °C. La alta humedad del suelo y los períodos de clima húmedo o estaciones lluviosas están asociados con una alta incidencia de enfermedades. La humedad del suelo también afecta la reproducción y supervivencia del patógeno; los niveles de humedad del suelo de -0,5 a -1,0 bar favorecen la expresión de la enfermedad, mientras que los niveles de -5 a -15 bar son desfavorables (Safni et al., 2014).

Las condiciones climáticas, como las bajas temperaturas, que son desfavorables para la expresión de la enfermedad pueden ocultar una infección extensa. La bacteria tolera climas tales como; tropical, tropical húmedo y seco de sabana, seco (árido y semiárido), clima de estepa, clima templado cálido o con verano seco, clima templado y monzónico tropical (Osdaghi, 2020).

### **Cultivo y aislamiento**

La bacteria *R. solanacearum* puede ser aislada a partir de material vegetal sintomático utilizando medios nutritivos generales no selectivos como el agar nutritivo (AN), agar glucosa Peptona levadura (YPGA), agar peptona sacarosa (SPA) o el agar de Kelman con tetrazolio (TZC). A pesar de que antes de la siembra de las muestras vegetales estas

se deben desinfectar con agentes químicos como el hipoclorito de sodio, muchas veces en la planta se dan infecciones secundarias o tienen poblaciones altas de saprofitos, suele recomendarse que este procedimiento se realice en medios semiselectivos, para esto se puede utilizar el medio modificado mSMSA o el medio Sequeira (EPPO, 2022).

Para realizar la siembra de las muestras vegetales se debe preparar suspensiones bacterianas con diluciones adecuadas y llevarlas a placas de los medios anteriormente mencionados por extensión o estriado. Las placas deben incubarse durante 2-6 días a 28°C (García et al., 2019).

### **Métodos de identificación bacteriana**

Los métodos de identificación bacteriana en semillas y tejidos permiten diagnosticar enfermedades fitopatógenas de manera oportuna, rápida y precisa, esto ayuda a tomar decisiones adecuadas para el control de las enfermedades en los cultivos agrícolas (Khakimov et al., 2022).

La detección de bacterias patógenas involucran la revisión de campo y las plantas en búsqueda de signos y síntomas así como el diagnóstico en el laboratorio en donde se aíslan a los microorganismos y se someten a diferentes pruebas como: fisiológicas, bioquímicas y de patogenicidad (Belete y Boyraz, 2019).

*R. solanacearum* puede ser detectada utilizando métodos basados en cultivos, como medios semiselectivos, métodos serológicos como pruebas de tiras reactivas y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas, pruebas bioquímicas como BIOLOG, análisis de ácidos grasos, proteínas, y pruebas basadas en ácidos nucleicos (Osdaghi, 2020) Para realizar la identificación deben utilizarse al menos dos pruebas basadas en principios bioquímicos diferentes o dirigidas a dos partes diferentes del genoma para las pruebas moleculares (EPPO, 2022).

Algunas de las pruebas que se realizarán en este trabajo son: observación visual, microscopía, observación morfológica de colonias, pruebas bioquímicas, diagnóstico inmunológico por ELISA e identificación genética molecular, métodos que serán descritos a continuación.

### **Observación visual**

Se trata de la comparación de una planta enferma con una sana, se observan características como el color, forma, densidad de las hojas en la planta, cambios en el sistema radicular, manchas o necrosis en tallos u hojas, aparición de esporangio, etc. Sacar conclusiones solo con la observación visual no es suficiente para el diagnóstico, para aumentar la fiabilidad de los resultados es importante realizar otros tipos de estudio (Khakimov et al., 2022).

### **Microscopía**

Tras la observación visual de signos y síntomas se deben llevar las muestras a un laboratorio para su observación microscópica, para una observación primaria se utiliza un estereomicroscopio binocular con el que se observará de manera general hifas, microesclerosis, conidióforos y conidios de hongos, mediante esta técnica no se observan bacterias por ser de menor tamaño (Khakimov et al., 2022).

### **Observación Morfológica**

Si por el método de microscopía no se encuentran hongos en la superficie de la muestra, se procederá a macerar el tejido para sembrarlo en cajas petri con medio diferencial o selectivo para la observación de colonias.

Algunas de las características a tener en cuenta son el tamaño, la morfología y la pigmentación de la colonia. Dentro de las características morfológicas se encuentran: forma, tamaño, textura, elevación, tipos de bordes, consistencia, etc. (Goszczyńska et al., 2000).

En los medios de nutrientes generales, aislados virulentos de *R. solanacearum* desarrollan colonias de color blanco crema nacarado, planas, irregulares y fluidas, a menudo con verticilos característicos en el centro. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* forman colonias butíricas pequeñas, redondas, no fluidas, que son completamente de color blanco crema. En los medios de tetrazolio y SMSA de Kelman, las espirales son de color rojo sangre. Las formas avirulentas de *R. solanacearum* forman colonias butíricas pequeñas, redondas, no fluidas, que son enteramente de color rojo oscuro (García et al., 2019).

### ***Pruebas Bioquímicas***

Con el descubrimiento de que son los microorganismos los causantes de ciertas enfermedades surgió la necesidad de identificarlos, una de las maneras más antiguas encontradas son las pruebas bioquímicas, su fundamento se basa en que las bacterias producen grandes volúmenes de enzimas dependiendo del sustrato en el que se encuentran, el tipo de enzimas que produce una bacteria puede ser utilizado para clasificar sus especies pues, todos los microorganismos poseen perfiles enzimáticos distintos (Altheide, 2019).

Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas que tienen una duración de segundos a minutos, evalúan la existencia de una enzima preformada estas son catalasa y oxidasa, otras pruebas que tienen una duración menor a seis horas como Ureasa e Indol y la mayoría de pruebas que requieren de incubación de 18 horas en adelante y detectan productos del metabolismo o la sensibilidad de un microorganismo a cierto sustrato como la prueba óxido fermentativa o reducción de nitratos (Bou et al., 2011).

### ***Pruebas Serológicas***

También llamados métodos de inmunodiagnóstico, incluyen la inmunofluorescencia, inmunotransferencia, microscopía electrónica especial serológica, el ensayo inmunoenzimático (ELISA), entre otros. Estos métodos eran utilizados principalmente para la detección de virus, sin embargo en los últimos años se han utilizado también para el diagnóstico de otros fitopatógenos como oomicetos, bacterias y fitoplasmas (Khakimov et al., 2022).

Uno de los métodos más sensibles y específicos de los antes mencionados es ELISA, este permite un diagnóstico fiable, es una prueba que combina la especificidad de los anticuerpos y el cambio de color para identificar un objetivo. Los anticuerpos pueden reconocer antígenos específicos asociados a un determinado patógeno vegetal; los anticuerpos policlonales, utilizados con éxito para detectar el patógeno, no siempre son suficientemente específicos, mientras que los anticuerpos monoclonales son más específicos, pero aún más caros (Scala et al., 2018).

## **Pruebas Moleculares**

Las técnicas basadas en ácidos nucleicos (ADN) son más sensibles, específicas y confiables para la detección, identificación y cuantificación de fitopatógenos. Una de estas técnicas es el ensayo de PCR (Polymerase Chain Reaction) y sus variantes, estas tienen la capacidad de detectar microorganismos causantes de la enfermedad desde cultivos puros en placa o desde la planta huésped (Belete y Boyraz, 2019). Esta técnica fue utilizada por primera vez en plantas por Rasmussen y Wolf en 1991 para identificar la bacteria *Pseudomonas syringae*, y desde entonces ha sido ampliamente utilizada por su superioridad sobre los métodos tradicionales de diagnóstico de enfermedades de las plantas (Khakimov et al., 2022).

Para la identificación de bacterias por secuencia de nucleótidos se utiliza principalmente el Gen 16s rRNA, también la subunidad "B" de la ADN girasa (*gyrB*), la ARN polimerasa (*rpoB*, *rpoD*, etc.), una combinación de genes dependientes de proteínas de choque térmico (*cpn60*, *hsp70*, etc.) y otros marcadores (Scala et al., 2018).

La identificación de fitopatógenos por secuencias nucleotídicas implica una serie de pasos: muestreo, aislamiento del cultivo puro, aislamiento del ADN del genoma, la selección del marcador molecular para la PCR y la formación del cebador, la realización de la reacción en cadena de la polimerasa, aislamiento de los fragmentos de ADN por electroforesis y la purificación del ADN, la determinación de las secuencias nucleotídicas (Tewari et al., 2019). Una vez determinada la secuencia de nucleótidos, las secuencias de ADN se editan y rectifican. Este trabajo se realiza en programas especiales como *Sequencing Analysis (Applied Biosystems)*, *BioEdit (Ibis Biosciences, EE.UU.)*, *UGENE (UniPro, Rusia)* y *ClustalX*. Después se debe realizar una comparación de las secuencias nucleotídicas de las muestras estudiadas con las secuencias nucleotídicas interpretadas a partir de bases de datos genéticas como BlastN del recurso internacional NCBI. Además, existen muchas bases de datos internacionales sobre biología molecular, genética y biomedicina, como EMBL (The European Molecular Biology Laboratory), ENA (European Nucleotide Archive), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), FungiDB (Fungal and Oomycetes

Genomics Resources), MycoBank (Centraalbureau voor Schimmelcultures fungal biodiversity center), etc. (Khakimov et al., 2022).

### **Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los agentes antimicrobianos se puede ensayar por varios métodos disponibles en el laboratorio mediante las pruebas de sensibilidad. El objetivo es evaluar la interacción de un microorganismo con uno o varios antibacterianos. De manera general, las pruebas de sensibilidad para bacterias aerobias son clasificadas en métodos de difusión y métodos de dilución (macro y microdilución) (Larrosa et al., 2022).

Las regulaciones de estas pruebas están dadas por varias normas entre ellas CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), entre otros.

#### ***Difusión en disco***

La difusión en disco también llamada antibiograma disco-placa, consiste en depositar sobre una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo de interés discos de papel secante impregnados con los antimicrobianos a estudiar. Cuando el disco contacta con la superficie del agar este absorbe agua y el antibiótico difunde al agar de forma radial, de esta manera se forma un gradiente de concentración que pasado el tiempo de incubación (18-24h) se observa en forma de un halo denominado zona de inhibición. Los diámetros obtenidos de los halos de inhibición se interpretan utilizando criterios publicados por el CLSI en el apartado M-02 (Bayot y Bragg, 2022).

Este es un método cualitativo, nos dará como resultado que la bacteria es Susceptible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibacteriano, en lugar de que nos dé una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Larrosa et al., 2022).

#### ***Métodos de dilución***

Estos métodos se consideran para la determinación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos sobre los microorganismos, además de la

actividad bactericida o bacteriostática (Larrosa et al., 2022). La CMI de un agente antimicrobiano es la concentración mínima en la que este agente inhibe el crecimiento y multiplicación del microorganismo de interés (Reller et al., 2009).

Pueden realizarse mediante macrodilución o microdilución, las normas que se pueden revisar para realizar este procedimiento son la M-02 y M-07 del CLSI.

**Macrodilución.** Uno de los primeros métodos en ser aplicados para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos es la prueba de dilución en tubo o macrodilución. Este método consiste en preparar soluciones de antimicrobianos en doble concentración en medio de cultivo líquido a la que se les añade una concentración bacteriana de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/mL, se deja en incubación a condiciones óptimas y se examina el crecimiento mediante la turbidez (Reller et al., 2009). Este método también permite cuantificar el crecimiento bacteriano mediante la siembra en placa por tiempos de las diluciones realizadas, formando así una curva de muerte por tiempo, útil para determinar el efecto bactericida o bacteriostático, el ensayo muestra un efecto de prueba dependiente de la concentración o del tiempo de los agentes antimicrobianos sobre cepas de microorganismos (Adusei et al., 2019).

