

# **Evaluación de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 para la recuperación de suelos bananeros contaminados con *Ralstonia solanacearum***

**Ruth Natalia Moncada Ossa**

Universidad EAFIT  
Escuela de Ingeniería  
Ingeniería de Procesos  
Medellín, Colombia  
2014



# **Evaluación de extractos de *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 para la recuperación de suelos contaminados con *Ralstonia solanacearum***

**Ruth Natalia Moncada Ossa**

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

**Maestría en Ingeniería**

Directora:

Ph.D., Valeska Villegas Escobar

Codirectora:

M.Sc., Edurecia María Ramírez

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en ciencias biológicas y bioprocesos CIBIOP

Universidad EAFIT

Escuela de ingeniería

Medellín, Colombia

2014



*“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”*

*Marie Curie*



## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad EAFIT y a la Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA) por su apoyo académico y económico en la realización de este proyecto de Maestría.

Especialmente agradezco a mis tutoras, Valeska Villegas y María Ramírez, por haber creído en mí y por aportarme día a día sus conocimientos y formación científica. También a Camilo Ramírez, Luz Edith Argel y John Jairo Mira, por sus asesorías y aportes en la investigación.

A todos los amigos y compañeros de investigaciones, al semillero BIOQUIP, al personal de los laboratorios de la Universidad EAFIT y AUGURA.

Finalmente a mi familia, por su enorme apoyo y comprensión en todo momento.



## Resumen

El cultivo del banano es de gran importancia a nivel mundial y su productividad se ve afectada por algunos factores bióticos. Dentro de estos, se encuentra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*, el agente causal de la enfermedad del Moko. Esta enfermedad produce una marchitez general y muerte a las plantas en los cultivos de banano. Los métodos de control, que combinan labores culturales y químicas con largos periodos de cuarentena del suelo, no han sido totalmente efectivos. El objetivo de este estudio se basó en evaluar los extractos bacterianos (EB) producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 en suelos contaminados con *R. solanacearum* y el efecto en la supervivencia y reducción del tiempo de cuarentena en microcosmos e invernadero. Bajo las condiciones evaluadas en este trabajo se encontró que el EB y otros tratamientos derivados de la fermentación de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 no mostraron reducciones significativas de las poblaciones en microcosmos de suelos, ya que la población de la cepa *R. solanacearum* AW1 se mantuvo a una concentración aproximada de  $3.2 \times 10^9$  UFC/g suelo en 60 días evaluados. Adicionalmente, en los suelos contaminados con *R. solanacearum* EAP009 a nivel de invernadero, el EB no mostró efectos de reducción del tiempo de cuarentena, ya que en los tratamientos evaluados, incluyendo el control absoluto, la concentración de *R. solanacearum* no fue detectable a los 120 días después de la infección. Estos resultados no evidencian una disminución de los tiempos de cuarentena por parte del EB a las condiciones evaluadas, lo cual demuestra la complejidad del control biológico en el suelo.

**Palabras clave:** *R. solanacearum*, *B. amyloliquefaciens*, banano, Moko, cuarentena

## Abstract

Banana crops are ranked as one of the most important fruit crops at a national and worldwide level. However, its productivity seems greatly affected by several biotic factors such as the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of Moko disease, which causes general wilt and subsequent death in banana crops. The traditional methods implemented for the control of Moko disease involve a combination of cultural and chemical practices along with long periods of quarantine; nonetheless these practices have not been fully effective. The aim of this study was based on assessing the bacterial extracts (EB) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 in soils contaminated with *R. solanacearum* and the effect of survival and reducing quarantine time in microcosms and greenhouse. Under the evaluated conditions it was found that the EB and other treatments derived from the fermentation of *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123, showed no significant reductions on the population of *R. solanacearum* AW1 in the microcosms soil, as its population was maintained at  $3.2 \times 10^9$  CFU/g soil after 60 days of the inoculation with the EB and other treatments. Additionally, in soils contaminated with *R. solanacearum* EAP009 at greenhouse level, the EB showed no effect in the reduction of quarantine time either. In fact, the evaluated treatments, including the absolute control, showed that the concentration of *R. solanacearum* was not detectable 120 days after its inoculation. The results obtained in this work did not show that the EB inoculation caused a decrease of quarantine time under the evaluated conditions, demonstrating the complexity of biological control in soil.

**Keywords:** *R. solanacearum*, *B. amyloliquefaciens*, banana, Moko, quarantine

# Contenido

|  |      |
|--|------|
| Resumen .....  | IX   |
| Abstract.....  | X    |
| Contenido .....  | XI   |
| Lista de figuras.....  | XIII |
| Lista de tablas .....  | XV   |
| Lista de anexos .....  | XVI  |
| Lista de abreviaturas.....   | XVII |
| Introducción .....   | 1    |
| Objetivos.....   | 4    |
| Capítulo 1: Características ecológicas de <i>Ralstonia solanacearum</i> y el potencial de un agente biocontrolador del Moko en el suelo..... | 5    |
| 1.1 Resumen.....   | 5    |
| 1.2 Generalidades del cultivo de banano .....  | 5    |
| 1.3 Ecología de <i>R. solanacearum</i> .....   | 7    |
| 1.3.1 Ciclo de la enfermedad causada por <i>R. solanacearum</i> .....  | 9    |
| 1.3.2 Enfermedad del Moko .....  | 11   |
| 1.4 Control biológico en la rizosfera.....   | 13   |
| 1.5 Métodos de control de <i>R. solanacearum</i> .....   | 16   |
| Capítulo 2: Materiales y métodos.....  | 21   |
| 2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo .....   | 21   |
| 2.2 Medios de cultivo y reactivos .....  | 21   |
| 2.3 Cinética de crecimiento del <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123.....   | 22   |

---

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 2.3.1                                       | Producción de biomasa de la bacteria <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 en diferentes medios de cultivo.....          | 23        |
| 2.3.2                                       | Actividad de extractos (EA-CB0123) contra <i>R. solanacearum</i> .....   | 23        |
| <b>2.4</b>                                  | <b>Concentración mínima inhibitoria (CMI) .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>2.5</b>                                  | <b>Aislamiento de cepas de <i>R. solanacearum</i>.....</b>   | <b>26</b> |
| 2.5.1                                       | Caracterización molecular de los aislados .....  | 27        |
| 2.5.2                                       | Pruebas de patogenicidad de <i>R. solanacearum</i> en plantas de banano.....   | 28        |
| <b>2.6</b>                                  | <b>Evaluación del extracto de la EA-CB0123 en suelos contaminados con <i>R. solanacearum</i> .....</b>                   | <b>30</b> |
| 2.6.1                                       | Obtención del extracto bacteriano y tratamientos derivados .....   | 30        |
| 2.6.2                                       | Evaluación del extracto bacteriano a nivel de microcosmos.....   | 31        |
| 2.6.3                                       | Evaluación del extracto bacteriano a nivel de invernadero.....   | 33        |
| <b>2.7</b>                                  | <b>Análisis estadístico .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>Capítulo 3: Resultados</b> .....         |  | <b>37</b> |
| <b>3.1</b>                                  | <b>Cinética de crecimiento y evaluación de actividad de los extractos de <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 .....</b> | <b>37</b> |
| <b>3.2</b>                                  | <b>Concentración mínima inhibitoria .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3.3</b>                                  | <b>Aislamiento y caracterización de cepas de <i>R. solanacearum</i>.....</b>   | <b>40</b> |
| 3.3.1                                       | Pruebas de patogenicidad de <i>R. solanacearum</i> en plantas de banano.....   | 42        |
| <b>3.4</b>                                  | <b>Obtención del extracto bacteriano .....</b>   | <b>46</b> |
| <b>3.5</b>                                  | <b>Evaluación del EB en suelos contaminados con <i>R. solanacearum</i>.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>Discusión</b> .....                      |  | <b>53</b> |
| <b>Conclusiones y recomendaciones</b> ..... |  | <b>69</b> |
| Conclusiones.....                           |  | 69        |
| Recomendaciones.....                        |  | 70        |
| <b>Bibliografía</b> .....                   |  | <b>77</b> |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2-1</b> Método de difusión en agar. ....   | 25 |
| <b>Figura 2-2</b> Esquema del proceso de aplicación de los tratamientos y sembrado de plantas de banano en suelos contaminados con <i>R. solanacearum</i> a nivel de invernadero .....   | 35 |
| <b>Figura 3-1</b> Cinética de crecimiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 y radio de inhibición de los SLC en MOLP, TSB y DRU.....  | 38 |
| <b>Figura 3-2</b> Porcentaje de inhibición de <i>R. solanacearum</i> EAP009 a partir de extractos metanólicos de <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 producidos en MOLP, TSB y DRU a nivel <i>in vitro</i> . ....  | 40 |
| <b>Figura 3-3</b> Comportamiento del desarrollo de los síntomas de la enfermedad del Moko causada por <i>R. solanacearum</i> en el tiempo en plantas de banano cv. Williams. A. Porcentaje de marchitez y B. Porcentaje de clorosis en hojas de plantas de banano infectadas con diferentes aislados de <i>R. solanacearum</i> .. .... | 44 |
| <b>Figura 3-4</b> Plantas de banano infectadas con diferentes aislados de <i>R. solanacearum</i> en invernadero. ....  | 45 |
| <b>Figura 3-5</b> Radio de inhibición de <i>R. solanacearum</i> EAP009 a nivel <i>in vitro</i> producidos por diferentes tratamientos derivados de la obtención del EB. ....   | 46 |
| <b>Figura 3-6</b> Efecto del EB y otros derivados obtenidos del cultivo de <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g suelo) de <i>R. solanacearum</i> AW1 en el tiempo en microcosmos.....   | 47 |
| <b>Figura 3-7</b> Efecto del EB obtenido del cultivo de <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g suelo seco) de <i>R. solanacearum</i> EAP009 en suelo de los tratamientos CAB, EB y Agua, en el tiempo. ....   | 49 |
| <b>Figura 3-8</b> Efecto del EB obtenido del cultivo de <i>B. amyloliquefaciens</i> EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g tejido) de <i>R. solanacearum</i> EAP009 en tejido de banano en diferentes tratamientos. ....  | 50 |

**Figura 3-9** Efecto del EB obtenido del cultivo de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g suelo seco) de bacterias totales cultivables en suelo de los diferentes tratamientos.....52

## Lista de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 2-1</b> Tratamientos para la evaluación del efecto antagonista con <i>R. solanacearum</i> en microcosmos de suelo.....   | 32 |
| <b>Tabla 2-2</b> Tratamientos para la evaluación de la disminución del tiempo de cuarentena de suelos contaminados con <i>R. solanacearum</i> a nivel de invernadero..... | 33 |
| <b>Tabla 3-2</b> Origen, morfología y tamaño de los aislados de <i>R. solanacearum</i> .....  | 41 |
| <b>Tabla 3-3</b> Resultados del ABCDE de las sintomatologías de las plantas causadas por los aislados <i>R. solanacearum</i> ..   | 45 |

## Lista de anexos

|  |    |
|--|----|
| <b>Anexo 1</b> Análisis del sustrato de germinación Tierra Negra®.....         | 72 |
| <b>Anexo 2</b> Halos de inhibición en la metodología de difusión de agar ..... | 73 |
| <b>Anexo 3</b> Aislamiento de cepas de <i>R. solanacearum</i> .....            | 75 |

## Lista de abreviaturas

### Abreviatura Término

---

|                        |  |
|------------------------|--|
| <i>3-OH PAME</i>       | 3-hidroxy Palmitic Acid Methyl Ester               |
| <i>ABCDE</i>           | Área Bajo la Curva del Desarrollo de la Enfermedad |
| <i>ACB</i>             | Agente de Control Biológico                        |
| <i>ADE</i>             | Agua Destilada Estéril                             |
| <i>ADN</i>             | Ácido Desoxiribunocléico                           |
| <i>BAFE</i>            | Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endospora        |
| <i>C(-)</i>            | Control negativo                                   |
| <i>CAB</i>             | Control Absoluto                                   |
| <i>CMI</i>             | Concentración Mínima Inhibitoria                   |
| <i>DPI</i>             | Días Posteriores a la Infección                    |
| <i>DO</i>              | Densidad Óptica                                    |
| <i>EB</i>              | Extracto Bacterial                                 |
| <i>EPS</i>             | Exopolisacárido                                    |
| <i>FIA</i>             | Foco de Infección Artificial                       |
| <i>ha</i>              | Hectáreas  |
| <i>HPLC</i>            | “High Performance Liquid Chromatography”           |
| <i>LC<sub>50</sub></i> | “Lethal Concentration 50”                          |
| <i>LP</i>              | Lipopéptidos                                       |
| <i>M-H</i>             | Mueller Hinton                                     |
| <i>MOLP</i>            | “Medium Optimal for Lipopeptide Production”        |
| <i>MCRH</i>            | Máxima Capacidad de Retención de Humedad           |
| <i>P-C</i>             | “Phenotype Conversion”                             |
| <i>PCR</i>             | “Polymerase Chain Reaction”                        |

**Abreviatura Término**

---

|             |  |
|-------------|--|
| <i>PglA</i> | Poligalacturonasa                      |
| <i>PGPR</i> | “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” |
| <i>SLC</i>  | Sobrenadante Libre de Células          |
| <i>SMSA</i> | Medio Semiselectivo SurAfrica          |
| <i>SPE</i>  | “Solid Phase Extraction”               |
| <i>TSA</i>  | “Tryptic Soy Agar”                     |
| <i>TSB</i>  | “Tryptic Soy Broth”                    |
| <i>TZC</i>  | “Trifenil Tetrazolio Cloruro”          |
| <i>UFC</i>  | Unidades Formadoras de Colonias        |
| <i>VBNC</i> | “Viable But Not Culturable”            |

# Introducción

El sector agropecuario ha sido uno de los pilares más fuertes en la economía mundial (Proexport Colombia and SAC, 2012). Dentro de los cultivos principales que proveen al mundo de alimentos básicos se encuentran los cereales, cultivos oleaginosos, raíces, tubérculos y plátanos, además de los cultivos tradicionales como el banano, azúcar, caucho natural y bebidas tropicales (café, té y cacao) (FAO, 2004). En Colombia, éste sector contribuye un 21% del total de las exportaciones y un 19% a la generación total de empleo en el año 2012 (Proexport Colombia and SAC, 2012).

En nuestro país la agroindustria bananera es el rubro más importante en la economía, junto con el café y las flores (Arias *et al.*, 2004; Espinal *et al.*, 2005); con participaciones del 1.32% del total de éstas y un 30.7% en exportaciones agropecuarias (sin café), incluyendo el plátano de exportación (AUGURA, 2012). Además el área del cultivo ascendió un 1.8% con respecto al 2011, con un total de 48,300 ha en las zonas del Urabá Antioqueño, Magdalena y La Guajira (AUGURA, 2012).

En los reportes históricos bananeros en Colombia, se han descrito descensos en la productividad debido a problemas fitosanitarios y problemas relacionados con el clima, además de los conflictos sociales y políticos (Arias *et al.*, 2004). Respecto a las enfermedades causadas por agentes fitopatógenos, se encuentra la enfermedad del Moko (causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*) (Belalcazar *et al.*, 2003; Denny, 2006), la cual es considerada como uno de los mayores limitantes en la producción de banano en Colombia, debido a los altos costos del control químico y cultural, tanto por la destrucción de plantas enfermas y sanas, como por la aplicación de herbicidas y períodos de cuarentena (Belalcazar *et al.*, 2003). Igualmente ésta enfermedad afecta cerca de 125,000 familias que dependen directamente del cultivo de banano y plátano (Gómez, 2005).

El hábitat natural de la bacteria *R. solanacearum* es el suelo, en donde se ve atraída por los exudados radiales de las plantas que hay alrededor y comienza a colonizarla. Luego de su establecimiento, comienza a producir ciertas enzimas que permiten la entrada al interior de las raíces de la planta hospedera, llegando hasta los haces vasculares, en donde la concentración poblacional aumenta y se secretan sustancias como exopolisacáridos, los cuales taponan los canales vasculares. Después de esta colonización, se presentan síntomas en la planta de marchitamiento y clorosis en sus hojas, la cual finalmente muere (De Oliveira e Silva *et al.*, 2000; Schell, 2000).

Hasta el momento, el único método de control de *R. solanacearum* es la combinación de métodos culturales y compuestos químicos. El glifosato es el agente químico más utilizado para eliminar plantas infectadas, seguido de un periodo de cuarentena de 6 meses (Castañeda *et al.*, 2002). Sin embargo, estos métodos no son totalmente efectivos, ya que la bacteria *R. solanacearum* tiene la capacidad de diseminarse por el suelo a través de los efluentes naturales y colonizar plantas asintomáticas. Las prácticas agrícolas como el uso de herramientas y el riego del cultivo, contribuyen a la diseminación de la bacteria (Bornacelly and Mena, 2010).

La presencia de la enfermedad en los cultivos agrícolas presenta un comportamiento variable, debido a los diferentes climas y aspectos bióticos cambiantes en el país, lo cual causa pérdidas económicas. En muchas regiones de Colombia, las áreas afectadas presentan pérdidas hasta del 100% de la producción, siendo muy grave en los llanos orientales, principalmente en Meta y Arauca (Hoy, 2009). No obstante, los productores han puesto de su parte y están implementando tecnologías favorables para el medio ambiente, como es el uso de la biotecnología en el mejoramiento del cultivo y de las prácticas agrícolas. Además ésta herramienta tiene algunos beneficios potenciales como una mayor productividad en la plantación, nuevas variedades de cultivos, menor necesidad de insumos perjudiciales para el medio ambiente, entre otros (FAO, 2002).

Pese a que no existe un producto comercial completamente efectivo para el control del Moko (Álvarez *et al.*, 2010), solo algunas aproximaciones de tratamientos (Agrobiológicos, 2012), diversas investigaciones se han llevado a cabo, evaluando la capacidad que tienen ciertos microorganismos de producir compuestos antagónicos y de contrarrestar el crecimiento de los agentes fitopatógenos a nivel *in vitro* y en invernadero.

En dichas investigaciones, el género bacteriano *Bacillus* spp. ha mostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de *R. solanacearum* en combinación con fertilizantes orgánicos (Zhang *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013b); o con lixiviados de compostaje de plátano como lo investigó Arenas y colaboradores (2004); lo cual demuestra diferentes alternativas para el control de *R. solanacearum* en diversos cultivos y con diferentes condiciones ambientales.

Con el fin de contribuir a los factores estratégicos para la competitividad en el mercado y mejorar la eficiencia en los costos de producción, se desea encontrar nuevas estrategias de control necesarias para reducir el avance de la enfermedad del Moko en cultivos de *Musa* en el país, como el uso de Agentes de Control Biológico (ACBs) para reducir los períodos cuarentenarios del suelo contaminado con *R. solanacearum* y el aporte de un nuevo mecanismo de fitosanidad en el país.

## Objetivos

### General

Evaluar la acción de extractos bacterianos de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* EA-CB0123 y el efecto en la reducción de los tiempos de cuarentena del suelo infectado con el fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* a nivel de microcosmos e invernadero.

### Específicos

- Evaluar la cinética de crecimiento y la concentración mínima inhibitoria de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en diferentes medios de cultivo contra *R. solanacearum* a nivel *in vitro*.
- Obtener y caracterizar aislados de *R. solanacearum* de acuerdo a su virulencia en condiciones de invernadero.
- Evaluar el efecto del extracto de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 sobre la supervivencia de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos.
- Determinar la presencia y la capacidad de infección de *R. solanacearum* en suelos previamente contaminados con el patógeno y tratados con el extracto de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 bajo condiciones de invernadero.

# Capítulo 1: Características ecológicas de *Ralstonia solanacearum* y el potencial de un agente biocontrolador del Moko en el suelo

## 1.1 Resumen

*Ralstonia solanacearum* es una bacteria que ocasiona daños devastadores con distribución global, causando marchitez y bajas productividades en importantes cultivos como papa, berenjena, tomate, tabaco y banano. La alta incidencia de mortalidad en las plantas y la carencia de métodos de control eficaces para dicha enfermedad, hacen que *R. solanacearum* sea una bacteria fitopatógena con una capacidad destructiva a nivel mundial. La dificultad para desarrollar estrategias de control de la enfermedad se atribuye principalmente a la falta de conocimientos básicos de la ecología y evolución del fitopatógeno. Recientemente, se ha evidenciado el alto potencial biocontrolador que tienen algunas especies pertenecientes al género *Bacillus* spp; además se han evaluado diferentes alternativas biológicas que ayudan al control de enfermedades en el suelo. Con el fin de esclarecer algunos conceptos fundamentales, se abarca en esta revisión ciertas generalidades del cultivo de banano en Colombia, algunas características ecológicas de la bacteria fitopatógena y la enfermedad del Moko; así como la revisión del potencial de *Bacillus* spp. como agente de control biológico de este patógeno bacteriano.

## 1.2 Generalidades del cultivo de banano

El banano es una planta herbácea, perenne y de gran tamaño, que pertenece a la familia de las musáceas. Esta carece de verdadero tronco, denominado pseudotallo formado por vainas foliares, que alcanzan hasta 30 cm de diámetro basal y 7 m de altura, aproximadamente. Sus hojas son grandes y lisas, dispuestas en espiral, alcanzando 3 m de largo y cuando alcanza la edad de producción, presenta flores violetas de donde se desarrollan los frutos en hileras o racimos (AUGURA, 2013; Sánchez and Mira, 2013).

El proceso productivo del banano tiene una duración de 50 semanas aproximadamente, comprendiendo las etapas de precosecha, cosecha y postcosecha. En la etapa de precosecha, se llevan a cabo las labores de desmache, fertilización y embolse de flores y racimos; en la cosecha se toma el racimo y se transporta a la central de distribución; y en la postcosecha se toman medidas de calidad, selección, limpieza, empaque y distribución. Las condiciones de desarrollo óptimo de este cultivo se da en zonas intertropicales, con temperaturas de 27.0 a 29.5°C, niveles de precipitación de 2,000 a 3,000 mm en el año y suelos de tipo franco, planos y con altos contenidos de nutrientes (Gómez, 2011; AUGURA, 2013; Sánchez and Mira, 2013).

Según los datos de la FAO, en el año 2011 la producción mundial de banano se encontró en el lugar 18 con aproximadamente 107 millones Ton/año, en donde Colombia aportó el 1.9% (2 millones Ton/año), ocupando el lugar 14 a nivel mundial (FAO, 2013); estadísticas que hacen que esta fruta sea uno de los productos más importantes comercializados alrededor del mundo, junto con las manzanas y cítricos (Espinal *et al.*, 2005). Así mismo, este cultivo representa un alto valor de ingresos y empleo para muchos países productores ubicados en África, Asia y América Latina y el Caribe. En Colombia las exportaciones incrementaron en el año 2012 en un 2.83% en valor con respecto al 2011, con un total de exportaciones de US\$ 757.3 millones (AUGURA, 2012).

Gracias a su ubicación, Colombia cuenta con diversos climas y biodiversidad que le permite el desarrollo agrícola de múltiples cultivos incluido el banano. En las regiones del Golfo de Urabá (Antioquia) y nororiente del departamento de Magdalena se encuentran lugares especializados en la producción y exportación del banano, con aproximadamente 48,300 ha de cultivo, donde se integran productores y comercializadores, generando 32,000 empleos directos y 96,000 indirectos (AUGURA, 2012).

Sin embargo, en los últimos años Colombia ha tenido bajas en la productividad y exportaciones del banano por la oferta de otros países competidores, problemas administrativos, políticos, climáticos y fitosanitarios (AUGURA, 2012). Este último factor se vuelve de gran importancia ya que los cultivos de banano son susceptibles a patógenos y plagas que se expanden alrededor del mundo. Dentro de las enfermedades más importantes que afectan a estos cultivos están: la Sigatoka negra (causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*) (Stover, 1980), el Mal de Panamá (causado por el hongo

*Fusarium oxysporum*) (Ploetz and Pegg, 2000), el Moko (causado por la bacteria *R. solanacearum*) (Belalcázar *et al.*, 2003; Denny, 2006) y plagas como nemátodos de la raíz y gorgojo del plátano (ICA, 2012). Estas enfermedades y plagas son controladas principalmente con fumigaciones químicas y controles culturales (Belalcázar *et al.*, 1990). Las medidas de control y de renovación del suelo por el manejo de las enfermedades esta valorizado en COP\$ 30.000.000 /ha/año (Bornacelly and Mena, 2010).

### 1.3 Ecología de *R. solanacearum*

La bacteria fitopatógena *R. solanacearum* es un bacilo Gram negativo, con un tamaño aproximado de 0.5 - 0.7 a 1.5 - 2.5  $\mu\text{m}$ , con múltiples flagelos polares, clasificado en la subdivisión de las  $\beta$ -proteobacterias (Genin and Boucher, 2004). Este microorganismo, incluido durante varios años en el grupo de las *Pseudomonas* spp. fue reclasificado al género *Ralstonia* por diversos análisis moleculares y filogenéticos (Schell, 2000). Tradicionalmente la clasificación del complejo *R. solanacearum* se ha subdividido en cinco razas (rango de hospederos), 5 biovars (degradación de disacáridos), 4 filotipos (distribución geográfica) y secuevars (análisis de la secuencia de genes de virulencia) (Denny, 2006). La secuenciación de los genomas completos de *R. solanacearum* muestran evidencia que el único método que tiene carácter monofilético corresponde a los análisis de filotipos y secuevars (Genin and Denny, 2012; Wicker *et al.*, 2012).

