

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Caracterización de compuestos orgánicos volátiles producidos durante las fases de crecimiento de *Kosakonia cowanii* y su uso potencial para inhibir el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*

Tesis

Como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Lic. en Biol. Yoali Fernanda Hernández Gómez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2025

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



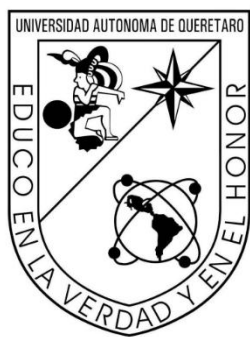
**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Caracterización de compuestos orgánicos volátiles producidos durante las fases de crecimiento de *Kosakonia cowanii* y su uso potencial para inhibir el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*.

Tesis

Como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Lic. en Biol. Yoali Fernanda Hernández Gómez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Juan Campos Guillén

Presidente

Dr. Miguel Angel Ramos López

Secretario

Dr. Víctor Pérez Moreno

Vocal

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

Suplente

Dr. José Alberto Rodríguez Morales

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto 2025

México

## DEDICATORIAS

Dedico con todo mi amor y cariño esta tesis a:

Mi familia: Ustedes saben que son mi motor diario, que cada uno de mis logros, esfuerzos, derrotas y alegrías les pertenece. Su amor es el regalo más puro, sincero, incomparable e irremplazable que algún ser humano podría imaginar. No tengo duda alguna al decir que son la definición de amor verdadero. Esta investigación es completamente suya: Mamá, David y Amelie.

A Luis, por escuchar cada una de mis discusiones internas y externas, y por ayudarme —con paciencia infinita— a llegar a conclusiones objetivas... y no solo me refiero a la tesis.

A mi profesor, quien nos enseñó a descubrir con pasión y a asombrarnos cada día con el poder de la ciencia. Gracias por despertar en mí esa mirada curiosa y comprometida.

Y a Jacqueline, porque juntas convertimos en realidad nuestros sueños y metas. Eres el complemento perfecto en este viaje.

Gracias a todos por formar parte de cada aspecto de lo que soy, y de todo lo que aún me falta por ser.

Con profundo cariño,  
Yoali

## AGRADECIMIENTOS

Qué difícil es agradecer tantas cosas que me han sido brindadas a lo largo de este proyecto de investigación. Es claro que este pequeño espacio nunca será suficiente para expresar todo lo que deseo; sin embargo, trataré de ser breve y concisa.

Quiero agradecer a mi director, Dr. Juan Campos Guillén, quien me brindó un sinfín de enseñanzas, no solo para mi investigación, sino también para la ciencia en sí. Gracias a usted aprendí a ser objetiva, observadora, crítica, creativa (o al menos hago el esfuerzo constante), y, sobre todo, a mantener la curiosidad por cada detalle. Gracias por su paciencia y por concederme ser parte del asombro diario que se vive en el laboratorio.

A mi amiga Jacqueline, gracias por tu tolerancia ante mis necesidades, por escucharme cuando más lo necesitaba y por acompañarme en cada experimento. Sin duda, compartimos memorias inquebrantables.

Gracias a mi hermanita, Amelie, quien me acompañó en cada noche de desvelo escribiendo la tesis, escuchando las incoherencias que vociferaba mientras intentaba entender los resultados... Lamento pensar en voz alta. Sin duda hiciste que esta etapa fuera más llevadera: caímos juntas en la locura escolar.

Gracias a mi hermano, David, por estar siempre dispuesto a escucharme y darme ánimos. Los momentos contigo me ayudaban a recuperar la energía para seguir adelante.

Agradezco profundamente a Luis, por ser mi soporte cuando creía que no podría continuar, cuando las inseguridades y los miedos me rebasaban. Siempre tuviste la empatía para escuchar mi verborrea de incertidumbre; aun no entiendo cómo siempre encuentras las palabras exactas para calmar mi mente.

Y a mi vida entera, mi madre, quien me ha enseñado lo que significan la paciencia, la perseverancia, la disciplina y, sobre todo, el amor. Sin tu infinito apoyo y tu fe en mí, jamás habría llegado hasta aquí. Gracias por amarme más de lo que podría merecer; sin duda, soy yo quien está más agradecida por tenerte en mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Uso de plaguicidas y contaminación.....	3
2.2 Microorganismos fitopatógenos.....	5
2.2.1 Hongos fitopatógenos.....	6
2.2.2 <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	8
2.3 Control de fitopatógenos.....	12
2.3.1 Uso de microorganismos para control biológico .....	13
2.4 Compuestos orgánicos volátiles .....	14
2.4.1 COV's en microorganismos.....	15
2.4.2 Propiedades antifúngicas de los COV's .....	16
2.5 Sinergismo en COV's y microorganismos .....	18
2.6 <i>Kosakonia cowanii</i> .....	20
2.7 Dinámica de COV's en diferentes fases de crecimiento microbiano.....	22
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS</b> .....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	26
5.1 Crecimiento de <i>Kosakonia cowanii</i> .....	26
5.2 Material fúngico .....	26
5.3 Evaluación de actividad antifúngica de <i>Kosakonia cowanii in vitro</i> .....	26
5.4 Análisis de crecimiento de <i>Kosakonia cowanii</i> .....	27
5.5 Identificación del perfil de los COV's mayoritarios pertenecientes a <i>Kosakonia cowanii</i> durante sus fases de crecimiento. ....	28