**Microdilución.** La técnica de microdilución es ampliamente utilizada para el ahorro de medios de cultivo, reactivos y compuestos a ensayar, este procedimiento que miniaturiza las reacciones se han convertido en un método que ahorra espacio y reactivos, se realiza en una bandeja que contiene 96 pocillos con capacidad de 0.1 mL, se pueden probar hasta 12 antimicrobianos con 8 diluciones (Reller et al., 2009). Mediante este método se puede realizar la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), esta se define como la cantidad de antibacteriano que inhibe el crecimiento visible (fase inhibidora) del microorganismo (Pankey y Sabath, 2004).

Este es un método cuantitativo, se puede utilizar espectrofotometría o colorantes para lograr determinar una CMI. Cuando se utiliza colorantes se denomina como CMI colorimétrica, para esta técnica se pueden utilizar diversos colorantes, especialmente usadas las sales de Tetrazolio como el bromuro de 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT),

2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio carboxanilida sal interna (XTT), 2-[4-yodofenil]-3-[4-dinitrofenil]-5-feniltetrazolio cloruro (INT) y otros compuestos, el más conocido la resazurina (Azul Alamar). El cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) es una sal de tetrazolio ampliamente utilizada en la determinación de MIC y es un compuesto incoloro cuando se solubiliza con agua, cuando está en presencia de bacterias metabólicamente activas se reduce a formazán de color rojo que es directamente proporcional a la cantidad de células viables, es un colorante menos tóxico que algunas de las sales mencionadas como el MTT o INT y no sufre alteraciones en el color al reducirse como el XTT y la rezasurina (Veiga et al., 2019).

### **Producción orgánica**

El abastecimiento de productos que estén acorde con la preservación del medio ambiente y el consumo de alimentos sanos se ha incrementado en el mundo y se han desarrollado mercados que lo garantizan, hoy en día se puede encontrar productos orgánicos con certificaciones tales como: ISO-14001, Orgánico, Eco-OK, NutraClean Systems, HACCP, Rainforest Alliance, GLOBALGAP, SKAL, Fairtrade FLO, Naturama, Bonita Europe y otros, que garantizan al consumidor que el sistema de producción utilizado siguió las normas establecidas por cada una de esas agencias. En la última década han aparecido en el mercado diferentes entes certificadores orgánicos, en las normativas nacionales (Dirección de Orgánicos) e internacionales (Ecocert, Nature Land, BCS, Soil Association, USDA, Codex) ([MPCEIP], 2017).

Para que la producción pueda ser llamada “orgánica” debe cumplir con métodos de producción y procesamiento específicos, las normas existen que regulan la agricultura orgánica prohíbe el uso de la mayoría de plaguicidas y fertilizantes sintéticos, los organismos genéticamente modificados, lodos cloacales y la irradiación.

En el Ecuador la producción orgánica se regula mediante la Resolución Técnica 0099 Instructivo de la Normativa General para Promover y Regular la Producción Orgánica-ecológica y Biológica en el Ecuador, norma que se encuentra vigente desde el año 2013.

### ***Productos químicos permitidos en la producción orgánica***

Los plaguicidas agrícolas son compuestos utilizados para matar o inhibir el crecimiento de agentes patógenos o los efectos que estos ejercen sobre los cultivos, estos compuestos pueden tener un origen físico, químico o biológico (Tamm et al., 2022).

Los productos químicos utilizados en la agricultura pueden ser sistémicos o de contacto. Los compuestos sistémicos son aquellos que entran y son transportados al xilema y floema de la planta, permitiendo la protección del cultivo cuando la infección de microorganismos ya ha empezado. Por otro lado, los productos de contacto protegen a la planta de posibles infecciones, estos duran menos que los sistémicos pues se lavan y dependen de las condiciones climáticas.

Compuestos de cobre. El uso de compuestos de cobre se conoce desde hace más de un siglo para el control de oomicetos, hongos y bacterias, se utilizaban para proteger cultivos de uvas contra el mildiú vellosa causado por *Peronospora sparsa*, este fue un descubrimiento accidental de un compuesto químico (sulfato de cobre) en contra de microorganismos patógenos. Aunque desde entonces se han utilizado en la agricultura muchas sustancias con actividad antimicrobiana, el cobre no ha dejado de ser utilizado pues juega un papel importante en el manejo integrado de plagas, el manejo de enfermedades en la agricultura orgánica depende casi exclusivamente de su uso (Tamm et al., 2022).

Los compuestos de cobre más utilizados como antimicrobianos son: óxidos, sulfatos y oxiclорuros. Los óxidos e hidróxidos tienen una solubilidad y un potencial de ionización alto, por ende, se liberan de forma rápida, al paso del tiempo su uso puede provocar fitotoxicidad a cambios de temperatura. Los sulfatos como el caldo bordelés tienen una solubilidad baja y un potencial ionizante medio, también se liberan de forma rápida pero su efecto es más corto, sus dosis suelen ser más altas. Por último los oxiclорuros tienen una solubilidad baja y un potencial ionizante alto, lo que implica que su liberación será lenta y por ende de mayor duración (La Torre et al., 2018).

Compuestos de azufre. Los compuestos de azufre son utilizados en la agricultura ecológica, este compuesto puede ser utilizado del azufre de los fertilizantes o azufre en bruto obtenido de fuentes naturales. En el cultivo ecológico de frutas y hortalizas, el azufre elemental es un agente principal y esencial de la protección fitosanitaria para mantener la calidad interna y externa de las plantaciones (Paulsen, 2005).

Ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos son parte de los compuestos utilizados en la agricultura orgánica, están constituidos por metabolitos microbianos provenientes de preparados biológicos, ejemplos de estos son los ácidos carboxílicos, ácido cítrico, ácido piroleñoso, ácido succínico,  $\alpha$ -cetoglutárico, palmitoleico y otros que en los últimos años han revelado propiedades bactericidas, fungicidas y nematocidas (Morgunov et al., 2017).

El ácido piroleñoso es un compuesto orgánico utilizado en la agricultura como enraizador de plantas, fertilizante foliar, insecticida, bactericida y mejorador de la calidad del suelo. También conocido como "alquitrán líquido" o "ácido pirólico", se obtiene a través de la destilación de biomasa, está compuesto por un 80% a 90% de agua (Rhea y Yanela, 2022), y el resto lo conforman compuestos orgánicos como hidrocarburos alifáticos, aromáticos y nafténicos y otros compuestos oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas, furanos, ácidos, fenoles y éteres (Grewal et al., 2018).

## Capítulo III: Metodología

### Instituciones participantes

Este proyecto de investigación se desarrolló desde el 01 de junio del 2023 hasta el 18 de agosto del mismo año, por medio del convenio existente entre la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, AGROCALIDAD y la Universidad de las Fuerzas Armadas, con los fondos del Programa de Vigilancia Fitosanitaria de AGROCALIDAD.

### Productos a utilizar

Desde el departamento de orgánicos de la Agencia se recibieron 5 productos para probarlos en contra de la bacteria *R. solanacearum*. Estos productos se describen a continuación.

#### **Caldo Bordelés®**

El caldo bordelés es un producto ampliamente utilizado en la agricultura como fungicida y bactericida. Se trata de una mezcla de sulfato de cobre tribásico e hidróxido de calcio. El compuesto a utilizar es un polvo mojable que posee mixtura de Caldo Bordelés en concentración de 810 g/Kg, un equivalente a 200 g/Kg de cobre, ofrece protección a variedad de cultivos contra hongos y bacterias, su efecto es de contacto, su textura fina permite la acción fungicida desde las primeras aplicaciones y tiene efecto a largo plazo (Edifarm, 2016).

Algunas de los microorganismos que pueden ser tratados con este compuesto son *Mycena citricolor*, *Capnodium citri*, *Phytophthora infestans*, *Pseudomonas solanacearum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, entre otros.

#### **Kopercup®**

Es un fungicida y bactericida de amplio espectro, es un producto de acción por contacto con la planta, se utiliza para el control de varias enfermedades fúngicas y bacterianas en cultivos. Algunos de los microorganismos a los que ataca son: *Phytophthora*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, entre otros. Está compuesto por oxiclورو de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ ) al 87%, que equivale a 500 g/kg de cobre.

**Phyton®**

Es un producto de acción sistémica, que posee doble acción, preventiva y curativa. Se utiliza para el control de varias enfermedades foliares y radicales de flores y frutos provocadas por hongos y bacterias. Es un concentrado soluble compuesto de 240 g/L de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y un *pool* de ácidos orgánicos, su fórmula permite la absorción y transporte sistémico a través de la planta, su mecanismo de acción es sobre la pared celular interfiriendo con los mecanismos reproductivos de los microbios (Ecuaquímica, 2018).

**Azufrol®**

En su hoja técnica se describe como un acaricida y fungicida que tiene como base 80% de azufre (800 g/kg). Es fabricado y distribuido por la empresa QUIMETAL INDUSTRIAL S.A. El modo de acción de este producto es por contacto y está especialmente indicado para el tratamiento de oídios y arañas. La textura de este compuesto le permite tener una uniforme y óptima adherencia en la superficie de la planta (QUIMETAL, 2012).

**Ácido piroleñoso**

Este producto actúa principalmente en forma de contacto, se aplica directamente sobre las plantas o en el suelo para combatir los patógenos. Al entrar en contacto con los hongos y bacterias, inhibe su crecimiento y propagación, contribuyendo así a la protección de los cultivos. El ácido piroleñoso que se utilizará en este proyecto se obtuvo de la Universidad de Quevedo en donde lo utilizaron para el control de *Prodiplosis longifila* G. en tomate (Estrella Hablich, 2019).

**Aislamiento de la bacteria**

Para aislar el agente causal de la marchitez bacteriana, se utilizaron muestras vegetales con síntomas provenientes de todo el país a los laboratorios de Fitopatología de AGROCALIDAD Matriz. Se empezó por una desinfección de la superficie de las muestras utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 2% por cinco minutos y tres enjuagues con agua estéril, una vez desinfectadas se trituraron en agua peptona. Finalmente se tomó

muestra de este último tubo y se rayó con un asa estéril la superficie de una placa con medio diferencial Kelman con TZC (1 g de Ácido casamínico, 10 g de peptona, 5 g de glucosa, 5 mL de cloruro de tetrazolio).

Las placas se incubaron a 28°C por 24 horas, después de ese tiempo se seleccionaron las colonias con características típicas de *Ralstonia solanacearum* y se sembraron por estriado en medio semiselectivo SMSA. Una vez se obtuvo un cultivo puro las colonias se pasaron a agar nutritivo para conservarlas y realizar las siguientes pruebas.

### **Identificación de la bacteria**

La identificación de *R. solanacearum* fue llevada a cabo mediante pruebas bioquímicas, pruebas serológicas mediante ELISA y pruebas moleculares por PCR.

### **Pruebas bioquímicas**

Se realizó una batería de pruebas en tubo, según Cruz et al., (2023), las pruebas necesarias para la identificación de *R. solanacearum* son: Coloración de Gram (Violeta de genciana, lugol, alcohol cetona y zafranina), Prueba de oxidasa, prueba de catalasa (peróxido al 30%), Prueba de KOH 3%, Prueba de oxidación de la glucosa (Medio BBL Basal OF), Prueba de licuefacción de gelatina (5 g de Peptona, 3 g de extracto nutritivo, 120 g de gelatina, 1 L de agua). Prueba de almidón (Medio Muller Hinton y lugol), Prueba de Arginina dihidrolasa (1 g de peptona, 5 g de NaCl, 0.30 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 g de rojo fenol, 10 g de arginina, 3 g de agar, 1000 mL de agua), Reducción de nitratos (5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 1 g de nitrato de potasio), Prueba Simmons Citrato (Medio basal Citrato).

