

## DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS Y ESTEQUIOMÉTRICOS DE CRECIMIENTO DEL FITOPATÓGENO *Ralstonia solanacearum* RsJ0314

### DETERMINATION OF GROWTH KINETIC AND STOICHIOMETRIC PARAMETERS OF THE PLANT PATHOGEN *Ralstonia solanacearum* RsJ0314

José L. Mendoza-Porcayo, Elizabeht de la Cruz-Alistac, Julio Cedillo-Bahena, Luis Treviño-Quintanilla, Jesús Hernández-Romano y María I. Chávez-Béjar\*

Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Dirección Académica de la Ingeniería en Biotecnología, Jiutepec, Morelos, México.

\*Autor de correspondencia (mchavez@upemor.edu.mx)

#### RESUMEN

*Ralstonia solanacearum* es una bacteria fitopatógena que provoca marchitez bacteriana en plantas de importancia económica en varias regiones de América. En este estudio se reporta por primera vez la caracterización cinética de la cepa RsJ0314 de *R. solanacearum* aislada en México la cual pertenece al filotipo II. Se evaluaron tres fuentes de carbono que se pueden encontrar en el xilema de la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*). La velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación en glucosa fue 1.9 y 1.8 veces mayor que en sacarosa, mientras que la bacteria no creció en maltosa ni fructosa. Este estudio contribuye al conocimiento de los parámetros cinéticos de crecimiento de *R. solanacearum*, y constituye información necesaria para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas que ayuden al control biológico de esta bacteria. Además, este estudio será la base para comparar el crecimiento con otras cepas de esta especie aisladas en México o en otras partes del continente americano.

**Palabras clave:** *Ralstonia solanacearum*, fuentes de carbono, marchitez bacteriana, velocidad de crecimiento.

#### SUMMARY

*Ralstonia solanacearum* is a phytopathogenic bacterium that causes bacterial wilt disease in economically important plants in several regions of the Americas. This study reports for the first time the kinetic characterization of strain RsJ0314 of *R. solanacearum* isolated in Mexico, which belongs to phylotype II. Three carbon sources that can be found in the xylem of the tomato plant were evaluated. The specific growth rate and doubling time in glucose were 1.9 and 1.8 times higher than in sucrose, while no growth was observed in maltose or fructose. This study contributes to the understanding of the kinetic parameters of growth of *R. solanacearum*, and provides information necessary for the development of biotechnological applications that assist in biological control of this bacterium. In addition, this study will serve as the basis for comparing growth with other strains of this species isolated in Mexico or other parts of the Americas.

**Index words:** *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt disease, carbon sources, growth rate.

#### INTRODUCCIÓN

En México, los ingresos por la producción de tomate ascendieron a \$ 36,508 millones de pesos mexicanos

en el cierre del año 2023 (SIAP, 2024), siendo uno de los principales productos agrícolas de exportación. Diversos agentes patógenos, como hongos, bacterias, insectos y virus afectan los cultivos de tomate, lo cual genera pérdidas económicas importantes. El complejo de especies conocidas como *Ralstonia solanacearum*, RSSC por sus siglas en inglés, es el agente causante de marchitez bacteriana en distintas especies de plantas de importancia económica, tales como berenjena, plátano y tomate. Existen reportes en la literatura relacionados con el aislamiento de *R. solanacearum* en plantas de tomate en varios estados mexicanos como Morelos, Sinaloa, Baja California y Jalisco (Hernández-Romano *et al.*, 2012; Perea *et al.*, 2011); sin embargo, no se conocen las estadísticas del daño ocasionado por esta enfermedad en México. Se estima que esta bacteria es la responsable de la pérdida del 30 al 90% de las cosechas de papa (*Solanum tuberosum*) alrededor del mundo, por lo que está considerada entre los primeros 10 fitopatógenos más peligrosos a nivel mundial (Karim *et al.*, 2018; Yuliar *et al.*, 2015).