5.6 Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los COV's mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento de <i>Kosakonia cwanii</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i> .	29
5.7 Evaluación de cinéticas de competencia de colonización en frutos de <i>Capsicum annuum</i> L. entre <i>Kosakonia cwanii</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i> para determinar la participación de COV's.	30
5.8 Diseño experimental y análisis estadístico	32
<b>6. RESULTADOS</b>	34
6.1 Evaluación de actividad antifúngica de <i>Kosakonia cwanii in vitro</i>	34
6.2 Análisis de la producción de COV's y crecimiento de <i>Kosakonia cwanii</i>	36
6.3 Identificación del perfil de los COV's mayoritarios pertenecientes a <i>Kosakonia cwanii</i> durante sus fases de crecimiento.	37
6.4 Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los COV's mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento de <i>Kosakonia cwanii</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i> .	40
6.5 Evaluación de cinéticas de competencia de colonización en frutos de <i>Capsicum annuum</i> L. entre <i>Kosakonia cwanii</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i> para determinar la participación de COV's.	42
<b>7. DISCUSIÓN</b>	49
7.1 Identificación del perfil de los COV's mayoritarios pertenecientes a <i>Kosakonia cwanii</i> durante sus fases de crecimiento	49
7.2 Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los COV's mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento de <i>Kosakonia cwanii</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i> .	51
7.4 Evaluación de cinéticas de competencia de colonización en frutos de <i>Capsicum annuum</i> L. entre <i>Kosakonia cwanii</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i> para determinar la participación de COV's.	55
<b>8. CONCLUSIONES</b>	59
<b>9. REFERENCIAS</b>	61
<b>10. ANEXOS</b>	77

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Cultivos infectados por <i>Sclerotium rolfsii</i> y síntomas que presentan .....	11
2. COV's con actividad antifúngica y algunos de los organismos de los cuales fueron identificados.....	18
3. COV's mayoritarios en cada fase de crecimiento según su área de porcentaje relativa.....	37



## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Infección de <i>Sclerotium rolfsii</i> en <i>Capsicum annuum</i> L.....	9
2. Formación de esclerocios por <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	10
3. Cambios morfológicos y fisiológicos en hongos fitopatógenos causados por COV's.....	17
4. Ensayo de actividad antifúngica de <i>Kosakonia cowanii</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	34
5. Dinámica de crecimiento de <i>Kosakonia cowanii</i> .....	36
6. COV's mayoritarios producidos por <i>Kosakonia cowanii</i> durante sus fases de crecimiento.....	38
7. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> por COV's estándar y su efecto en interacción con <i>Kosakonia cowanii</i> .....	40
8. Efecto en el crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> en presencia de COV's.....	41
9. Evaluación de la inhibición de <i>Sclerotium rolfsii</i> en frutos de <i>Capsicum annuum</i> L. mediante la aplicación de <i>Kosakonia cowanii</i> y sus compuestos orgánicos volátiles (COV's).....	42
10. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) de <i>Kosakonia cowanii</i> sobre la infección en frutos de chile inoculados con <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	43
11. Porcentaje de inhibición de <i>Sclerotium rolfsii</i> en respuesta a los tratamientos con cultivo y filtrados de <i>Kosakonia cowanii</i> .....	44
12. Porcentaje de inhibición de <i>Sclerotium rolfsii</i> en presencia de compuestos volátiles (COV's) individuales.....	46

## RESUMEN

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica representan una de las principales problemáticas en el sector agrícola. El uso de plaguicidas sintéticos para controlar fitopatógenos genera serios problemas ambientales, por lo que encontrar alternativas es clave para disminuir su impacto. Se ha demostrado que el control biológico a partir de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) producidos por microorganismos es una opción eficaz y sostenible para combatir plagas que afecten los cultivos. *Kosakonia cowanii* ha demostrado capacidad antagonista frente a ciertos microorganismos mediante la producción de COV's, aunque la dinámica de su perfil metabólico en las distintas fases de crecimiento no ha sido caracterizada. Conocer esta variación permitiría identificar los compuestos con mayor potencial para inhibir a *Sclerotium rolfsii*, un fitopatógeno de alta relevancia. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la composición de los COV's durante las fases de crecimiento de *K. cowanii* y evaluar su efecto antifúngico. Primero, se identificaron los COV's producidos por *K. cowanii* durante sus fases de adaptación, exponencial y estacionaria. También se cuantificó el efecto de los COV's contra *S. rolfsii* a partir del crecimiento radial. Para analizar la interacción sinérgica se colocaron los COV's mayoritarios en conjunto con la bacteria y se midió el radio de crecimiento del fitopatógeno. Los resultados muestran metabolitos clave en cada fase de crecimiento: benzaldehído y ciclododecano en la fase lag; acetoína y 2,5-dimetil-pirazina en la fase exponencial; y etanol en la fase estacionaria. Estos compuestos mostraron propiedades antifúngicas variables, destacando su capacidad para inhibir el crecimiento radial del hongo en ensayos in vitro e in vivo. Además, algunos COVs, como el 2,5-dimetil-pirazina y etanol, potencian su capacidad inhibitoria al tener una interacción con la bacteria. Esta investigación proporciona un mejor entendimiento en las interacciones de los COV's y los microorganismos, brindando una perspectiva para el desarrollo de tratamientos.

Palabras clave: *Kosakonia cowanii*, Fitopatógenos, COV, inhibición, interacción.

## ABSTRACT

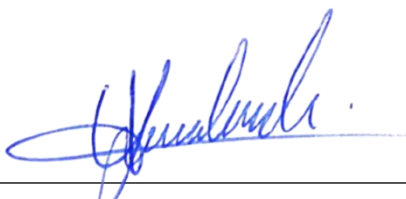
Diseases caused by phytopathogenic fungi in economically important crops represent one of the main challenges in the agricultural sector. The use of synthetic pesticides to control phytopathogens generates serious environmental problems; therefore, finding alternative strategies is key to reducing their impact. Biological control through volatile organic compounds (VOCs) produced by microorganisms has been shown to be an effective and sustainable option to combat crop-affecting pests. *Kosakonia cowanii* has demonstrated antagonistic activity against certain microorganisms through the production of VOCs, although the dynamics of its metabolic profile across different growth phases have not yet been characterized. Understanding this variation would allow the identification of compounds with the greatest potential to inhibit *Sclerotium rolfsii*, a highly relevant phytopathogen. Therefore, the objective of this study was to determine the composition of VOCs during the growth phases of *K. cowanii* and evaluate their antifungal effect. First, VOCs produced by *K. cowanii* during the lag, exponential, and stationary phases were identified. The effect of these VOCs against *S. rolfsii* was then quantified based on radial growth measurements. To analyze synergistic interactions, the major VOCs were tested in combination with the bacterium, and the radial growth of the phytopathogen was measured. The results revealed key metabolites in each growth phase: benzaldehyde and cyclododecane in the lag phase; acetoin and 2,5-dimethylpyrazine in the exponential phase; and ethanol in the stationary phase. These compounds exhibited varying antifungal properties, with notable inhibition of fungal radial growth in both in vitro and in vivo assays. Moreover, certain VOCs, such as 2,5-dimethylpyrazine and ethanol, enhanced their inhibitory capacity when interacting with the bacterium. This research provides a deeper understanding of VOC–microorganism interactions, offering insight for the development of biological treatments.