### **Pruebas Serológicas**

Se utilizó el Kit "*Ralstonia solanacearum* Reagent Set" de Agdia. Para realizar las pruebas ELISA se prepararon los reactivos necesarios descritos en el Apéndice 1. Se utilizarán 8 pocillos para colocar tres muestras de aislado bacteriano por duplicado y para el control positivo y negativo. Como primer paso se preparó el anticuerpo de captura (CAB) para 8 pocillos en un microtubo, se colocó 792 µL de *carbonate coating buffer* con 8 µL de anticuerpo de captura, se colocó 100 µL en cada micropocillo y se dejó en incubación a 4°C

toda la noche en una cámara húmeda. Al siguiente día se preparó la suspensión con el antígeno, se puso una colonia con un asa estéril con 1 mL de buffer de extracción GEB (General Extract Buffer) para cada muestra, se sacó la placa de refrigeración y se realizó 7 lavados con buffer PBST, se eliminó el exceso de agua y se colocó 100 µL de la suspensión bacteriana anteriormente mencionada, el control negativo y el control positivo. Se incubó en la cámara húmeda a temperatura ambiente por 1 hora. Se repitió el proceso de lavado con buffer PBST, se eliminó el exceso de agua y se colocó 100 µL del conjugado enzimático peroxidasa que viene en el Kit, se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente en la caja húmeda. Se preparó sustrato TMB que viene en el Set y después de repetir por 8 veces el proceso de lavado de placa y secar el exceso de agua se colocó 100 µL de sustrato en cada pocillo. Finalmente, la lectura e interpretación de resultados se realizó después de 15 min de incubación del sustrato, se evaluó la reacción de forma visual y fotométricamente leyendo los valores de la densidad óptica (OD) a 650 nm en el espectrofotómetro. Se determinó el umbral positivo/negativo mediante el punto de corte; este valor se calculó multiplicando la media de la densidad óptica (OD) de los valores de los controles negativos multiplicado por 2. Los valores menores al valor calculado se consideraron negativos y los valores superiores al valor calculado se determinaron como positivo (Crowther, 2009). Para determinar el punto de corte se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Punto de corte} = \left( \frac{OD(CN1) + OD(CN2)}{2} \right) \times 2$$

Las etapas para el diagnóstico de *R. solanacearum* mediante la prueba de inmunoensayo DAS-ELISA se describen a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Etapas de diagnóstico de R. solanacearum mediante la prueba de inmunoensayo DAS-ELISA*

Etapa	Volumen por pocillo (mL)	Incubación		Lavados (# veces)
		Tiempo (h)	T (°C)	
Anticuerpo de recubrimiento (CAB)	0.1	Toda la noche	2-8	3
Aplicación de muestra y controles	0.1	1	25	8
Reacción enzimática	0.1	1	25	8
Reacción sustrato	0.1	0.15	25	--

### **Pruebas moleculares**

Para realizar la identificación de la bacteria por pruebas moleculares es necesario obtener el ADN de los aislados, realizar la amplificación con cebadores específicos (PCR) y la observación por electroforesis, los pasos detallados de este proceso están en el Apéndice 2. Para obtener ADN es necesario partir de aislados puros del microorganismo, para eso se colocó con un palillo estéril una colonia de bacteria en caldo nutritivo, se dejó crecer en agitación por 12 horas, al día siguiente se traspasó 1 mL de caldo a microtubos y se centrifugó por 5 minutos a 1000 RPM para obtener un precipitado bacteriano.

La extracción de ADN se realizó a ocho aislados bacterianos con el Kit *Quick-Start Protocol, DNeasy® Plant Mini Kit*. De acuerdo a sus directrices, se verificó la calidad y cantidad de las muestras de ADN midiendo sus proporciones A260/A280 con un NanoDrop. La amplificación del ADN obtenido se realizó en PCR convencional con los cebadores específicos correspondientes a *R. solanacearum* (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Primers utilizados en la amplificación de fragmentos específicos de R. solanacearum*

Primer	Secuencia	Referencia
759	5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3'	(Prior y Fegan, 2005)
760	5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3'	

Se preparó una *Mastermix*, para 11 reacciones. Mientras tanto se precalentó el termociclador de gradiente e inicio el programa del ciclo del programa de amplificación. Los ciclos se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Ciclos para la reacción en cadena de la polimerasa*

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30s	
T° de annealing	59°C	30s	30 ciclos
Extensión	72°C	17s	
Extensión final	72°C	5 min	1 ciclo
	4°C	Infinito	1 ciclo

Después del proceso de amplificación, se llevó a cabo un proceso de electroforesis del resultado de la PCR con el fin de detectar la presencia de amplificaciones. Para este propósito, se empleó un marcador de peso molecular de ADN que posee una longitud de 1000 pares de bases. La electroforesis se ejecutó aplicando una corriente de 100V durante un lapso de 30 a 45 minutos, o hasta que se percibió que las bandas se habían desplazado

aproximadamente dos tercios a través del gel. Las secuencias amplificadas de los productos del PCR se hicieron visibles al iluminarlos con luz ultravioleta en el transiluminador (Sambrook & Russell, 2001).

## **Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana.**

### ***Difusión por disco en agar***

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la normativa M02 del CLSI, (2018) para pruebas de difusión por disco. El objetivo de este ensayo es observar si existe inhibición de alguno de los productos frente *R. solanacearum*, se probará una sola dosis del 10% (100 mg/mL). Se utilizaron tres aislados bacterianos y cinco productos comerciales (Kopcup, Caldo bordelés, Azufrol, Phytón y Ácido piroleñoso), se realizaron tres réplicas de cada ensayo.

**Preparación del inóculo.** El día anterior al ensayo se estirió por agotamiento cada uno de los aislados bacterianos de interés en agar nutritivo. El día del ensayo se prepararon las suspensiones bacterianas de cada muestra ajustada a una escala de 0.5 McFarland (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), para esto se tomó entre dos y tres colonias de cultivo puro con un hisopo y se colocaron en tubos de agua salina 0.9%.

**Preparación de las soluciones antimicrobianas.** Se prepararon las soluciones antibacterianas con cada uno de los productos al 10% para obtener soluciones de 100 mg/mL; para los compuestos sólidos se mezcló 10 g de polvo en 100 mL de agua Tipo I, mientras que para los compuestos líquidos se colocó 10 mL de producto con 90 mL de agua Tipo I. Las soluciones fueron preparadas el mismo día del ensayo.

**Ensayo de difusión en disco.** Para realizar los antibiogramas se tomó un hisopo estéril y se remojó en la solución bacteriana, se escurrió en las paredes del tubo y en una caja de agar nutritivo de 9 mm se estirió en forma de césped girando la caja 3 veces a 60° aproximadamente, para terminar, se pasó el hisopo por el borde de la caja, se procuró utilizar esta suspensión en los próximos 15 minutos, se realizó el mismo procedimiento con los demás aislados.

Se tomaron discos de papel filtro con un diámetro de 6 mm y se empaparon con 10  $\mu$ L

de antimicrobiano, en cada placa se colocaron 7 discos con los 5 productos con la dosis indicada, además del control positivo un antibiótico con base de oxitetraciclina a una concentración de 4 µg/mL y el control negativo agua estéril.

En total se obtuvieron 9 placas con antibiogramas, fueron llevadas a incubación a una temperatura de 28°C por 24 h. Después de este tiempo se llevó a cabo la observación y medición de los halos de inhibición.

### ***Microdilución en caldo***

Este método se utilizó para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada producto utilizado, se siguió el procedimiento indicado en el manual M07 de la CLSI, (2018). Se utilizaron 5 productos comerciales (Kopecup, Caldo bordelés, Azufrol, Phytón y Ácido piroleñoso), un control positivo (Antibiótico de oxitetraciclina a 4 ppm). Se trabajó con 3 aislados bacterianos y 3 réplicas del ensayo.

**Preparación de soluciones antimicrobianas.** Para este ensayo se empezó por realizar la dosis a probar de los antimicrobianos, se hizo una solución inicial al 10% (para obtener soluciones de 100 mg/mL) de cada producto en caldo nutritivo, considerando que al realizar las diluciones esta quedará reducida a la mitad.

**Preparación del inóculo.** Se preparó el inóculo partiendo de una solución McFarland de 0.5, para esto se tomó de 2 a 3 colonias de bacterias con un hisopo estéril y se puso en un tubo con caldo nutritivo, después se colocó 0.1 mL de esta en 10 mL de caldo nutritivo (dilución 1:100) para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  UFC/mL por tubo. Para controlar que el número de UFC es correcto se realizó un control de calidad colocando 0.01 mL de la última dilución en 10 mL de caldo nutritivo y se sembró 0.1 mL en una caja de agar nutritivo, con esto se espera que crezcan al menos 50 colonias.

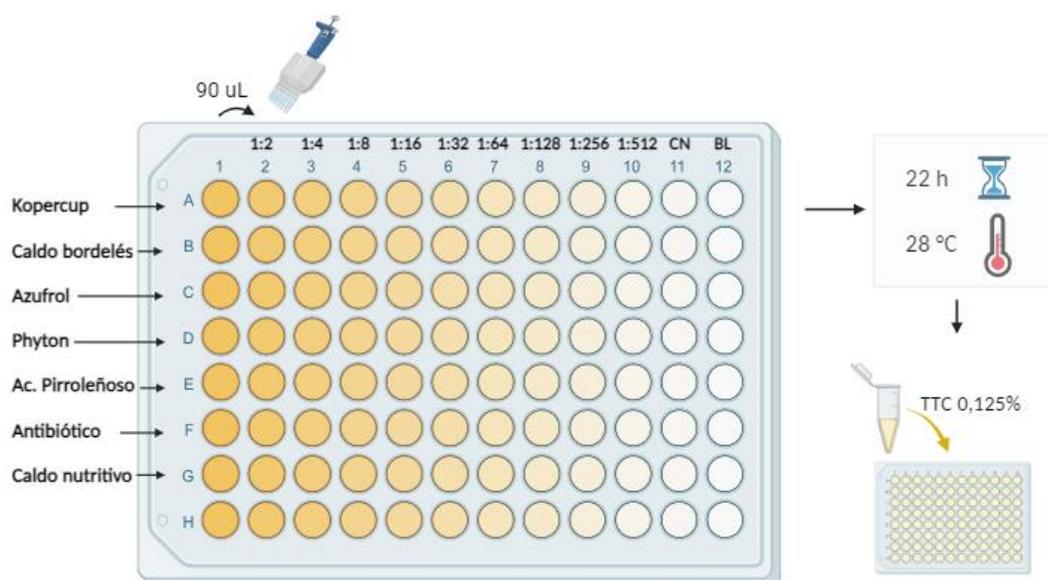
**Ensayo de microdilución.** En una placa de 96 micropocillos se colocó 90 µL de caldo nutritivo desde la columna 1 a la 12 y de la fila A la G. En la columna 1 se colocó 90 µL de cada una de las soluciones antimicrobianas (Figura 2), en la primera columna se obtuvo así una concentración inicial de 50 mg/mL, se realizó diluciones en serie 1:1; se tomó 90 µL de la Columna 1 con la pipeta multicanal y se pasó a la siguiente columna y así sucesivamente

hasta la columna 10 descartando 90  $\mu\text{L}$  de esta última. La fila F y G se llenaron con 90  $\mu\text{L}$  del antibiótico y con caldo nutritivo respectivamente, de la misma manera se descartó 90  $\mu\text{L}$ . Los pocillos de la columna 11 del control negativo (CN) contenían 90  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Los pocillos de la columna 12 del Blanco (BL) contenían 90  $\mu\text{L}$  de medio más 90  $\mu\text{L}$  de antimicrobiano, se descartó 90  $\mu\text{L}$ . Finalmente se colocó 10  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana en cada pocillo de la columna 1 a la 11, en la columna 12 se colocó 10  $\mu\text{L}$  de solución salina en lugar de inóculo, las microplacas se cubrieron con láminas adhesivas para microplacas y se colocaron en incubación a 28°C por 22 h en una cámara húmeda.

Después de las 22 horas de incubación, en la cámara de flujo y con la ayuda de una pipeta multicanal se colocó 20  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 0.125% en todos los pocillos, se volvió a colocar el film y se colocaron en la cámara húmeda, se dejaron incubando por dos horas más a 28°C. Se leyeron los resultados y se consideró que la CMI era el pocillo de la fila que no tuviera coloración rojiza o turbia y este fue dado con la dilución correspondiente. Para el análisis estadístico y determinación de una CMI se utilizó una estadística con análisis Probit con el 95% de confianza.

## Figura 2

*Esquema de diluciones en microplacas para ensayo de inhibición bacteriana.*



*Nota.* Elaborado con Biorender.