Recientemente, las bacterias incluidas dentro del RSSC fueron divididas en tres especies: *R. pseudosolanacearum*, que incluye cepas pertenecientes a los filotipos I y III, cuyo origen geográfico se sitúa en Asia y África; *R. solanacearum*, que incluye especies americanas pertenecientes al filotipo II; finalmente, *R. syzygii*, que abarca las cepas del filotipo IV, cuyo origen se sitúa en Indonesia y Japón (Paudel *et al.*, 2020; Prior *et al.*, 2016).

En nuestro grupo de investigación se han aislado distintos bacteriófagos líticos para ser empleados como agentes antimicrobianos en el combate de *R. solanacearum* (Hernández-Romano *et al.*, 2019), y se prevé que su aplicación en plantaciones de tomate ayudará a prevenir la marchitez bacteriana. En este contexto, la evaluación del efecto protector de los bacteriófagos, así como su aplicación en invernaderos experimentales y comerciales

hace necesario el desarrollo de un bioproceso para lograr la producción de grandes volúmenes de soluciones virales.

Considerando que *R. solanacearum* es el sustrato para llevar a cabo la amplificación viral, en este estudio se aborda la determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de este microorganismo. Los datos generados en este estudio permitirán un mejor entendimiento de la fisiología del fitopatógeno; además, son necesarios en el desarrollo de un bioproceso para la producción de bacteriófagos. En un estudio reciente, se caracterizó el crecimiento de la cepa *R. pseudosolanacearum* GM11000 en diferentes fuentes de carbono (Baroukh *et al.*, 2022), obteniéndose sus parámetros cinéticos, características importantes para entender el crecimiento de la bacteria en el xilema. Existen reportes en los que se empleó una cepa de *R. solanacearum* aislada en Brasil como plataforma para la producción de poli(3-hydroxybutirato); sin embargo, los autores no reportaron los parámetros relativos al crecimiento de esta cepa (Alves *et al.*, 2019). Por lo que se sabe, éste es el primer reporte de parámetros cinéticos y estequiométricos para una cepa de *R. solanacearum* perteneciente al filotipo II aislada en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa RsJ0314 se aisló de plantas de tomate con marchitez bacteriana en el municipio de Jiutepec, Morelos en marzo de 2014. Para mantenimiento de *R. solanacearum* RsJ0314 y la preparación de inóculos se empleó el medio NBYS (peptona de caseína, 5.0 g L<sup>-1</sup>, extracto de carne 3.0 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2.0 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.25 g L<sup>-1</sup>, sacarosa 25 g L<sup>-1</sup>). Para evaluar distintas fuentes de carbono se utilizó un medio mineral (MM) cuya composición fue la siguiente: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g L<sup>-1</sup>, KNO<sub>3</sub> 0.38 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0.1 g L<sup>-1</sup> y CaCl<sub>2</sub> 0.02 g L<sup>-1</sup>. Como únicas fuentes de carbono se emplearon glucosa (MMG), sacarosa (MMS) y maltosa (MMM), y fructosa a una concentración final de 1.0 g L<sup>-1</sup>. Las cinéticas de crecimiento se realizaron en los minibioreactores RTS-1C (Biosan Ltd., RTS-1C, Riga, Letonia), con un volumen de operación de 25 mL. Las condiciones de cultivo fueron 30 °C, 2000 rpm de agitación y *spin* de 1 s<sup>-1</sup>. La Figura 1 muestra los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes para cada fuente de carbono. Para la determinación de la constante de afinidad (K<sub>s</sub>), biomasa en peso seco y el rendimiento biomasa-sustrato (Y<sub>xs</sub>) se realizaron cinéticas en el biorreactor Biostat A (Sartorius, Göttingen, Alemania) con un volumen de operación de 3.0 L. Las condiciones de cultivo fueron 300 rpm, 700 mL min<sup>-1</sup> de aire, 30 °C. La concentración de biomasa de las muestras fue cuantificada determinando la densidad