La complejidad en la clasificación se debe a que *R. solanacearum* tiene un amplio rango de hospederos, con más de 200 especies incluidas en 50 familias botánicas (Genin and Denny, 2012). Entre las plantas cultivadas de importancia económica se destaca una gran diversidad de especies, donde se incluye tomate, papa, tabaco, berenjena, lulo, ají, pimienta, plátano, banano, heliconias, entre otras (Guo *et al.*, 2004; Obregón *et al.*, 2008). Además existen algunas arvenses y malezas como hospederos alternos que crecen asociados a los cultivos (asintomáticas), lo que favorece la fuente de inóculo en los suelos del cultivo (Obregón *et al.*, 2008). Infortunadamente, hay poca información acerca de las pérdidas económicas producidas por la bacteria *R. solanacearum* en el mundo, ya que varía según la planta hospedera, cultivar, clima, tipo de suelo, prácticas culturales y razas del patógeno (Cardozo and Rodríguez, 2009).

Igualmente, se encuentran algunos factores ecológicos, los cuales son claves para el desarrollo de *R. solanacearum* en ambientes acuáticos y en el suelo (van Elsas *et al.*,

2000), los cuales van a determinar la supervivencia y patogenicidad de *R. solanacearum* la cual posee alta heterogenicidad, diferentes hospederos (Álvarez *et al.*, 2010) y adaptación a distintas condiciones edafoclimáticas del trópico y subtrópico (van Elsas *et al.*, 2000).

Como ejemplo, Álvarez y colaboradores (2008) demostraron que la bacteria *R. solanacearum* IVIA 1602.1 puede llegar a sobrevivir en microcosmos de agua por cuatro años de evaluación, en donde mostró diferentes estrategias de supervivencia al ambiente. En este estudio se observó una respuesta eficiente de la bacteria en condiciones de pocos nutrientes, en donde la población se mantuvo constante, conservando la patogenicidad y entrando en un estado “viable pero no cultivable” o VBNC, definido inicialmente por (Grey and Steck, 2001) (por sus siglas en inglés de “Viable But Not Culturable”). La morfología de las células sufrió transformaciones en el tiempo, cambiando de su forma típica bacilar a cocos, posiblemente para captar de una forma más eficiente los escasos nutrientes y para llegar a lugares más estrechos en el entorno; y a una formación de agregados, para su protección conjunta. Por otra parte, van Elsas y colaboradores (2001) evaluaron los efectos de cambios de temperaturas y contenido de humedad del suelo en microcosmos y la supervivencia de la bacteria fitopatógena 1609 aislada de *Solanum tuberosum* L. cv *Bartina* en Holanda. Entre temperaturas de 12, 15 y 20°C, *R. solanacearum* 1609 disminuyó gradualmente en los suelos evaluados, mientras que a una temperatura de 4°C la población bacteriana descendió con mayor rapidez. Por otro lado, las modificaciones moderadas de humedad en el suelo (50-90%) no afectaron drásticamente la dinámica poblacional de la bacteria; mientras que la sequía causó descensos de la población en todos los suelos.

Sin embargo, la bacteria fitopatógena ha adquirido diversas formas de sobrevivir en el ambiente. Entre las estrategias que han sido identificada se encuentra el estado VBNC, latencia (Starved cells), conversión fenotípica P-C (por sus siglas en inglés de “Phenotypic Conversion”) y formación de estructuras similares a las biopelículas. El estado VBNC se puede dar por diferentes condiciones de estrés ambiental tales como: bajas temperaturas pH alto, sequías y presencia de cobre en suelos. El estado de latencia (Starved cells), se genera en hábitats carentes de nutrientes en donde se sugiere que la población bacteriana se mantiene constante pero cultivable, logrando mantener su patogenicidad hasta por 4 años. El estado de conversión fenotípica P-C donde la bacteria cambia su

fenotipo de mucoide a no mucoide, se puede dar en cultivos sólidos de agar en tiempos prolongados y cuando crece en un cultivo líquido carente de aire, con glucosa y una fuente orgánica de nitrógeno, sugiriendo una reducción en la capacidad de inducir la enfermedad; y por último el estado de la formación de estructuras similares a las biopelículas, en donde se aglomeran las células adquiriendo una mayor protección, entrando en contacto con superficies bióticas y abióticas (van Elsas *et al.*, 2000; van Overbeek *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2008a; Messiha *et al.*, 2009; Imazaki and Nakaho, 2009; Álvarez *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011).

Así mismo, otra de las estrategias desarrolladas por la bacteria fitopatógena es que produce típicamente dos tipos de colonias sobre medios de cultivo complejos, el primero son colonias avirulentas, aplanadas, secas, más pequeñas y de forma redonda y el segundo son colonias fluídas, con bordes irregulares y mucoides con alto contenido de exopolisacáridos (EPS), formando un remolino rojo en el centro en medio SMSA (Medio Semiselectivo SurAfrica) (French *et al.*, 1995), clasificadas como virulentas (Denny and Hayward, 2001; Gómez, 2005)

### **1.3.1 Ciclo de la enfermedad causada por *R. solanacearum***

*R. solanacearum* se comporta como una bacteria saprófita, capaz de sobrevivir largos períodos de tiempo en varios hábitats naturales, como en el agua y en diferentes tipos de suelos (van Elsas *et al.*, 2000; Messiha *et al.*, 2009). Alrededor de estos nichos, el ciclo de la enfermedad del microorganismo comienza en el suelo, donde la bacteria censa un estímulo específico y es atraída por los exudados radicales de las plantas hospederas. En la rizosfera, la bacteria inicia la colonización por mecanismos de adhesión como las fimbrinas y los pilis (Genin and Boucher, 2004), entrando al interior de la planta a través de aberturas naturales y una motilidad dirigida por el flagelo tipo “swimming” (Álvarez *et al.*, 2010). *R. solanacearum* invade rápidamente (menos de 4h) el espacio intercelular de la corteza de la raíz, gracias a la secreción de enzimas celulolíticas y peptinasas (Schell, 2000; Denny and Hayward, 2001).

El desarrollo de la enfermedad ocasionada por *R. solanacearum* dentro de la planta hospedera, involucra una cascada de señales coordinada por múltiples factores de virulencia, que asegura que los factores especializados se produzcan en apropiadas cantidades, lugares y tiempos determinados. El sistema Phc (por sus siglas en inglés de

“Phenotype conversion”) controla y regula la red de virulencia y patogenicidad, dependiendo de factores ambientales en el interior y exterior de la célula (Schell, 2000).

En el momento de la colonización de las raíces, el sistema Phc inactiva el regulador transcripcional PhcA (el cual es un regulador tipo Lys-R) que es dependiente de la densidad celular, haciendo que no se produzca ningún efecto de virulencia o patogenicidad, y en cambio, incrementa la producción de algunos compuestos como PglA (poligalacturonasa), sideróforos y aumenta la motilidad tipo swimming (Schell, 2000). Este regulador transcripcional central controla la expresión de muchos genes y es conocido como un regulador que acciona o reprime otros reguladores en *R. solanacearum*, como el sistema regulador de producción de 3-OH PAME (PhcB, PhcR y PhcS), de poligalacturonasas (PehR y PehS), entre otros (Genin and Denny, 2012).

Una vez adentro (aproximadamente 2 a 3 días después de la colonización), la bacteria se desplaza hacia el parénquima vascular y xilema. Luego, del cuarto al quinto día aproximadamente, *R. solanacearum* se mueve por toda la planta heterogéneamente aumentando su población, aparentemente dentro de unos sacos intercelulares formando biopelículas; actuando sigilosamente ya que causa un daño mínimo en las células del tejido y aparentemente evade (o suprime) el reconocimiento y/o la respuesta de las defensas de la planta (Schell, 2000). Seguidamente, hacia el día 8 después de la colonización, la bacteria se encuentra en una concentración de  $10^{10}$  células/cm tallo, taponando los haces vasculares con exopolisacáridos (EPS I). Se produce una marchitez foliar y clorosis probablemente por la reducción en el flujo de savia, que comienza desde las hojas más jóvenes y progresa hacia las hojas más viejas, ocasionando una posterior muerte de la planta (De Oliveira e Silva *et al.*, 2000; Schell, 2000).

En ese momento el interruptor PhcA se encuentra activado, debido a que la densidad celular es alta, haciendo que se active a su vez el sistema regulador para la producción de 3-OH PAME (3-OH Palmitic Acid Methyl Ester), comenzando desde la enzima biosintética PhcB. Este compuesto es altamente específico y afín a *R. solanacearum* y es perteneciente al quórum sensing de la bacteria. A concentraciones altas de 3-OH PAME se activan diversos reguladores de la red Phc y se producen otros factores de virulencia como el EPS I, algunas exoenzimas (enzimas pectinolíticas, celulolíticas, Tek), genes

tipo *hrp* que codifican el sistema de secreción tipo III y la bacteria se vuelve altamente virulenta (Schell, 2000).

Después de este proceso, la bacteria se desarrolla parcialmente en desechos vegetales o en el suelo, en donde puede sobrevivir por largos periodos de tiempo dependiendo de la raza y de las características físicas, químicas y biológicas del ambiente (Álvarez *et al.*, 2010). Además, el fitopatógeno debe soportar las tensiones y adversidades impuestas por el ambiente, desarrollando estrategias de supervivencia y potencialmente infectar nuevas plantas hospederas (van Elsas *et al.*, 2000).

En el proceso de producción de 3-OH PAME y de una consecuente activación de la red de virulencia, es donde se podría realizar un control, ya sea químico o biológico de los genes de virulencia de *R. solanacearum*, haciendo que este compuesto se desintegre o no lo censen las células bacterianas, impidiendo la activación de virulencia y patogenicidad. Otra de las alternativas posibles es la colonización de otras bacterias oportunistas no patógenas, como en el estudio de Kay y colaboradores (2002) donde encontraron una colonización oportunista por parte de *Acinetobacter* sp. BD413, desarrollando un estado competente con *R. solanacearum* a plantas de tomate; con el fin de disminuir la posibilidad de ingreso de la bacteria fitopatógena al sistema interno de las plantas.

### 1.3.2 Enfermedad del Moko

*R. solanacearum* filotipo IIB, clado 4, es el agente causal de la enfermedad conocida como la marchitez bacteriana (Genin and Denny, 2012). En los cultivos de *Musa* spp., esta bacteria fitopatógena causa la enfermedad del Moko, que adquiere este nombre gracias al primer estudio científico realizado en la isla de Trinidad a finales del siglo XIX, donde ésta bacteria destruyó casi la totalidad de los cultivos de banano y del cultivar de plátano llamado “Moko” (Montoya, 2003).

Este fitopatógeno proveniente del suelo, aparece de forma repentina en cultivos susceptibles, induciendo un marchitamiento que comienza con el decaimiento y amarillamiento de las hojas más jóvenes de la planta de banano, así como la necrosis de la hoja bandera. Esta sintomatología continúa hacia las demás hojas de la planta y en los tejidos internos, tornándose necróticos. Los frutos presentan un desarrollo anormal, disminuyendo su crecimiento y pudriendo su interior. Consecuentemente, la planta muere

y queda como reservorio para que la bacteria se instale en la materia orgánica en descomposición en la matriz del suelo, en donde se dispersa con el agua de riego y agentes externos en la plantación, como herramientas, botas y animales (De Oliveira e Silva *et al.*, 2000; Agrios, 2004); características que determinan la magnitud de la enfermedad y el impacto económico en el cultivo (Vargas-Sánchez *et al.*, 2002; Belalcazar *et al.*, 2003).

La primera aparición de la enfermedad del Moko en Colombia fue en la zona de Prado en el departamento del Tolima en el año 1954; su siguiente registro fue en el año 1962 en el departamento del Magdalena. Posteriormente, se detectó en los años 1968 y 1970 en la zona bananera del Urabá Antioqueño y en el eje cafetero en cultivos de banano y plátano, respectivamente (Obregón *et al.*, 2008; Cardozo and Rodríguez, 2009). Estas apariciones fueron detectadas gracias a los primeros síntomas de marchitamiento y clorosis que se evidencian cuando una planta está enferma (Denny, 2006).

En nuestro país la enfermedad se ha incrementado, ya que, por ejemplo, hacia los inicios del año 2008 se comenzó con 4 focos de infección y al final se obtuvieron 400 focos, dando como resultado 2,000 ha de banano de exportación amenazadas por esta enfermedad. Esta situación se ve agravada por la carencia de alternativas para el manejo de la enfermedad, ya que la única medida de control consiste en el uso de controles químicos y culturales en simultáneo, en donde se erradican las plantas infectadas en un radio de 5 a 10 m a la redonda con herbicidas (glifosato), manteniendo el área en cuarentena por 6 meses aproximadamente. Allí se debe evitar el crecimiento de plantas hospederas asintomáticas, que pueden representar una fuente potencial de inóculo y además de personal capacitado para el buen manejo de las herramientas dentro de la plantación (Bornacelly and Mena, 2010).

El sistema de regulación actual por parte de las entidades ambientales, ha implementado una alta variedad de controles biológicos para enfermedades causadas por diversos fitopatógenos; sin embargo, para una efectiva aplicación se requiere del entendimiento de las interacciones entre las plantas, el ambiente y los microorganismos (Pal *et al.*, 2006). A partir de estos aspectos se introducen conceptos alternativos al uso de químicos sintéticos, como es la utilización de controladores biológicos.

## 1.4 Control biológico en la rizosfera

El término de control biológico o biocontrol se aplica al uso de agentes microbianos antagonistas para la supresión de enfermedades en las plantas y es el organismo vivo o extractos de cultivos bacterianos quienes suprimen el patógeno, por lo cual se le asigna el nombre de Agente de Control Biológico (ACB) (Pal *et al.*, 2006). Recientemente, los agricultores están interesados en disminuir la dependencia de insumos químicos, por lo que el control biológico entra a jugar un papel importante en las nuevas estrategias y alternativas en los sistemas de manejo integrado en los cultivos. No obstante, existen algunos aspectos importantes a la hora de aplicar nuevos controles alternativos a los existentes; entre éstos se encuentran la ecología de los microorganismos relacionados a las plantas, cómo están distribuidos los patógenos y sus antagonistas en el ambiente y bajo cuáles condiciones los ACB ejercen sus capacidades supresivas. También es importante reconocer la forma de aplicación del medio controlador y sobretodo la integración práctica en los sistemas agrícolas (Pal *et al.*, 2006).

Actualmente, se han reconocido especies bacterianas promisorias como ACBs, tales como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Streptomyces*, entre otras (Shoda, 2000). Los mecanismos de acción utilizados por estos microorganismos contra los agentes fitopatógenos son diversos y su control biológico exitoso resulta de la combinación gradual de estas interacciones, las cuales se desarrollan en mayor o menor medida, dependiendo del contexto medioambiental en donde ocurran (Pal *et al.*, 2006).

El uso de diferentes Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endospora (BAFE), como *Bacillus* spp., para el control biológico de fitopatógenos ha sido menos estudiado que las bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas* spp. El género *Bacillus* spp. tiene las características de ser omnipresente en los suelos, presentar alta tolerancia térmica, formar endosporas de resistencia y en su mayoría, ser agentes biológicos seguros, por lo que le confiere un alto potencial de ser empleado como ACB (Shoda, 2000).

Algunas BAFEs se encuentran asociadas a las plantas, beneficiando el desarrollo y la promoción de crecimiento vegetal. Este tipo de microorganismos se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (por sus siglas en inglés de "Plant Growth Promoting Rhizobacteria") (Kloepper, 1993), las cuales ocupan la zona próxima a la raíz de las plantas donde se localiza una concentración alta de exudados como compuestos carbonados solubles, factores moduladores del pH, sideróforos,

fenoles, carboxilatos, compuestos antimicrobiales, entre otros. La combinación de todos los eventos que ocurren alrededor de las raíces de las plantas y el suelo próximo a ellas, crea unas condiciones apropiadas para el desarrollo microbiano, que se conoce como el efecto rizosfera (Nihorimbere *et al.*, 2012).

En general se conocen dos mecanismos de las PGPRs: directos e indirectos (Kloepper *et al.*, 1999). Los mecanismos directos se refieren a acciones biofertilizantes, fitoestimulantes y rizoremediadores, ya que se mejora el estado nutricional de las plantas hospederas al realizar una fijación biológica de nitrógeno y un aumento en la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera (Ramírez and Kloepper, 2010), una inducción del crecimiento del área superficial de las raíces y mejora otros mecanismos simbióticos benéficos para la planta hospedera (Antoun and Prévost, 2005). Dentro de los mecanismos indirectos se detallan la acción biopesticida, en donde se da un desplazamiento físico y colonización del patógeno (Handelsman and Stabb, 1996), la producción de antibióticos (pequeñas moléculas que inhiben el crecimiento del patógeno) (Ongena and Jacques, 2008) y la producción de enzimas líticas (van Loon *et al.*, 1998; Niranjan Raj *et al.*, 2005).

Entre las características biopesticidas, la acción biocontroladora se puede dar bajo otras clasificaciones de mecanismos antagonistas: directo, indirecto y mixto. En el antagonismo directo se dan los mecanismos de hiperparasitismo y predación; el antagonismo indirecto abarca los mecanismos de competencia e inducción de resistencia del hospedero; y en el antagonismo mixto se dan interferencias químicas y físicas, una producción de desechos no regulados (como amonio y dióxido de carbono), enzimas líticas y antibióticos (Pal *et al.*, 2006).

Algunos ACBs como *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*, tienen la capacidad de producir compuestos antibióticos, los cuales ayudan al antagonismo de patógenos que producen enfermedades devastadoras en las plantas. De hecho, en la actualidad se tienen algunos productos comerciales, lanzados por importantes compañías agroquímicas, como Bayer y Monsanto, donde utilizan ACBs, por ejemplo Rhapsody® y Serenade®. El 70% de estos productos contienen cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales se caracterizan por ser unas de las mejores candidatas para el desarrollo de

productos biopesticidas eficientes, gracias a la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, la expresión de diferentes mecanismos de acción para el control y a la producción de esporas, las cuales tienen un alto nivel de resistencia a condiciones adversas de humedad y temperatura; características necesarias para asegurar el éxito en las formulaciones de productos biocontroladores y prolongar el tiempo de almacenamiento (Ongena and Jacques, 2008). Asimismo, las esporas producidas por estas bacterias, pueden dispersarse fácilmente por el viento y viajar largas distancias, por lo que pueden encontrarse en diversos lugares (Shoda, 2000).

Aunque las dinámicas poblacionales y los mecanismos de supresión del patógeno en el suelo por parte de *Bacillus* spp. no han sido extensamente estudiados, se conocen algunos detalles en los cuales se concentran actualmente la mayoría de investigaciones de esta clase. Se ha descrito que para *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, se destina entre el 5 y 8% de su genoma, respectivamente, a la síntesis de metabolitos secundarios (Stein, 2005; Cheng *et al.*, 2007); como los antibióticos, que son moléculas biológicamente activas y potencialmente inhibitoras del crecimiento de fitopatógenos (Emmert & Handelsman, 1999; Ongena y Jacques 2008).

También se sabe, por ejemplo, que *B. subtilis* produce cierta clase de sustancias antibióticas sintetizadas ribosomalmente como los lantibióticos y no ribosomales como los lipopéptidos (LPs), los cuales involucran en general tres familias: iturinas, fengicinas y surfactinas, con diferentes isoformas (Rogers *et al.*, 1965; Delcambe *et al.*, 1977; Peypoux *et al.*, 1980, 1986; Ohno *et al.*, 1992; Ongena and Jacques, 2008). Estos péptidos pertenecen a una clase de moléculas que se caracterizan por tener alta interacción con tejidos membranales, lo cual les confiere gran actividad surfactante y antibiótica (Steller *et al.*, 1999). Estos LPs influyen en la competencia (o "fitness") ecológico con relación en la colonización de las raíces y su persistencia en la rizosfera; además tienen relaciones benéficas con las plantas, estimulando mecanismos de defensa de los hospederos (Ongena and Jacques, 2008). Adicionalmente, se ha encontrado que moléculas producidas por *B. amyloliquefaciens* actúan realizando una inserción en la bicapa lipídica de otros microorganismos, generando un rompimiento y un desbalance en la célula; complementariamente pueden intervenir en el movimiento de las células cuando están colonizando las raíces del hospedero (Bais *et al.*, 2004; Leclère *et al.*, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2010).

Siguiendo esta idea, se podría sugerir que los LPs bacterianos son candidatos ideales como biopesticidas eficientes y productos de bioremediación (Vollenbroich *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2012), asimismo, podrían actuar como reductores en enfermedades de postcosecha, como lo describe Arguelles-Arias y colaboradores (2009) y podría ser una alternativa para la disminución del tiempo de cuarentena de suelos contaminados con *R. solanacearum* en cultivos de *Musa* sp.

## 1.5 Métodos de control de *R. solanacearum*

Para el control de la enfermedad del Moko en los cultivos de banano y plátano, se tienen diversas alternativas como controles químicos, culturales y biológicos, o una mezcla de los anteriores. Dentro del manejo químico, se utilizan varias sustancias como los fumigantes de bromuro de metilo, Dazomet®, formol y el herbicida glifosato. Estas sustancias han demostrado que después de una aplicación sobre los cultivos, un período cuarentenario y una posterior siembra, no se evidencian síntomas de la enfermedad, hasta la floración (Castañeda *et al.*, 2002). Igualmente se ha recomendado por entes como el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), la incorporación de formol al suelo, o productos orgánicos como el Fulvan® líquido, fabricado en Colombia, el cual es 100% soluble y tiene un alto contenido de electrolitos, los cuales ejercen una acción floculante ayudando a mejorar la aireación, porosidad y textura de los suelos, aumentando la actividad microbiana; además favorece la capacidad de intercambio catiónico mejorando la absorción de nutrientes en los cultivos gracias a la concentración de ácidos fúlvicos (Arenas *et al.*, 2004).

También, Castañeda y colaboradores (2002), por medio de un análisis económico que comprendía los costos del tratamiento, mantenimiento de la cuarentena y pérdida de ganancias o ingresos, demostraron que las pérdidas causadas por la enfermedad tratada con bromuro de metilo y Dazomet®, son tres veces mayores a aquellas causadas por el tratamiento con glifosato. El uso del herbicida glifosato tiene la ventaja de que no sólo mata a la planta en un corto período de tiempo (alrededor de 20 días) sino que además destruye a la bacteria un día después, en condiciones *in vitro* en cultivo sumergido, lo cual podría sugerir que dentro de sus tejidos en el sistema radical podría ocurrir de una forma similar, el cual a diferencia de la parte foliar, es muy difícil su remoción y quema (citado por Belalcazar *et al.*, 2003). Aunque tiene factores en contra, como el tiempo de

cuarentena que se debe esperar en la zona de fumigación, de aproximadamente 6 meses (Belalcazar *et al.*, 2003) y puede causar resistencia microbial, sobretodo en bacterias Gram negativas cuando es aplicado en altas cantidades por periodos prolongados (Lancaster *et al.*, 2010).

Sin embargo, se ha encontrado que la bacteria *R. solanacearum* es tan resistente, que puede quedar remanente en el suelo, incluso después de la fumigación y cuarentena, hasta por cinco meses sin alimentarse de ningún hospedero y hasta por seis meses y medio si dentro del foco existe material infectado y sin total descomposición o en presencia de hospedantes alternos, como las plantas arvenses que pueden estar situadas alrededor de la plantación (Bornacelly and Mena, 2010).

El control cultural que se emplea actualmente es el uso de material de siembra (cormos o colinos) que deben provenir de lugares que no estén infectados por la bacteria del Moko o por laboratorios certificados en los que se realice la propagación *in vitro*. Por parte de las herramientas utilizadas en los cultivos, deben estar previamente desinfectadas y las botas de trabajo y demás utensilios deben estar higienizados, con soluciones de productos a base de hipoclorito de sodio al 10%, yodo agrícola al 20% (ICA, 2012) o amonios cuaternarios (Martínez and Guzmán, 2011), evitando la propagación por factores externos. Para que la planta tenga un buen desarrollo es importante implementar diferentes prácticas de manejo directo, como la eliminación de hojas verdes dobladas y secas, deshije y desbellote, y también prácticas indirectas como el suministro de agua y nutrientes y manejo correcto de arvenses (Belalcazar *et al.*, 2003; Bornacelly and Mena, 2010).