**Keywords:** *Kosakonia cowanii*, phytopathogens, VOCs, inhibition, interaction.

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y reporto detalles necesarios para que los resultados de esta investigación sean reproducibles a futuro.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual declaro y doy reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



---

Yoali Fernanda Hernández Gómez

## 1. INTRODUCCIÓN

El daño ambiental y los riesgos que implican a la salud los plaguicidas químicos sintéticos ha sido bien documentado en las últimas décadas, a pesar de ello este tipo de químicos sigue siendo utilizado en gran medida como técnica de conservación postcosechas debido a los altos niveles de demanda alimenticia en todo el mundo por el aumento exponencial de la población.

Algunos de los factores más comunes en la pérdida de la cosecha y postcosecha son las infecciones fúngicas que se presentan en los cultivos, como resultado se ve afectada la calidad y la composición de los nutrientes. Por otro lado, los esfuerzos continuos por la preservación de los cultivos incrementan de manera desmedida los valores en los mercados, siendo un problema en países con recursos limitados, los cuales requieren alimentos con mayor calidad nutricional.

La agricultura en México genera un Producto Interno Bruto (PIB) alto (aproximadamente 675 656 millones de pesos mexicanos anualmente), por ende, es un importante sector dentro de la economía nacional. Anualmente producimos millones de toneladas de cultivos de gran importancia mundial como: la caña de azúcar, maíz, cebada, chile, entre otros. Como consecuencia, este sector es el principal sustento económico en muchos estados, no obstante, los métodos convencionales de siembra son insuficientes para la población y se ve aún más perjudicado por la presencia de enfermedades causados por microorganismos fitopatógenos.

El desarrollo de alternativas para la conservación postcosecha es clave para los agricultores en la actualidad, pues brinda oportunidades sustentables que permite disminuir las pérdidas económicas. Además, implementar estrategias que logren un menor impacto ambiental ayuda a contribuir de manera significativa a la reducción de gases de efecto invernadero, producto de la contaminación causada por algunos fungicidas.

El control biológico es una opción eficaz y sostenible para las enfermedades o plagas que pueden llegar a presentar los cultivos, sin embargo, aún existe una gran variedad de elementos o compuestos naturales desconocidos, razón por la cual también lo son aquellos que pueden tener propiedades relacionadas con el control de enfermedades por microorganismos fitopatógenos.

Los compuestos orgánicos volátiles (COV's) desempeñan un papel crucial en el biocontrol de plagas. Su importancia radica en su capacidad para comunicar información química y desencadenar respuestas biológicas específicas, las cuales pueden estar directamente relacionadas con la competencia por el espacio y nutrientes entre los diferentes organismos. Los COV's microbianos provocan cambios moleculares y fisiológicos en hongos fitopatógenos, por ejemplo, la vacuolización, ruptura de hifas fúngicas y desregulación del metabolismo, logrando inhibir su crecimiento.

*Kosakonia cowanii* es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteraceae que se encuentra asociada a microbiomas de plantas, dándole características de bacteria promotora de crecimiento vegetal. Recientemente se registró su capacidad para inhibir el crecimiento *Alternaria alternata*, además de la identificación de sus COV's, sin embargo, aún no existen estudios en los cambios de la composición y abundancia de su volatiloma en distintas fases de crecimiento, así como tampoco de la dinámica de su metabolismo al interactuar con dichos metabolitos.

El propósito de esta investigación es proporcionar un mejor entendimiento en las interacciones entre los COV's y *Kosakonia cowanii* para la inhibición de hongos fitopatógenos de importancia agrícola, mostrando las posibles interacciones y los diferentes mecanismos bioquímicos involucrados en el proceso, brindando así nuevas perspectivas para los futuros tratamientos antifúngicos con un menor impacto ambiental.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Uso de plaguicidas y contaminación

Los plaguicidas son productos utilizados con propósitos fungicidas, insecticidas, herbicidas y de regulación en el crecimiento vegetal para el control de enfermedades originadas por plagas que afectan la producción agrícola o la salud de humanos. Se estima que 370 mil toneladas de residuos de plaguicidas llegan a ecosistemas ajenos a los campos de cultivos debido a escorrentías, derivas aéreas o fumigaciones excesivas que causan una alteración en los ciclos bioquímicos naturales (Bharagava & Chowdhary, 2019).

Uno de los principales plaguicidas utilizados en el siglo XX fue el diclorodifeniltricloroetano (DDT). Se calcula que su degradación en el suelo tarda entre 4 y 30 años, mientras que otros como los ACO clorados pueden tardar más años en culminar su proceso. Esto se debe principalmente a su poca capacidad física, química y biológica de degradarse en el medio ambiente, ocasionando que los humanos y los animales se encuentren expuestos a los efectos nocivos de estos microcontaminantes al comer alimentos en contacto con agua o suelos contaminados (Saka et al., 2023).