### **Macrodilución en caldo**

Para este método es necesario conocer la CMI de antemano ya que nos ayudará a realizar una curva de letalidad bacteriana, para esto se seguirá la metodología del manual M26-A (CLSI, M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, 1999). Para este ensayo se utilizarán los productos que tuvieron una CMI en el ensayo de microdilución, se harán tres repeticiones.

**Preparación del inóculo.** Se preparó el inóculo partiendo de una solución McFarland de 0.5, para esto se tomó de 2 a 3 colonias de bacterias con un hisopo estéril y se puso en un tubo con caldo nutritivo, después se colocó 0.1 mL de esta en 10 mL de caldo nutritivo (dilución 1:100) para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  UFC/mL por tubo

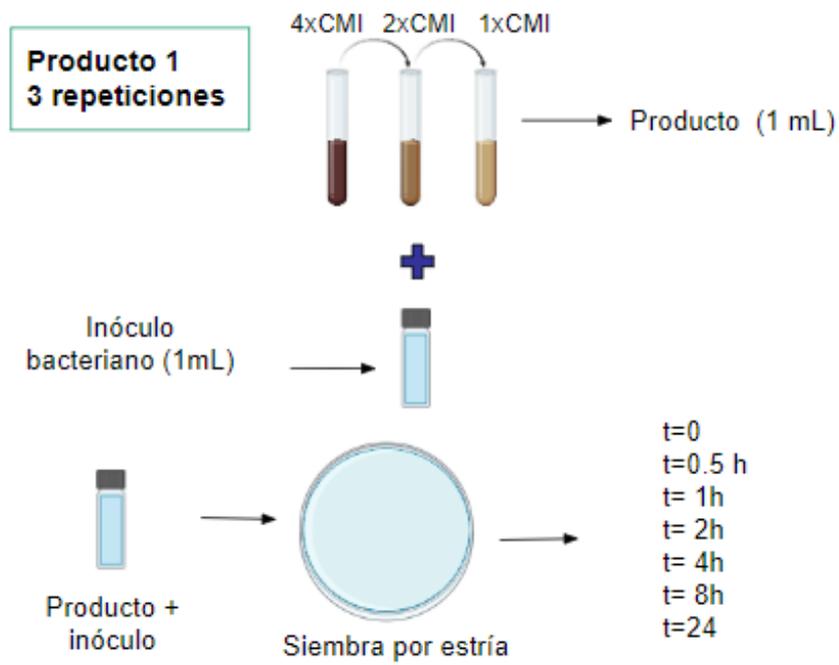
**Preparación de soluciones antimicrobianas.** Una vez determinada la CMI de cada producto se utilizó concentraciones de 1x(CMI), 2x(CMI) y 4x(CMI) de los productos. Se puso en tubos de ensayo 4 mL de la dosis mayor de cada producto al doble de concentración y se realizó tres diluciones pasando 2 mL de medio de un tubo a otro, así obteniendo las tres dosis requeridas.

**Ensayo de macrodilución.** Se colocó 2 mL de caldo nutritivo con inóculo en un tubo de ensayo que contenía 2 mL producto a las diferentes concentraciones y se sembró en placas de agar nutritivo una alícuota de 10  $\mu$ L de acuerdo a cada uno de los tiempos de incubación indicados (Figura 3). Los tiempos se eligieron a lo largo de 24 horas: tiempo inicial ( $t=0$ ), 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Las placas fueron puestas en incubación a 28°C y pasadas las 24 h se realizó el recuento de colonias por placa teniendo en cuenta el factor de dilución. Los recuentos se representaron de forma gráfica colocando en el eje de las ordenadas las UFC/mL en escala semilogarítmica y en el eje de las abscisas el tiempo en escala aritmética. La fórmula para realizar el recuento de colonias bacterianas es la siguiente:

$$UFC/mL = \frac{\#Colonias\ por\ placa \times Factor\ de\ dilución}{mL\ de\ muestra\ sembrada}$$

**Figura 3**

*Esquema de diluciones en placas para ensayo de macrodilución.*



*Nota.* Elaborado con Biorender

## Capítulo IV: Resultados

### Aislamiento de la bacteria

Mediante el análisis de muestras llegadas al laboratorio en lo que va del año 2023, se escogieron muestras sintomáticas como pseudotallo, fruto y raquis de musáceas; se observa en los frutos una podredumbre seca, tiene una consistencia harinosa e inodora de color marrón (Figura 4 A, B), en un corte transversal del raquis de la planta se presentan a en la superficie del corte puntuaciones oscuras de color café (Figura 4 C), a lo largo de los haces vasculares del pseudotallo se observa una decoloración vascular de color marrón (Figura 4 D).

### Figura 4

*Muestras de banano y plátano con síntomas de presentar *R. solanacearum**



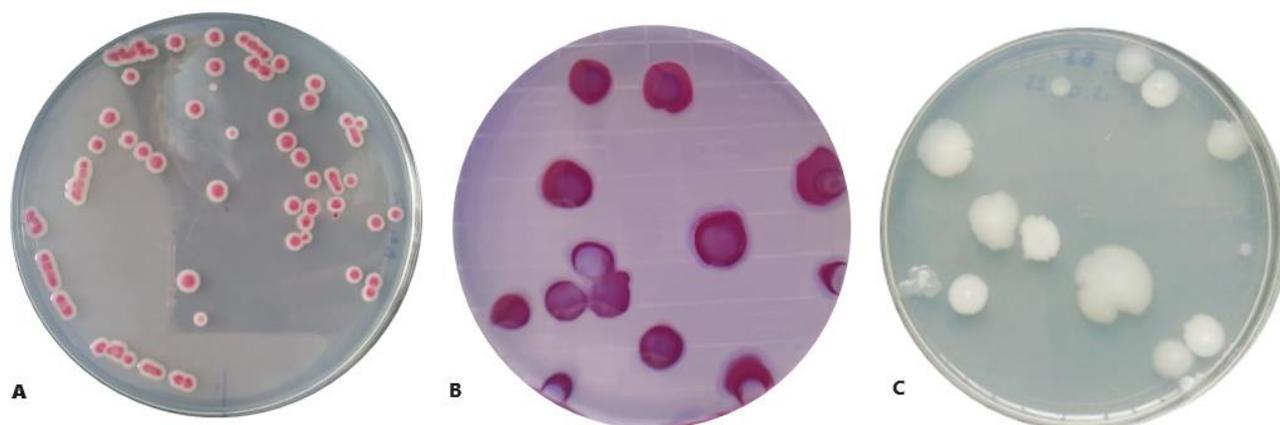
*Nota.* En las imágenes se puede observar: A) Fruto de banano con síntomas de podredumbre. B) Fruto de plátano con síntomas de podredumbre. C) Raquis de banano sintomático. D) Pseudotallo de plátano con síntomas.

De las muestras obtenidas se aislaron varias bacterias en el medio diferencial TZC, se seleccionaron aquellas que mostraron colonias características como colonias de color blanco con centros rosados, mucoides, lisas, bordes irregulares y redondeadas (Figura 5A).

Las colonias que cumplieron con esas características fueron sembradas por estriado en agar semiselectivo SMSA (Figura 5B), las características observadas en este medio son colonias mucoides de color magenta con tamaño similar a las obtenidas en TZC. Cuando se obtuvo colonias puras fueron sembradas en agar nutritivo (Figura 5C) para conservarlas y realizar las pruebas de identificación.

## Figura 5

*Características morfológicas de R. solanacearum en diferentes tipos de agar*



*Nota.* En las imágenes se puede observar: A) Colonias puras de *R. solanacearum* en medio TZC. B) Colonias puras de *R. solanacearum* en medio SMSA. C) Colonias puras de *R. solanacearum* en medio Agar nutritivo.

## Identificación de las cepas bacterianas

### **Pruebas bioquímicas**

Se obtuvieron varios aislados bacterianos puros los cuales fueron sometidos a las pruebas bioquímicas ya descritas en el apartado de metodología, en total se realizó 9 pruebas por aislado, con dos repeticiones. Las pruebas de tinción Gram, oxidasa, catalasa y KOH 3% fueron realizadas y analizadas en un día, pues son pruebas de reacción rápida. Las pruebas de reducción de nitratos, citrato, arginina dihidrolasa y óxido fermentación fueron incubadas por 24 h a 28°C para analizar los resultados y la prueba de licuefacción de gelatina estuvo a temperatura ambiente por 14 días aproximadamente y después de este tiempo se analizó los resultados.

De los aislados puestos a prueba, cuatro cumplen con las características bioquímicas que se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5***Características bioquímicas más importantes para R. solanacearum*

Prueba bioquímica	Aislado 1	Aislado 2	Aislado 3	Aislado 4
Reducción de nitratos	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-
Óxido Fermentación	+	+	+	+
Tinción Gram	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
KOH 3%	+	+	+	+

**Prueba ELISA**

Se realizaron las pruebas inmunológicas por el método ELISA, los resultados se muestran en la Tabla 6. Los micropocillos se leyeron en el lector de placas (BIOTEK ELX800) a una longitud de onda de 650nm y se obtuvo el punto de corte, a partir de la fórmula descrita en metodología, se determinó que los OD mayores que este valor son positivos para *R. solanacearum*. Los puntos de corte obtenidos para cada columna fueron de 0.111 y de 0.165.

**Tabla 6**

*Resultado de las absorbancias a 650 nm de las pruebas ELISA realizadas con el Kit*

*“Ralstonia solanacearum Reagent Set” de agdia*

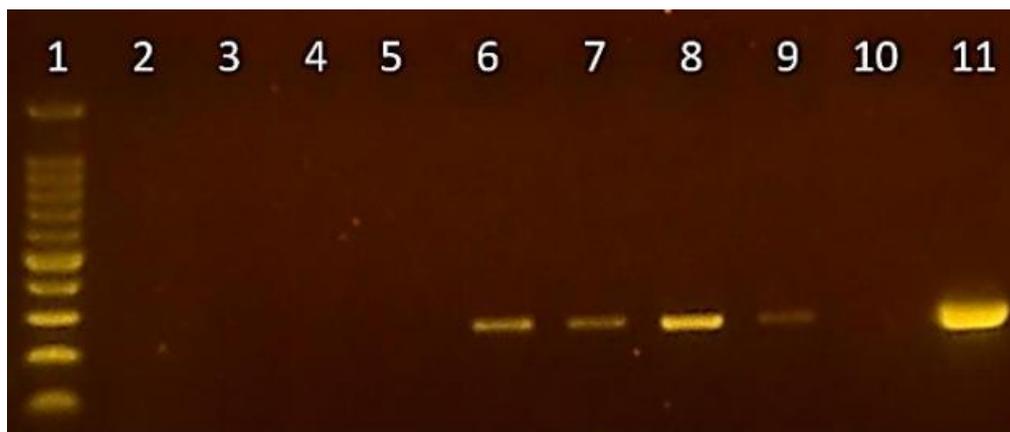
	Columna 1	Muestra	Resultado	Columna 2	Muestra	Resultado
A	1,000	C+	C+	3,000	C+	C+
B	0,297	M1	Positivo	0,278	M3	Positivo
C	0,208	M1	Positivo	0,289	M3	Positivo
D	0,206	M2	Positivo	0,291	M4	Positivo
E	0,216	M2	Positivo	0,292	M4	Positivo
F	0,067	Blanco	Blanco	0,054	Blanco	Blanco
G	0,057	C-	C-	0,083	C-	C-
H	0,054	C-	C-	0,082	C-	C-

### **Pruebas moleculares**

Se determinó la concentración y pureza del ADN genómico en una longitud de onda de 260/280 nm, se observó un cromatograma con un solo pico, no se observaron picos entre 230 y 260 nm ni se observaron picos después de 280 nm. Después de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó la electroforesis del producto PCR (Figura 6), se observan bandas a la altura de 280 pb aproximadamente.

**Figura 6**

*Electroforesis del producto PCR*



*Nota.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de producto PCR para amplificación de fragmentos. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1000 pb, los carriles del 2 al 9 corresponden a las muestras analizadas, el carril 10 es el control negativo y el carril 11 el control positivo para *R. solanacearum*.