Respecto al control biológico, diversos estudios se han llevado a cabo por parte de bacterias hacia patógenos como *R. solanacearum* a nivel *in vitro* y a nivel de suelo en cultivos, discutidos a continuación. En investigaciones con bacterias del género *Bacillus*, se ha demostrado su alto potencial antagonista contra *R. solanacearum* y otros patógenos, con la producción de proteínas antimicrobiales y compuestos antibióticos que posiblemente hacen parte de la familia de los lipopéptidos, los cuales tienen la característica de ser termoestables, resistentes a las proteasas y solubles en metanol (Bernal *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2010).

A nivel *in vitro* se han evaluado diversos extractos naturales provenientes de plantas medicinales con propiedades antibióticas, obteniendo halos de inhibición mediante la técnica de difusión en agar que varían entre 1 y 41 mm de diámetro de inhibición a concentraciones de aproximadamente 30 µg/mL de los compuestos activos, contra *R. solanacearum* (Hasan *et al.*, 2011; Sukanya *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Owoseni and Sangoyomi, 2014). Además se ha evidenciado valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de 1 a 1000 µL/mL (Nezhad *et al.*, 2012), el cual es un valor de alta importancia a nivel de biocontrol, ya que a partir de este se reconoce el efecto de antibiosis en cualquier sistema a evaluar.

En investigaciones en suelo, Tan y colaboradores (2013) evaluaron el uso de microorganismos pertenecientes a *B. amyloliquefaciens* (CM-2 y T-5) en suelo y plántulas de tomate, a nivel de invernadero, infectados con *R. solanacearum* (QLRs-1115); obteniendo una disminución de la incidencia de la enfermedad y un efecto de promoción de crecimiento en las plantas. En otras investigaciones se evaluaron aplicaciones de cepas de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* y sus fertilizantes bio-orgánicos derivados de las bacterias, como agentes potenciales de biocontrol contra el fitopatógeno en papa; y se encontró que los fertilizantes bio-orgánicos con las bacterias disminuyeron la incidencia de la enfermedad e incrementaron los rendimientos de la planta (Ding *et al.*, 2012).

Complementariamente, se han realizado investigaciones para reducir el nivel del patógeno en el suelo cuarentenario. Arenas y colaboradores (2004), inocularon suelo estéril de la zona de Quindío, Colombia con *R. solanacearum* Raza 2, en condiciones de invernadero, para evaluar el efecto de prácticas no contaminantes alternativas al formol sobre la población del patógeno y se probaron los tratamientos de Marigold o “flor del muerto”, *Tagetes patula*, incorporación de calfos, fertilizante Fulvan® líquido y lixiviado de compostaje de plátano. Como resultados se obtuvieron reducciones del orden de 80 – 90% de la bacteria, con un tiempo de 20 días después de la aplicación. Asimismo, se han evaluado otros extractos acuosos de plantas de invasión en Etiopía, adicionándolos a suelos contaminados con *R. solanacearum* en concentraciones de 10<sup>9</sup> UFC/mg mL; en este estudio se encontró que las plantas de tomate evaluadas con diferentes tiempos de aplicación de los extractos tuvieron un alto porcentaje de reducción de la enfermedad en comparación con el control, de aproximadamente 75%, 91.7% y 79.2% en las

aplicaciones de 2 días antes, simultáneo con el fitopatógeno y 2 días después, respectivamente; adicionalmente encontraron que la CMI del extracto de la planta *Eichhorina crassipes* a nivel *in vitro* fue de 5 mg/mL (Alemu *et al.*, 2013). Posiblemente los extractos naturales utilizados están realizando una inhibición de la bacteria *R. solanacearum* debido a los compuestos presentes en los extractos, como taninos, alcaloides, terpenoides, esteroides, entre otros, los cuales al parecer actúan de una forma sinérgica disminuyendo la densidad bacteriana.

También, se conoce que la bacteria *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123, aislada de la rizosfera de cultivos de *Musa* sp. por Ramirez (2012) posee actividad antimicrobiana a nivel *in vitro* contra *R. solanacearum* EAP009 produciendo halos de inhibición de 12 mm aproximadamente en medio BGTA. A su vez, estos extractos producidos durante el crecimiento de la BAFE actúan contra otros microorganismos como *Serratia marcescens*, *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis* a nivel de laboratorio (Pinzón, 2010; Gil and Gómez, 2011; Ramírez, 2012; Villegas, 2012). Se sugiere además que estos metabolitos activos pueden pertenecer a la familia de los lipopéptidos, por algunas evaluaciones realizadas mediante HPLC por Villegas (2012), además de otras pruebas de estabilidad a cambios de temperatura entre 50 y 121°C y pH entre 3 y 11, las cuales mostraron sólo una pérdida de actividad del 22% contra *R. solanacearum* al ser sometidos hasta una temperatura de 100°C y se degradaron completamente a condiciones de autoclavado (121°C y 15 psig) (Pinzón, 2010).

Con estos antecedentes e investigaciones se puede concluir que pueden existir diferentes alternativas ecológicamente seguras y eficientes para el biocontrol, por lo que se abren diferentes posibilidades del uso de microorganismos como *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 o sus metabolitos bioactivos que aporten a este sistema de un control natural y poder así reducir los tiempos cuarentenarios en los suelos contaminados con *R. solanacearum* en los cultivos de banano y plátano en el país.



## Capítulo 2: Materiales y métodos

### 2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

La bacteria fitopatógena *R. solanacearum* EAP009 fue aislada del tejido del cormo de banano infectado según la metodología de Álvarez y colaboradores (2008) y fue almacenada en medio BG con glicerol (20%) a -80°C (Ramírez, 2012). La identificación de *R. solanacearum* se realizó por la secuencia del ADN ribosomal 16S con una relación del 99% a la cepa R221 con número de acceso al GeneBank AY464965.1, Enero 2011 (Villegas, 2012). La bacteria *R. solanacearum* AW1 perteneciente a la Raza 1, aislada de un cultivo de tomate en Alabama, Estados Unidos y la cepa AW1-3 modificada genéticamente en el gen *phcB83*; *eps-130::lacZ*, fueron donadas por el Dr. T. Denny (Denny *et al.*, 1988; Flavier *et al.*, 1997b; Milling *et al.*, 2009).

El microorganismo *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 usado para las pruebas de biocontrol fue aislado de la rizosfera de una planta de banano cultivar Gran enano del campo experimental de AUGURA, en la zona del Urabá Antioqueño por Ramírez (2012). Esta bacteria hace parte de una colección de microorganismos de la Universidad EAFIT y se encuentra almacenada en TSB (“Tryptic Soy Broth”) y glicerol (20%) a -80°C.

### 2.2 Medios de cultivo y reactivos

Los siguientes medios de cultivo fueron utilizados para comparar la producción de biomasa y de metabolitos secundarios en la cinética de la cepa EA-CB0123: Medio MOLP (*Medium Optimal for Lipopeptide Production*) (Jacques *et al.*, 1999): 20 g/L sacarosa (Merck®), 30 g/L peptona especial (Oxoid®), 7 g/L extracto de levadura (Oxoid®), 1.9 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carlo Erba®), 1 mL/L solución de elementos traza (1 mg/L CuSO<sub>4</sub>, 5 mg/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 2 mg/L KI, 0.14 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 10 g/L C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>) y 9 mL/L solución Mn·Mg (0.4 mg/L MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O y 50 mg/L MgSO<sub>4</sub>) a pH 7; TSB (Oxoid®): 2.5 g/L glucosa, 17 g/L caseína pancreática

digestiva, 3 g/L enzima digestiva de soya, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L  $K_2HPO_4$  y medio DRU (Mosquera, 2013): 0.042 g/L  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.031 g/L  $CaCl_2$ , 0.5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.5 g/L  $KH_2PO_4$ , 1 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 35 g/L extracto levadura, 4 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y 31.3 g/L glucosa,

El medio de cultivo BGTA fue usado para el crecimiento de las bacterias de la especie *R. solanacearum* y está compuesto por: 18 g/L agar (Oxoid ®), 1 g/L casaminoácidos (BD®), 1 g/L extracto de levadura (Oxoid ®), 10 g/L peptona especial (Oxoid ®), 5 g/L glucosa (Merck ®), 0.05 g/L 2,3,5 cloro trifenil tetrazoilo (TZC) (Panreac ®) (Flavier *et al.*, 1997a). Los medios de cultivo BGA y BG también fueron usados para el crecimiento de la bacteria fitopatógena con las diferencias en su composición, ya que no contienen TZC, en sus formas de medio de cultivo sólido y líquido, respectivamente. Igualmente el medio de cultivo SMSA (Medio Semiselectivo Sur Africa) (French *et al.*, 1995) se usó para el crecimiento y aislamiento de *R. solanacearum* y es una modificación del medio Cloro Trifenil Tetrazoilo (TTC). Este medio comprende 10 g/L peptona especial (Oxoid ®), 1 g/L casaminoácidos (BD ®), 18 g/L de agar (Oxoid ®), 100 mg/L polimixin  $\beta$  sulfato (Calbiochem ®), 5 mg/L cristal violeta (Merck ®), 50 mg/L 2,3,5 TZC (Panreac ®), 25 mg/L bacitracin (Sigma ®), 0.5 mg/L penicilina y 5 mg/L cloranfenicol.

El medio de cultivo Mueller-Hinton (M-H) (Wiegand *et al.*, 2008) fue utilizado como medio estándar para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos en bacterias y tiene la siguiente composición 300 g/L infusión de carne, 17.5 g/L peptona ácida de caseína, 1.5 g/L almidón, pH 7.3.

El medio de cultivo TSA (Merck ®): 10% (2.5 g/L glucosa, 17 g/L caseína pancreática digestiva, 3 g/L enzima digestiva de soya, 5 g/L NaCl, 2.5 g/L  $K_2HPO_4$ ) suplementado con 0.1% de sacarosa (Schonfeld *et al.*, 2003) y 50 mg/L TZC, fue utilizado para el crecimiento de la bacteria *R. solanacearum* y realizar la evaluación de morfología de las bacterias aisladas.

### **2.3 Cinética de crecimiento del *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123**

Para determinar las diferencias en la producción de biomasa y la actividad antagonista contra *R. solanacearum* en tres diferentes medios de cultivo, se realizó la cinética de

crecimiento de la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123. Para esto se hizo un preinóculo de la bacteria *B. amyloliquefaciens* en cada uno de los medios a evaluar (MOLP, TSB y DRU) sembrando una colonia activada en TSA al 50% de 48 horas y se adicionó a un Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo respectivo. Este cultivo se incubó a 30°C y 140 rpm por 12 horas. La fermentación de las bacterias evaluadas se llevó a cabo en un Erlenmeyer de 1,000 mL con 180 mL del medio de cultivo y 20 mL del preinóculo, por duplicado para cada tratamiento. Los tratamientos (cultivos de la bacteria *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en los medios MOLP, TSB y DRU) se mantuvieron a 140 rpm a 30°C por 72 horas y se tomaron muestras en diferentes tiempos para evaluar el crecimiento de las bacterias y la actividad antibacteriana de los compuestos producidos.

### **2.3.1 Producción de biomasa de la bacteria *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en diferentes medios de cultivo**

La determinación de la cinética de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 fue realizada tomando muestras de 1 mL cada dos horas, durante las primeras 12 horas y posteriormente cada 12 horas, hasta un tiempo final de 72 horas. Para la evaluación de la densidad bacteriana y la actividad del Sobrenadante Libre de Células (SLC) del cultivo de la cepa EA-CB0123, las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 14,000 rpm y los sobrenadantes se almacenaron a -18°C para un posterior análisis de actividad microbiana; luego el pellet bacteriano fue resuspendido en el mismo volumen de agua destilada estéril (ADE) y la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) fue medida en un espectrofotómetro a 600 nm, utilizando como blanco ADE. Durante la evaluación de la cinética, el número de células fue determinado mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por el método de diluciones seriadas del pellet bacteriano en diferentes tiempos de la cinética (0, 6, 12, 36 y 72 horas). Las diluciones fueron sembradas por superficie con 100  $\mu$ L de cada solución en medio TSA al 50% y se incubaron a 30°C, por 48 horas.

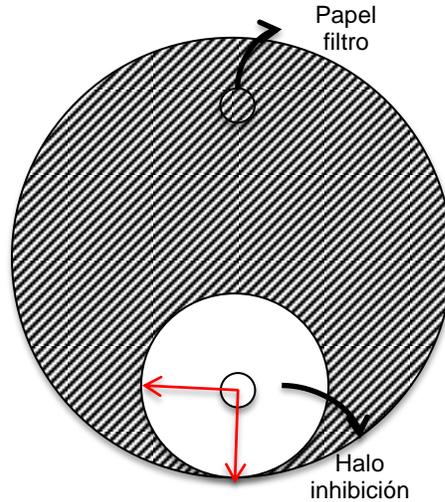
### **2.3.2 Actividad de extractos (EA-CB0123) contra *R. solanacearum***

Para evaluar la actividad de los compuestos producidos por la cepa EA-CB0123 en los diferentes medios de cultivo contra *R. solanacearum*, los sobrenadantes de la cinética de crecimiento fueron obtenidos por extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction, SPE C18 500 mg J.T Baker), mediante la metodología descrita por Pinzón (2010) y

modificada por Villegas (2012). Esta extracción se llevó a cabo mediante diferentes etapas; la primera involucró el acondicionamiento de la columna con 4 mL de metanol al 99.8% y luego 4 mL de agua destilada; la segunda etapa involucró la aplicación de la muestra (sobrenadantes, 2 mL) y se continuó con las etapas de elución con 4 mL de agua destilada, 4 mL de metanol al 50% y 4 mL de metanol al 99.8%. Finalmente se realizó un lavado de la columna de extracción adicionando 4 mL de metanol al 99.8% y 4 mL de acetonitrilo al 100%. Estas extracciones se realizaron bajo las condiciones de un flujo menor a 3 mL/min a temperatura ambiente en un "Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifolds".

Las fracciones obtenidas de la etapa con metanol al 99.8% se evaporaron completamente en un horno a 40°C y los compuestos sólidos obtenidos fueron resuspendidos en metanol (99.8%), para obtener una concentración de 15 mg/mL. Posteriormente, se realizó la prueba de actividad contra *R. solanacearum* mediante el método de difusión en agar descrito por Pinzón (2010), en donde se sembraron 100 µL de *R. solanacearum* por superficie a una concentración aproximada de 10<sup>6</sup> UFC/mL en medio BGTA y discos de papel filtro (Schleicher & Schuell 595 ref. 311619) de 0.5 cm de diámetro impregnados con 15 µL de cada uno de los extractos metanólicos, fueron colocados equidistantemente en la caja de Petri. El ensayo se incubó a 25°C en oscuridad por 4 días, al cabo de los cuales se realizó la medición de los radios de inhibición formados alrededor de cada círculo de papel (tres mediciones por radio de inhibición) como se muestra en la Figura 2-1. El ensayo tuvo como control positivo un disco de agar de la cepa EA-CB0123 en TSA al 50% de 48 horas de crecimiento y como control negativo se utilizó un papel filtro impregnado de metanol al 99.8%.

**Figura 2-1** Método de difusión en agar. El área con rayas negras significa crecimiento de *R. solanacearum*, mientras que el espacio en blanco es la zona de inhibición.



## 2.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la CMI (concentración mínima de un compuesto en la cual se inhibe el 100% del crecimiento de un microorganismo) de los metabolitos producidos por la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 contra la bacteria fitopatógica EAP009, se realizó el método de microdilución en medio de cultivo líquido M-H propuesto por Wiegand y colaboradores (2008). Para esto se realizó un cultivo bacteriano con *B. amyloquefaciens* EA-CB0123 en tres medios de cultivo (MOLP, TSB y DRU), cada uno en un Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de los medios, a los cuales se les adicionó la resina Amberlita XAD 16 (Alfa Aesar – A Johnson Matthey Company ®) al 4% después de 16 horas del crecimiento bacteriano, para la adsorción de los compuestos con actividad antibacteriana. El ensayo se mantuvo en agitación (140 rpm, 30°C) por 40 horas (cada unidad experimental fue realizada por duplicado). Después de este tiempo se recuperó la Amberlita del caldo de cultivo, se lavó con abundante agua, y luego los metabolitos adsorbidos en la resina fueron eluidos agregando 20 mL de metanol al 99.8%. El extracto metanólico fue evaporado en un rotoevaporador a 50 psig y 50°C y el residuo sólido resultante se pesó para determinar la cantidad de extractos producidos por la bacteria en cada medio de cultivo. Posteriormente, se realizaron diluciones de estos extractos con metanol, con el fin de obtener varias concentraciones y así poder determinar la CMI.

Los platos de Elisa usados para determinar la CMI fueron preparados así: control absoluto (50 µL inóculo *R. solanacearum* a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC/mL en medio M-H y 50 µL de medio M-H), blanco (100 µL de medio M-H) y las diferentes concentraciones de los extractos (50 µL de inóculo de *R. solanacearum* y 50 µL del extracto bacteriano preparado en medio M-H). A cada pozo del plato de Elisa se le añadió un volumen total de 100 µL, para lo cual las concentraciones finales evaluadas de los extractos bacterianos fueron de: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 ppm. Este procedimiento se dejó en oscuridad por 36 horas de incubación a 26°C. Posteriormente se determinó la CMI y la LC<sub>50</sub> (por sus siglas en inglés de “Lethal Concentration”, concentración letal a la que se inhibe el 50% del patógeno) por DO a 595 nm en un lector de Elisa (Bio Rad iMark™) y luego se compararon dichos parámetros en los diferentes medios de cultivo. El cálculo del porcentaje de inhibición se determinó por medio de la Ecuación 2-1. La selección del medio de cultivo con la menor CMI y LC<sub>50</sub> fue determinado mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, en donde la variable de respuesta fue %Inhibición.

$$\%Inhibición = \frac{DO_{CAB} - DO_{tto}}{DO_{CAB}} * 100\% \quad (2-1)$$

**Ecuación 2-1** Determinación del porcentaje de inhibición de las concentraciones de los extractos

Donde:

$DO_{CAB}$ : Densidad óptica a 595 nm del control absoluto

$DO_{tto}$ : Densidad óptica a 595 nm del tratamiento

## 2.5 Aislamiento de cepas de *R. solanacearum*

El aislamiento de cepas de *R. solanacearum* de tejido y suelo fue realizada por medio de dos metodologías modificadas descritas por Álvarez y colaboradores (2008). La primera metodología fue a partir de tejido vegetal infectado, en donde se tomaron 40 g de tejido

en piezas pequeñas (aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>) y se lavaron con ADE. Luego, los tejidos fueron licuados con 40 mL de ADE por 5 segundos y se realizaron diluciones seriadas de 1:10. Las diluciones desde 10<sup>-3</sup> hasta 10<sup>-5</sup> fueron sembradas por superficie en cajas de Petri con medio SMSA. Estas cajas se incubaron de 3 a 5 días a 30°C. Para el aislamiento a partir de suelo infectado se tomaron 10 g de suelo rizosférico y se adicionaron a un recipiente con 100 mL de ADE con esferas de vidrio estériles (van Elsas *et al.*, 2000). Las muestras fueron agitadas (200 rpm, 28°C) por 30 minutos y luego se llevaron a ultrasonido por 10 minutos (Ceballos *et al.*, 2012). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1:10 para la detección de *R. solanacearum*.

Las pruebas microbiológicas de KOH, oxidasa y tinción de Gram fueron utilizadas para caracterizar las colonias bacterianas con apariencia rojiza, mucoide, borde irregular y halo claro en medio SMSA.

### 2.5.1 Caracterización molecular de los aislados

La asignación taxonómica de los aislados de *R. solanacearum*, obtenidos de suelo y tejido fueron evaluados por una PCR específica (Reacción en cadena de la polimerasa o "Polymerase Chain Reaction") usando los cebadores 759/760. Para esto se realizó una extracción de ADN por la técnica de célula entera según la metodología de Ramírez (2008), resuspendiendo una colonia en viales con 20 µL de agua ultrapura, la cual se calentó en baño María a 96°C durante 5 minutos. Estas muestras de ADN obtenidas por célula entera, se usaron como molde para la PCR. La identificación realizada por esta última técnica, se desarrolló usando cebadores específicos para *R. solanacearum* (759/760 - 759: 5 GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3; 760: 5 GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3) que amplifican un fragmento de 282 pb que corresponde a una porción del gen *lpxC* que codifica para N-acetil-glucosamina desacetilasa (Cardozo and Rodríguez, 2009). La mezcla para la PCR fue preparada en un volumen total de 25 µL conteniendo 0.25 µM de cada cebador (P760 y P759), 1 U de Taq ADN polimerasa (GoTaq® Flexi), 0.2 mM de dNTP, 1X de buffer de enzima (100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40) y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> por cada reacción. Los ciclos incluyeron una desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por 20 segundos, 64°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y un período final de extensión a 72°C por 5 minutos. Luego de la amplificación, se tomaron 5 µL de los productos de reacción y se verificó el tamaño del amplicón por medio de la visualización

en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA-Promega), suplementado con 2  $\mu$ L de bromuro de etidio (Cardozo and Rodríguez, 2009). En todas las evaluaciones se incluyó como control positivo la cepa de referencia EAP009 de la Universidad EAFIT.

Las cepas positivas para *R. solanacearum* fueron almacenadas en crioviales con medio BG + 20% de glicerol a -80°C y fueron clasificadas según su morfología y características propias de las colonias (morfotipos) en medio TSA al 10% suplementado con sacarosa y TZC (0.05 g/L).

### **2.5.2 Pruebas de patogenicidad de *R. solanacearum* en plantas de banano**

Para realizar las pruebas de patogenicidad en plantas de banano a nivel de invernadero se preparó una solución de *R. solanacearum* EAP009 (cepa control), a una concentración de  $10^8$  UFC/mL y se inocularon plantas de cv. Williams de 6 semanas de edad. Estas fueron sembradas en 3 Kg de sustrato de germinación Tierra Negra ® (pH 6.4, franco arenoso, con contenido de materia orgánica de 17.6%, ver Anexo 1), por dos metodologías: la primera consistió en realizar inyecciones del inóculo del fitopatógeno en el pseudotallo de la planta a una altura de 2 cm por encima del cormo con una jeringa de 27G x 1/2", aplicando 0.3 mL (Gómez, 2005) lentamente, asegurando que el líquido entrara en la planta; y la segunda metodología consistió en el corte de 3 raíces principales con una herramienta impregnada del inóculo, simulando heridas naturales en las raíces.

Las plantas infectadas permanecieron bajo condiciones de temperatura (entre 24 y 29°C), luminosidad (13 horas luz) y una humedad relativa del suelo específica (60-80%). La variable de respuesta fueron los días hasta la aparición de los síntomas. Se utilizaron 5 repeticiones por unidad experimental. Como control positivo se utilizó la bacteria *R. solanacearum* EAP009 y como testigo negativo aplicación de ADE.

A partir de esta prueba se estandarizó el proceso de infección y creación de focos de infección artificiales (FIA) para continuar con los objetivos siguientes, teniendo en cuenta la metodología más efectiva.

### 2.5.2.1 Patogenicidad de los aislados de *R. solanacearum* en plantas de banano

Para evaluar la patogenicidad y virulencia de cada uno de los aislados de *R. solanacearum*, se infectaron plantas de banano cv. Williams de 6 semanas de edad en 3 Kg de sustrato de germinación Tierra Negra®, mediante la metodología de corte de raíces con una herramienta impregnada del inóculo de la bacteria fitopatógena a evaluar, como se explicó en el numeral anterior (2.5.2).

Los síntomas de marchitez, clorosis y muerte total de las plantas se reportaron durante 18 días posteriores a la infección (DPI). Para esta medición de síntomas se tomaron las hojas totales de cada planta y se registraron las hojas marchitas o cloróticas en el tiempo, obteniendo un porcentaje de hojas con síntomas como se muestra en la Ecuación 2-2 (Ibrahim *et al.*, 2005):

$$\%Marchitez = \frac{\text{Número hojas marchitas}}{\text{Número de hojas totales}} \times 100 \quad (2-2)$$

**Ecuación 2-2** Porcentaje de síntomas en las plantas. El porcentaje de clorosis se realizó de la misma forma.

Con la información recolectada se calculó el Área Bajo la Curva del Desarrollo de la Enfermedad (ABCDE), que permitió visualizar el grado de infección de la planta según los días transcurridos desde su inoculación (Gómez, 2005). Como control positivo se usó la bacteria EAP009 y como control negativo se utilizó ADE, además se utilizaron 7 repeticiones por unidad experimental y se empleó al análisis de varianza con la tabla ANOVA con una confiabilidad del 95%.

La evaluación anterior permitió seleccionar el aislado bacteriano perteneciente a *R. solanacearum* con una mayor severidad en planta a nivel de invernadero, para continuar las pruebas posteriores.