A partir del uso de estos plaguicidas se generó la necesidad de crear más de estas sustancias químicas que permitieran cubrir las mismas necesidades, pero sin afectar gravemente la integridad ambiental, sin embargo, los continuos esfuerzos resultan en compuestos que son actualizados periódicamente, complicando el análisis y la elaboración de métodos descontaminantes. Se estima que el promedio anual de plaguicidas agrícolas durante los años 2013 y 2017 fue de  $353 \times 10^6$  kg, de los cuales se encuentran representados aproximadamente 438 plaguicidas de uso comercial. De este promedio el 88 % se atribuyó al uso de herbicidas y el 6 % a los insecticidas y fungicidas (Meyer et al., 2009).

De igual forma, en un estudio realizado por Stackpoole et al. (2021) se monitoreó la presencia de plaguicidas en diferentes regiones de Estados Unidos de América, con el propósito de analizar si eran utilizados diferentes tipos dependiendo de la cosecha y zona. Los resultados mostraron diferentes incidencias, sin embargo, todos contaban con el mismo nivel de toxicidad. Los compuestos químicos que fueron detectados mayormente son el glifosato e imidacloprid.

El glifosato es un compuesto organofosforado utilizado ampliamente en los plaguicidas, ya que su estructura química permite la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que le brinda características herbicidas. Durante el año 2017, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) clasificó a este compuesto químico como cancerígeno en humanos. En las últimas décadas se proveen distintas pruebas de los efectos resultantes del uso de plaguicidas a base de glifosato, por ejemplo, el aumento de estrés oxidativo, la alteración de la vía de los estrógenos, el deterioro de funciones cerebrales y la correlación de algunos cánceres (Peillex & Pelletier, 2020).

Por otro lado, el imidacloprid ha demostrado ser un contaminante importante para los ecosistemas acuáticos, especialmente para los artrópodos, afectando directamente los receptores de acetilcolina. A pesar de tener una función insecticida, este químico ingresa a los cuerpos de agua a través del aire y la escorrentía agrícola, afectando la diversidad de arácnidos y hexápodos, teniendo consecuencias directas en las redes tróficas (Merga & Van den Brink, 2021).

El clorotalonil es el segundo fungicida más utilizado en los campos agrícolas (Estrada-Gamboa et al., 2023). Acquaroni et al. (2021) demostró que los compuestos químicos de este producto afectan directamente en los diferentes estadios de *Rhinella arenarum* (sapo grande), exhibiendo efectos en el desarrollo de los embriones y la larva, cambios conductuales, menor capacidad de flexión en la cola y mutaciones genéticas. Este anfibio es nativo de Sudamérica, específicamente de Argentina, por lo que la pérdida de su población representa un grave problema en las comunidades que integran su nicho ecológico.



La composición de estas sustancias tiene consecuencias indirectas en organismos no objetivo, afectando la homeostasis y regulación en procesos básicos para su supervivencia, principalmente en funciones endocrinas, reproductivas e inmunológicas. Por otro lado, el uso excesivo de estos químicos genera poblaciones resistentes, propiciando un consumo elevado que conlleva a agudizar la problemática. La compactación del suelo y la contaminación del agua son algunos de los factores en los que se observa un impacto nocivo por parte de los contaminantes, siendo los plaguicidas las principales fuentes (Rodríguez-Aguilar et al.,2022).

Los ecosistemas acuáticos cuentan con la capacidad de diluir algunos contaminantes por si solos, no obstante, las altas concentraciones de estos han incrementado durante los últimos años, siendo letal para la flora y fauna. La toxicidad de los plaguicidas dentro de los cuerpos de agua depende de varios factores, especialmente si se estudia en un organismo en particular, sin embargo, hasta una cantidad muy pequeña puede llegar a ser letal, incluso en los distintos tiempos de exposición (Muskan-Singhal et al.,2021).

## 2.2 Microorganismos fitopatógenos

Los microorganismos fitopatógenos son responsables de pérdidas significativas en la agricultura. Se estima que aproximadamente 40 % de la producción agrícola es perdida anualmente debido a alguna enfermedad fitopatógena (Agrosemex, 2019).

Existen diversos mecanismos por los cuáles estos fitopatógenos son capaces de afectar exitosamente los cultivos, los cuales se encuentran relacionados directamente con el organismo patógeno, por ejemplo, la capacidad de eludir o subvertir las defensas del huésped. Uno de los mecanismos más exitosos en la infección son las fitotoxinas, las cuales son producidas por agentes bacterianos como *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* spp. y *Candidatus Liberibacter* spp., mencionando algunos ejemplos. Por otro lado, existen hongos fitopatógenos que afectan a las plantas por medio de micotoxinas, por ejemplo,

*Alternaria alternata*, *Botritis cinérea*, *Cochliobolus spp.*, *Fusarium spp.*, *Magnaporthe spp.* y *Penicillium spp.* (Pontes et al., 2020).

La interacción de los patógenos con su huésped es ligada a la función de los factores de virulencia con los que cuentan los microorganismos. Estos actúan como señales químicas o bioquímicas que interfieren directamente con el metabolismo del huésped, principalmente la expresión de genes y proteínas, secreción de carbohidratos, tasa fotosintética y valores de pH, lo que puede causar muerte celular o necrosis. En algunos casos, estas interacciones pueden ser asintomáticas, es decir, sin el desarrollo de enfermedades, esto debido a la resistencia de las plantas y estrategias de microorganismos que pueden cohabitar con el entorno del huésped (Kosakivska, 2008).

Como se mencionó anteriormente, existen diversos microorganismos que pueden causar enfermedades en las plantas, entre los cuales se encuentran los virus, bacterias y hongos, siendo estos últimos aquellos que tienen mayor impacto en el desarrollo de fitopatologías. Cada uno de estos grupos cuentan con estrategias específicas para el desarrollo de una infección en cualquier tejido de la planta, además de una estructura particular y compleja, por lo que encontrar métodos en común para erradicarlos suele ser complejo (Chen et al., 2019).