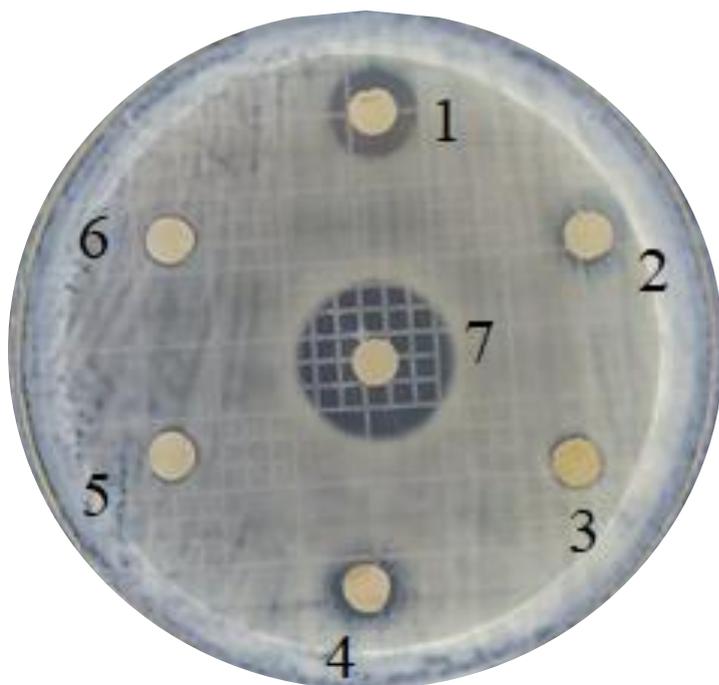
## Pruebas de inhibición bacteriana

### *Difusión por disco*

Se realizaron los ensayos por difusión en disco y se observa la formación de halos de inhibición en cuatro de los cinco productos (Figura 7) el halo de inhibición más grande corresponde al antibiótico utilizado como control, seguido del producto Kopercup, Phytol, Caldo bordelés y un pequeño halo del Ácido piroleñoso. El producto Azufrol y el control negativo de agua destilada no generaron halo de inhibición.

### Figura 7

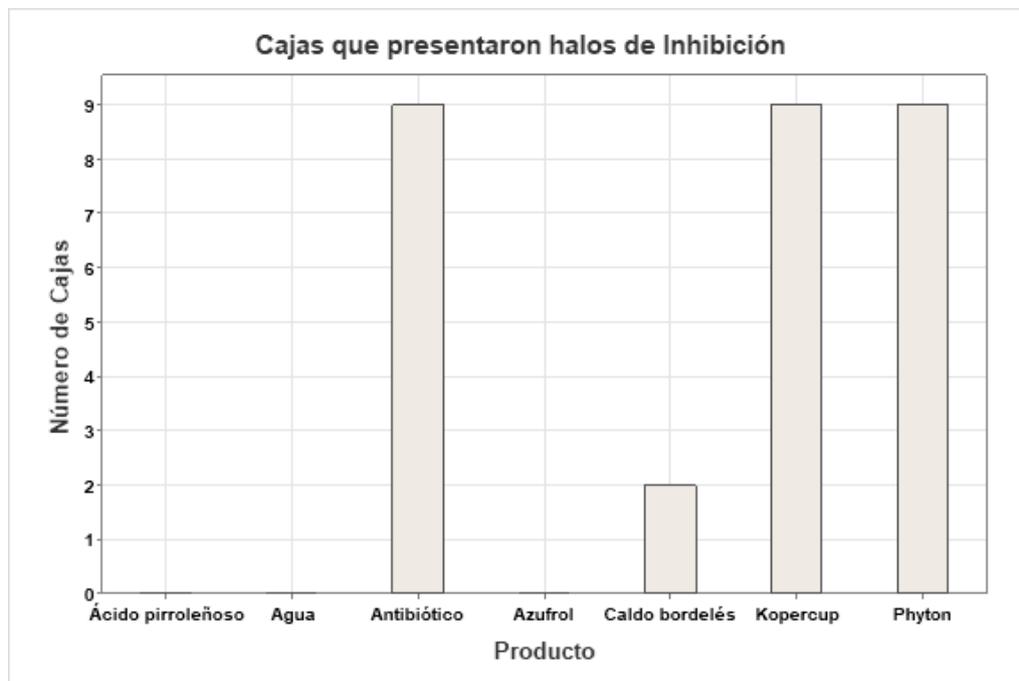
*Zonas de inhibición producidas por los productos frente a *R. solanacearum**



*Nota.* Los discos están impregnados con los productos: 1) Kopercup, 2) Caldo Bordelés, 3) Azufrol, 4) Phytol, 5) Ácido piroleñoso, 6) Agua destilada, 7) Antibiótico

**Figura 8**

*Número de ensayos en los que se generó zonas de inhibición (en agar nutritivo) para cada producto a una concentración de 100 mg/mL.*



*Nota.* Creado en Minitab

### **Microdilución en caldo**

Se realizaron diluciones seriadas de cada producto a probar en microplacas junto con bacteria y el reactivo TTC, de forma cualitativa se tomó los datos de aquellos pocillos que no presentaban coloración rojiza como CMI, se observó coloración en todos los controles negativos, no se observó crecimiento en los controles positivos (Figura 9). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos utilizados contra el organismo de prueba se determinó mediante un Análisis Probit con un nivel de confianza del 95%, Los resultados se muestran en la Tabla 7. Cuatro de los cinco productos presentaron dosis de inhibición excepto el producto Azufrol.

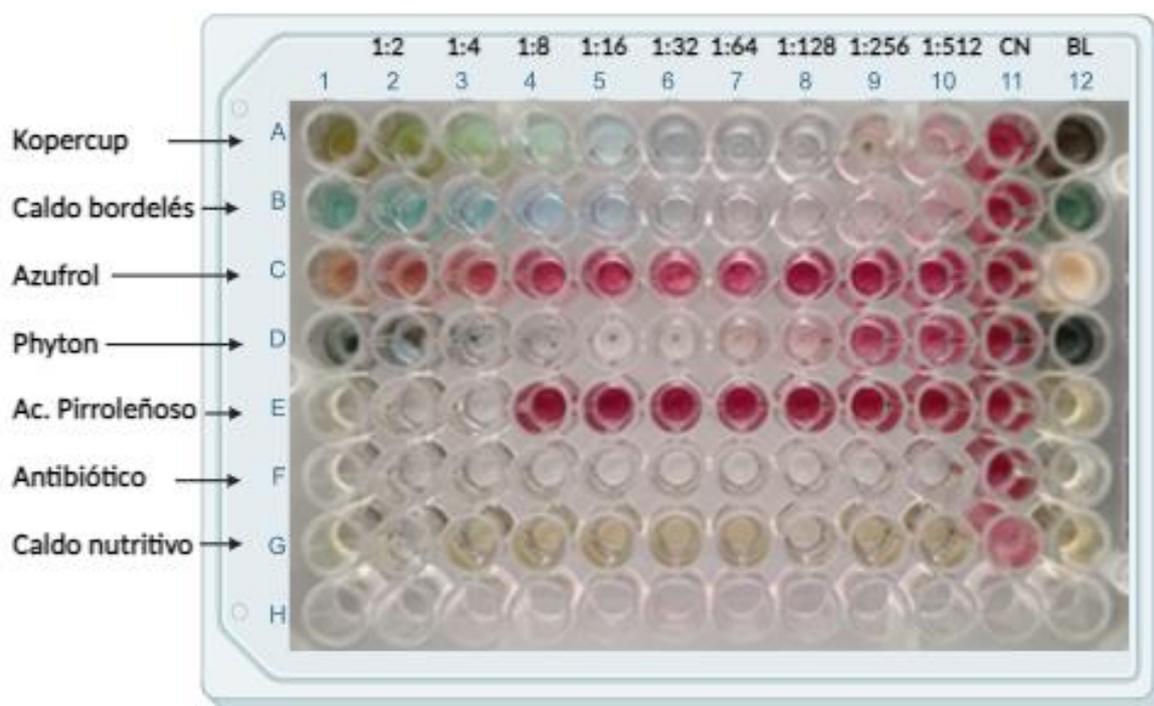
**Tabla 7**

*Concentración mínima inhibitoria de los productos utilizados.*

Productos	Concentración mínima inhibitoria (mg/mL)
Kopercup	1.38
Caldo bordelés	2.78
Azufrol	Ninguna
Phyton	4.54
Ácido Piroleñoso	18.79

**Figura 9**

*Microplaca con ensayos de microdilución con TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) después de 24 horas de incubación.*



*Nota.* Elaborado en Biorender.

### **Macrodilución en caldo**

Para este ensayo se utilizaron cuatro productos, tres dosis (Tabla 8) y 7 tiempos de referencia: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Se realizó gráficas de perfil cinético de muerte para cada producto y un ANOVA unidireccional seguido de una prueba Tukey con una confianza el 95%. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Minitab.

**Tabla 8**

*Dosis usadas para los ensayos de macrodilución en caldo de los diferentes productos*

Producto	Dosis 1 (mg/mL)	Dosis 2 (mg/mL)	Dosis 3 (mg/mL)
Kopercup	1.5	3	6
Caldo bordelés	3	6	12
Phyton	5	10	15
Ácido piroleñoso	19	38	76

El perfil cinético de tiempo de muerte del producto Kopercup contra *Ralstonia solanacearum* mostró una reducción en el número de células viables entre las 2 h, y las 24 h en las tres dosis, en comparación con el control bacteria (crecimiento del organismo sin agentes antimicrobianos) (Figura 10). La prueba Tukey muestra que hay diferencia significativa entre el crecimiento normal de la bacteria y las dosis usadas a 3 y 6 mg/mL, estas últimas tienen más semejanza con el control de antibiótico usado (Tabla 9).

El perfil cinético de tiempo de muerte del producto Caldo bordelés contra *Ralstonia Solanacearum* (Figura 11) mostró una reducción en el número de células viables entre la primera hora y las 24 horas en las tres dosis en comparación con el control bacteria. La prueba Tukey (Tabla 10) muestra una semejanza de las tres dosis usadas con el control antibiótico.

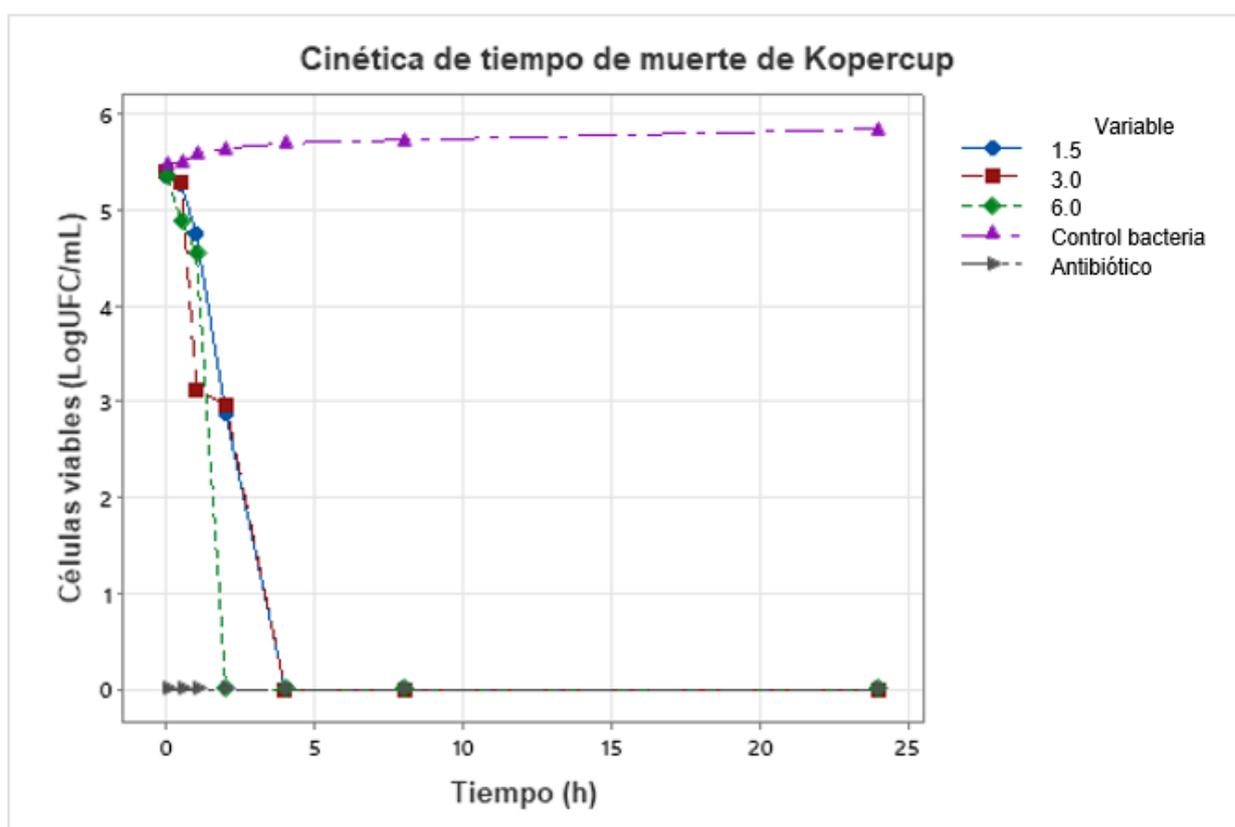
El perfil cinético de tiempo de muerte del producto Phyton contra *Ralstonia solanacearum* mostró una reducción en el número de células viables entre las 0.5 h y las 24 h en las tres dosis (Figura 12), en comparación con el control bacteriano. La prueba Tukey

(Tabla 11) muestra una diferencia significativa entre las tres dosis usadas y el control de crecimiento bacteriano.