## 2.6 Evaluación del extracto de la EA-CB0123 en suelos contaminados con *R. solanacearum*

### 2.6.1 Obtención del extracto bacteriano y tratamientos derivados

Para la preparación del Extracto Bacteriano (EB) se activó la cepa de *B. amyloquefaciens* EA-CB0123 en TSA al 50% (48 horas a 30°C). Posteriormente, se adicionó a un Erlenmeyer de 1,000 mL un preinóculo de 20 mL de 12 h de crecimiento a 180 mL del medio MOLP y se agitó a 140 rpm por 5 días a 30°C.

La separación de células y caldo de cultivo fue realizado mediante centrifugación (4,500 rpm por 15 min a 4°C), con el fin de obtener el sobrenadante, al cual se le realizó una precipitación ácida con HCl (2N) hasta alcanzar un pH de 2 y una posterior sedimentación durante 24 h a 4°C. Luego se centrifugó dicha solución ácida (4,500 rpm por 15 min a 4°C) donde el pellet fue resuspendido en la mitad del volumen inicial con ADE restituyendo el pH a 7 con NaOH (2N) y el sobrenadante se descartó (Ohno *et al.*, 1992). Finalmente, las células antes separadas y resuspendidas en mitad del volumen inicial con ADE, se adicionaron a la solución con el pellet de la precipitación ácida, formando así el EB (pH 6.95) a una concentración final de  $1.8 \times 10^9$  UFC/mL.

Adicionalmente se prepararon otros tratamientos para su posterior evaluación:

T1: antibiótico gentamicina. Se preparó una solución de gentamicina (Genfar ®) en ADE a una concentración final de 1 mg/Kg suelo.

T2: EB (antes descrito).

T3: Células de la bacteria EA-CB0123. Células de la bacteria EA-CB0123 obtenidas en medio MOLP y resuspendidas en agua. Para la obtención de dicho tratamiento se realizó un cultivo de la bacteria EA-CB0123 en medio de cultivo MOLP durante 5 días a 140 rpm y 30°C. Posteriormente, el cultivo se centrifugó (4,500 rpm por 15 minutos a 4°C) y el pellet resultante se resuspendió en el mismo volumen inicial, logrando una concentración final de  $1.8 \times 10^9$  UFC/mL.

T4: Fermentación de EA-CB0123. Se realizó el mismo procedimiento de cultivo de la bacteria EA-CB0123 en medio MOLP durante 5 días, no obstante no se realizó separación de las bacterias del sobrenadante, obteniendo una concentración final de bacterias de  $1.8 \times 10^9$  UFC/mL.

T5: SLC (Sobrenadante Libre de Células). La fermentación de EA-CB0123 obtenida en medio MOLP durante 5 días se centrifugó (4500 rpm por 15 minutos a 4°C) y el sobrenadante se filtró con una membrana de acetato de celulosa (0.45  $\mu$ m, Sartorius Biolab®) obteniendo así el SLC.

### **2.6.2 Evaluación del extracto bacteriano a nivel de microcosmos**

Para evaluar el efecto antagonista del EB y los demás tratamientos derivados en una matriz con sustrato sólido (sustrato de germinación Tierra Negra®), se realizó un montaje de microcosmos simulando condiciones de campo (temperatura de 30°C, luminosidad de 13 horas luz y una humedad relativa del suelo entre el 60-80% de la máxima capacidad de retención de humedad - MCRH), en donde se tomaron 50 g de suelo esterilizado previamente por 3 veces a 121°C y 15 psig y se inocularon con una solución de la bacteria AW1 a una concentración inicial de  $10^5$  UFC/g suelo.

La concentración de AW1 en el tiempo se determinó por diluciones seriadas y plateo por superficie en medio BGTA. Para ello se adicionó 1 g de suelo en 9 mL de ADE y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$ . Diferentes diluciones fueron sembradas (100  $\mu$ L) por superficie en medio BGTA suplementado con ácido nalidíxico (solución de NaOH 0.1 M pH 12.5 estéril con ácido nalidíxico 5 mg/mL) y fueron incubadas a 30°C por 2 días, donde se determinaron las UFC/g suelo en cada uno de los tratamientos.

**Tabla 2-1** Tratamientos para la evaluación del efecto antagonista con *R. solanacearum* en microcosmos de suelo

| <i>Tratamiento</i> | <i>Aplicación</i>                              | <i>Especificaciones</i>   |
|--------------------|--|---|
| CAB                | Control absoluto<br>Aplicación de ADE (2.5 mL) | Concentración inicial de <i>R. solanacearum</i> AW1 de $10^5$ UFC/g suelo.            |
| T1                 | Gentamicina (1 mg/Kg suelo)                    | Aplicación de 2.5 mL a una concentración de 1 mg/Kg suelo.                            |
| T2                 | EB ( $1.8 \times 10^9$ UFC/mL)                 | Aplicación de 2.5 mL a una concentración de $1.8 \times 10^9$ UFC/mL y 85 ppm.        |
| T3                 | Células de la bacteria EA-CB0123               | Concentración $1.8 \times 10^9$ UFC/mL.   |
| T4                 | Fermentación de EA-CB0123 en MOLP              | Fermentación de 5 días en medio MOLP a una concentración de $1.8 \times 10^9$ UFC/mL. |
| T5                 | Sobrenadante Libre de Células (SLC)            | Sobrenadante resultante de la filtración del sobrenadante de la fermentación.         |

Los tratamientos evaluados en esta metodología se adicionaron al mismo tiempo que el inóculo de la bacteria fitopatógena, con aplicaciones adicionales de 2.5 mL cada 15 días; además se tomaron muestras de suelo en los tiempos 0, 10, 20, 30 y 60 DPI, para monitorear las poblaciones de *R. solanacearum*. Se emplearon 3 repeticiones por unidad experimental. Como control absoluto se utilizó la bacteria *R. solanacearum* AW1 y se realizó el análisis estadístico por la prueba de Duncan tomando como variable de respuesta la concentración de AW1 (UFC/g suelo) en el tiempo, con un análisis de varianza (ANOVA) y un nivel de confianza del 95%, utilizando el software Statgraphics Centurion XV®.

### 2.6.3 Evaluación del extracto bacteriano a nivel de invernadero

Para determinar el efecto del EB en la reducción del inóculo de *R. solanacearum*, se tomaron plantas de banano cv. Williams de 6 a 8 semanas de edad sembradas en 3 Kg de sustrato de germinación Tierra Negra® y se infectaron con un inóculo de *R. solanacearum* EAP009 a una concentración de  $10^8$  UFC/mL por medio del corte de raíces con una herramienta impregnada del inóculo. Transcurridos 15 días posteriores a la infección (DPI), tiempo en el cual se observaron las plantas infectadas, se causó la muerte de la mismas con la inyección de 15 mL de glifosato al 20% al pseudotallo de cada planta. Una vez muertas las plantas (30 DPI), se aplicaron los diferentes tratamientos a cada sustrato contaminado con *R. solanacearum* (Tabla 2-2) adicionando 150 mL del tratamiento y realizando una homogenización del suelo. Durante todo el ensayo el suelo se mantuvo al 60% de su MCRH.

**Tabla 2-2** Tratamientos para la evaluación de la disminución del tiempo de cuarentena de suelos contaminados con *R. solanacearum* a nivel de invernadero

| <i>Tratamiento</i> | <i>Aplicación</i>   | <i>Especificaciones</i>                 |
|--------------------|---|---|
| C (agua)           | Aplicación de ADE   | Tratamiento sin patógeno                |
| CAB                | Aplicación de ADE   | Tratamiento con aplicación del patógeno |
| EB                 | EB ( $1.8 \times 10^9$ UFC/mL bacterial y 85 ppm de compuestos activos) | Tratamiento con aplicación del patógeno |

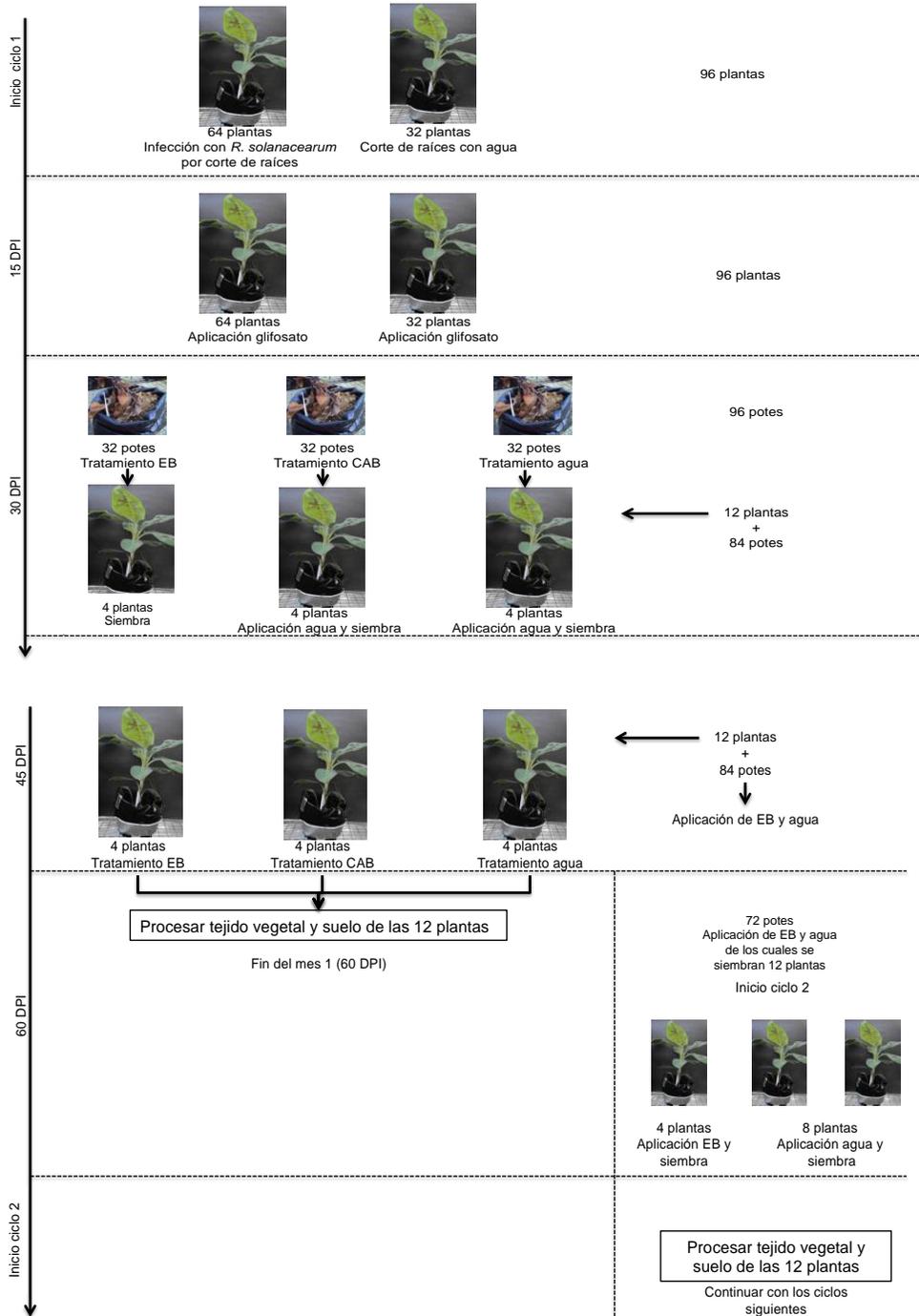
Para este ensayo se tuvieron 8 divisiones pertenecientes a 8 meses de evaluación de los tratamientos; en cada una de las divisiones se dispusieron los tres tratamientos a evaluar. Los tratamientos estuvieron representados por 4 unidades experimentales por cada mes de evaluación para un total de 96 unidades en todo el experimento, que consistían en potes con sustrato de germinación. Cada mes se sembraron 12 plantas de banano, pertenecientes a cada uno de los tratamientos (3 tratamientos por 4 plantas) (Figura 2-2); adicionalmente cada 15 días se aplicaron los tratamientos en los suelos con tejido en descomposición.

La efectividad del extracto y la supervivencia de *R. solanacearum* se determinaron mediante la incidencia de la enfermedad (presencia/ausencia de síntomas), días hasta la aparición de los síntomas en plantas de banano (sembradas cada mes durante 4 meses); así como por la detección de la bacteria por pruebas microbiológicas al suelo y a los tejidos, descrito en el numeral 2.5. Como control se usó el tratamiento C (agua), el cual no tenía presencia del patógeno en el suelo y como control absoluto (CAB) se usó el tratamiento de suelo contaminado con el fitopatógeno EAP009.

## **2.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento, pruebas de inhibición, desarrollo de la enfermedad en plantas de banano y concentración de *R. solanacearum* en suelos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Para la verificación de los supuestos se analizó la normalidad por medio del valor-P de Shapiro-Wilks y los supuestos de igualdad de varianzas por medio del test de Bartlett. La diferencia entre las medias de los tratamientos fue evaluada con un análisis de rangos múltiples por medio de la prueba de LSD para todas las pruebas y Duncan en la prueba de evaluación de EB a nivel de microcosmos, con el software Statgraphics Centurion XV®.

**Figura 2-2** Esquema del proceso de aplicación de los tratamientos y sembrado de plantas de banano en suelos contaminados con *R. solanacearum* a nivel de invernadero. DPI (Días posteriores a la infección), EB (Extracto bacteriano), CAB (Control absoluto).





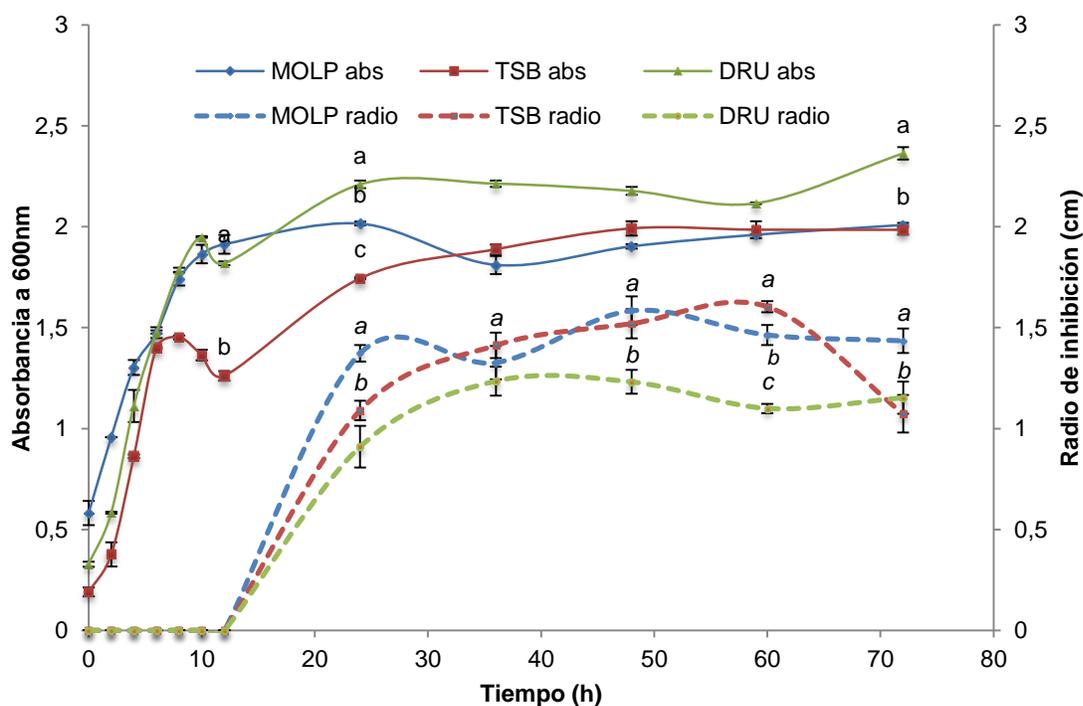
## Capítulo 3: Resultados

### 3.1 Cinética de crecimiento y evaluación de actividad de los extractos de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123

Para determinar un medio de cultivo con las mejores propiedades de crecimiento de la bacteria (biomasa) y mayor producción de metabolitos con actividad contra *R. solanacearum*, la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 fue evaluada en diferentes medios de cultivo líquidos (MOLP, TSB y DRU). La absorbancia y la actividad inhibitoria contra el patógeno (Figura 3-1) fue determinada por un periodo de 72 horas en cada medio evaluado.

La cinética de crecimiento de la cepa EA-CB0123 en los tres medios de cultivo presentaron una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente 12 horas, seguidas de una fase de desaceleración que alcanzó las 24 horas aproximadamente y finalmente una fase estacionaria hasta las 72 horas de cultivo. Al determinar la velocidad específica de crecimiento del microorganismo en cada medio de cultivo, se evidenció que éste crece más rápidamente en medio TSB ( $0.34 \text{ horas}^{-1}$ ), posteriormente en medio DRU ( $0.18 \text{ horas}^{-1}$ ) y finalmente en medio MOLP ( $0.11 \text{ horas}^{-1}$ ) durante la fase exponencial. No obstante, la biomasa obtenida en el medio DRU en la fase estacionaria (desde 24 a 72 horas) difiere de los otros medios de cultivo evaluados con diferencias estadísticamente significativas en todos estos tiempos, obteniendo una biomasa total en términos de densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 2.36, a diferencia de 2.01 y 1.99, para los medios MOLP y TSB, respectivamente, a las 72 horas. Sin embargo, las concentraciones celulares en UFC/mL difirieron de los resultados de la  $DO_{600}$ , ya que se obtuvieron concentraciones de  $1.8 \times 10^9$  UFC/mL,  $1.6 \times 10^9$  UFC/mL y  $1.1 \times 10^9$  UFC/mL en los medios MOLP, DRU y TSB, respectivamente.

**Figura 3-1** Cinética de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 y radio de inhibición de los SLC en MOLP, TSB y DRU. Los medios evaluados fueron MOLP (azul), TSB (rojo) y DRU (verde). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de absorbancia para cada medio en los tiempos 12, 24 y 72 horas y radio de inhibición en los tiempos de 24 a 72 horas (letras en cursiva) (valor  $P < 0.05$ ), mediante la prueba LSD. Las barras verticales denotan el error estándar en cada uno de los tiempos evaluados, con  $n = 4$  para la absorbancia y  $n = 8$  para el radio de inhibición.



Adicionalmente se obtuvo un comportamiento diferente en las curvas entre la bacteria y los diferentes medios de cultivo con respecto a la actividad inhibitoria de los SLC contra el patógeno *R. solanacearum* EAP099, observando halos de inhibición desde las 24 hasta las 72 horas de crecimiento bacteriana, con resultados de 1.4, 1.0 y 1.1 cm a las 72 horas en los medios MOLP, TSB y DRU, respectivamente (Anexo 2). Sin embargo, antes de estos tiempos no se obtuvo actividad evidente en las pruebas realizadas.

Estos resultados sugieren que la fermentación de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en el medio de cultivo MOLP se producen sustancias que inhiben el crecimiento de *R. solanacearum* EAP099 a nivel *in vitro*, en mayor proporción que los otros medios de

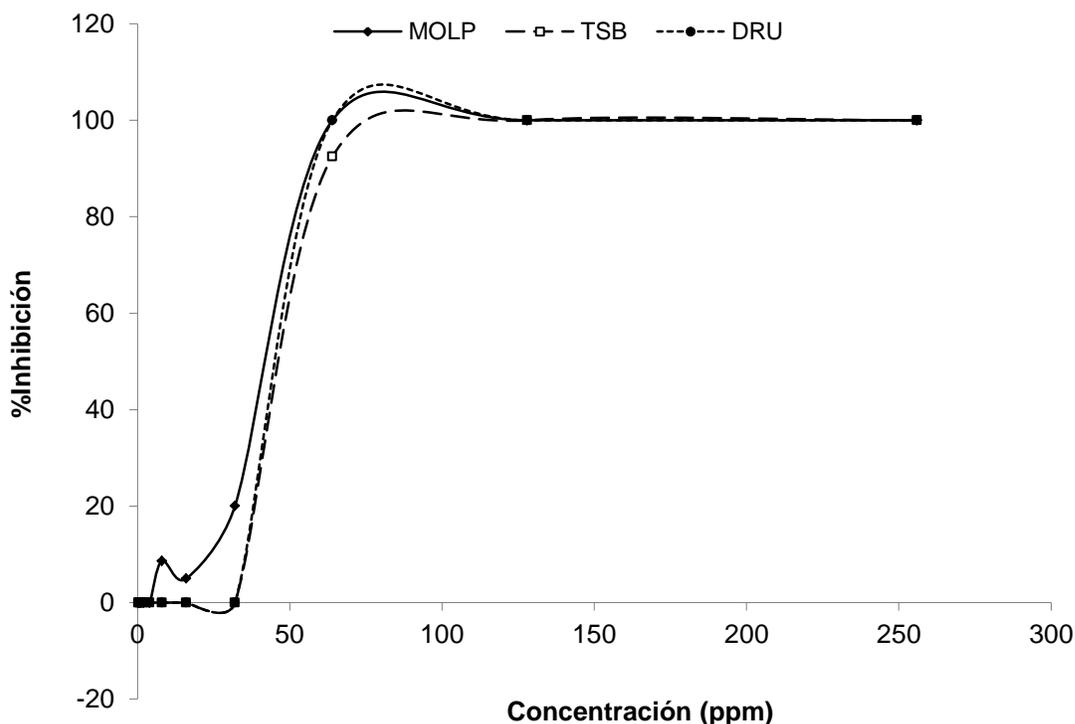
cultivo evaluados. Adicionalmente los resultados de actividad del SLC indican que los metabolitos activos producidos están parcialmente ligados el crecimiento celular, ya que la actividad aumenta al finalizar la fase exponencial.

### 3.2 Concentración mínima inhibitoria

Los compuestos metanólicos obtenidos del cultivo de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en diferentes medios de cultivo, fueron preparados en rangos de concentraciones entre 256 y 0.25 ppm con la metodología de microdilución. Según los datos obtenidos de absorbancia se calcularon los porcentajes de inhibición de cada uno de los tratamientos contra *R. solanacearum* EAP009 y se obtuvo la CMI para los medios MOLP, TSB y DRU. Los resultados mostraron que para los medios MOLP y DRU la CMI fue de  $64 \pm 0.02$  ppm ( $IC_{50}$  de 32 ppm), mientras que para el medio TSB fue de  $128 \pm 0.02$  ppm ( $IC_{50}$  de 64 ppm) a nivel *in vitro*. A las concentraciones más altas que la CMI, los compuestos metanólicos generaron la misma acción inhibitoria del patógeno del 100%, para todos los tratamientos evaluados, como se observa en la Figura 3-2.

Adicionalmente se realizaron las mediciones del rendimiento del extracto total de la fermentación de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 obtenido de la extracción de la Amberlita en cada uno de los medios de cultivo evaluados, obteniendo valores de 1.53, 1.00 y 0.58 g/L, para los medios MOLP, DRU y TSB, respectivamente.

**Figura 3-2** Porcentaje de inhibición de *R. solanacearum* EAP009 a partir de extractos metanólicos de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 producidos en MOLP, TSB y DRU a nivel *in vitro*. Los medios evaluados fueron MOLP (♦), TSB (□) y DRU (•).



### 3.3 Aislamiento y caracterización de cepas de *R. solanacearum*

El aislamiento realizado a partir de tejido y suelo de plantas infectadas en la zona del Urabá Antioqueño, permitió establecer una colección de cuatro bacterias (cuatro aislamientos) pertenecientes a *R. solanacearum*, que fueron identificadas por características morfológicas y moleculares (datos no mostrados). Igualmente, estos aislados compartieron similitudes con respecto a su morfología irregular, borde redondeado, elevación convexa, consistencia mucosa y color beige en los bordes cuando fueron evaluadas en el medio de cultivo TSA al 10% enriquecido con sacarosa y TZC. En el medio se logró observar que las colonias difieren en la coloración que se produce posiblemente por la transformación de la sal de tetrazolium (TZC) a formazán, las cuales presentaron una pigmentación rojiza y cambios en la tonalidad del color, dependiendo de

la cepa: rojo intenso, medios y rosadas (Tabla 3-1). Además, se pudo observar que el tiempo de aparición de las colonias de las diferentes cepas de *R. solanacearum* en el medio de cultivo sólido también difería entre aislados, apareciendo desde 3 a 4 días. También, se realizó la medición del tamaño de los bacilos de cada uno de los aislados y se obtuvo que la cepa EAP011 fue la de mayor tamaño bacilar con  $1.33 \pm 0.07 \mu\text{m}$ , en comparación con las demás cepas, incluyendo el control EAP009. Finalmente, se realizaron algunas pruebas microbiológicas de KOH y tinción de Gram para verificar que las bacterias aisladas eran Gram negativas, para lo cual todas fueron positivas.

Los aislados fueron registrados en el cepario de la Universidad EAFIT como EAP011, EAP012, EAP013 y EAP014 y siempre se realizaron las comparaciones con la bacteria control EAP009.