### 2.2.1 Hongos fitopatógenos

Las enfermedades en los cultivos provocan pérdidas anuales del 10 al 15 %, transformándose en un valor monetario de hasta miles de millones de dólares. Los patógenos que tienen mayor relevancia en la producción son aquellos que son transmitidos por medio del suelo, por lo cual los hongos representan uno de los principales agentes fitopatógenos, causando aproximadamente del 70 al 80 % de las pérdidas agrícolas, generando un problema significativo en el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Tyśkiewicz et al., 2022).

Los hongos son organismos de suma importancia ecológica, pues se estima que existen más de 144 000 especies dentro de este reino que tienen un rol fundamental

en interacciones bióticas, incluyendo la patogenicidad de plantas y animales. Dicha patogenicidad es producto del desarrollo de estrategias como el cambio de morfología, detección de señales ambientales, mecanismos de reproducción, búsqueda de nutrientes, invasión de tejidos y evasión de respuestas inmunes de los hospederos (Fisher et al.,2020).

Los hongos fitopatógenos cuentan con complejos enzimáticos que posibilitan la degradación de materia orgánica, incluyendo la pared celular de las plantas, permitiendo obtener nutrientes de estos organismos. Algunas de las enzimas que ayudan a esta función son: las proteasas, fosfolipasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas, ligninasas y nucleasas, proporcionando mecanismos que sustentan la virulencia (Fisher et al.,2020). Por otro lado, su capacidad de reproducción sexual y asexual, el cambio epigénético y la tolerancia a los cambios en la plodía (número de cromosomas) de su genoma, les permiten adaptarse a entornos cambiantes y altamente selectivos, lo que les brinda beneficios en la resistencia a los agentes fitopatógenos (Fisher et al.,2018).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se han registrado 19 000 especies de hongos que causan graves enfermedades a los cultivos, principalmente arroz, trigo, maíz, soya y papa, siendo estas fuentes importantes de alimento a nivel mundial (Archana-Jain et al.,2019). Los hongos que causan micosis pertenecen principalmente a los filos Ascomycota y Basidiomycota, dentro de los cuales los géneros de mayor relevancia son: *Cladosporium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Verticillum*, *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Abbas et al.,2019; Li et al.,2019).

Se conoce que algunas de las enfermedades en cultivos son causadas por una sinergia existente entre distintos tipos de patógenos presentes en el medio, representando un reto importante para la erradicación de dichas enfermedades. Por otro lado, existen múltiples variedades de hongos fitopatógenos que han coevolucionado con sus hospederos, formando interacciones complejas y altamente

especializadas que impiden una forma de inhibición más generalizada (Quintanilha-Peixoto et al., 2019).

### 2.2.2 *Sclerotium rolfsii*

Esta especie es considerada como un fitopatógeno de importancia por su prevalencia en cultivos de alto consumo, causando enfermedades en una amplia variedad de plantas, las cuales incluyen: hortalizas, frutas y especies ornamentales. Uno de los principales cultivos afectados por este fitopatógeno es la especie *Beta vulgaris* L. (betabel), la cual es utilizada para la obtención de azúcar en países orientales como Bangladesh. Se estima que el 9.74 % de este cultivo es infectado por este hongo, causando graves pérdidas en la producción del cultivo y, por lo tanto, en las ganancias económicas provenientes de este (Paul et al., 2021).

#### 2.2.2.1 Ecología

Se estima que este hongo fitopatógeno cuenta con alrededor de 500 especies hospederas en Norteamérica, estas especies (agrupadas dentro de 100 familias) pertenecen a los grupos de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Debido a la gran amplitud de hospederos con los que cuenta, esta especie tiene un amplio rango de adaptación en distintas temperaturas, por lo que su distribución es mundial (Hernández-Jiménez et al., 2004).

Además de sus capacidades de adaptación, cuenta con una gran diversidad genética, llegando a presentar diferencias en su genoma dependiendo de su localización. Por ejemplo, en un estudio realizado por Flores-Moctezuma et al., (2007), determinaron que hongos aislados de diferentes regiones de México no corresponden con los hospederos de origen ni con las zonas geográficas registradas en la colección mundial, indicando la existencia de diversos y nuevos genotipos.

#### 2.2.2.2 Patogenicidad

La infección de este patógeno se caracteriza por una alta abundancia de micelio blanco, generando patrones distintivos en forma de abanico que se presentan en los tallos inferiores, suelo u hojarasca, tal como se muestra en la Figura 1. Sus principales síntomas incluyen una severa pudrición del tallo y marchitamiento de las ramas. Las heridas en la planta comienzan comúnmente en los puntos de contacto con el suelo o con tallos previamente infectados, extendiéndose paulatinamente hasta llegar a las partes aéreas de la planta (Dwivedi & Prasad, 2016).



**Figura 1.** Infección de *Sclerotium rolfsii* en una planta de pimienta (*Capsicum annuum*), el micelio crece en su característica forma de abanico, (tomado de Bayer, 2023).

Al ser un patógeno necrotrófico, su mecanismo de colonización se basa en matar a los tejidos vegetales a partir de la producción de algunos ácidos y enzimas que degradan la pared celular, como el ácido oxálico y celulasas respectivamente. Uno de sus principales mecanismos de sobrevivencia a condiciones ambientales adversas son la producción de esclerocios (Figura 2), los cuales son estructuras de reserva nutrimentales que germinan a partir de la señalización de compuestos

volátiles emitidos por la descomposición de material vegetal. Además, puede prosperar en ambientes aerobios, con un pH con valores de 3 a 5 y una temperatura óptima de 27 a 35 °C, brindándole una gran cantidad de características para prevalecer en el medio y poder distribuirse de manera cosmopolita (Yan et al., 2021).



**Figura 2.** Formación de esclerocios que se tornan con una pigmentación marrón con el paso del tiempo, (tomado de INRAE, 2024).