El perfil cinético de tiempo de muerte del producto Ácido piroleñoso contra *Ralstonia solanacearum* mostró que la dosis 1 (76 mg/mL) es efectiva en la reducción de células viables a partir de la octava hora hasta la 24 (Figura 13), mediante el análisis Tukey se observó que con la dosis 2 (38 mg/mL) y la dosis 3 (19 mg/mL) no hay diferencias significativas con el control negativo (Tabla 12).

### Figura 10

*Población bacteriana en valores log<sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Kopercup*



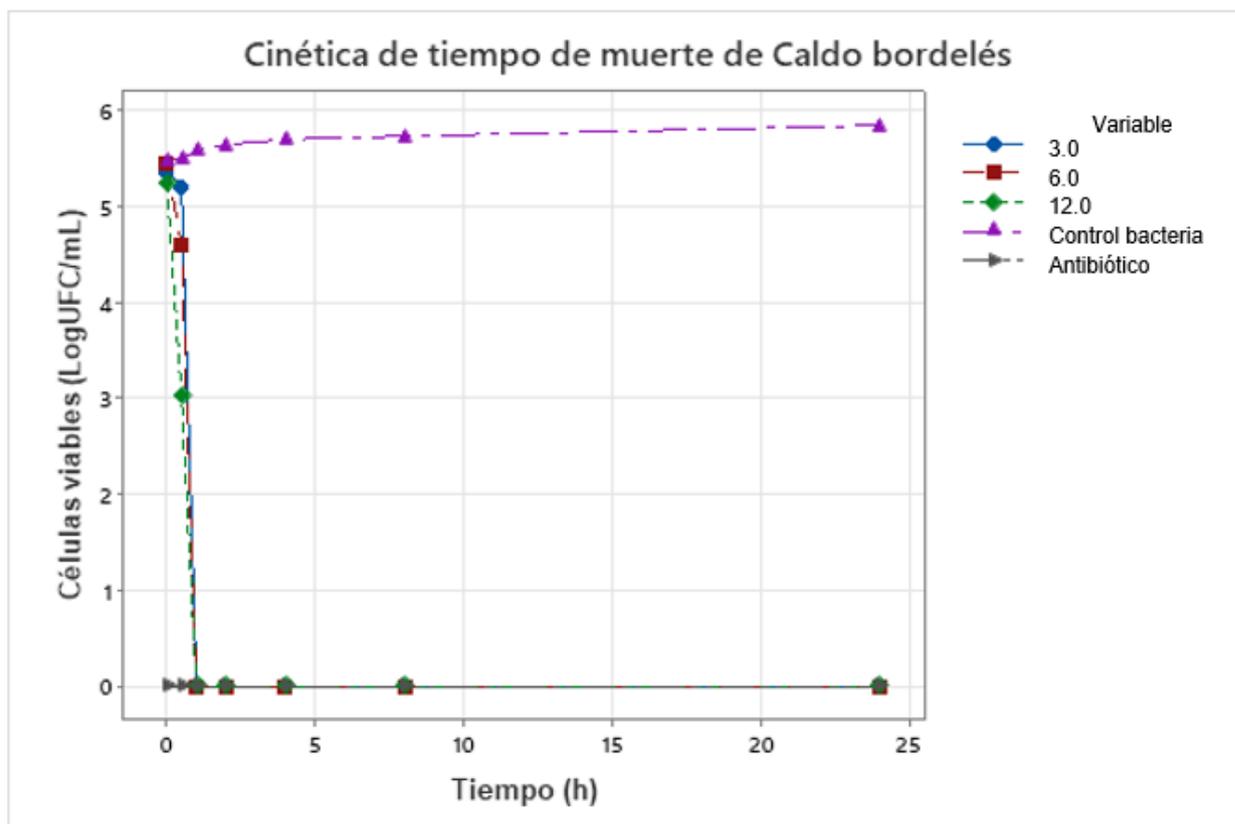
**Tabla 9**

*Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Kopercup*

Factor	N	Media	Agrupación	
Control bacteria	7	5.6403	A	
1.5	7	2.607	A	B
3.0	7	2.399		B
6.0	7	2.12		B
Antibiótico	7	0.000000		B

**Figura 11**

*Población bacteriana en valores log10 en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Caldo bordelés*



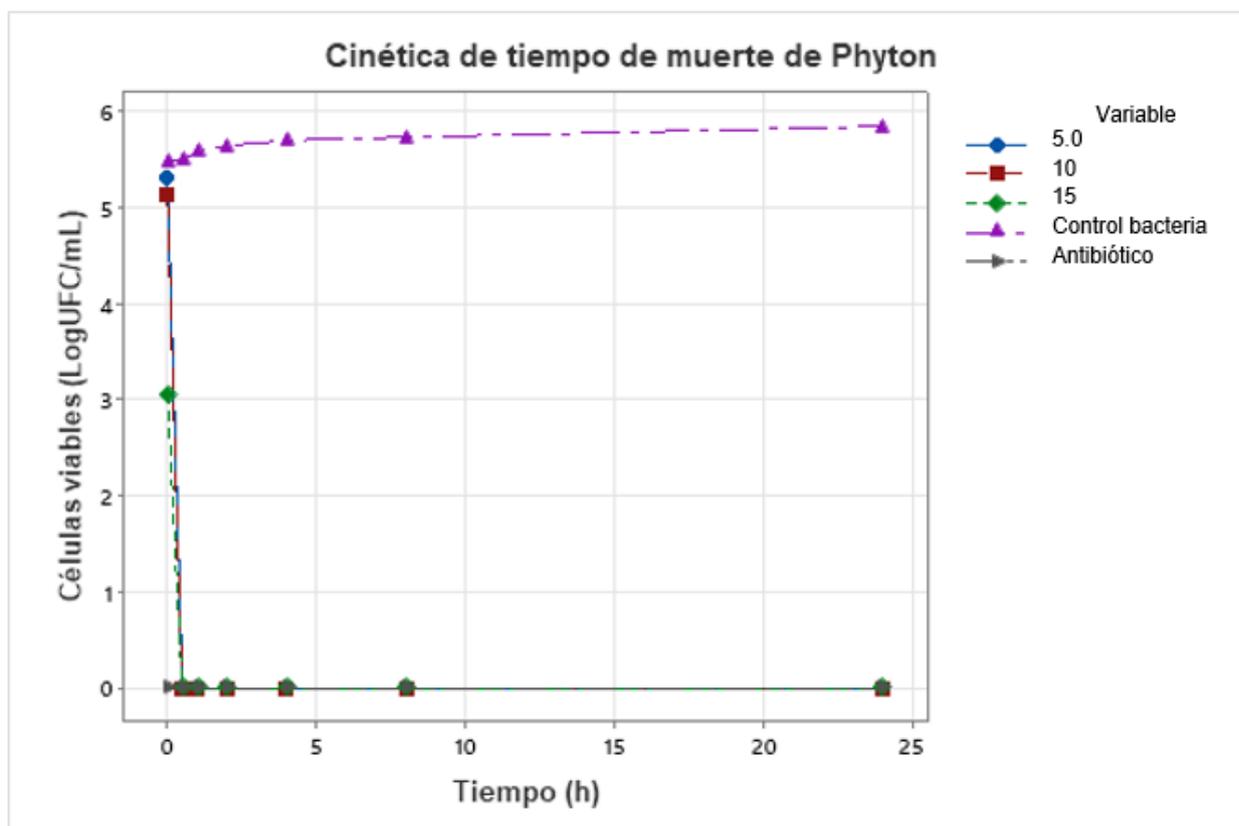
**Tabla 10**

*Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Caldo bordelés*

Factor	N	Media	Agrupación
Control bacteria	7	5.6403	A
3.0	7	1.510	B
6.0	7	1.436	B
12.0	7	1.184	B
Antibiótico	7	0.000000	B

**Figura 12**

*Población bacteriana en valores log<sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Phytol.*



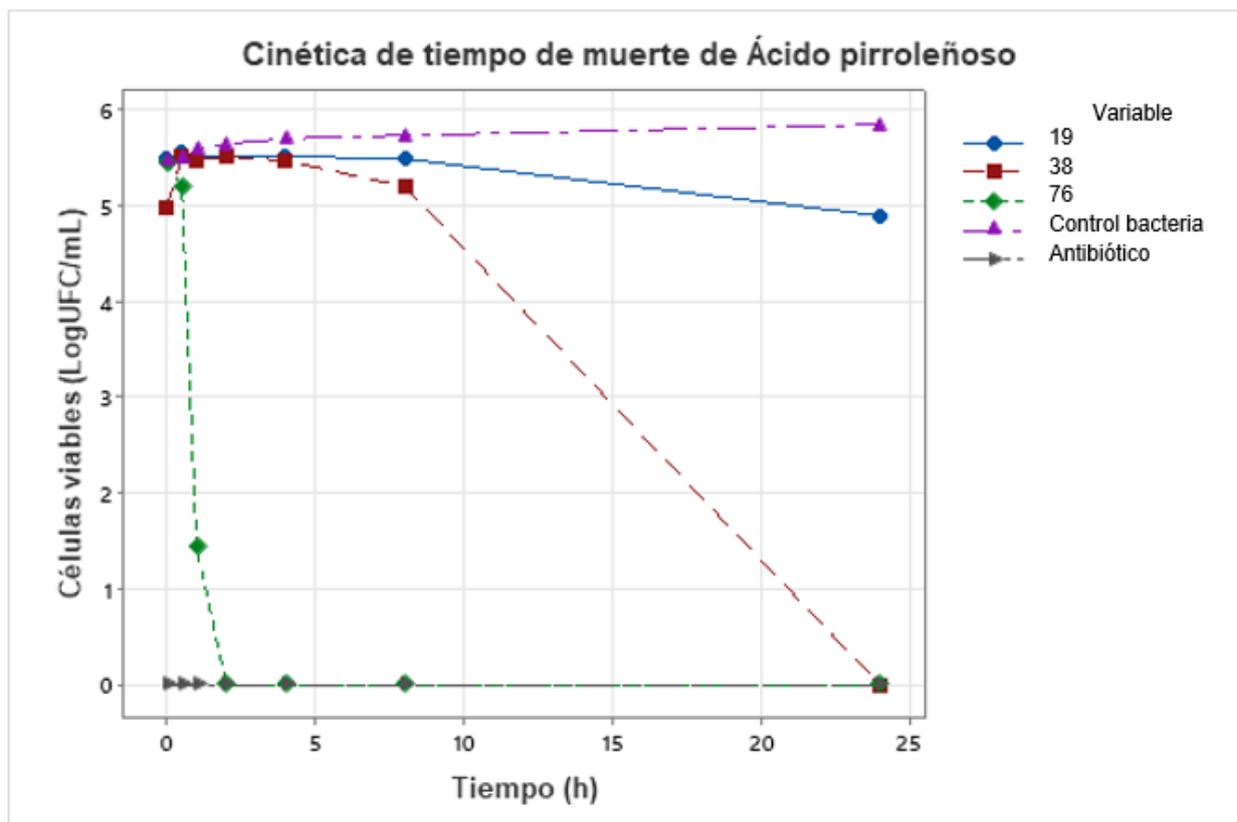
**Tabla 11**

*Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Phyton*

Factor	N	Media	Agrupación
Control bacteria	7	5.6403	A
5.0	7	0.760	B
10	7	0.732	B
15	7	0.438	B
Antibiótico	7	0.000000	B

**Figura 13**

*Población bacteriana en valores log<sub>10</sub> en diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones del producto Ácido pirroleñoso.*



**Tabla 12**

*Prueba de comparación de medias del logaritmo de UFC/mL de las dosis probadas con la prueba Tukey para el producto Ácido piroleñoso*

Factor	N	Media	Agrupación
Control bacteria	7	5.6403	A
19	7	5.4248	A
38	7	4.592	A
76	7	1.727	B
Antibiótico	7	0.000000	B

A partir de la observación y análisis de las curvas, aquellas en las que se observa un descenso en la concentración bacteriana en más de tres Logaritmos base 10, se dice que son bactericidas, a partir de esto se estableció las concentraciones mínimas bactericidas mostradas en la Tabla 13.