**Tabla 3-1** Origen, morfología y tamaño de los aislados de *R. solanacearum*. <sup>a</sup>Localización de las fincas ubicadas en la zona de Urabá a partir de las cuales se realizaron los aislamientos de *R. solanacearum*. <sup>b</sup> Muestra enviada de plantas de banano enfermas para el aislamiento. <sup>c</sup>Morfología de los aislados en medio de cultivo sólido TSA al 10% con sacarosa y TZC, a las 4 días de incubación a una temperatura de 30°C. <sup>d</sup>Tamaño del bacilo ( $\mu\text{m}$ ) y su desviación estándar.

| <b>Localización<sup>a</sup></b>        | <b>Muestra<sup>b</sup></b> | <b>Código</b> | <b>Tiempo aparición (días)</b> | <b>Morfología<sup>c</sup></b>   | <b>Tamaño bacilo (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>d</sup></b> |
|--|----------------------------|---------------|--------------------------------|---|---|
| Urabá, Apartadó                        | Suelo                      | EAP011        | 3                              |  | $1.33 \pm 0.07$   |
| Urabá, Municipio de Carepa, Santa Cruz | Tejido-Yema                | EAP012        | 4                              |  | $0.78 \pm 0.03$   |
| Caribana, Urabá                        | Suelo                      | EAP013        | 4                              |  | $0.98 \pm 0.06$   |
| Urabá                                  | Tejido-Cormo               | EAP014        | 3                              |  | $0.87 \pm 0.03$   |

### 3.3.1 Pruebas de patogenicidad de *R. solanacearum* en plantas de banano

Las dos metodologías evaluadas por cortes de raíces e inyección al pseudotallo fueron efectivas para la infección de las plantas de banano con *R. solanacearum* (datos no mostrados). Sin embargo con la técnica de corte de raíces fue más efectiva para generar los síntomas de la infección en un tiempo menor (11 días posteriores a la infección o DPI) que con la técnica de inyección (15 DPI). La sintomatología de las plantas infectadas fue similar entre sí, presentándose marchitamiento y clorosis en las hojas en los primeros días de inoculación y finalmente la muerte de la planta. La técnica de infección estandarizada y seleccionada para las pruebas de patogenicidad y la creación del foco de infección artificial (FIA) fue por cortes de raíces con una herramienta impregnada del inóculo de la bacteria fitopatógena.

Para evaluar la capacidad de infección de los cuatro aislados se tomaron plantas de banano y se crearon los FIA en cada una de éstas, para posteriormente registrar en el tiempo los síntomas de marchitez y clorosis. Para el síntoma de marchitez en las hojas de banano se obtuvo (Figura 3-3A) que en el día 10 DPI los tratamientos obtuvieron porcentajes de marchitamiento de 70, 1, 52, 70 y 38% para las cepas EAP009, EAP011, EAP012, EAP013 y EAP014, respectivamente; y en el tiempo final 18 DPI de la evaluación, el 100% del total de las hojas de todas las plantas mostraron marchitez. También las ABCDE con respecto al porcentaje de marchitez son similares para todos los tratamientos evaluados, ya que no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3-2).

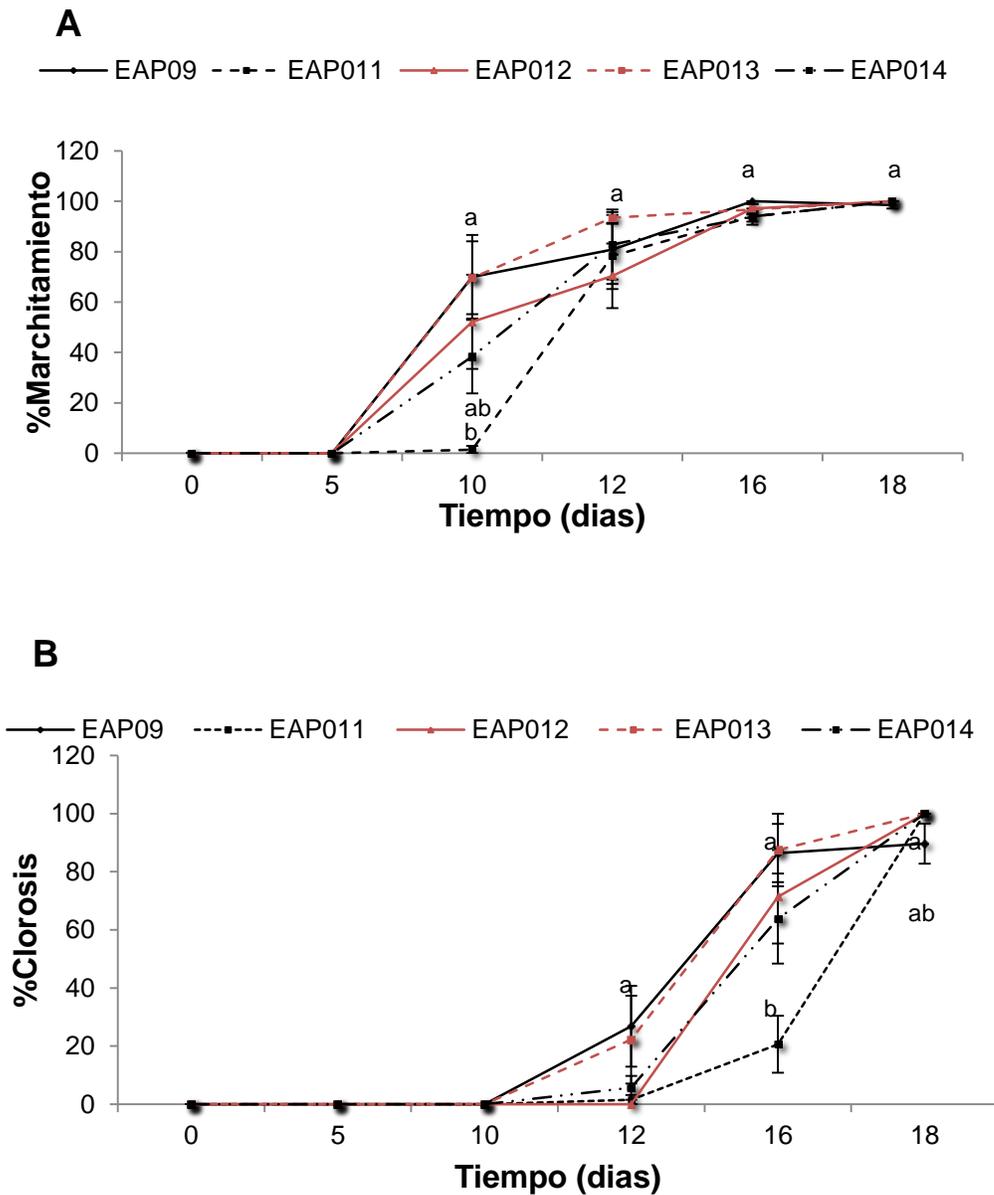
Con respecto a la clorosis (Figura 3-3B), se obtuvo que después de los 12 DPI las hojas comenzaron a presentar dicho síntoma, acentuándose en los aislados EAP013 (22%) y EAP009 (27%), y en un menor porcentaje en el aislado EAP011 (2%), respecto al control establecido (EAP009). El comportamiento de infección con relación al porcentaje de hojas con clorosis de los aislados EAP013 y EAP009 son similares con una ABCDE de 434.1 y 440.7, respectivamente (Tabla 3-2), mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás tratamientos. Al terminar el tiempo de evaluación (18 DPI) se obtiene que el 100% del total de las hojas de las plantas infectadas presentaron clorosis (Figura 3-4).

---

Para las dos sintomatologías registradas en los ensayos de FIA (%Marchitez y %Clorosis), se obtuvo que el tratamiento control con ADE no presentó ninguno de estos síntomas de enfermedad.

El comportamiento del aislado EAP013 fue diferente al de los demás aislados evaluados, ya que 12 DPI, la mayoría de las hojas de las plantas presentaban marchitez y clorosis; por lo anterior se confirma que ésta bacteria presenta sintomatología similar al microorganismo control EAP009 y podría tomarse para posteriores evaluaciones de virulencia e infección. Adicionalmente se encontró que no había una relación entre la morfología (coloración de las colonias), tamaño de los microorganismos y su patogenicidad en plantas de banano.

**Figura 3-3** Comportamiento del desarrollo de los síntomas de la enfermedad del Moko causada por *R. solanacearum* en el tiempo en plantas de banano cv. Williams. **A.** Porcentaje de marchitez y **B.** Porcentaje de clorosis en hojas de plantas de banano infectadas con diferentes aislados de *R. solanacearum*. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas de los valores de %Marchitez y %Clorosis en cada uno de los tiempos (valor  $P < 0.05$ ), mediante la prueba LSD. Las barras verticales son los errores estándar en cada uno de los tiempos evaluados, con  $n = 7$ .



**Tabla 3-2** ABCDE de las sintomatologías de las plantas causadas por los aislados *R. solanacearum*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ABCDE para cada síntoma y aislado de *R. solanacearum* (valor  $P_{\text{clorosis}} = 0.008$  y valor  $P_{\text{marchitez}} = 0.600$ ), mediante la prueba LSD, con  $n = 7$ . \*No hay diferencias significativas para este síntoma y los tratamientos.

| <i>Tratamiento</i> | <i>ABCDE</i>    |                   |
|--------------------|-----------------|-------------------|
|                    | <i>Clorosis</i> | <i>Marchitez*</i> |
| EAP009             | 440.7 (a)       | 719.3             |
| EAP011             | 121.7 (b)       | 658.5             |
| EAP012             | 298.5 (ab)      | 663.3             |
| EAP013             | 434.1 (a)       | 750.0             |
| EAP014             | 290.7 (ab)      | 689.4             |

**Figura 3-4** Plantas de banano infectadas con diferentes aislados de *R. solanacearum* en invernadero. Las plantas infectadas mostradas tienen 18 DPI.

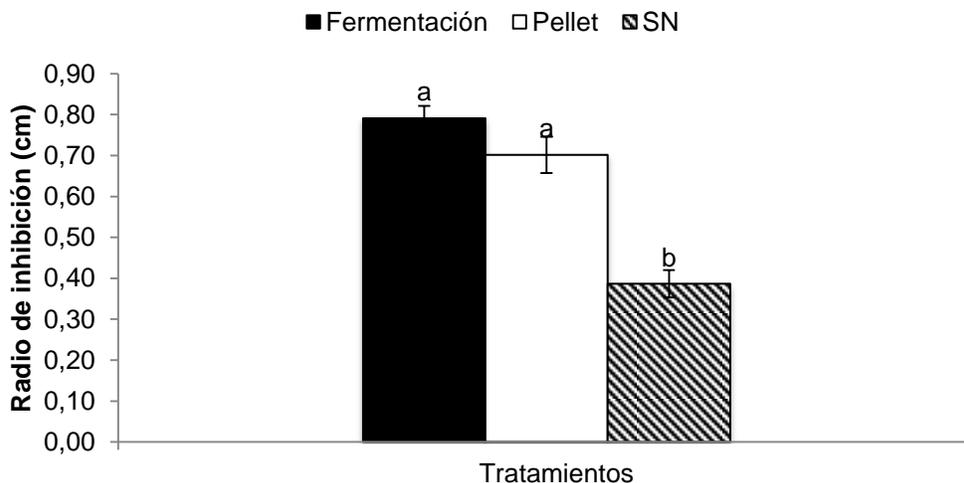


Finalmente, se siguieron los postulados de Koch, con el fin de verificar que los síntomas de las plantas y la muerte hubiesen sido producidos por los aislados antes introducidos en el sistema de FIA. En todos los tratamientos se confirmó la presencia del fitopatógeno por las pruebas microbiológicas (Anexo 3).

### 3.4 Obtención del extracto bacteriano

Para el desarrollo del EB se realizó la precipitación ácida del sobrenadante, posterior a la fermentación de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en medio MOLP (72 horas). En este ensayo se evaluó el efecto inhibitorio por parte de la fermentación completa, el pellet precipitado resuspendido en agua con el mismo volumen de la fermentación y el sobrenadante libre de células resultante de la separación (Figura 3-5). Los resultados mostraron diferencias significativas de los tratamientos de fermentación (0.79 cm) y pellet del precipitado (0.7 cm), con respecto al sobrenadante (0.39 cm), confirmando que la mayoría de la actividad inhibitoria se queda en el precipitado ácido y solo una parte en el sobrenadante resultante de la separación.

**Figura 3-5** Radio de inhibición de *R. solanacearum* EAP009 a nivel *in vitro* producidos por diferentes tratamientos derivados de la obtención del EB. Los tratamientos utilizados fueron fermentación de la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en medio MOLP por 72 horas (negro), Pellet resultante de la precipitación ácida del sobrenadante (blanco) y SN sobrenadante libre de células después de la precipitación ácida (rayas). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas de los valores de radio de inhibición (cm) en cada uno de los tratamientos (valor  $P < 0.05 \times 10^{-6}$ ), mediante la prueba LSD. Las barras verticales son los errores estándar con cada tratamiento evaluado, con  $n = 9$ .



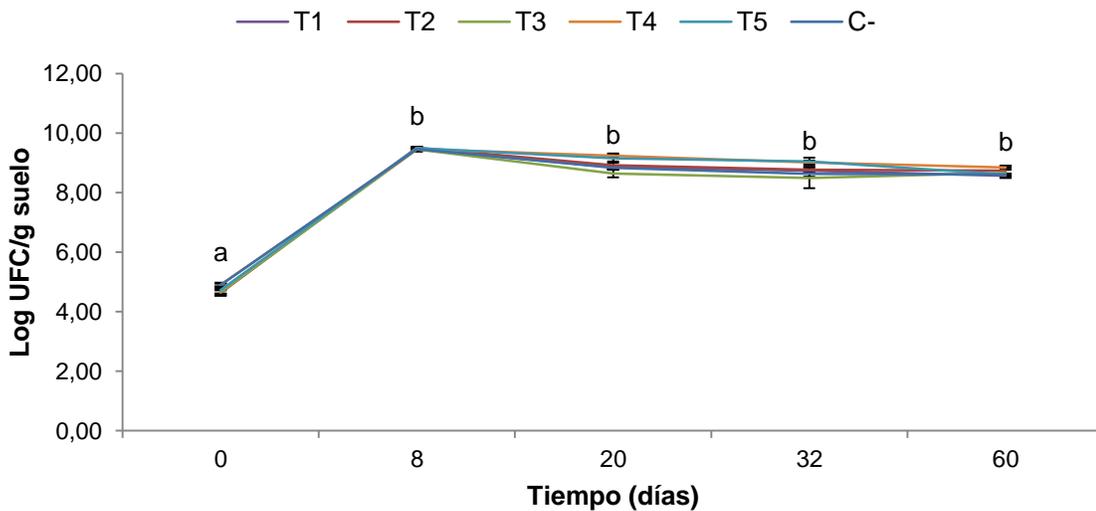
### 3.5 Evaluación del EB en suelos contaminados con *R. solanacearum*

El extracto bacteriano (EB) fue evaluado en suelos contaminados con *R. solanacearum* a nivel de microcosmos e invernadero.

#### 3.5.1 Evaluación a nivel de microcosmos

Para evaluar el efecto de los EB y sus derivados sobre la supervivencia de *R. solanacearum* en microcosmos, se utilizó un sustrato de germinación Tierra Negra®. En estos a análisis a nivel de microcosmos, el sustrato fue inoculado con la cepa AW1, la cual es resistente al ácido nalidíxico, con el fin de realizar un aislamiento selectivo en el suelo. Para estas pruebas se tomaron muestras a los 0, 10, 20, 30 y 60 DPI, realizando el conteo de UFC/g de suelo evaluado (Figura 3-6).

**Figura 3-6** Efecto del EB y otros derivados obtenidos del cultivo de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g suelo) de *R. solanacearum* AW1 en el tiempo en microcosmos. Los tratamientos utilizados fueron: T1 gentamicina, T2 EB, T3 células de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123, T4 fermentación de EA-CB0123, T5 SLC y C- control negativo. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas de los valores de concentración de AW1 en cada uno de los tratamientos (valor  $P_{\text{tiempo } 0d} = 0.9563$ , valor  $P_{\text{tiempo } 8, 20, 32 \text{ y } 60d} = 0.8017$ ), mediante la prueba Duncan. Las barras verticales son los errores estándar con cada tratamiento evaluado, con  $n = 3$ .

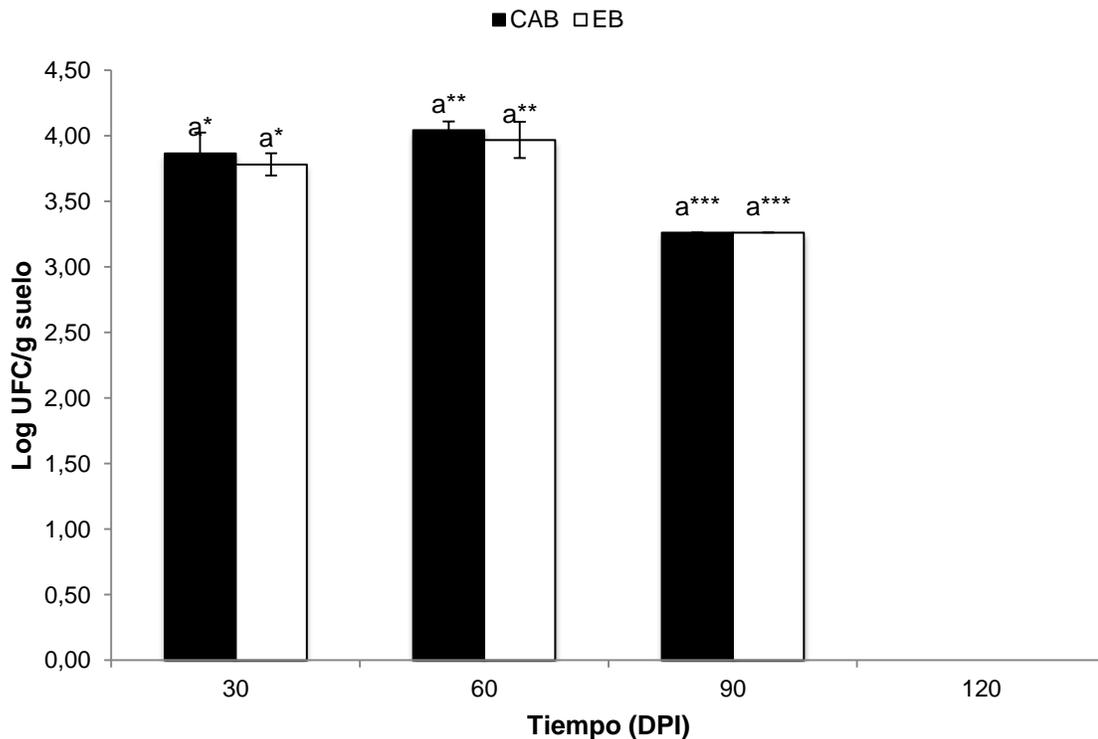


En el tiempo 0 DPI se inició con una concentración de *R. solanacearum* AW1 aproximadamente de  $1.00 \times 10^5$  UFC/g suelo para todos los tratamientos evaluados (sin diferencias estadísticamente significativas). Seguidamente en los tiempos de 10, 20, 30 y 60 DPI la concentración de AW1 aumentó llegando a valores máximos en el tiempo 10 DPI de  $3.2 \times 10^9$  UFC/g suelo aproximadamente y de allí en adelante la concentración de la bacteria fitopatógena se mantuvo constante con unos valores promedio entre todos los tratamientos de  $8.01 \times 10^8$  UFC/g suelo. Para el análisis estadístico de esta prueba se utilizó la prueba de Duncan para las concentraciones de *R. solanacearum* AW1 en cada uno de los tiempos y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, sugiriendo que en el sistema evaluado no hubo efecto del EB y tratamientos derivados, debido posiblemente a que las concentraciones utilizadas no fueron las apropiadas para generar un efecto de inhibición. Adicionalmente se evaluaron las ABCDE (datos no mostrados), no obstante no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en ellas.

### **3.5.2 Evaluación a nivel de invernadero**

Para evaluar el EB en los suelos contaminados con *R. solanacearum* EAP009, se infectaron plantas de banano mediante el corte de raíces, a las cuales 15 DPI se les aplicó glifosato (al 20% 15 mL a cada planta) y 15 días después de esto (30 DPI) se comenzó con la aplicación de los extractos. Se tomaron muestras de suelo y tejido vegetal cada mes y se obtuvieron datos de las bacterias totales y *R. solanacearum*. Además se realizó un seguimiento del progreso de la enfermedad en las plantas de banano (datos no mostrados). En la Figura 3-7 y Figura 3-8 se muestran las concentraciones de *R. solanacearum* EAP009 en los meses evaluados en suelo y tejido, respectivamente.

**Figura 3-7** Efecto del EB obtenido del cultivo de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g suelo seco) de *R. solanacearum* EAP009 en suelo de los tratamientos CAB, EB y Agua, en el tiempo. Los tratamientos fueron CAB (control absoluto) en negro, EB (extracto bacteriano) en blanco y el tratamiento Agua no se muestra, ya que no hay concentración de *R. solanacearum* EAP009. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de concentración de *R. solanacearum* (log UFC/g suelo seco). \*Tiempo 30 DPI, \*\*Tiempo 60 DPI y \*\*\*Tiempo 90 DPI (valor  $P_{30 \text{ DPI}} = 0.1159$ , valor  $P_{60 \text{ DPI}} = 0.3013$  y valor  $P_{90 \text{ DPI}} = 0.7595$ ), mediante la prueba de LSD. Las barras verticales son los errores estándar en cada uno de los tiempos evaluados, con  $n = 4$ .

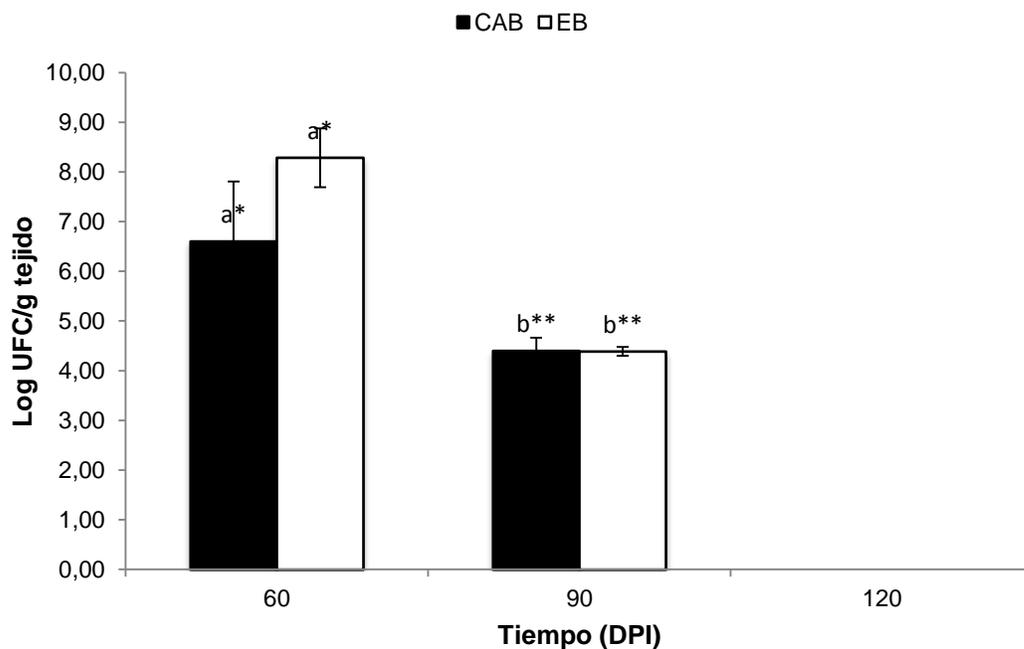


Las mediciones del suelo en este ensayo se comenzaron 30 DPI, fecha programada para iniciar la siembra de las plantas de banano y verificar la concentración de *R. solanacearum* en el suelo. Seguidamente, se continuó con el muestreo de suelo mensualmente.

Como se observa en la Figura 3-7, la concentración de *R. solanacearum* EAP009 en el suelo de los tratamientos CAB y EB en invernadero, tuvieron una concentración similar ( $9.35 \times 10^2$  UFC/g suelo seco, en promedio) en los tiempos 30 y 60 DPI, sin diferencias significativas. Sin embargo, hacia 90 DPI de evaluación, la concentración de *R. solanacearum* disminuyó en los dos tratamientos alcanzando una concentración de 9.12

x  $10^1$  UFC/g suelo seco y finalmente hacia 120 DPI y en los siguientes meses (datos no mostrados), la concentración de la bacteria fitopatógena no fue detectable en el suelo. Adicionalmente, en el tiempo 90 DPI, no se evidenciaron síntomas de la enfermedad en las plantas de banano, aun así se procesaron las muestras de suelo y se evidenció presencia de la bacteria EAP009.