Como se mencionó anteriormente, este hongo fitopatógeno cuenta con una gran diversidad de hospederos, algunos de ellos son cultivos de gran importancia económica. Todos ellos cuentan con una sintomatología particular o tienen características en común, tal como se resume en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Cultivos infectados por *Sclerotium rolfsii* y síntomas que presentan.

<b>Cultivo afectado</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Referencia</b>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Puede llegar a ser transmitido por semillas. Afecta el desarrollo temprano de la planta por el cambio en el peso en la parte superior de las plántulas. En los estadios adultos presentan clorosis y marchitamiento lo que resulta en una pudrición en el tallo o seca la planta.	(González, 2013)
<i>Malus domestica</i>	El micelio puede llegar a desarrollarse en parches y presentan manchas marrones en la superficie de la hoja y el tallo.	(Chand et al., 2020)
<i>Beta vulgaris</i>	Esta planta se caracteriza por la presencia de tejidos succulentos y con gran cantidad de nutrientes, por lo que la enfermedad avanza en poco tiempo. Esta comienza con la producción de micelio en la parte alta de la raíz y finaliza con una pudrición blanda en todo el órgano.	(Aycock, 1966)
<i>Helianthus annuus</i>	El marchitamiento característico de este fitopatógeno se presenta primeramente en la base del tallo, sin embargo, una particularidad de la enfermedad para este cultivo es la incidencia del hongo en las etapas de floración y maduración del girasol.	(Chaluat et al., 1981)

<i>Solanum lycopersicum</i>	<p>Afecta principalmente a las partes que se encuentran ubicadas cerca del suelo. Las estructuras infectadas se tornan en colores marrones. El micelio crece hasta la formación de esclerocios. Existe un marchitamiento secundario en la copa y las raíces. En el caso de los frutos, los cambios en la coloración en la etapa temprana de la enfermedad muestran colores amarillentos, además de un ablandamiento y pudrición.</p>	(INRAE, 2024)
-----------------------------	--	---------------

Los métodos de control para este hongo fitopatógeno suelen ser generalista, es decir, se utilizan fungicidas para controlar las pudriciones tanto en el tallo como en las hojas, sin embargo, estos métodos son preventivos y deben realizarse después de dos meses que se inició la plantación. Por otra parte, generalmente se realiza una aplicación adicional del fungicida después de un periodo de dos a cuatro semanas para garantizar su funcionalidad. El uso de estos fungicidas puede tener consecuencias ambientales severas, tal como se explicó en el apartado 3.1, por lo cual se siguen investigando diversos mecanismos de control para enfermedades en plantas (Augusto et al., 2010).

### 2.3 Control de fitopatógenos

Se han generado distintas estrategias para lograr eliminar la creciente incidencia en el desarrollo de enfermedades de origen fúngico. Uno de los principales campos dedicados a esta labor es la nanotecnología, cuyo propósito es crear distintos



materiales, dispositivos o estructuras funcionales a escala nanométrica que interrumpan el crecimiento de plagas en los campos de cultivo y cosechas (Salvatore et al.,2021). A pesar del gran número de beneficios con los que cuentan las nanopartículas, como la tolerancia al estrés abiótico, existen desventajas en su utilización que tienen que ser consideradas antes de la implementación en el mercado, principalmente en el ambiente y en la salud humana, ya que la liberación generalizada de algunos materiales puede traer graves consecuencias en estos ámbitos (Zulfiqar et al.,2019).

Igualmente, se ha desarrollado e implementado una técnica química conocida como MIC-MGC, la cual consiste en la combinación de compuestos químicos activos como SDS, NaOH, NaHCO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causando porosidad en las células microbianas. A pesar del bajo costo de estos compuestos, aún se cuenta con riesgos ecológicos y la sanidad de la población, pues no se encuentran ampliamente regulados o la eliminación de estos químicos en los cultivos suele ser incompleta (El-Baky et al.,2021).

Por otro lado, existen alternativas basadas en la composición química de algunos productos del metabolismo de diversos organismos, que permiten tener una actividad biológica herbicida, antibiótica y antifúngicas. Estos mecanismos de biocontrol intervienen directamente en los mecanismos de patogenicidad y virulencia a partir de compuestos naturales (Chaluat et al., 1981).

### 2.3.1 Uso de microorganismos para control biológico

Dentro de la búsqueda de alternativas para el biocontrol de fitopatógeno se encuentra el uso de diversos microorganismos con potencial inhibidor. Recientemente, se han logrado aislar bacterias y hongos endófitos de diferentes sustratos, propios de distintas plantas, que demostraron ser eficaces antifúngicos. Dichos microorganismos cuentan con metabolitos que tienen facultades fungistáticas o fungicidas (Bolívar-Anillo et al.,2020).

Los agentes de control biológico microbiano (MBCA) representan una forma ecológica y sustentable para el control de enfermedades que afectan a las plantas, y, por consecuencia, a los cultivos de importancia alimenticia. Los MBCA estimulan el crecimiento y el rendimiento de plantas, convirtiéndose en promotores de crecimiento en plantas (PGPR/PGPF) ayudando, además, a inducir respuestas inmunológicas con la presencia de sustancias químicas (El-Saadony et al.,2022).

La utilización de la microbiota propia de las plantas para encontrar agentes antifúngicos, representa una posible solución sostenible para los mismos cultivos. Se han registrado varios géneros microbianos que producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, por ejemplo, las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son clave en la supresión de patógenos perjudiciales para algunos cítricos (Mardanov et al., 2017; Andreolli et al., 2019).

#### 2.4 Compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos volátiles (COV's) son sustancias químicas producto del metabolismo primario que se encuentra principalmente en plantas y microorganismos. Su influencia ha sido estudiada principalmente en las bacterias. A diferencia de otros metabolitos secundarios, los volátiles suelen ser de menor tamaño (de aproximadamente C<sub>20</sub>), baja masa molecular (100-500 Dáltones), bajo punto de ebullición y una fracción lipófila, facilitando la evaporación y la difusión en el ecosistema. Algunos de los grupos químicos que componen los COV's producidos por bacterias son: alquenos, alcoholes, cetonas, terpenos, benzenoides, pirazinas, ácidos y ésteres (Zhou et al.,2022).