óptica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) y mediante la determinación del peso seco celular. La concentración de glucosa residual se cuantificó por medio de un glucómetro (Countour TS, Bayer, Mishawaka, Indiana, Estados Unidos). En la Figura 2 se muestra el promedio y la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Para comparar cuantitativamente el crecimiento en las distintas fuentes de carbono se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) con la siguiente ecuación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Donde  $t$  es el tiempo y  $x$  la concentración celular. El tiempo de duración de la fase lag ( $t_l$ ) y la biomasa máxima ( $X_m$ ) fueron estimados con el apoyo del programa GraphPad Prism 9.0 y la ecuación de Gompertz, la cual se muestra a continuación:

$$x = x_m \times \left( \frac{x_0}{x_m} \right) \times (e^{-t/x})$$

Donde  $x_0$  representa la biomasa inicial.

Para la determinación de la constante de afinidad ( $k_s$ ) se usó una linealización de la ecuación de crecimiento de Monod:

$$\frac{s_p}{\mu} = \frac{k_s}{\mu_m} + \frac{s_p}{\mu_m}$$

Donde  $s_p$  es la concentración promedio de la fuente de carbono.

Con los parámetros obtenidos de las cinéticas de crecimiento (Cuadro 1) se realizó análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , además de la prueba de Fisher con un intervalo de confianza del 95 %. Ambos análisis se realizaron con el apoyo del programa Minitab 21.3.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se caracterizó la cepa de *R. solanacearum* RsJ0314, perteneciente al filotipo II. Los parámetros de crecimiento calculados para esta cepa (Cuadro 1) se compararon con *R. pseudosolanacearum* GM11000 que pertenece al complejo de especies RSSC (Baroukh *et al.*, 2022). El primer grupo de experimentos se inició con la caracterización de *R. solanacearum* RsJ0314 en medio NBYS, ya que fue el medio de cultivo empleado para la preparación de inóculos y mantenimiento de la cepa (Figura 1, Cuadro 1). La  $\mu$  en el medio NBYS fue de  $0.42 \pm 0.05$  h<sup>-1</sup>, 2.3 veces superior en comparación con el medio MMG. La concentración celular máxima alcanzada en

NBYS fue similar al MMS; sin embargo, el valor del  $t_L$  en el medio NBYS fue mayor en comparación con los medios minerales. El medio mineral con sacarosa, glucosa, maltosa y fructosa mostró claras diferencias en el crecimiento de *R. solanacearum* RsJ0314. La  $\mu$  en glucosa como única fuente de carbono fue de  $0.15 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ , 1.9 veces superior a la  $\mu$  en sacarosa, mientras que el  $t_d$  fue 1.8 veces superior en glucosa que en sacarosa. Este patrón coincide con los

reportes de que la cepa *R. pseudosolanacearum* GM11000, que tiene una  $\mu$  en glucosa, es seis veces superior que en sacarosa (Baroukh *et al.*, 2022). Una posible razón para explicar que la velocidad de crecimiento en glucosa sea mayor que en sacarosa se apoya en un reporte reciente en el que se demostró que las cepas pertenecientes a RSCC emplean principalmente la vía de Entner-Doudoroff (ED) para oxidar la glucosa, ya que carecen del gen *pfk-1*,