**Figura 3-8** Efecto del EB obtenido del cultivo de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g tejido) de *R. solanacearum* EAP009 en tejido de banano en diferentes tratamientos. Los tratamientos fueron CAB (control absoluto) en negro, EB (extracto bacteriano) en blanco y el tratamiento Agua no se muestra, ya que no hay concentración de *R. solanacearum* EAP009, en el tiempo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de concentración de *R. solanacearum* (log UFC/g tejido). \*Tiempo 60 DPI y \*\*Tiempo 90 DPI (valor  $P_{60 \text{ DPI}} = 0.5866$  y valor  $P_{90 \text{ DPI}} = 0.1529$ ), mediante la prueba de LSD. Las barras verticales son los errores estándar en cada uno de los tiempos evaluados, con  $n = 4$ .



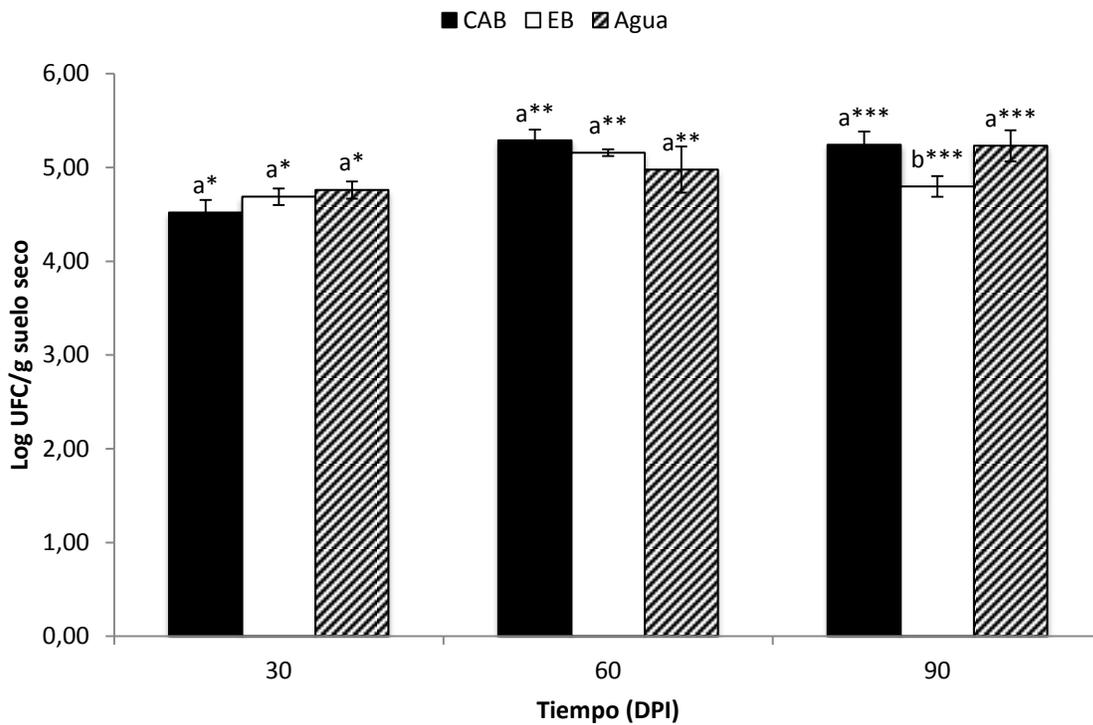
Las mediciones de tejido de las plantas, se comenzaron desde 60 DPI, debido a que el proceso de infección requieren algunos días para iniciar el desarrollo de los síntomas. Por esta razón no hay mediciones en el tiempo 30 DPI. Después de los 60 DPI, se continuó con el muestreo mensualmente.

Al realizar las mediciones de la concentración de *R. solanacearum* EAP009 en el tejido de las plantas de banano, se obtuvo que en 60 DPI no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos, obteniendo valores de  $3.18 \times 10^8$  UFC/g tejido y  $8.29 \times 10^8$  UFC/g tejido, para CAB y EB, respectivamente. Similarmente, hacia los 90 DPI, las concentraciones arrojaron resultados similares entre los dos tratamientos ( $2.75 \times 10^4$  y  $1.25 \times 10^4$  UFC/g tejido, para CAB y EB, respectivamente), sin embargo fueron menores a los del tiempo anterior. Cabe destacar que en 90 DPI, no se observaron sintomatologías en las plantas de banano, como se comentó en los resultados de suelo. Finalmente, hacia el tiempo 120 DPI y en adelante (datos no mostrados), las plantas de banano evaluadas no mostraron síntomas y tampoco se evidencia presencia de la bacteria mediante técnicas microbiológicas.

Los resultados sugieren que a las condiciones evaluadas a nivel de invernadero, el EB no tuvo un efecto significativo sobre la población de *R. solanacearum* EAP009 en suelo ni tejido de la planta. Esto posiblemente se atribuya a bajas concentraciones del EB adicionado y a la disminución de *R. solanacearum* en el suelo por otras variables no estudiadas.

Paralelamente, se evaluó la concentración de bacterias totales cultivables en el suelo contaminado con *R. solanacearum* EAP009 y tratado con el EB durante el experimento llevado a cabo en invernadero. Para comprobar el efecto del EB sobre la concentración total de bacterias se tomaron muestras en los tiempos 30, 60, 90 y 120 DPI, las cuales se sembraron en el medio semiselectivo SMSA. Los resultados de esta evaluación muestran un comportamiento similar en todos los tiempos, con valores aproximados de  $1.07 \times 10^5$ ,  $3.89 \times 10^4$  y  $3.81 \times 10^4$  UFC/g suelo para los tratamientos CAB, EB y Agua, respectivamente (Figura 3-9), exceptuando para los 90 DPI que se obtuvieron resultados variables en los tratamientos de EB y Agua. Esto sugiere que la concentración bacteriana total cultivable se mantuvo estable durante el tiempo de evaluación mostrado, independiente del EB adicionado en el medio evaluado.

**Figura 3-9** Efecto del EB obtenido del cultivo de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 sobre la concentración (Log UFC/g suelo seco) de bacterias totales cultivables en suelo de los diferentes tratamientos. Los tratamientos evaluados fueron CAB (control absoluto) en negro, EB (extracto bacteriano) en blanco y Agua en rayas, en el tiempo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores de concentración de bacterias totales cultivables (log UFC/g tejido). \*Tiempo 30 DPI, \*\*Tiempo 60 DPI y \*\*\*Tiempo 90 DPI. (valor  $P_{30 \text{ DPI}} = 0.3081$ , valor  $P_{60 \text{ DPI}} = 0.4146$ , valor  $P_{90 \text{ DPI}} = 0.0872$ ), mediante la prueba de LSD. Las barras verticales son los errores estándar en cada uno de los tiempos evaluados, con  $n = 4$ .



## Discusión

El género *Bacillus* ha sido reconocido por ser uno de los principales ACB (Agentes de Control Biológico) en el área agroindustrial, gracias a sus propiedades de producción de metabolitos secundarios antagonistas de algunos fitopatógenos y a la formación de endosporas, lo cual las hace interesantes en la investigación y comercialización de bioinsumos. Se conoce también que las bacterias pertenecientes a *B. amyloliquefaciens* usan cerca del 8.5% de su genoma en la síntesis de metabolitos secundarios, como los lipopéptidos (LPs), los cuales han demostrado ser activos contra un rango amplio de fitopatógenos a nivel *in vitro* e *in vivo*. Dentro de estos fitopatógenos se encuentra la bacteria *R. solanacearum*, la cual es un microorganismo agente causal de la marchitez bacteriana en un gran espectro de especies de plantas a nivel mundial, incluidos el banano y plátano.

En este trabajo se realizó el aislamiento de diferentes cepas de *R. solanacearum* provenientes de tejidos y suelos infectados de banano y se determinó su capacidad de infección en dicha planta. Paralelamente, se evaluó la producción del agente controlador biológico por parte de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en diferentes medios de cultivo con el fin de determinar en cuál de ellos se lograba la mayor producción de biomasa y actividad antimicrobiana. Una vez establecida la cepa más virulenta de *R. solanacearum* y el medio de cultivo más apropiado para la producción del ACB, se procedió a realizar las evaluaciones en microcosmos e invernadero con el fin de determinar si el extracto bacteriano (EB) obtenido de la fermentación de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 lograba reducir los tiempos de cuarentena ocasionados por la presencia de *R. solanacearum* en el suelo.

Inicialmente, se realizaron aislamientos de suelo contaminado y tejido infectado con la bacteria fitopatógena, provenientes del Urabá Antioqueño, con el fin de obtener una colección de bacterias perteneciente a *R. solanacearum*. De estos aislamientos se

obtuvieron 4 cepas (Tabla 3-1) con morfología similar a la cepa control *R. solanacearum* EAP009 (Ramírez, 2012). A cada una de estas bacterias se les realizaron algunas pruebas microbiológicas y moleculares, las cuales confirmaron pertenecer a *R. solanacearum*. Las características morfológicas de estos aislados tienen una forma irregular en las colonias, con márgenes lisos y de color blanco, opaco y viscoso, con un centro de color rojizo ocasionado por la sal TZC adicionada al medio de cultivo en el cual se evaluaron las morfologías. Estas características coinciden con las referencias de colonias típicas, en donde existen muy pocas diferencias con respecto al tono rojizo del centro de las colonias y en ser más o menos mucoides (Tans-kersten *et al.*, 2001; Ibrahim *et al.*, 2005; Prior and Fegan, 2005; Chandrashekara *et al.*, 2012).

A la colección de bacterias obtenidas se les realizaron pruebas de patogenicidad y virulencia en plantas de banano a nivel de invernadero, mediante el corte de raíces con una herramienta contaminada con un inóculo de *R. solanacearum*, simulando aberturas que se dan naturalmente en las raíces, la cual es causante del ingreso de la bacteria fitopatógena en las plantas. La realización y determinación de la patogenicidad es un paso importante para el reconocimiento de bacterias fitopatógenas, debido a que existen dificultades para verificar todas las características de una bacteria y diferenciar entre especies (Obregón *et al.*, 2008), como es el caso de la bacteria *R. solanacearum*, la cual ataca a un determinado grupo de hospederos, dependiendo de su raza y biovar (Genin and Denny, 2012).

Estas pruebas de patogenicidad se realizaron con el fin de representar las condiciones naturales que se dan en el ambiente; sin embargo hay que tener en cuenta el “triángulo de la enfermedad”, el cual explica que para que pueda existir una patogenicidad en una planta, se deben mantener unas condiciones estables de tres componentes importantes: patógeno, condiciones ambientales y planta hospedera. En estos sistemas, un conjunto de condiciones ambientales dentro de un rango favorable debe ocurrir para que se desarrolle la enfermedad (Agrios, 2004). Por esta razón se estandarizó el modelo de patogenicidad, fijando humedad en el suelo (60-80%), estadio de las plantas hospederas (6 a 8 semanas de edad) e infecciones con el patógeno (concentración de *R. solanacearum* de  $10^8$  UFC/mL). Los resultados obtenidos en estas pruebas de patogenicidad y virulencia, con respecto al porcentaje de marchitamiento, clorosis y del

ABCDE, revelaron que el aislado con una mayor virulencia fue la bacteria control EAP009, ya que ninguno de los aislados evaluados superó sus resultados, aunque no se hayan presentado diferencias en el ABCDE respecto al %Marchitez. Por estas razones se sugiere que este aislado podría utilizarse en evaluaciones posteriores de bioformulados para el biocontrol de la enfermedad en suelo.

Paralelamente, se realizó la selección del medio de cultivo líquido que presentara las mejores características de crecimiento bacterial y producción de metabolitos por parte de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123. En los cultivos sumergidos evaluados (MOLP, DRU y TSB) la bacteria tuvo un desarrollo donde se obtuvieron las fases de crecimiento exponencial, de desaceleración y estacionaria, durante el proceso de cultivo tipo batch en 72 horas. La fase exponencial tuvo un tiempo promedio entre los tres medios evaluados de 10 horas aproximadamente, seguida de una fase de desaceleración de 14 horas y finalmente la fase estacionaria de 48 horas (desde 24 a 72 horas). Estos resultados obtenidos coinciden con lo expuesto en la literatura, en donde identifican que en la fase exponencial aumenta considerablemente la densidad celular y que la fase estacionaria depende del tiempo en que se deje el microorganismo en medios de cultivo enriquecidos (Milner *et al.*, 1996). Sin embargo, Gil y Gómez (2011) evaluaron el crecimiento de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en medio MOLP, reportando una fase de latencia y aceleración entre las 0 y 5 horas, luego una fase exponencial desde 5 a 15 horas y finalmente una fase de desaceleración y estacionaria desde las 15 hasta las 70 horas. Estas diferencias se pueden atribuir a que los tiempos de toma de muestras de la fermentación fueron diferentes a los evaluados en este trabajo, y posiblemente las curvas de crecimiento difieren. En la cuantificación del crecimiento de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 se obtuvo que la  $DO_{600}$  máxima fue de 2.36, 2.00 y 1.98 en el medio DRU, MOLP y TSB, respectivamente, a las 72 horas del cultivo; sin embargo las concentraciones celulares en UFC/mL difirieron de los resultados de la  $DO_{600}$ , ya que se obtuvieron concentraciones de  $1.8 \times 10^9$  UFC/mL,  $1.6 \times 10^9$  UFC/mL y  $1.1 \times 10^9$  UFC/mL en los medios MOLP, DRU y TSB, respectivamente a las 72 horas. La medición de densidad óptica es una cuantificación indirecta de la cantidad de biomasa presente en un cultivo, aunque por lo general coincide con las cuantificaciones directas como es el conteo de UFC/mL; es por esto que algunos autores (Shuller and Kargi, 1992) la

consideran directa. Según lo obtenido en este trabajo se recomienda realizar el conteo de UFC/mL para hacer las cuantificaciones de número de células.

Los elementos que constituyen los medios de cultivo se vuelven de gran interés, ya que van a permitir que las células crezcan y se desarrollen; por esto los medios de cultivo deben contener los elementos químicos que conforman los materiales y estructuras celulares, así como elementos requeridos para el transporte intermembranal y la generación de energía necesaria para los procesos biosintéticos (Scragg, 1997). El crecimiento de biomasa de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en los medios de cultivo MOLP y DRU fue más evidente que en el medio comercial TSB, lo cual podría explicarse posiblemente por las fuentes de carbono y nitrógeno, y la presencia de micro y macroelementos usados en los medios enriquecidos (MOLP y DRU), en comparación con el medio comercial (TSB). Se ha observado que la glucosa, al ser un monosacárido, es una fuente de fácil asimilación por los microorganismos (Fisher and Sonenshein, 1991), lo que le atribuye un mayor crecimiento en medios de cultivo que contienen dicho compuesto; sin embargo la fuente de carbono utilizada en el medio MOLP es la sacarosa (disacárido) a una concentración de 20 g/L y la de los medios DRU y TSB es la glucosa, a concentraciones de 31.3 g/L y 2.5 g/L, respectivamente. Estas concentraciones altas de sacarosa y glucosa en los medios MOLP y DRU, podrían incidir en una mayor cantidad de biomasa, comparado con el medio TSB. También la fuente de nitrógeno es importante para el comportamiento del crecimiento bacteriano (Fisher and Sonenshein, 1991). En los medios evaluados el medio de cultivo MOLP tiene dos fuentes de nitrógeno: peptona universal (30 g/L) y extracto de levadura (7 g/L), mientras que el medio DRU contiene extracto de levadura (35 g/L) y el TSB caseína pancreática digestiva (17 g/L); por lo que se esperaba que en los medios con una mayor concentración de fuentes de nitrógeno existiera una mayor densidad bacteriana, como en este caso los medios de cultivo MOLP y DRU.

En el análisis de la actividad antimicrobiana generada por el SLC de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en los tres medios de cultivo evaluados, se obtuvo que el medio que indujo una mayor antibiosis, según el halo de inhibición de *R. solanacearum* EAP009 a nivel *in vitro* fue el medio MOLP con un valor de  $1.43 \pm 0.06$  cm, seguido del medio DRU con  $1.15 \pm 0.08$  cm y TSB con  $1.07 \pm 0.09$  cm de radio de inhibición, a las 72 horas del

cultivo, en medio BGTA. Adicionalmente el radio de inhibición del control positivo (*B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 fresca) fue de  $1.29 \pm 0.06$  cm. Estudios anteriores con esta misma cepa bacteriana en medio MOLP, arrojaron resultados de  $1.75 \pm 0.08$  cm de radio de inhibición a las 70 horas del cultivo, en comparación con la bacteria fresca de  $0.25 \pm 0.04$  cm (Gil and Gómez, 2011). No obstante, los resultados obtenidos en la literatura y los resultados de este estudio, reportan que la producción de compuestos antagonicos de *R. solanacearum* depende de varios aspectos, entre los cuales se encuentran el medio de cultivo que se utilice y el tiempo en que se realice la medición del halo de inhibición. Por ejemplo, Aliye y colaboradores (2008) evaluaron diferentes microorganismos aislados del suelo, entre ellos bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, mediante la técnica de difusión de agar contra *R. solanacearum*, y reportaron radios de inhibición que variaban entre 0.12 y 1.11 cm de las suspensiones bacterianas en agua estéril, en medios de cultivo KB, agar nutritivo y LB.

Complementariamente, se realizó el análisis de la cinética de crecimiento y la actividad antimicrobiana de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123. Los resultados obtenidos sugieren una asociación entre la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y la obtención de halos de inhibición en ese mismo período, posiblemente por la producción de metabolitos parcialmente ligados al metabolismo celular o por la concentración de los metabolitos producidos en las fases anteriores, realizando una sinergia entre éstos. Esta hipótesis se sustenta ya que algunos lipopéptidos (LPs) como las surfactinas están parcialmente ligadas al metabolismo energético (Jacques *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2005), mientras que las iturinas y las fengicinas no lo están. Adicionalmente se ha evidenciado que los medios de cultivo optimizados pueden generar la producción de algunos metabolitos no presentes en la formulación original, como lo demostró Jacques y colaboradores (1999) en el medio optimizado MOLP en donde se produjeron fengicinas no presentes en los medios originales. Se ha investigado además que en las especies de *Bacillus*, el quórum sensing juega un papel muy importante en la regulación de la biosíntesis de LPs; por ejemplo la expresión de los genes de la surfactina se asocia con mayores densidades celulares y se produce en la transición de la fase exponencial a estacionaria en el crecimiento bacteriano, mientras que la biosíntesis de la fengicina e iturina se da más tarde en la fase estacionaria (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Así mismo, Villegas en el (2012) evaluó los metabolitos secundarios producidos por la bacteria *B. amyloliquefaciens* EA-CB0959 aislada de la filosfera de plantas de plátano cv. Hartón, por medio de HPLC y espectrometría de masas. En este trabajo se obtuvo que la actividad antimicrobiana contra *R. solanacearum* EAP009 se dió por la producción de LPs de las familias de las surfactinas, fengicinas e iturinas, especialmente las surfactinas C14 y C15 y las fengicinas A y B; caso sobresaliente ya que no se había reportado en la literatura una actividad inhibitoria bacteriana por parte de las fengicinas, donde su mayor acción se centra en actividades antifúngicas. También, la cepa de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 presenta el mismo perfil cromatográfico que la EA-CB0959, lo cual sugiere una producción similar de los compuestos responsables de la inhibición del crecimiento de *R. solanacearum* EAP009. Adicionalmente, las dos cepas son de la misma especie y son morfológicamente idénticas en medio TSA. Con las razones antes descritas, se podría explicar que durante la fase estacionaria del crecimiento de EA-CB0123 se haya obtenido los mayores halos de inhibición contra la bacteria fitopatógica, ya que en ese tiempo es donde se producen las fengicinas; o también se podría sugerir que es una acción sinérgica entre las surfactinas, fengicinas e iturinas producidas en el crecimiento bacterial.

Igualmente, se obtuvo que en la evaluación de los SLC producidos por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 contra *R. solanacearum* EAP009 a nivel *in vitro*, a pesar que todos los extractos metanólicos se encontraban a una misma concentración (15 mg/mL), había una menor actividad en el medio DRU que en MOLP y TSB, y adicionalmente se produjo más biomasa en DRU, con respecto a la absorbancia, que en los demás medios de cultivo. Este resultado se podría explicar con las metodologías utilizadas para la extracción de compuestos antibióticos (extracción en fase sólida), ya que allí se pudieron haber excluido algunas sustancias que favorecen a la antibiosis, producidas en el medio DRU, que como se explicó anteriormente, es un medio de cultivo modificado para la producción de endoesporas de *B. subtilis* EA-CB0015, y posiblemente no tenga el mismo efecto para la cepa evaluada. No obstante, se recomienda realizar una caracterización parcial de los compuestos producidos en los diferentes medios por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 y poder realizar una comparación equitativa, con respecto a la concentración utilizada de las sustancias antibióticas.

Los resultados obtenidos de la CMI y  $LC_{50}$  de la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en los medios evaluados, arrojaron valores de  $64 \pm 0.02$  ppm ( $32 \pm 0.02$  ppm de  $LC_{50}$ ) para los medios MOLP y DRU y  $128 \pm 0.02$  ppm ( $64 \pm 0.02$  ppm de  $LC_{50}$ ) para TSB. En investigaciones anteriores con la cepa EA-CB0123 se obtuvo una CMI de  $197.9 \pm 4.3$  ppm y una  $LC_{50}$  de  $98.9 \pm 2.1$  ppm (Gil and Gómez, 2011) contra *R. solanacearum* EAP009, que son valores más altos a los obtenidos en este estudio, posiblemente a que la metodología aplicada allí fue diferente a la metodología de la presente investigación, ya que evaluaron distintas concentraciones finales de los extractos y una concentración diferente de *R. solanacearum* EAP009. Adicionalmente, se han evaluado extractos de semillas de *Clausena lansium* contra la marchitez bacteriana (*R. solanacearum*) en tabaco, encontrando que el compuesto Lansiumamide B inhibe el crecimiento de la bacteria fitopatógena a una concentración de 125 mg/L (CMI) a nivel *in vitro* (Li *et al.*, 2014); la cual es una concentración más alta que las CMIs encontradas anteriormente. Los datos obtenidos en este ensayo, suplementan información importante para ensayos posteriores, donde se evaluará el efecto de estos metabolitos y su concentración a nivel de microcosmos, que finalmente servirán para un escalado hacia invernadero y campo.

Asimismo, se encontró que en la mayoría de los tiempos del cultivo, la actividad antagonista producida por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en el medio TSB fue mayor que en DRU, no obstante la CMI es mayor en el medio TSB que en DRU; este resultado podría indicar una diferencia en las metodologías para la obtención de los compuestos activos contra *R. solanacearum* EAP009, ya que en los diferentes tiempos de la cinética de crecimiento se extraían mediante una fase sólida (SPE) y para la CMI, se obtenían en el tiempo total de la fermentación (72 horas) mediante la resina amberlita y metanol. También se podría sugerir que en el medio TSB se producen algunos compuestos como los LPs, los cuales actuaban sinérgicamente a medida que la cepa EA-CB0123 crecía y posiblemente en el medio DRU no se alcanzaban a producir en las mismas proporciones, lo cual podría explicarse ya que el medio DRU fue estandarizado y modificado para la producción de endoesporas para un microorganismo específico (*B. subtilis* EA-CB0015) por Mosquera (2013) y probablemente no tenga el mismo efecto para la cepa de *B. amyloliquefaciens* estudiada.

Teniendo en cuenta que la mayor producción de biomasa y actividad antimicrobiana contra *R. solanacearum* se obtuvieron en la transición de la fase exponencial y en la

estacionaria, se hace importante conocer el tiempo en el cual se debe finalizar la fermentación y poder obtener una mayor biomasa celular y metabolitos de interés. El conocimiento de los datos cinéticos y la relación entre el microorganismo y el ambiente, permiten una optimización en el diseño del proceso de obtención de cierto metabolito, en donde los parámetros ambientales como la concentración de nutrientes, tipo de agitación, oxígeno disuelto, pH y temperatura, juegan un papel importante (Milner *et al.*, 1996; Scragg, 1997). Adicionalmente, el rendimiento de los productos deseados al finalizar la fermentación del microorganismo es importante; en esta investigación se obtuvo 1.53 g/L, 1.00 g/L y 0.58 g/L para los medios MOLP, DRU y TSB, respectivamente, a las 72 horas de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 de los compuestos bioactivos; mientras que en algunos trabajos anteriores se obtuvieron rendimientos de 1.06 g/L, 0.88 g/L y 0.21 g/L, para los medios de cultivo MOLP, TSB y DRU, respectivamente, a las 70 horas de crecimiento (Gil and Gómez, 2011), los cuales fueron menores a los obtenidos debido posiblemente a que el tiempo de fermentación fue menor.