Una de las cualidades de los COV's es que las interacciones que presentan pueden ser proximales, por difusión acuosa, o de mayores distancias a través de difusión atmosférica, de conectividad de estructuras como poros del suelo o incluso en la troposfera abierta. Estas interacciones pueden ayudar a otros organismos cumplir con sus funciones o como un medio de defensa contra posibles patógenos (Khoshru et al.,2023).

La clasificación de volátiles bacterianos ha revelado 75 derivados de ácidos grasos, 50 compuestos aromáticos, 74 compuestos que contienen nitrógeno, 30 compuestos de azufre, 96 terpenoides y 18 compuestos halogenados, selenio, telurio u otros compuestos metaloides. Algunos compuestos parecen presentar una mayor concentración, por ejemplo, pirazinas, componentes volátiles de azufre, geosmina y 2-metilisoborneol (Kai *et al.*,2006).

#### 2.4.1 COV's en microorganismos

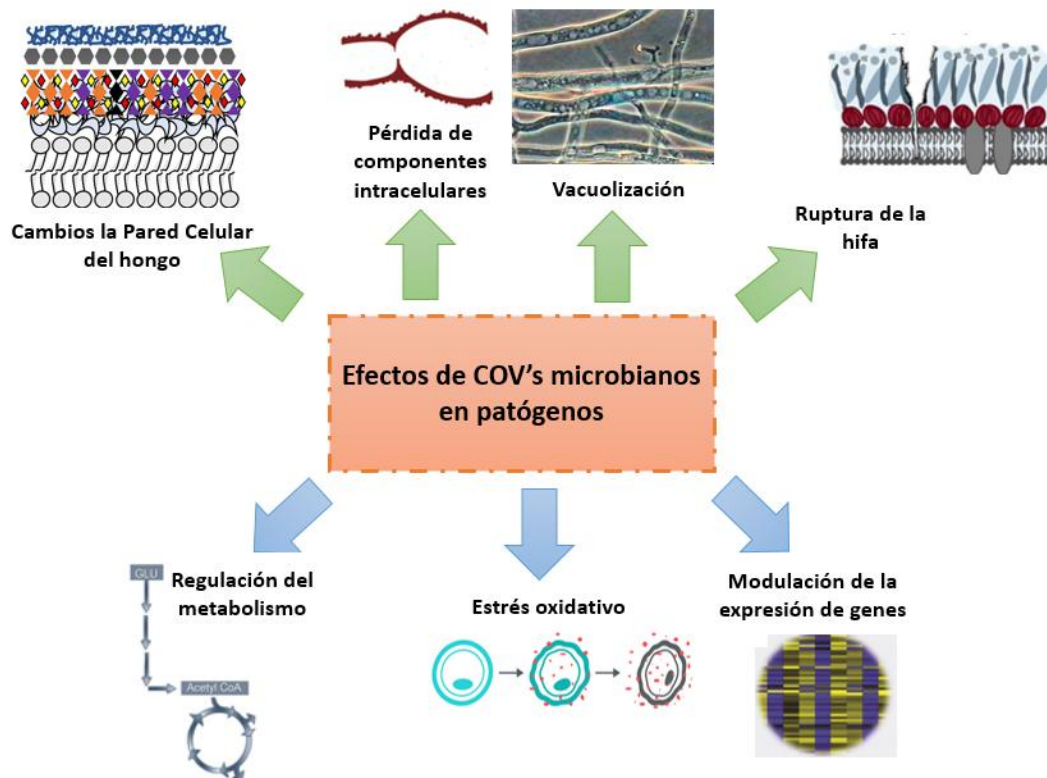
Las funciones de los COV's bacterianos aún no se comprenden en su totalidad, sin embargo, se puede suponer que dichos metabolitos son similares a los producidos por otros organismos, por lo que podrían tener actividades infoquímicas para la comunicación interorganismos e intraorganismos, ayudar a establecer señales de comunicación de célula a célula, una posible válvula de liberación de carbono o como agentes inhibidores o promotores de crecimiento (Weisskopf *et al.*,2021). Estos a su vez son importantes para mantener las poblaciones bacterianas en nichos ecológicos y como un apoyo en la ventaja selectiva para la supervivencia y evolución a partir de relaciones simbióticas y mutualistas (Guo *et al.*,2021).

Un aspecto importante es que los volátiles producidos por distintos microorganismos son exclusivos de ciertas cepas, por lo cual, la cantidad y composición de estos puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo (Netzker *et al.*,2020). Otros factores que pueden influir en la producción de COV's son el estado fisiológico en la que se encuentre el organismo productor, la disponibilidad de oxígeno, la humedad, temperatura y el pH. Con lo anterior mencionado, se infiere que la producción de este tipo de metabolitos secundarios será en función a los parámetros ambientales consistentes como la disponibilidad de nutrientes. De allí la importancia para caracterizar los COV's, ya que su composición y abundancia podrían impactar en las comunidades microbianas (Insam & Seewald, 2010).

#### 2.4.2 Propiedades antifúngicas de los COV's

Actualmente se conoce que la germinación de esporas en hongos, así como el crecimiento de hifas, pueden ser inhibidos por volátiles bacterianos, además se ha demostrado que algunos COV's tienen la capacidad de cambiar la morfología fúngica, la actividad enzimática y la expresión génica. Un claro ejemplo es la actividad de enzimas lacasas y tirosinasas que puede llegar a verse afectada por la presencia de volátiles bacterianos. Sin embargo, esta sensibilidad presenta diferencias dependiendo de la especie de hongo, por lo cual los parámetros de inhibición estarán definidos por la interacción bacteria-hongo. Por otra parte, algunos volátiles también pueden influir en el crecimiento poblacional de los hongos, así como en el desarrollo de la virulencia (Wang et al., 2020).