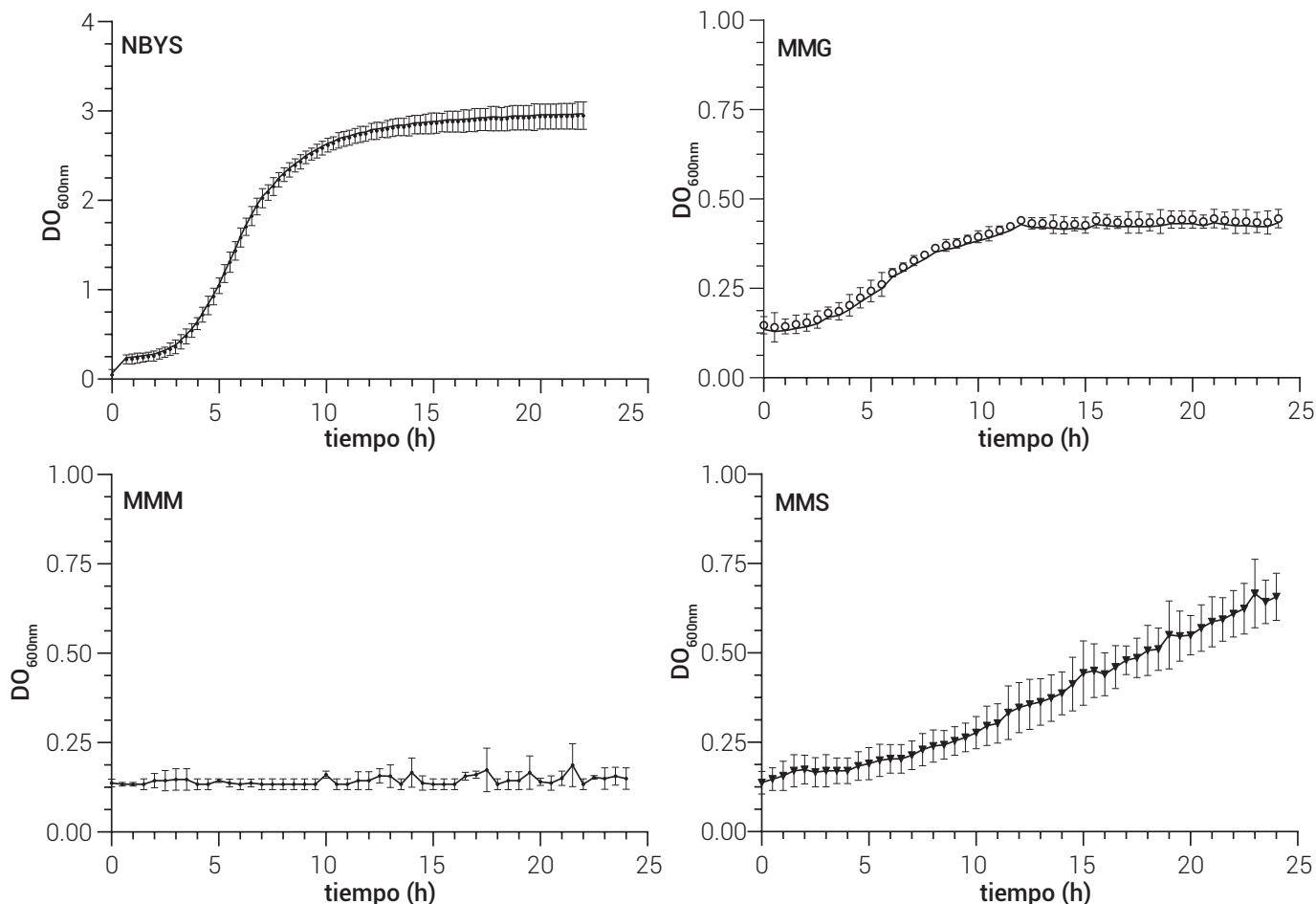


Figura 1. Crecimiento de *R. solanacearum* en distintas fuentes de carbono. NBYS: medio NBY con sacarosa, MMG: medio mineral con glucosa, MMM: medio mineral con maltosa, MMS: medio mineral con sacarosa. Los resultados mostrados son el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Cuadro 1. Parámetros de crecimiento de *R. solanacearum* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d \text{ (h)}$	$t_L \text{ (h)}$	$X_{m\acute{a}x} \text{ (DO}_{600\text{nm}}\text{)}$
NBYS	$0.42 \pm 0.05^a$	$1.42 \pm 0.16^a$	$0.41 \pm 0.04^a$	$2.91 \pm 0.13^a$
MMG	$0.15 \pm 0.03^b$	$4.65 \pm 0.79^b$	$0.22 \pm 0.01^b$	$0.45 \pm 0.02^b$
MMS	$0.08 \pm 0.01^b$	$8.29 \pm 0.70^c$	$0.03 \pm 0.00^c$	$3.02 \pm 0.75^a$

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento,  $t_d$ : tiempo de duplicación,  $t_L$ : tiempo de duración de la fase lag,  $X_{m\acute{a}x}$ : biomasa máxima en  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ . Existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias que tienen distintas letras (a, b, c) en cada columna.