**Tabla 13**

*Concentraciones mínimas bactericidas de los compuestos probados*

Productos	Concentración mínima bactericida (mg/mL)
Kopercup	1.5
Caldo bordelés	3.0
Azufrol	Ninguna
Phyton	5.0
Ácido Piroleñoso	76

## Capítulo V: Discusión

Las enfermedades provocadas por *R. solanacearum* tales como la marchitez bacteriana o el *Moko* en las musáceas son un problema a nivel nacional e internacional, tiene la capacidad de inducir enfermedades en más de 450 especies de plantas en 55 familias lo que indica que esta especie es de importancia económica, debido a la pérdida de rendimiento y el deterioro de la comerciabilidad de varias plantas **(Lee et al., 2020)**

Durante los últimos años, los pesticidas de quimiosíntesis tradicionales se han utilizado para controlar las enfermedades transmitidas por el suelo. Sin embargo, muchos plaguicidas químicos contaminan el medio ambiente y provocan la acumulación de residuos en los cultivos y el suelo **(Li et al., 2016)**, por lo tanto es importante encontrar productos que eviten estos problemas.

Se obtuvieron aislados bacterianos a partir de muestras de musáceas sintomáticas (Figura 4), según Šindelářová et al., (2001), es más fácil el aislamiento del patógeno a partir de este tipo de muestras debido a la alta densidad del patógeno en los tejidos, a diferencia de otras muestras como suelo que contiene una alta carga de microorganismos de los cuales muchos se multiplican de forma más rápida que el microorganismo de interés. Se utilizaron los medios de cultivo TZC y SMSA, una vez se obtuvieron cultivos puros (Figura 5) se observaron las características morfológicas de las colonias, en medio TZC se observan de color rosadas con un halo blanquecino alrededor, fluidas y de forma irregular (Figura 5A) y en el medio SMSA se vieron características similares (Figura 5C), según García et al., (2019) esas deben ser las características de la bacteria en estos medios. El medio de cultivo TZC es un medio diferencial, mientras que SMSA es semiselectivo, contiene glicerol en lugar de la glucosa que contiene TZC, esto permite un crecimiento más rápido de la bacteria y evita problemas con bacterias competidoras y antagónicas **(Šindelářová et al., 2001)**.

Según lo reportado por Safni et al., (2014) las células de *R. solanacearum* son gramnegativas con forma de bastoncillo, catalasa y oxidasa positivos, es capaz de crecer a 28°C en medio CPG, también reducen el nitrato a nitrito. La mayoría de las cepas pueden

utilizar citrato, las pruebas de actividad de arginina dihidrolasa es negativa, el ácido se produce oxidativamente a partir de glucosa, manosa, fructosa, glicerol, galactosa y sacarosa. Las características bioquímicas mencionadas coinciden con los resultados obtenidos que se observan en la Tabla 5.

Por otro lado, se confirmó la identidad de la bacteria con el uso del Kit "*Ralstonia solanacearum* Reagent Set" de Agdia (Tabla 2), este es un método utilizado por AGROCALIDAD para la detección del patógeno, el producto está diseñado para la detección cualitativa del antígeno a través de un sandwich de doble anticuerpo directo conocido como DAS-ELISA. Una vez completada la prueba, las muestras que contienen el analito objetivo se volverán azules debido a la etiqueta de la enzima peroxidasa, mientras que los negativos permanecerán incoloros. Según el protocolo del kit, se debe obtener el punto de corte y compararlo con los demás pocillos, los OD mayores a este se consideran positivos. De las cepas analizadas todas son positivas para *R. solanacearum* (Tabla 5). Según el protocolo de agdia, (2023) el límite de detección de este producto es de  $2 \times 10^6$  UFC/mL y no tiene reacción cruzada con ningún otro microorganismo conocido.

La confirmación de que los aislados corresponden a *Ralstonia solanacearum* se dio por pruebas moleculares con PCR convencional, según Safni et al., (2014), los fragmentos que se amplifican para esta bacteria son los correspondientes a 759/760 (759: 5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3'; 760: 5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3'), se confirma mediante la corrida electroforética del producto PCR (Figura 6).

Los ensayos de susceptibilidad bacteriana se llevaron a cabo por tres métodos: Difusión en disco, microdilución y macrodilución en caldo.

El primer método utilizado fue la difusión en disco (Figura 7). En la Figura 8 se observan los resultados, el control con antibiótico y el producto Kopercup si generaron una zona de inhibición mientras que los demás compuestos no. Esto, según Balouiri et al., (2016), se puede deber a que es imposible cuantificar la cantidad de agente antimicrobiano difundido en el medio de agar por lo que no se sabría si el producto no tuvo efecto o no se difundió en el medio.

El método de microdilución en caldo fue usado para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de cada compuesto frente a la bacteria. Se observó crecimiento en todos los controles positivos y no se observó crecimiento en los controles negativos lo que indica que el caldo nutritivo mantuvo el crecimiento de los organismos empleados y que los insumos y el ambiente no introdujeron microorganismos en el caldo nutritivo (Adusei et al., 2019). Las Concentraciones mínimas inhibitorias fueron determinadas por un análisis Probit con una significancia del 0.05%, el análisis estadístico se da a partir de los valores de los pocillos que no presentaron una coloración rojiza (Figura 9), y a partir de las repeticiones de cada ensayo. En la Tabla 7 se presentan las CMI de los productos usados; el producto que presentó la CMI más baja fue el producto Kopercup a una concentración de 1,38 mg/mL, el siguiente producto es el Caldo bordelés a una concentración de 2,78 mg/mL, Phytón con una concentración de 4,54 mg/mL y finalmente el producto Ácido piroleñoso al 18,79 mg/mL, Azufrol no presentó inhibición bacteriana a ninguna de las dosis probadas. La CMI fue determinada de forma cuantitativa por colorimetría con el reactivo *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* (TTC) que según Veiga et al., (2019), es un agente ampliamente utilizado para la determinación de CMI, es incoloro cuando se encuentra en su forma de sal, sin embargo, cuando hay presencia de bacterias metabólicamente activas, estas reducen el compuesto a formazán que se observa de color rojo, pigmento producido por la actividad deshidrogenasa de las bacterias.

Mediante los ensayos de macrodilución en caldo se realizó una cinética de muerte por tiempo, este procedimiento ayuda a comprender mejor la interacción que tienen los antimicrobianos con las cepas bacterianas y determina que los agentes puedan ser bactericidas o bacteriostáticos (Adusei et al., 2019), cuando el agente antimicrobiano ha prevenido totalmente el crecimiento o existe una disminución del 99,9% (es decir, una reducción de  $3 \log_{10}$  en las unidades formadoras de colonias [UFC]/mL) del inoculo inicial, se puede determinar la concentración mínima bactericida (CMB) (Pankey y Sabath, 2004).

En las curvas de inhibición obtenidas se observa que Kopercup (Figura 10) es un compuesto bactericida desde la dosis más baja correspondiente a la CMI (1.5 mg/mL). El

Caldo bordelés (Figura 11), tiene una dosis efectiva como bactericida desde su CMI (3.0 mg/mL), el antimicrobiano Phyton (Figura 12) muestra una actividad bactericida desde los 30 minutos de contacto con la bacteria desde la dosis mínima (5.0 mg/mL), por último las curvas de muerte del compuesto Ácido piroleñoso (Figura 13) muestra que es efectivo para la primera dosis (76 mg/mL) desde la hora 2 mostrando un efecto bactericida, la dosis 2 (38 mg/mL) es efectiva como bactericida únicamente a las 24 horas de contacto, por último, en la tercera dosis (19 mg/mL) no se observan cambios en la curva, se puede inferir que es un bacteriostático.

Tres de los cinco productos utilizados son a base de cobre, los tres compuestos ejercen una actividad bactericida frente a una concentración bacteriana de aproximadamente  $2-3 \times 10^5$  UFC/mL en todas las dosis probadas ejerciendo su efecto entre los 30 minutos y una hora. El efecto bactericida del cobre en contra de microorganismos ha sido descrito por varios años, Lamichhane et al., (2018) argumentan que la acción de este compuesto sobre las bacterias es debido a mecanismos de acción tales como, la generación de especies reactivas del oxígeno e inactivación de enzimas debido a la formación de puentes disulfuro no nativos o sustitución por el cobre de otro metal de transición en los centros activos de las metaloenzimas.

Así mismo hay que tomar en cuenta que el exceso de iones cobre, puede competir con otros metales de transición esenciales por la unión a los centros activos de las metaloenzimas y catalizar la formación de puentes disulfuro no nativos en las proteínas, resultando en una perturbación de la función de estas. Además, el cobre cambia la permeabilidad de las membranas y afecta la conductancia de los canales iónicos (Tegoni et al., 2014). Por estos motivos es que varias regiones entre ellas la Unión Europea se ha solicitado que se limite el uso de productos derivados de cobre, usándose en esta región un máximo de 8 kg por hectárea y por año hasta el 2019, además han encontrado formas de reducir el uso de este metal que incluyen formulaciones innovadoras con contenido reducido de cobre, optimización de dosis de cobre, uso de modelos de pronóstico, uso de variedades resistentes,

optimización del manejo agrícola y alternativas naturales como aceites esenciales (La Torre et al., 2018).

En el Ecuador el uso de cobre y otros compuestos orgánicos está regulada por la “Resolución Técnica 0099 Instructivo de la Normativa General para Promover y Regular la Producción Orgánica-ecológica y Biológica en el Ecuador (Betancourt y Melo, 2020)”, esta normativa permite el uso de Cobre como fertilizante en forma de oxiclورو de cobre (Kopercup), sulfato de cobre tribásico, óxido cuproso, óxido cuprico, octanoato de cobre, sulfato de cobre pentahidratado (Phyton), oleato de cobre, linoleato de cobre, como Caldo Bordelés y se permite su uso hasta 6 kg de cobre por ha y año. Sin embargo, los productos utilizados no están registrados como productos orgánicos ya que para esto deben tener un certificado emitido por AGROCALIDAD que certifique esto. Hay que tomar en cuenta que los productos que se describen en la norma técnica se describen para uso como fertilizantes mas no como pesticidas.

El ácido piroleñoso es un producto líquido de color rojizo que se obtiene a partir de la condensación del humo formado durante la pirolisis de biomasa vegetal, contiene compuestos bioactivos que se utilizan en la agricultura para mejorar la productividad y calidad de los cultivos (Ofoe et al., 2022). Este producto consta de más de 200 compuestos químicos solubles en agua, puede contener de 80% a 90 % de agua y entre un 10% a 20% de ácidos orgánicos alcanos, fenólicos, alcoholes y ésteres (Grewal et al., 2018).