Por las razones antes descritas y con los resultados obtenidos en las cinéticas de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 se sugiere que el medio MOLP es el medio de cultivo evaluado promisorio para el crecimiento celular y producción de metabolitos activos contra *R. solanacearum* EAP009, con los parámetros utilizados en los ensayos; y que además el tiempo de recolección del cultivo podría ser de 48 horas, ya que fue un tiempo en donde se obtuvo un pico alto con respecto al crecimiento bacteriano (con  $DO_{600}$  de 2.18, 1.99 y 1.90, para DRU, TSB y MOLP, respectivamente) y al radio de inhibición (1.58, 1.52 y 1.23 cm para MOLP, TSB y DRU, respectivamente); sin embargo, el tiempo escogido en esta investigación fue de 72 horas, donde también se encontraron resultados positivos.

Los resultados anteriormente descritos concluyen la elección de la cepa *R. solanacearum* EAP009 como el aislado más virulento en las pruebas de patogenicidad y el medio de cultivo MOLP, para el crecimiento y producción de compuestos activos de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123, permitiendo desarrollar el EB como un posible agente de biocontrol para el fitopatógeno en el suelo. Idealmente los estudios de efectos biocontroladores por parte de algún producto o ACB se realizan inicialmente en ensayos a nivel de microcosmos o pequeños mesocosmos, que tengan propiedades similares al

área donde se desea evaluar finalmente el agente; sin embargo, los métodos deben ser optimizados en esta etapa antes de seguir con las evaluaciones a gran escala (van Elsas *et al.*, 1998). Para evaluar el efecto biocontrolador de la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 y de los metabolitos producidos por ésta, se realizaron ensayos a nivel de microcosmos adicionando diferentes tratamientos (Tabla 2-1) y utilizando la bacteria *R. solanacearum* AW1, la cual es resistente al ácido nalidíxico y contribuye con su fácil aislamiento y determinación; además se realizaron evaluaciones de antagonismo *in vitro* con el extracto metanólico de la cepa EA-CB0123 a concentraciones de 79.4 mg/mL, produciendo halos de aproximadamente 1.91 cm, demostrando que los compuestos bioactivos producidos por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 también inhibían el crecimiento de *R. solanacearum* AW1. Consecuentemente, se obtuvo que en el tiempo 0 DPI, la concentración inicial de *R. solanacearum* AW1 en microcosmos de suelo fue de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/g suelo en todos los tratamientos y que de allí en adelante la concentración aumentó exponencialmente, llegando a valores máximos de  $3.2 \times 10^9$  UFC/g suelo. Sin embargo esta concentración se mantuvo constante hasta un tiempo de 60 DPI, observando un efecto nulo de los tratamientos evaluados.

También se realizó la evaluación en uno de los tratamientos con el antibiótico gentamicina, con el fin de determinar su efecto controlador en una matriz diferente a la antes evaluada (medio de cultivo líquido). Para este caso se adicionó una concentración final de gentamicina de 1 mg/Kg suelo al sistema de microcosmos, ya que en ensayos anteriores se había determinado que la CMI a nivel *in vitro* de la gentamicina contra *R. solanacearum* AW1 era de 1 ppm (1 mg/L) (datos no mostrados). Sin embargo, este antibiótico no produjo ningún efecto en cuanto a la disminución de la densidad celular de *R. solanacearum* AW1 en microcosmos, posiblemente a que la concentración adicionada fue baja, a comparación de otros ensayos en suelo donde utilizan concentraciones de extractos de semillas de *Clausena lansium* y su compuesto antibacterial Lansiumamide B a una concentración de 100 ppm (100 mg/Kg), controlando la enfermedad en tabaco producida por *R. solanacearum* 40 veces más que el antibiótico estreptomina (Li *et al.*, 2014). Se sugiere entonces, que en posteriores estudios se evalúen unas concentraciones de antibiótico más altas y que se realice la comparación de la CMI a nivel *in vitro* contra la CMI en matriz de suelo (microcosmos), sabiendo además que el suelo es un sistema completamente diferente a un medio de cultivo en donde se tienen

todas las condiciones controladas, mientras que en el suelo las fases gaseosas, sólidas y líquidas, se encuentran de una forma heterogénea, lo que presenta un desafío a los métodos de monitoreo del alcance y efectos de inoculantes y sus interpretaciones (van Elsas *et al.*, 1998).

Las pruebas de antibiosis generadas por algunas bacterias *in vitro*, son un método inicial de proyección y tamizaje de ciertas bacterias controladoras; sin embargo estos resultados no siempre son relacionados directamente a la antibiosis en el suelo y el campo y tampoco existe una relación positiva entre las zonas de inhibición *in vitro* y los efectos de supresión de enfermedades en las plantas (Kloepper, 1993; van Elsas *et al.*, 1998; Lemessa and Zeller, 2007; Ding *et al.*, 2012). Para la evaluación de un ACB se recomienda el uso de bacterias aisladas del mismo entorno en el que se supone deben funcionar, ya que están más adaptadas a las tensiones ecológicas de su hábitat (van Elsas *et al.*, 1998), como lo es *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123, la cual fue aislada de la rizosfera de cultivos de banano en el Urabá Antioqueño. Sin embargo, con los tratamientos usados en esta investigación en microcosmos, en los que se incluía *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123, no se obtuvo ningún efecto inhibitorio o controlador de la bacteria fitopatógena; posiblemente a que el ACB no se desarrolló bien en la matriz del suelo, o a que los compuestos introducidos se encontraban en una baja concentración (85 ppm), como el caso de la gentamicina, con una concentración evaluada de 1 ppm. Otra de las sugerencias del poco efecto de los tratamientos en los microcosmos es, que las sustancias adicionadas fueron adsorbidas por la superficie de las partículas de suelo, dejándolas retenidas o posiblemente cambiando su estructura natural; produciendo así un efecto nulo en la concentración de *R. solanacearum* AW1.

Las condiciones abióticas estandarizadas en el microcosmos, como la humedad del suelo, aumentó considerablemente (mayor al 80%). Este efecto se pudo haber dado ya que no se pudo garantizar un flujo de gases a través del ensayo; por esta razón se podría sugerir que *R. solanacearum* AW1 se mantuvo a concentraciones altas en dicha matriz; además porque según van Elsas y colaboradores (2001) la bacteria *R. solanacearum* 1609 se resguarda en los poros de las superficies de los sedimentos del suelo, proporcionando una protección física ante los cambios bióticos y abióticos que afectan al microorganismo. También se ha evidenciado que a humedades muy altas (inundación) la

densidad poblacional de *R. solanacearum* disminuye, como lo evidenciaron Pradhanang y Momol (2001) al evaluar la supervivencia del patógeno en las raíces de las malezas acuáticas en los cultivos de arroz y otras investigaciones llevadas a cabo en la Universidad EAFIT, en las cuales se evaluó la supervivencia de *R. solanacearum* AW1 en microcosmos (datos no publicados). Sin embargo, esta bacteria tiene diferentes estrategias para sobrevivir a cambios abióticos en su hábitat, logrando mantener su concentración en algunas condiciones de inundación (Pradhanang and Momol, 2001), mientras que la sequía da lugar a rápidos descensos de la población (van Elsas *et al.*, 2000).

A pesar del efecto nulo del EB y otros tratamientos derivados de la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 y su fermentación a nivel de microcosmos, se evaluó el efecto del EB a nivel de invernadero, en donde había una interacción con la planta, el suelo y los microorganismos. Los resultados de esta evaluación fueron similares tanto para las muestras de suelo como para las de tejido, ya que en los días iniciales comenzaron con concentraciones en los rangos comprendidos de  $7.76 \times 10^2$  a  $1.09 \times 10^3$  UFC/g suelo seco y  $5.73 \times 10^8$  UFC/g tejido para los tiempos de 30 y 60 DPI. Sin embargo, se observó un decaimiento en la concentración de la bacteria fitopatógena hacia los 90 DPI, ya que en las plantas no se observaron síntomas y en las pruebas microbiológicas los rangos de concentraciones disminuyeron a  $9.12 \times 10^1$  UFC/g suelo seco y  $2.0 \times 10^4$  UFC/g tejido. En los tiempos posteriores de evaluación (120 DPI en adelante) no se evidenciaron síntomas en las plantas de banano sembradas en suelos contaminados con *R. solanacearum* EAP009 y tampoco mediante las pruebas microbiológicas realizadas. Cabe mencionar que en el control agua, no se evidenciaron síntomas ni presencia de *R. solanacearum* EAP009 en las pruebas microbiológicas realizadas a los tejidos y el suelo en ningún tiempo de la evaluación (datos no mostrados). Se podría sugerir que el EB adicionado al suelo contaminado con *R. solanacearum* EAP009 no fue efectivo para el control de la enfermedad, ya que tanto el tratamiento con el EB como el control absoluto, no evidenciaron presencia del fitopatógeno después de 120 DPI; o también se podría pensar que la persistencia de *R. solanacearum* EAP009 en el suelo en las condiciones ambientales evaluadas, no fueron óptimas para su desarrollo y supervivencia; o que la concentración de metabolitos activos en el EB (85 ppm) no era suficiente para producir una inhibición más rápida que la ocasionada por las condiciones naturales del ensayo en suelo. Por estas razones se

deben implementar otras estrategias de evaluación inicialmente en microcosmos para conocer la CMI del EB y posteriormente aplicar dicha concentración en invernadero.

Según algunos autores, se recomienda adicionar el agente antagonista con un sustrato que extienda su supervivencia en el suelo y pueda mejorar la eficacia en biocontrol (Zhang *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012). Es el caso de varias investigaciones con bacterias pertenecientes a *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, mezcladas con compost o sustrato con altas concentraciones de materia orgánica, a suelos contaminados con *R. solanacearum*. En estos estudios han obtenido inhibiciones en la invasión de las raíces de plantas de papa por el patógeno y reducciones en la incidencia de la enfermedad en tomate (63-74%); además sugirieron que la alta cantidad de nutrientes provenientes del fertilizador bio-orgánico (compost) podría proveer a las bacterias benéficas una clase de resguardo o fuente de nutrientes, lo cual les conviene para su supervivencia y posterior inhibición de *R. solanacearum* en el suelo (Ding *et al.*, 2012; Tan, Dong, *et al.*, 2013; Tan, Jiang, *et al.*, 2013). En esta investigación por el contrario, en el proceso de producción del EB se procuró minimizar compuestos nutricionales remanentes de la fermentación, mediante centrifugación y precipitación ácida, encontrando una inhibición a nivel *in vitro* similar a la resultante con la fermentación completa, es decir, con la cepa *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en medio MOLP durante 72 horas. En el proceso de precipitación ácida se pudieron haber precipitado otros compuestos en el sobrenadante de la fermentación, que se alteran bajo condiciones de acidez y podrían presentar bioactividad. Cabe preguntarse entonces ¿por qué los nutrientes adicionados con el agente controlador solo benefician al ACB y no a los agentes fitopatógenos? Para esto Ding y colaboradores (2012) comprueban que la adición de un bio-fertilizante (mezcla 1:1, w/w de compost madurado de cerdo y cascarilla de arroz, y un fertilizador orgánico) aumenta la cantidad de bacterias antagonistas y actinobacterias en la rizósfera del suelo y por el contrario, el contenido de *R. solanacearum* y de hongos disminuye, en evaluaciones realizadas en papa. Sin embargo esta afirmación puede ser falseada por el hecho de que los microorganismos que se liberan al suelo están expuestos a una variedad de diferentes condiciones ambientales (van Elsas *et al.*, 1998) y va a depender de la densidad celular y las adaptaciones que tengan los diferentes microorganismos en sobrevivir en aquella matriz de suelo, la cual es un nicho favorable porque la temperatura y humedad son estables (Doornbos *et al.*, 2011).

Sin embargo en algunas evaluaciones antes descritas donde usan los ACBs con biofertilizantes concluyen que los efectos encontrados de biocontrol hacia *R. solanacearum* 1609, fueron dependientes de la presencia del compost ya que no se obtuvieron efectos sin adición del compost (Schonfeld *et al.*, 2003). También han reportado que algunos agentes patógenos que se transmiten por el suelo, como *R. solanacearum*, no pueden mantenerse bajo control cuando sólo se aplica una estrategia para el control (Ding *et al.*, 2012), lo cual puede ser lo que ocurrió en esta investigación.

Se conoce además que la estructura de la comunidad de la microflora bacteriana del suelo está determinada por algunos factores, como la ubicación geográfica, la estructura del suelo, tamaño de partículas del suelo, la composición mineral, prácticas agrícolas (Doornbos *et al.*, 2011), pH y contenido de materia orgánica (Schonfeld *et al.*, 2003), entre otros. Además la actividad microbiana en el suelo está muy influenciada por las raíces de las plantas (Bais *et al.*, 2004), ya que son los exudados radicales los que contribuyen a la selección de elementos específicos de su microflora bacteriana en la rizosfera, estableciendo un ambiente favorable para su desarrollo (Latour *et al.*, 1996). En esta investigación, en la mayoría del tiempo de la evaluación en invernadero, se encontraba el suelo con el tejido vegetal en descomposición y sólo al inicio del ensayo había presencia de plantas de banano sembradas en las macetas; lo que podría explicar la presencia de *R. solanacearum* en los primeros tiempos de evaluación y su no detección al cabo de 3 meses de establecido el experimento. Por ejemplo, algunos autores indican que una posible razón por la cual *R. solanacearum* sobrevive poco tiempo en el suelo en el sistema cerrado de invernadero, comparado con el sistema natural del campo, es porque en la maceta no había posibilidad de diseminarse y tampoco había raíces hospederas para colonizar y poder comenzar de nuevo su ciclo (Pradhanang *et al.*, 2000; Messiha *et al.*, 2009).

Los microorganismos adicionados al suelo, sean patógenos, neutros o benéficos, son sometidos a una gran variedad de procesos después de su introducción, incluyendo su desarrollo, crecimiento, muerte, adaptación fisiológica, propagación física, entre otros (van Elsas *et al.*, 1998). Probablemente los factores presentes en el sistema estudiado no fueron favorables para la supervivencia de los microorganismos adicionados. Se podría sugerir entonces que al añadir el EB al suelo contaminado con *R. solanacearum* EAP009, la población de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 decreció considerablemente, aunque se

encontró que en las muestras de suelo analizadas en los tiempos determinados, la población bacteriana total fue estable (Figura 3-9) con poblaciones promedio de  $1.07 \times 10^5$ ,  $3.89 \times 10^4$  y  $3.81 \times 10^4$  UFC/g suelo para los tratamientos CAB, EB y Agua, respectivamente. En estudios realizados por Zhang y colaboradores (2011), aplicaron agentes biocontroladores (*B. subtilis* N11) con un fertilizante al suelo, para controlar la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* en plantas de banano, en donde encontraron que la población del ACB disminuyó 15 días después de la aplicación de éste; por lo tanto se sugiere que este decaimiento en la concentración sea posiblemente por una competencia con microorganismos nativos del suelo utilizado (Hiddink *et al.*, 2005). Complementariamente, se ha estudiado que las bacterias pertenecientes al género de *Bacillus*, son buenos competidores y se adhieren fácilmente a las superficies de las raíces, especialmente cuando se usa un inóculo esporulado (Shoda, 2000; Zhang *et al.*, 2011), pero en el presente estudio las únicas raíces que estuvieron presentes al adicionar el EB fueron las de las plantas de banano en descomposición, debido a la inyección del glifosato realizada previamente. Se ha propuesto además que para la cepa *B. amyloliquefaciens* S499, la producción de LPs es cualitativa y cuantitativamente mediado por el estado nutricional de la rizosfera, los exudados de las plantas y por la formación de biopelículas alrededor de los pelos radicales (Nihorimbere *et al.*, 2012), por lo que posiblemente las células de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 adicionadas con el EB no produjeron LPs, posiblemente responsables de la antibiosis.

Otro aspecto a analizar es si el glifosato aplicado remanente, generó algún efecto sobre el ACB e inclusive sobre los metabolitos presentes en el EB; sin embargo se conoce que este herbicida se inactiva rápidamente en el suelo y puede generar un efecto no selectivo sobre los microorganismos y sus procesos (Gil and Gómez, 2011). Para el caso de *R. solanacearum* se conoce que el glifosato tiene un efecto bactericida al otro día de su exposición a nivel *in vitro* (Granada, 2003), por esto se podría sugerir que el glifosato aplicado pudo haber tenido alguna actividad antibiótica con *R. solanacearum* EAP009 en el suelo o que posiblemente haya reaccionado de alguna forma con los compuestos presentes en el EB y producidos por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 adicionados. Por estas razones, sería interesante evaluar el efecto del glifosato en las poblaciones de *B.*

*amyloliquefaciens* EA-CB0123, *R. solanacearum* EAP009 y el EB, tanto a nivel *in vitro*, como en suelo.

En el sistema de patogenicidad realizado se pudieron observar síntomas durante las primeras etapas de evaluación, normalmente después de 1 semana de haber sembrado la planta en el suelo contaminado en cada maceta, como lo menciona Pradhanang y colaboradores (2000) en sus investigaciones y que además estos síntomas van a depender del potencial de inóculo de la bacteria y de la disponibilidad de las condiciones ambientales. Sin embargo, después de los 3 meses no se observaron sintomatologías en las plantas de banano, según Álvarez y colaboradores (2010) la expresión de los síntomas y la tasa del desarrollo de la enfermedad, pueden variar según la susceptibilidad de la planta hospedera y la agresividad de la cepa patogénica. Durante el tiempo de evaluación en el invernadero, la bacteria *R. solanacearum* EAP009 posiblemente haya pasado por varios estados, por ejemplo haya perdido su capacidad para atacar la planta hospedera, haya muerto, o posiblemente las células pudieron haber cambiado su condición a un estado de latencia, desarrollándose en la parte inferior del pseudotallo (cormo) sin ocasionar síntomas, como se evidenció en los ensayos de Schönfeld y colaboradores (2003) donde evaluaron el efecto de la adición de compost en la disminución de *R. solanacearum* 1609 en microcosmos y campo. Allí mostraron un decrecimiento en apenas 60 DPI de la concentración de la bacteria de  $10^6$ - $10^7$  a  $10^4$ - $10^5$  UFC/g suelo seco y se observó la presencia del patógeno en la parte baja del tallo de la planta de papa mediante las técnicas IFC (por sus siglas en inglés de "Immunofluorescence colony") y PCR. A pesar de esto, en la actual investigación, se procesaron los tejidos inferiores de las plantas de banano que no presentaban sintomatología, como cormo y pseudotallo, con el fin de evaluar su presencia allí, pero no se evidenció existencia de la bacteria *R. solanacearum* EAP009 (datos no mostrados).

Se reconoce que la efectividad del agente biocontrolador a nivel de invernadero, depende de varios factores influyentes en el sistema de experimentación. Dentro de estos factores se encuentran el tiempo de aplicación (o dosis), modo de aplicación, la edad de la planta, entre otros (Ramesh *et al.*, 2008). No obstante, estas condiciones fueron estandarizadas para el modelo de sistema de patogenicidad creado con anterioridad para las plantas de banano, por lo que se esperaría que la concentración de *R. solanacearum* EAP009 no se

viera afectada en los suelos evaluados, especialmente para el tratamiento CAB, ya que después de la destrucción de la planta por parte del glifosato aplicado, la bacteria fitopatógena se instala en la materia orgánica del tejido vegetal en descomposición (Scherf *et al.*, 2010), como en un período de vida inter-huésped (Denny *et al.*, 1994). Posiblemente, hacia el mes 3 de evaluación, ya el tejido vegetal estaba totalmente descompuesto, quedando *R. solanacearum* EAP009 en el suelo en donde se enfrentaba a condiciones totalmente diferentes, tanto bióticas como abióticas, haciendo que la concentración disminuyera considerablemente, casi hasta un nivel indetectable (Coutinho, 2005); o como ocurrió en el estudio de van Elsas y colaboradores (2000) en donde la supervivencia de la bacteria fitopatógena (raza 3) se vio favorecida en las capas más profundas del suelo, posiblemente a un menor cambio en la temperatura y a un menor grado de depredación o competencia por la microbiota de la matriz.

La detección de *R. solanacearum* se ha basado previamente en el uso de medios semiselectivos como el SMSA, pero la principal desventaja recae en que el crecimiento del patógeno se inhibe por la presencia de otras bacterias saprofitas antagónicas en las muestras a procesar, lo que puede resultar en diagnósticos falsos (Pradhanang *et al.*, 2000); además esos recuentos podrían ser subestimados ya que *R. solanacearum* puede crecer en los medios de cultivo sólidos como colonias irreconocibles, no fluídas, mutantes avirulentas o formas no cultivables (van Elsas *et al.*, 1998; Pradhanang *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2010). Por lo anterior se recomienda usar una metodología alterna a la infección de la planta, que sea más específica para la bacteria a detectar a nivel de laboratorio.

# Conclusiones y recomendaciones

## Conclusiones

El crecimiento y la actividad antimicrobiana de la bacteria *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en los medios de cultivo MOLP, DRU y TSB presentó diferencias significativas. Allí se evidenció que la BAFE en el medio MOLP tuvo un crecimiento bacterial máximo de  $1.8 \times 10^9$  UFC/mL y produjo un radio de inhibición de  $1.43 \pm 0.06$  cm contra *R. solanacearum* a nivel *in vitro*, a las 72 horas de cultivo.

La CMI del extracto metanólico obtenido de la fermentación de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en los diferentes medios de cultivo, a nivel *in vitro* con la bacteria *R. solanacearum* EAP009 fue de 64 ppm para los medios MOLP y DRU y 32 ppm para el medio TSB.

Las cepas de *R. solanacearum* EAP011, EAP012, EAP013 y EAP014 provenientes de suelo contaminado y tejido infectado del Urabá Antioqueño, presentaron características morfológicas similares en medio de cultivo sólido, con colonias de morfología irregular, borde redondeado, elevación convexa, consistencia mucosa y color beige en los bordes. Estas 4 cepas bacterias generaron síntomas de clorosis y marchitez similares en plantas de banano, sin embargo ninguno de los aislados superó a la bacteria control EAP009 con respecto a su virulencia.

La supervivencia de *R. solanacearum* AW1 a nivel de microcosmos tuvo un comportamiento similar en todas las unidades tratadas con el EB y tratamientos derivados; comenzando con una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/g suelo para el tiempo 0 DPI y una concentración promedio final de  $3.2 \times 10^9$  UFC/g suelo para los 60 DPI, observando ningún efecto en la inhibición por parte de los tratamientos con *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123.

La presencia de *R. solanacearum* EAP009 en suelos previamente contaminados y tratados con el EB de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 a nivel de invernadero, mostró una densidad celular de EAP009 en el tiempo 30 y 60 DPI de  $7.76 \times 10^2$  a  $1.09 \times 10^3$  UFC/g suelo seco y  $5.73 \times 10^8$  UFC/g tejido, pasando a concentraciones celulares hacia 90 DPI de  $9.12 \times 10^1$  UFC/g suelo seco y  $2.0 \times 10^4$  UFC/g tejido. Adicionalmente, la capacidad de infección por parte de *R. solanacearum* EAP009 no mostró evidencias de síntomas en las plantas en el tiempo restante de la evaluación, sugiriendo que no hubo efecto del EB en el sistema evaluado.

La concentración bacteriana total cultivable en los suelos contaminados con *R. solanacearum* y tratados con el EB se mantuvo constante para los tiempos evaluados, con valores aproximados de  $1.07 \times 10^5$ ,  $3.89 \times 10^4$  y  $3.81 \times 10^4$  UFC/g suelo para los tratamientos CAB, EB y Agua, respectivamente.

## Recomendaciones

En esta tesis se evaluaron los metabolitos producidos por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 en diferentes medios de cultivo con la supervivencia de *R. solanacearum* EAP009 y AW1 en ensayos realizados a nivel de microcosmos e invernadero. Con el fin de obtener un extracto bacteriano (EB) eficaz para la inhibición del fitopatógeno a nivel de suelo, se recomienda desarrollar nuevos procedimientos y métodos para extraer los compuestos activos responsables de la antibiosis y evaluarlos en diferentes concentraciones y formulaciones en microcosmos e invernadero, ya que posiblemente el poco efecto del EB evaluado se deba a la metodología utilizada. Por estas razones, es de vital importancia determinar un rango de concentraciones del compuesto antibiótico y definir la dosis a las cuales se debe aplicar el EB para eliminar el 100% de la población patógena, ya que las CMI encontradas *in vitro*, difieren de las CMI que pueden existir en matrices diferentes como microcosmos, invernadero y campo.

Dentro de esta investigación queda sin resolver la cuestión de si hay o no una actividad inhibitoria por parte del EB hacia *R. solanacearum* AW1 y EAP009 a nivel de microcosmos e invernadero, ya que en los dos sistemas evaluados (microcosmos e

invernadero) los resultados no fueron los esperados y por el contrario no hubo efecto en ninguno de éstos, por lo tanto se recomienda mejorar dichas condiciones en donde algunas variables, como temperatura y humedad, sean controlables y constantes. Por ejemplo en los ensayos de microcosmos se recomienda estandarizar el intercambio de gases que se da normalmente en la naturaleza, y que se simule un sistema en donde el líquido adicionado no quede retenido, sino que pueda interactuar con el ambiente, como en las condiciones de invernadero, en donde siempre se encontraba en contacto con los cambios atmosféricos. También es necesario implementar un compuesto o producto que inhiba el crecimiento de *R. solanacearum*, con el fin de tener un control positivo dentro del análisis, ya sea con un antibiótico o un producto comercial químico.