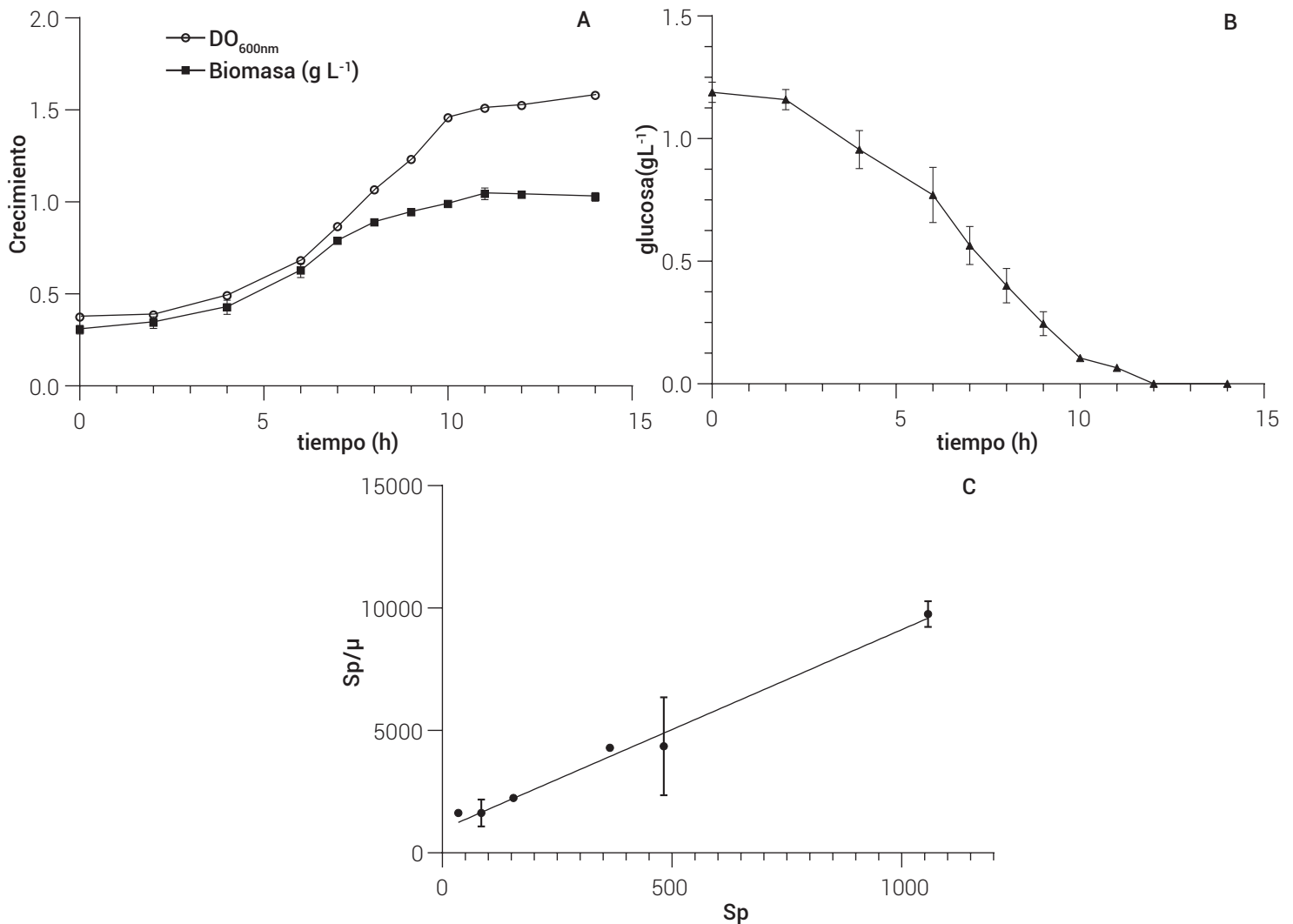


Figura 2. Crecimiento de la cepa RsJ0314 en cultivo por lote a un volumen de operación de 3.0 L. [A] Perfil de crecimiento en mg L<sup>-1</sup> y DO<sub>600nm</sub>, [B] consumo de sustrato (mg L<sup>-1</sup>). [C] Diagrama de Langmuir para el cálculo de K<sub>s</sub>. La ecuación de la recta es  $y = 9.155x + 960.2$  con una R<sup>2</sup> = 0.9389. En los gráficos se muestran el promedio y la desviación estándar de los datos obtenidos de dos experimentos independientes.

que codifica para la fosfofructoquinasa; además, en este estudio se demostró que estas cepas no tienen el gen *gnd* (que codifica para la fosfogluconato deshidrogenasa), por lo que solamente emplean el brazo no oxidativo de la vía de las pentosas para metabolizar algunos azúcares y reciclarlos a glucosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, lo cual también tendría implicaciones en la velocidad de crecimiento en sacarosa (Jyoti *et al.*, 2020). Finalmente, en otro estudio se sugiere que la vía de ED es termodinámicamente más favorable que la glucólisis (Flamholz *et al.*, 2013). Por otra parte, se generó una concentración de células 6.7 veces superior en sacarosa en comparación con la glucosa (Cuadro 1), lo cual pudiera deberse a que la sacarosa es un disacárido que, para

metabolizarse, se descompone en glucosa y fructosa, lo que representa una mayor cantidad de carbono disponible para el crecimiento.

Por otro lado, no se observó crecimiento con maltosa como única fuente de carbono, lo cual fue un resultado esperado en las cepas que pertenecen al filotipo II, como *R. solanacearum* RsJ0314; así mismo, no se observó crecimiento en MM con fructosa (datos no mostrados), en comparación con la cepa GMI1000 que sí crece en esta fuente de carbono (Baroukh *et al.*, 2022). Las razones por las cuales *R. solanacearum* RsJ0314 no creció con fructosa como única fuente de carbono aún deben determinarse, sin embargo, se tiene la hipótesis que ante