Los efectos bactericidas del ácido piroleñoso sobre fitopatógenos no son desconocidos, por ejemplo Young-Hee et al., (2005) en su estudio prueban los diferentes compuestos de este producto pero a base de madera de *Cryptomeria japónica* (Cedro japonés) en contra de varios microorganismos entre ellos *R. solanacearum*, según este estudio los compuestos responsables del efecto inhibitorio son los fenoles y guayacoles que se encuentran en este producto a concentraciones considerablemente altas, otros compuestos como el metanol y ácido acético que se encuentran más concentrados, sin embargo no tuvieron el mismo efecto. En este ensayo se determinó como CMI 20 mg/mL de

producto para producir inhibición contra *R. solanacearum*, lo que coincide con este ensayo en donde se determinó una CMI de 19 mg/mL de producto.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) de Brasil ha aprobado el uso de este compuesto para varios fines entre ellos para el manejo y control de plagas y enfermedades en plantas y tratamiento poscosecha en sistemas de producción orgánica. En China se permite el uso de este compuesto como bactericida, está regulado por la Administración de Certificación y Acreditación de la República popular de China (Cândido et al., 2023). La situación en el Ecuador mediante la normativa emitida por AGROCALIDAD no hace mención al uso del ácido piroleñoso (Betancourt y Melo, 2020).

## Capítulo VI: Conclusiones

Se aislaron varias cepas de bacterias encontradas en muestras con síntomas de *Moko* en Musáceas, para este propósito se utilizaron los medios TZC y SMSA, las características observadas en ambos medios estaban relacionadas con *R. solanacearum*.

Las pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares confirmaron la identidad taxonómica de cuatro de los aislados de los cuales se seleccionó y trabajó con tres en los próximos ensayos.

Los ensayos de difusión en disco son insuficientes para determinar si existe inhibición de los productos probados frente a *R. solanacearum* ya que presenta varias limitaciones entre ellas el tipo de papel de los discos, la cantidad utilizada en cada uno, la difusión del producto en el agar, entre otras.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI se llevó a cabo con un ensayo de microdilución colorimétrico en placa, mediante un análisis Probit al 95% de confianza se determinó que las CMI son las siguientes: Kopercup 1.5 mg/mL, Caldo bordelés 3.0 mg/mL, Azufrol, no mostró una CMI a las dosis probadas, Phytol 5.0 mg/mL y Ácido piroleñoso 19 mg/mL.

El ensayo de Macrodilución permitió realizar curvas de letalidad bacteriana, los resultados muestran que los productos y sus dosis efectivas para generar un efecto bactericida (CMB) sobre una concentración de  $2-3 \times 10^5$  UFC/mL de la bacteria *R. solanacearum* son:

Kopercup, bactericida desde la dosis más baja correspondiente a la CMI (1.5 mg/mL). Caldo bordelés, efectiva como bactericida desde su CMI (3.0 mg/mL), Phytol, efectiva como bactericida desde su CMI (5.0 mg/mL) y Ácido piroleñoso mostrando un efecto bactericida únicamente en la dosis 4 veces su CMI (76 mg/mL).

## Capítulo VII: Recomendaciones

El análisis realizado en este proyecto es *in vitro*, se recomienda llevar estos resultados a campo y probar diferentes métodos de aplicación, y así saber si las dosis y los productos aquí descritos son útiles para la erradicación o control de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

En ensayos futuros se recomienda realizar los mismos ensayos con cepas de control de calidad, así, el laboratorio tiene una manera de saber si están realizando las pruebas de manera adecuada y monitorear las pruebas que se realizan con regularidad.

Los ensayos de determinación de la Concentración mínima inhibitoria CMI en microplacas tienen la opción de tener un análisis mucho más preciso cuando se leen las absorbancias de cada placa, se recomienda estandarizar un proceso de medición de células viables por espectrofotometría.

Ninguno de los productos mencionados en este trabajo de titulación tienen la certificación de uso en cultivos orgánicos, se recomienda que si este tipo de productos quieren ser usados en este tipo de cultivos saquen la certificación voluntaria en AGROCALIDAD.

## Referencias

- [MPCEIP], M. d. (2017). *Informes Sectoriales – Banano – Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca*. <https://www.produccion.gob.ec/informes-sectoriales-banano/>
- Adusei, E. B., Adosraku, R. K., Oppong-Kyegyeku, J., Amengor, C. D., y Jibira, Y. (2019). Resistance Modulation Action, Time-Kill Kinetics Assay, and Inhibition of Biofilm Formation Effects of Plumbagin from *Plumbago zeylanica* Linn. *Journal of Tropical Medicine, 2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/1250645>
- agdia. (2023). *ELISA Reagent Set for Ralstonia solanacearum (Rs)*. <https://orders.agdia.com/agdia-set-rs-perox-srp-33900>
- Altheide, S. T. (2019). Biochemical and Culture-based Approaches to Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory. *American Society for Clinical Laboratory Science, 32(4)*, 166-175. <https://doi.org/10.29074/ascls.2019001875>
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2)*, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bayot, M. L., y Bragg, B. N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
- Belete, T., y Boyraz, N. (2019). Biotechnological tools for detection, identification and management of plant diseases. *African Journal of Biotechnology, 18(29)*, 797-807. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16591>
- Betancourt, P., y Melo, L. (2020). *AGROCALIDAD. NORMATIVA GENERAL PARA PROMOVER Y REGULAR LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA-ECOLÓGICA - BIOLÓGICA EN EL ECUADOR*: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/by3.pdf>
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Pérez Vicente, L., y Molina, A. (2017). Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated

- Approaches Toward Sustainable Management. *Frontiers in Plant Science*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01290>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011).  
 Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.  
*Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Cândido, N. R., Pasa, V. M., Vilela, A. d., Campos, Â. D., de Fátima, Â., y Modolo, L. V.  
 (2023). Understanding the multifunctionality of pyroligneous acid from waste biomass  
 and the potential applications in agriculture. *Science of The Total Environment*.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163519>
- CLSI. (1999). *M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline*.
- CLSI. (2018). *M02Ed13 | Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 13th Edition*. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>
- Cruz, P. S., Romanova, E. V., Guamán, R. N., Cortázar, S. M., y Abril, Á. F. (2023).  
 Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* Raza 2,  
 bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador.  
*Siembra*, 10(1), 4305. <https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4305>
- Ecuaquimica. (2018). *Phyton*.  
[https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm\\_quickagro/pdfs/productos/PHYTON-20181105-161907.pdf](https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/PHYTON-20181105-161907.pdf)
- Edifarm. (2016). *Caldo bordeles*.  
<https://quickagro.edifarm.com.ec/pdfs/productos/CALDOBORDELES80PM-20160816-112543.pdf>
- EPPO. (2022). *Ralstonia solanacearum* R. *pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *EPPO Bulletin*, 52(2), 225-261.  
<https://doi.org/10.1111/epp.12837>

- Estrella Hablich, S. T. (2019). *Uso del ácido piroleñoso obtenido de la cáscara de arroz (Oriza sativa L. ) para el manejo de Prodiplosis longifila G. en tomate (Solanum lycopersicum L.)*. Quevedo-UTEQ: <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3623>
- García, R. O., Kerns, J. P., y Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- Goszczyńska, T., J, S., y S., S. (2000). Introduction to practical Phytobacteriology. <https://ipmil.cired.vt.edu/wp-content/uploads/2014/06/Practical-Bacteriology-Guide-copy.pdf>
- Grewal, A., Abbey, L., y Gunupuru, L. R. (2018). Production, prospects and potential application of pyroligneous acid in agriculture. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 135, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.09.008>
- Khakimov, A., Salakhutdinov, I., Omolikhov, y Utaganov, S. (2022). Traditional and current-prospective methods of agricultural plant diseases detection: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 951(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012002>
- La Torre, A., Iovino, V., y Caradonia, F. (2018). Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(2), 201-236. <https://www.jstor.org/stable/26507086>
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., y Behlau, F. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3), 28. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Larrosa, M. N., Canut-Blasco, A., Natividad, B., Cantón, R., y Cercenado, E. (2022). Recomendaciones del Comité Español del Antibiograma (COESANT) para la realización de los Informes de Sensibilidad Antibiótica Acumulada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.01.004>

- Lee, I., Kim, Y. S., Kim, J.-W., y Park, D. H. (2020). Genetic and Pathogenic Characterization of Bacterial Wilt Pathogen, *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I), on Roses in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 36(5), 440-449. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2020.0095>
- Li, S., Yu, Y., Chen, J., Guo, B., Yang, L., y Ding, W. (2016). Evaluation of the Antibacterial Effects and Mechanism of Action of Protocatechualdehyde against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules*, 21(6), 754. <https://doi.org/10.3390/molecules21060754>
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., Dedyukhina, E. G., Chistyakova, T. I., y Lunina, J. N. (2017). Application of organic acids for plant protection against phytopathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(3), 921-932. [10.1007/s00253-016-8067-6](https://doi.org/10.1007/s00253-016-8067-6)
- Núñez, N. (2021). AGROCALIDAD. PLAN DE ACCIÓN PARA EL CONTROL DE RALSTONIA SOLANACEARUM RAZA 2: [https://aportecivico.gobiernoelectronico.gob.ec/legislation/processes/42/result\\_publication](https://aportecivico.gobiernoelectronico.gob.ec/legislation/processes/42/result_publication)
- Ofoe, R., Qin, D., Gunupuru, L. R., Thomas, R. H., y Abbey, L. (2022). Effect of Pyroligneous Acid on the Productivity and Nutritional Quality of Greenhouse Tomato. *Plants*, 11(13), 1650. <https://doi.org/10.3390/plants11131650>
- Osdaghi, E. (2020). *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of potato). <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.45009>
- Pankey, G. A., y Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864-870. <https://doi.org/10.1086/381972>
- Paulsen, H.-M. (2005). Sulfur in organic farming. *Landbauforschung Völkenrode*(283). [https://literatur.thuenen.de/digbib\\_extern/bitv/zi037573.pdf](https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/bitv/zi037573.pdf)

- Prior, P., y Fegan, M. (2005). Recent development in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae*, 695.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.14>
- QUIMETAL. (2012). *Azufrol*. <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/etiqueta-thiolux-wgok.pdf>
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., y Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Rhea, Q., y Yanela, M. (2022). *Efecto del ácido piroleñoso como complemento de la fertilización edáfica en el rendimiento del cultivo de pimiento (Capsicum annum L. Quevedo:UTEQ*: <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/6935>
- Safni, I., Ilse, C., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., y Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. s. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(9), 3087-3103.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Scala, V., Pucci, N., y Loreti, S. (2018). The diagnosis of plant pathogenic bacteria: a state of art. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 10(3), 449-460.  
<https://doi.org/10.2741/e832>
- Šindelářová, M., Schaad, N., Jones, J., y Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *Biologia Plantarum*, 44(4), 546.  
<https://doi.org/10.1023/A:1013748332579>
- Tamm, L., Thuerig, B., Apostolov, S., Blogg, H., y Borgo, E. (2022). Use of Copper-Based Fungicides in Organic Agriculture in Twelve European Countries. *Agronomy*, 12(3), 673. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030673>

- Tegoni, M., Valensin, D., Toso, L., y Remelli, M. (2014). Copper chelators: chemical properties and bio-medical applications. *Current Medicinal Chemistry*, 21(33), 3785-3818. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140601161939>
- Tewari, S., Sharma, S., Das, S., y Dash, H. R. (2019). Molecular Techniques for Diagnosis of Bacterial Plant Pathogens. En *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 481-497). Academic Press.
- Veiga, A., Toledo, M. d., Rossa, L. S., Mengarda, M., y Stofella, N. C. (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *Journal of Microbiological Methods*, 162, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>
- Young-Hee, H., Yoh-Ichi, M., Kazuhiro, S., y Takanao, M. (2005). Antimicrobial Effect of the Wood Vinegar from *Cryptomeria japonica* Sapwood on Plant Pathogenic Microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(5), 1106-1109. <https://koreascience.kr/article/JAKO200507521914860.page>