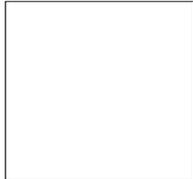
También se recomienda el análisis de los metabolitos secundarios producidos por *B. amyloliquefaciens* EA-CB0123 adicionados al suelo, por metodologías analíticas y cromatográficas, que ayuden a elucidar el comportamiento de estos compuestos en el suelo y su relación con los microorganismos introducidos.

La detección de *R. solanacearum* EAP009 por las metodologías microbiológicas usadas en esta investigación no fueron siempre frecuentes, es decir, los resultados fueron variables, lo cual sugiere una distribución desigual del patógeno en el suelo. Por tal razón se recomienda estandarizar o buscar nuevas alternativas para el muestreo de suelo, como enriquecimiento en medios de cultivo o reinocular en plantas huésped indicadoras.

Finalmente, se sugiere un estudio de cambios morfológicos en *R. solanacearum* a cambios en factores abióticos, como pH, temperatura, humedad; y al adicionar microorganismos biocontroladores en el mismo sistema donde se encuentre la bacteria fitopatógena, con el fin de evaluar sus estrategias de supervivencia, verificar una posible deformación de la membrana celular por parte de los LPs y poder esclarecer un mejor tratamiento para su control eficaz.

# Anexos

## Anexo 1 Análisis del sustrato de germinación Tierra Negra®



### Identificación

**Nombre** UNIVERSIDAD EAFIT  
**Nit o C.C.** 890901389-5  
**Dirección**  
**Teléfono** 316 698 258 55  
**Fax**  
**Email** nataliachoa@msn.com  
**F. Recibo** 28-NOV-13

### Análisis de Suelos

**Municipio** Uraba (Antioquia)  
**Vereda** Sin Especificar  
**Finca** Tierra Negra  
**Área** - Ha.  
**Profundidad** - cms.

### Reporte No. 36369

**Cultivo actual**  
**Cultivo anterior**

| Código  | Identificación en el campo | Textura |    |     |       | pH  | C.E. | M.O. | Al | Ca   | Mg  | K    | Na   | CICE | P | S  | Fe | Mn | Cu | Zn | B    | N-NO3 | N-NH4 | N |       |
|---------|----------------------------|---------|----|-----|-------|-----|------|------|----|------|-----|------|------|------|---|----|----|----|----|----|------|-------|-------|---|-------|
|         |                            | A%      | L% | Ar% | Clase |     |      |      |    |      |     |      |      |      |   |    |    |    |    |    |      |       |       |   | dSm-1 |
| SP19343 | Sustrato de Germinacion    | 76      | 22 | 2   | AF    | 6.4 |      | 17.6 | -  | 11.8 | 6.5 | 1.76 | 0.17 | 20.2 | 8 | 33 | 71 | 5  | 3  | 7  | 0.18 |       |       |   |       |

**Observaciones** *SP19343\* :Para la textura este material no dispersa --*

### Métodos

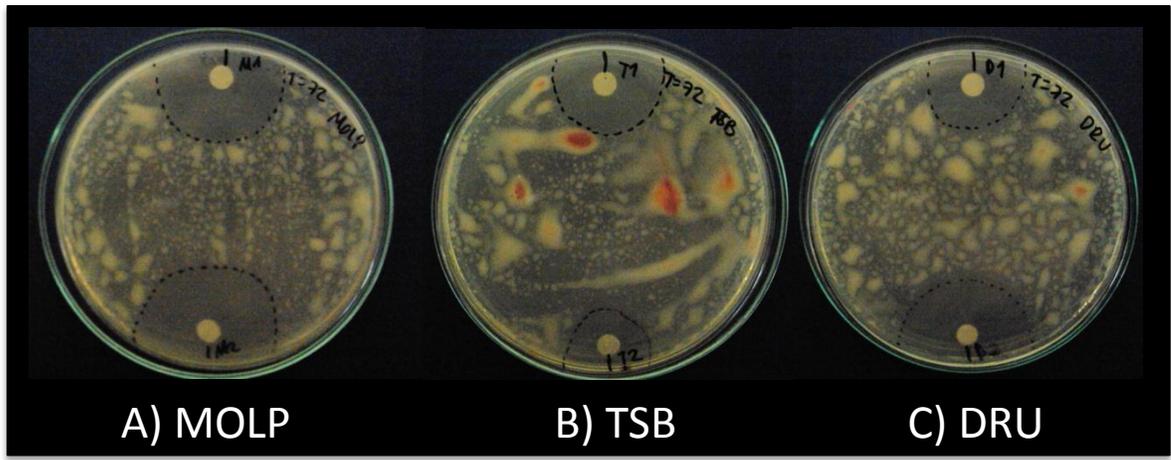
**Textura** : Bouyoucos; **pH** : Agua (1:1); **Conductividad eléctrica**: Extracto de saturación; **Materia orgánica**: Walkley Black; **Al** : KCl 1M; **Ca, Mg, K, Na** : Acetato de amonio 1M; **CICE** : Suma de cationes de cambio; **S** : Fosfato monocálcico 0.008M; **Fe, Mn, Cu, Zn** : Olsen - EDTA; **B** : Agua caliente; **NO3** : Sulfato de aluminio 0.025M; **NH4** : KCl 1M; **P** : Bray II.

### Tener en cuenta:

N.D.=No detectable  
 N.A.=No aplica  
 Para las unidades considere:  
 dSm-1 =mmho cm-1  
 cmolc kg-1 =meq/100 g suelo  
 ppm =mg kg-1

### Revisión Agronómica

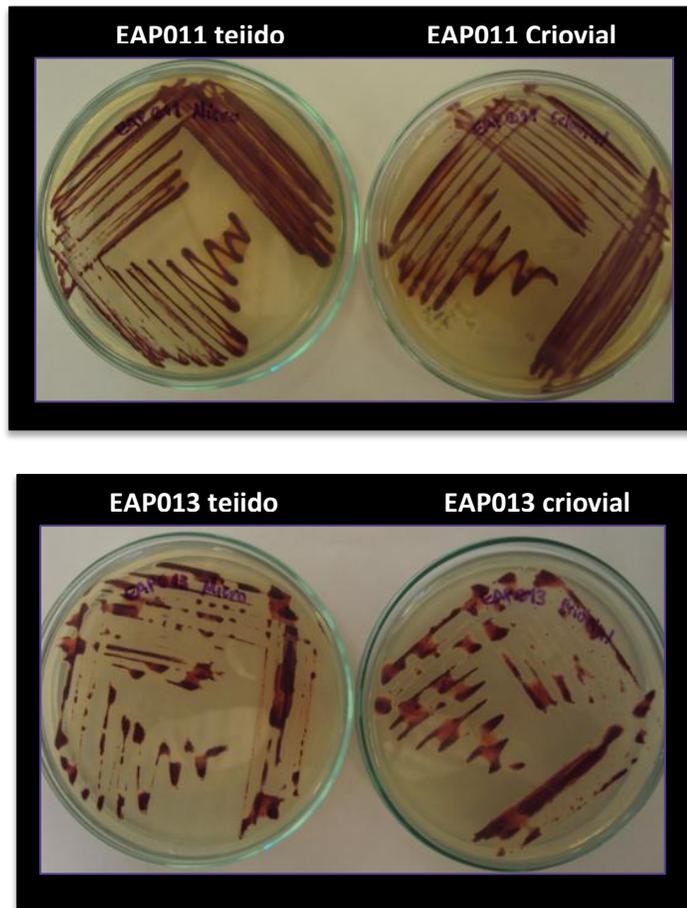
**Anexo 2** Halos de inhibición en la metodología de difusión de agar



Halos de inhibición en la metodología de difusión de agar a las 72 horas de crecimiento bacterial, con radio de inhibición de 1.4, 1.0 y 1.1 cm para las 72 horas de los medios A) MOLP, B) TSB y C) DRU, respectivamente. Los dos halos en cada caja de Petri son dos repeticiones por tratamiento.



### Anexo 3 Aislamiento de cepas de *R. solanacearum*



Se realizó el reislamiento de las cepas de *R. solanacearum* en el experimento en invernadero, con el fin de confirmar que los síntomas de la enfermedad, se producían por los aislados y no por algún otro agente exterior, siguiendo los postulados de Koch.

Se muestran únicamente los aislados de las bacterias EAP011 y EAP013 en medio BGTA, provenientes del tejido infectado.



## Bibliografía

Agrios, G., 2004. Plant pathology, fifth ed. Elsevier.

Agrobiológicos, 2012. Control del Moko del plátano (*Ralstonia solanacearum*).

Alemu, D., Lemessa, F., Wakjira, M., Berecha, G., 2013. Antibacterial activity of some invasive alien species extracts against tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith). Plant Pathol. J. 12, 61–70.

Aliye, N., Fininsa, C., Hiskias, Y., 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Biol. Control. Elsevier Inc. 47, 282–288.

Álvarez, B., Biosca, E.G., López, M.M., 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. 267–279.

Alvarez, B., López, M.M., Biosca, E.G., 2008a. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. Microbiology. 154, 3590–8.

Alvarez, J., Rodríguez, P., Marín, M., 2008b. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. Trop. plant Pathol. 33, 197–203.

Antoun, H., Prévost, D., 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, in: PGPR: Biocontrol and Biofertilization, pp. 1–38.

Arenas, A., López, D., Alvarez, E., Llano, G., Loke, J., 2004. Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smith, causante de Moko de plátano. Fitopatol. Colomb. 28, 1–5.

- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8, 63.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., Pilkauskas, P., 2004. La economía mundial del banano. 1985-2002, pp. 1–104.
- AUGURA, 2012. Coyuntura Bananera Colombiana, pp. 1–33.
- AUGURA, 2013. Sobre el banano.
- Bais, H., Park, S., Weir, T., Callaway, R., Vivanco, J., 2004. How plant communicate using the underground information superhighway. *Trend Plant Sci.* 9, 26–32.
- Belalcázar, C. S., Baena, A.H., Valencia, M.J.A., Martínez, G.A., 1990. Estudios sobre densidades de población. Generación de tecnología para el cultivo y producción rentable de plátano en la zona cafetera central colombiana. *Creced Quindío*, ICA Armenia, Regional Nueve. Armenia, Quindío, Colombia, pp. 63–76.
- Belalcazar, S., Rosales, F., Pocasangre, L., 2003. El “Moko” del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. *Costa Rica*, pp. 159–179.
- Bernal, G., Illanes, A., Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electron. J. Biotechnol.* 5, 1–9.
- Bornacelly, H., Mena, J., 2010. Conozca, prevenga y erradique el Moko en bananeras y plataneras.
- Cardozo, C., Rodríguez, P., 2009. Caracterización molecular del complejo de especies *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Urabá. *Agron. Colomb.* 27, 203–210.
- Castañeda, D., Elejalde, G., Patiño, L., Morales, J., Mejía, G., 2002. Alternatives to the use of methyl bromide in banana production in Colombia. *Acorbat*, pp. 207–211.
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J.J., Argel, L.E., Uribe-Velez, D., Romero-Tabarez, M., Orduz-Peralta, S., Villegas, V., 2012. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microb. Ecol.* 64, 641–53.

- Chandrashekara, K., Prasannakumar, M., Deepa, M., Vani, A., Khan, A., 2012. Prevalence of races and biotypes of *Ralstonia solanacearum* in India. J. Plant Prot. Res. 52, 1–6.
- Cheng, X., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P., Vater, J., Sussmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R., 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat Biotech. 25, 1007–1014.
- Coutinho, T., 2005. Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. Am. Phytopathol. Soc. 29–38.
- De Oliveira e Silva, S., De Mello Veras, S., Gasparotto, L., Rires de Matos, A., Maciel Cordeiro, J., Boher, B., 2000. Evaluación de *Musa* spp. para la resistencia a la enfermedad de Moko (*Ralstonia solanacearum*, raza 2). INFOMUSA. 9, 19–20.
- Delcambe, L., Peypoux, F., Besson, F., Guinand, M., Michel, G., 1977. Structure of iturin and iturin-like substance. Biochem. Soc. Trans. 5, 1122–1124.
- Denny, T., Brumbley, S., Carney, B., Clough, S., Schell, M.A., 1994. Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function, in: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*, pp. 137–143.
- Denny, T.P., 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Plant-Associated Bact. 573–644.
- Denny, T.P., Hayward, A., 2001. Gram negative bacteria. Am. Phytopathol. Soc. 151–173.
- Denny, T.P., Makini, F.W., Brumbley, S.M., 1988. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants deficient in extracellular polysaccharide. Mol. plant-microbe Interact. 1, 215–223.
- Ding, C., Shen, Q., Zhang, R., Chen, W., 2012. Evaluation of rhizosphere bacteria and derived bio-organic fertilizers as potential biocontrol agents against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato. Plant Soil. 366, 453–466.
- Doornbos, R.F., Loon, L.C., Bakker, P. a. H.M., 2011. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. Agron. Sustain. Dev. 32, 227–243.

- Emmert, E.A.B., Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 1–9.
- Espinal, C., Martínez, H., Peña, Y., 2005. La cadena del banano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica. 1991-2005.
- FAO, 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030.
- FAO, 2004. La economía mundial del banano 1985-2002.
- FAO, 2013. FAO Stats.
- Fisher, S., Sonenshein, A., 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 5, 107–135.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997a. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 26, 251–9.
- Flavier, A.B., Ganova-Raeva, L.M., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997b. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* 179, 7089–97.
- French, E., Gutarra, P., Elphinstone, J., 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* Isolation, identification and maintenance. 1–9.
- Genin, S., Boucher, C., 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 107–34.
- Genin, S., Denny, T.P., 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 67–89.
- Gil, C., Gómez, J., 2011. Evaluación de las cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y actividad antibacteriana contra *Ralstonia solanacearum* de dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* en diferentes medios de cultivo.
- Gómez, A.M., 2011. Transformación del banano en Urabá: experiencias pasadas, iniciativas presentes y nuevas oportunidades de industrialización. EAFIT.

- Gómez, E., 2005. Aislamiento, identificación y caracterización del agente causal del moko del plátano, *Ralstonia solanacearum* Raza 2, proveniente de plantaciones afectadas en Colombia.
- Granada, G., 2003. Manejo integrado del Moko en cultivos de banano y plátano. 6–13.
- Grey, B.E., Steck, T.R., 2001. The Viable But Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Appl. Environ. Microbiol. 67.
- Guo, J.-H., Qi, H.-Y., Guo, Y.-H., Ge, H.-L., Gong, L.-Y., Zhang, L.-X., Sun, P.-H., 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Biol. Control. 29, 66–72.
- Handelsman, J., Stabb, E., 1996. Biocontrol of soilborn plant pathogens. Plant Cell, pp. 1855–1869.
- Hasan, M.M., Bachchu, M.A.A., Bhuyain, M.M.H., Hossain, M.A., 2011. Efficacy of Akanda (*Calotropis gigantea* L.) against some phytopathogenic bacteria. J. Agrofor Env. 5, 15–18.
- Hiddink, G. a., Bruggen, A.H.C., Termorshuizen, A.J., Raaijmakers, J.M., Semenov, A. V., 2005. Effect of organic management of soils on suppressiveness to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and its antagonist, *Pseudomonas fluorescens*. Eur. J. Plant Pathol. 113, 417–435.
- Hoy, E., 2009, January 26. Alerta por bacteria en banano. 8.
- Hu, H.Q., Li, X.S., He, H., 2010. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of Capsicum bacterial wilt. Biol. Control. Elsevier Inc. 54, 359–365.
- Ibrahim, M.A., Metry, E.A., Moustafa, S.A., Tawfik, A.E., El-din, T.M.N., 2005. Morphological and molecular diagnosis of commercial potato cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. Arab J. Biotech. 8, 211–222.
- ICA, 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp.) Medidas para la temporada invernal, pp. 1–51.
- Imazaki, I., Nakaho, K., 2009. Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for detection of *Ralstonia solanacearum*. J. Gen. Plant Pathol. 76, 52–61.

- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P., 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. Appl. Biochem. Biotechnol. Humana Press Inc. 77, 223–233.
- Kay, E., Bertolla, F., Vogel, T.M., Simonet, P., 2002. Opportunistic colonization of *Ralstonia solanacearum*-infected plants by *Acinetobacter* sp. and its natural competence development. Microb. Ecol. 43, 291–7.
- Kloepper, J., 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microb. Ecol. Appl. Agric. Environ. Manag. 255–274.
- Kloepper, J., Rodriguez-Kabana, R., Zehnder, A., Murphy, J., Sikora, E., Fernández, C., 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Australas. Plant Pathol. 28, 21–26.
- Lancaster, S.H., Hollister, E.B., Senseman, S. a, Gentry, T.J., 2010. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. Pest Manag. Sci. 66, 59–64.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., Lemanceau, P., 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. Appl Env. microbiol. 62, 2449–2456.
- Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P., 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. Arch. Microbiol. 186, 475–83.
- Lee, Y.-H., Choi, C.-W., Kim, S.-H., Yun, J.-G., Chang, S.-W., Kim, Y.-S., Hong, J.-K., 2012. Chemical pesticides and plant essential oils for disease control of tomato bacterial wilt. Plant Pathol. J. 28, 32–39.
- Lemessa, F., Zeller, W., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biol. Control. 42, 336–344.
- Li, L., Feng, X., Tang, M., Hao, W., Han, Y., Zhang, G., Wan, S., 2014. Antibacterial activity of Lansiumamide B to tobacco bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Microbiol. Res.

- Martínez, I., Guzmán, M., 2011. Moko o marchitamiento bacteriano del banano y plátano (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et al.*), pp. 1–2.
- Messiha, N. a. S., van Bruggen, a. H.C., Franz, E., Janse, J.D., Schoeman-Weerdesteijn, M.E., Termorshuizen, a. J., van Diepeningen, a. D., 2009. Effects of soil type, management type and soil amendments on the survival of the potato brown rot bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Soil Ecol.* 43, 206–215.
- Milling, A., Meng, F., Denny, T.P., Allen, C., 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology.* 99, 1127–34.
- Milner, J., Martin, D., Smith, A., 1996. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 507–512.
- Montoya, C., 2003. Manejo fitosanitario en plátano y banano.
- Moreira, S., Natsuaki, T., Honjo, H., Fukui, R., 2011. Quick adaptation of *Ralstonia solanacearum* to copper stress to recover culturability and growth in water and soil. *Brazilian J. or Microbiol.* 576–591.
- Mosquera, S., 2013. Desarrollo del proceso productivo del *Bacillus subtilis* EA-CB0015 agente biológico controlador de *Mycosphaerella fijiensis*.
- Nezhad, M.H., Alamshahi, L., Panjehkeh, N., 2012. Biocontrol efficiency of medicinal plants against *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Escherichia coli*. *Open Conf. Proc. J.* 46–51.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M., 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 176–91.
- Niranjan Raj, N., Shetty, H., Reddy, M., 2005. Plant growth promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity, in: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, pp. 197–216.
- Obregón, M., Rodríguez, P., Morales, J., Salazar, M., 2008. Hospedantes de *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano y plátano en Colombia. 61, 4518–4526.
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M., 1992. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett. Springer Netherlands.* 14, 1165–1168.

- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125.
- Owoseni, A., Sangoyomi, T., 2014. Effect of solvent extracts of some plants on *Ralstonia solanacearum*. *Br. Microbiol. Res. J.* 4, 89–96.
- Pal, K.K., Scholar, V., Gardener, B.M., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Heal. Instr.* 1–25.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Lenzen, C., Dierickx, L., Delcambe, L., 1980. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. *J. Antibiot. (Tokyo).* 33, 1146–1149.
- Peypoux, F., Pommier, M., Marion, D., Ptak, M., Michel, G., 1986. Revised structure of mycosubtilin, a lipidolipid antibiotic from *B. subtilis*. *J. Antibiot.* 39, 636–641.
- Pinzón, P., 2010. Determinación de la actividad antimicrobiana de bacterias aeróbicas formadoras de endospora contra *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum*. EAFIT.
- Ploetz, R., Pegg, K., 2000. Fusarium wilt, in: Jones, D. (Ed.), *Diseases of banana, abacá and enset*. CABI, Wallingford, pp. 143–149.
- Pradhanang, P., Elphinstone, J., Fox, R., 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathol.* 49, 414–422.
- Pradhanang, P.M., Momol, M.T., 2001. Survival of *Ralstonia solanacearum* in soil under irrigated rice culture and aquatic weeds. *J. Phytopathol.* 149, 707–711.
- Prior, P., Fegan, M., 2005. Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR. In: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. *Am. Phytopathol. Soc.* 405–414.
- Proexport Colombia, SAC, S. de A. de C., 2012. Sector Agroindustrial Colombiano. 1–16.
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–62.

- Ramesh, R., Joshi, a. a., Ghanekar, M.P., 2008. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). World J. Microbiol. Biotechnol. 25, 47–55.
- Ramírez, C., Kloepper, J., 2010. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. Biol. Fertil. Soils. 46, 835–844.
- Ramírez, M., 2008. Rizobacterias asociadas a crisantemo (*Dendrathera grandiflora* tevelev) con potencial para promover crecimiento vegetal.
- Ramírez, M., 2012. Bacterias asociadas a raíces de Musa spp.: Densidad poblacional y potencial promotor de crecimiento vegetal, p. 137.
- Rogers, H.J., Lomakina, N., Abraham, E.P., 1965. Observations on the structure of bacilysin. Biochem. J. 97, 579–86.
- Sánchez, J., Mira, J., 2013. Principios para la nutrición del cultivo de banano. Medellín, p. 236.
- Schell, M.A., 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu. Rev. Phytopathol. 38, 263–292.
- Scherf, J.M., Milling, A., Allen, C., 2010. Moderate temperature fluctuations rapidly reduce the viability of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in infected geranium, tomato, and potato plants. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7061–7.
- Schonfeld, J., Gelsomino, A., van Overbeek, L.S., Gorissen, A., Smalla, K., van Elsas, J.D., 2003. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. FEMS Microbiol. Ecol. 43, 63–74.
- Scragg, A., 1997. Biotecnología para los ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Limusa (Ed.). Mexico.
- Shoda, M., 2000. Bacterial control of plant diseases. J. Biosci. Bioeng. 89, 515–521.
- Shuller, M., Kargi, F., 1992. Bioprocess Engineering: Basic concepts. Prentice Hall (Ed.), second ed.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56, 845–57.

- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P., Vater, J., 1999. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem. & Biol.* 6, 31–41.
- Stover, R., 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. *Plant Dis.* 64, 750–755.
- Sukanya, S.L., Sudisha, J., Prakash, H.S., Fathima, S.K., 2011. Isolation and characterization of antimicrobial compound from *Chromolaena odorata*. *J. Phytopathol.* 3, 26–32.
- Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang, J., Song, S., Xu, Y., Shen, Q., 2013a. Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. *Pest Manag. Sci.* 69, 1245–52.
- Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., Xu, Y., Shen, Q., 2013b. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Prot. Elsevier Ltd.* 43, 134–140.
- Tans-kersten, J., Huang, H., Allen, C., 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* 183, 3597–3605.
- Van Elsas, J., Duarte, G., Rosado, A., Smalla, K., 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Methods.* 32, 133–154.
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., de Vries, P.M., van Overbeek, L.S., 2001. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* 47, 842–854.
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., van Bekkum, P., van der Wolf, J.M., de Vries, P.M., van Overbeek, L.S., 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the Causative Agent of Potato Brown Rot, in Field and Microcosm Soils in Temperate Climates. *Phytopathology.* 90, 1358–66.
- Van Loon, L., Bakker, P., Pieterse, C., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.

- Van Overbeek, L.S., Bergervoet, J.H.W., Jacobs, F.H.H., van Elsas, J.D., 2004. The Low-Temperature-Induced Viable-But-Nonculturable State Affects the Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. *Phytopathology*. 94, 463–9.
- Vargas-Sánchez, J.E., Galindo-álvarez, J.R., Buitrado-gallego, É., Vargas-sánchez, L.A., 2002. Manejo integrado del moko del plátano en el Quindío-Colombia. 2002.
- Villegas, V., 2012. Identificación y caracterización de extractos bacterianos biológicamente activos contra patógenos de *Musa* sp.
- Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R., Pauli, G., 1997. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*. 289–297.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J.-C., Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P., 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* 6, 961–74.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group. 3, 163–175.
- Yeh, M.-S., Wei, Y.-H., Chang, J.-S., 2005. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnol. Prog.* 21, 1329–34.
- Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S., Zhang, Z., Shen, B., Yang, X., Zhang, R., Huang, Q., Shen, Q., 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil*. 344, 87–97.
- Zhu, Z., Zhang, G., Luo, Y., Ran, W., Shen, Q., 2012. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. *Bioresour. Technol.* Elsevier Ltd. 112, 254–60.