la posible ausencia de los genes *pfk-1* y *gnd*, se requiera de la presencia de otra fuente de carbono, como la glucosa, para que la bacteria crezca.

Para determinar el rendimiento biomasa-sustrato, la velocidad de consumo de sustrato y la  $k_s$  de *R. solanacearum* RsJ0314 fue necesario realizar los experimentos en un biorreactor con un mayor volumen. Se eligió la glucosa porque es fuente de carbono con un  $\mu$  y  $t_d$  mayores que en sacarosa, lo que podría acortar los tiempos del proceso. Los perfiles de crecimiento y consumo de sustrato se muestran en la Figura 2. La  $\mu$  fue de  $0.15 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ , el rendimiento fue de  $0.61 \pm 0.02 \text{ g biomasa g}^{-1} \text{ glucosa}$  ( $Y_x$ ), la velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_s$ ) fue de  $0.28 \pm 0.02 \text{ g glucosa g}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$ .

En el caso de la cepa *R. pseudosolanacearum* GM1000, en condiciones similares de crecimiento, se reportó que tenía un  $\mu$  de  $0.23 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y_x$  de  $0.45 \text{ g glucosa g}^{-1} \text{ biomasa}$ , y una  $q_s$  igual a  $0.5 \text{ g glucosa g}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$  (Baroukh *et al.*, 2022) que son datos similares a los de RsJ0314. Con el apoyo del diagrama de Langmuir se determinó que la  $K_s$  de *R. solanacearum* RsJ0314 tiene valor de  $117 \pm 88 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 2), que es un valor que no había sido reportado previamente para esta bacteria.

Los datos obtenidos en este estudio coinciden con otros reportes en que la glucosa es una de las fuentes de carbono preferidas para *R. solanacearum*, y que la sacarosa es muy importante en la colonización de la planta y la virulencia (Hamilton *et al.*, 2021; Lowe-Power *et al.*, 2018). Por lo anterior, ambas fuentes de carbono podrían ser usadas para el crecimiento de esta bacteria en un proceso biotecnológico.

Finalmente, es importante resaltar que ésta es la primera vez que se reportan los parámetros cinéticos y estequiométricos para una cepa de *R. solanacearum* perteneciente al filotipo II, de tal manera que este estudio contribuye al conocimiento que se tiene del fitopatógeno, además de ser una base para comparar las variaciones fenotípicas que puedan existir entre las cepas americanas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas de maestría.

## BIBLIOGRAFÍA

Alves M. I., K. L. Macagnan, C. R. Piecha, M. M. Torres, I. A. Perez, S. M. Kesslerlingh, ... and A. S. Moreira (2019) Optimization of *Ralstonia*

*solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for P(3HB) production: effect of agitation and aeration. *PLoS ONE* 14:e0211211, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211211>

- Baroukh C., M. Zemouri and S. Genin (2022) Trophic preferences of the pathogen *Ralstonia solanacearum* and consequences on its growth in xylem sap. *Microbiology Open* 11:e1240, <https://doi.org/10.1002/mbo3.1240>
- Flamholz A., E. Noor, A. Bar-Even, W. Liebermeister and R. Milo (2013) Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:10039-10044, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215283110>
- Hamilton C. D., O. R. Steidl, A. M. Macintyre, C. N. Hendrich and C. Allen (2021) *Ralstonia solanacearum* depends on catabolism of myo-inositol, sucrose, and trehalose for virulence in an infection stage-dependent manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34:669-679, <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-20-0298-R>
- Hernández-Romano J., S. Ramírez-Rojas and C. J. Ydrac-Morales (2012) First report of *Ralstonia solanacearum* causing tomato bacterial wilt in Mexico. *New Disease Reports* 26:22, <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.026.022>
- Hernández-Romano J., L. A. Mastache-Estrada, D. A. Molina-Sánchez, R. Serrano-Plancarte, C. Peña-Barrera, M. I. Chávez-Bejar, ... y A. N. Lecona-Valera (2019) Estabilidad y capacidad inhibitoria del bacteriófago  $\Phi$ RSP, agente potencial para el biocontrol de *Ralstonia solanacearum*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:13-19, <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.1.13>
- Jyoti P., M. Shree, C. Joshi, T. Prakash, S. K. Ray, S. S. Satapathy and S. K. Masakapalli (2020) The Entner-Doudoroff and nonoxidative pentose phosphate pathway bypass glycolysis and the oxidative pentose phosphate pathway in *Ralstonia solanacearum*. *mSystems* 5:e00091-20, <https://doi.org/10.1128/mSystems.00091-20>
- Karim Z. and M. S. Hossain (2018) Management of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato: focus on natural bioactive compounds. *Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management* 4:73-92, <https://doi.org/10.3329/jbcbm.v4i1.37879>
- Lowe-Power T. M., G. C. Hendrich, E. Roepenack-Lahaye, B. Li, D. Wu, R. Mitra, ... and C. Allen (2018) Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environmental Microbiology* 20:1330-1349, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14020>
- Paudel S., S. Dobhal, A. M. Alvarez and M. Arif (2020) Taxonomy and phylogenetic research of *Ralstonia solanacearum* species complex: a complex pathogen with extraordinary economic consequences. *Pathogens* 9:886, <https://doi.org/10.3390/pathogens9110886>
- Perea S. J. M., R. S. García E., R. Allende M., J. A. Carrillo F., J. León F., B. Valdez T. y F. S. M. López S. (2011) Identificación de razas y biovars de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:98-108.
- Prior P., F. Ailloud, B. L. Dalsing, B. Remenant, B. Sanchez and C. Allen (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:90, <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2024) Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Agosto 2024)
- Yuliar, Y. N. Nion and K. Toyota (2015) Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments* 30:1-11, <https://doi.org/10.1264/jmse2.ME14144>