Según Picazo-Aragonés et al. (2020) algunos COV's como el 3-hexenol y 2-cetonas tienen la capacidad de afectar la expresión génica de genes implicados en el transporte y metabolismo de aminoácidos, la producción y conversión de energía, los mecanismos de transducción de señales y en el transporte y metabolismo de iones inorgánicos, interviniendo con las funciones básicas del hongo y su crecimiento. Las bases químicas con las que cuentan les otorgan propiedades fisicoquímicas que les permiten afectar directamente a la membrana, regulando de forma negativa la expresión de genes relacionados con la fluidez de las membranas, el metabolismo energético, alteración del equilibrio redox y la integridad de la pared celular del hongo (Almeida et al., 2023), tal como se observa en la Figura 3.



**Figura 3.** Cambios en la morfología y fisiología de hongos fitopatógenos a partir de su interacción con COV's, (modificado de Almeida et al., 2023).

En algunos casos, la conductividad extracelular se ve alterada por el efecto de los COV's sobre la permeabilidad de la membrana. Según un estudio realizado por Yue et al. (2023), los COV's producidos por *Pseudomonas fluorescens* ZX lograron inhibir la biosíntesis de ergosterol (hasta una 76 %), compuesto esencial para las membranas fúngicas. Por otro lado, se inhibió la actividad de la ATPasa, la malato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, logrando interferir significativamente en las rutas metabólicas principales y provocando el aumento de las especies reactivas de oxígeno.

La inhibición de hongos fitopatógenos por parte de los COV's pertenecientes a microorganismos ha sido ampliamente estudiada. En el cuadro 2 se muestra algunos de los COV's con actividad antifúngica y los organismos a los que pertenecen.

**Cuadro 2.** COV's con actividad antifúngica y algunos de los organismos de los cuales fueron identificados.

Principales COV's identificados	Organismo antagonista	Referencia
2,3- butanediona; ácido 3-metilbutírico	<i>Bacillus subtilis</i>	(Ling et al., 2021)
Ácido étil éster benzoico	<i>Pseudomonas sp.</i>	(Wang et al., 2021a)
Ácido 3-metil butanoico	<i>Enterobacter sp.</i>	(Wang et al., 2021b)
2-nonanona; 2-undecanona	<i>Bacillus valezensis</i>	(Rybakova et al., 2017)
Hidrocarburos; Aldehídos; ésteres; ácidos; pirazinas	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(He et al., 2020)
Metil isobutil cetona	<i>Bacillus pumilus</i>	(Morita et al., 2019)

Como se observa en el cuadro 2, los compuestos más relevantes con actividad antifúngica son aquellos pertenecientes a los ésteres, alcoholes, ácidos y cetonas. Sin embargo, los diferentes COV's pueden actuar de forma aditiva y sinérgica para mostrar una máxima actividad biológica (Mookherjee et al., 2018).

## 2.5 Sinergismo en COV's y microorganismos

El estudio de la producción de antibióticos o antimicrobianos volátiles es raro entre los microorganismos y, por lo tanto, no ha sido ampliamente investigado. Este sesgo en la información es aún mayor en el ámbito de los COV's y su capacidad sinérgica para incrementar la actividad biológica (Ling et al., 2021).

A pesar de la carencia de estudios en este ámbito, la inhibición de hongos a partir de esta interacción también ha sido estudiada. Wambaugh et al. (2020) registró una amplia variedad de moléculas provenientes de extractos de plantas que interactúan con el antifúngico fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos, específicamente del género *Alternaria*, brindando un panorama de posibles alternativas para combatir enfermedades fitopatógenas en cultivos.

En un estudio realizado por Mookherjee et al. (2018) se mostró que un hongo endófito perteneciente al género *Gloeosporium* tiene la capacidad de producir efectos inhibidores con sus COV's y potenciar esta acción a partir de compuestos añadidos exógenamente (denominados sinergistanos), por lo que profundizar en la posible interacción que se presenta entre los diferentes compuestos originarios de distintos organismos es de suma importancia.

Algunos de los COV's registrados con potencial inhibidor para fitopatógenos son metabolitos secundarios productos de la fermentación, proceso realizado por varios grupos de microorganismos, incluyendo la familia Enterobacteriaceae. Esta capacidad metabólica está directamente influenciada por la presencia de genes que codifican a enzimas como alcohol deshidrogenasa y  $\alpha$ -acetolactato sintasa, necesarios para la vía de producción de etanol y acetaldehído respectivamente (Márquez-Villavicencio et al., 2011). Determinados COV's pueden llegar a interrumpir vías metabólicas, resultando en la disminución de virulencia, por lo cual entender las interacciones que tengan estos procesos es fundamental para comprender a profundidad el proceso inhibitorio (Almeida et al., 2023).

Además de los efectos antifúngicos de los COV's, existen otras secuelas que pueden llegar a tener estos metabolitos en las comunidades microbianas. Zhang et al. (2021) registró que los COV's producidos por *Pichia spp.* tienen la capacidad de modificar la diversidad en las poblaciones bacterianas y fúngicas utilizadas para la fermentación alcohólica. Este efecto es consecuencia de las nuevas señalizaciones resultantes por la interacción entre metabolitos secundarios, lo cual se traducen en nuevas y mejores condiciones del nicho.

Por otra parte, la interacción entre volatílo mas de distintas especies puede dar como resultado la expresión o inactivaciones de distintos genes. En un caso de estudio con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se mostró una alta sobreexpresión de los genes PDC1 y PDC5, los cuales codifican para piruvato descarboxilasa, enzima necesaria para llevar a cabo la fermentación. Los cambios en la expresión de estos genes fueron directamente correlacionados con presencia de la levadura *Metschnikowia pulcherrima*, la cual aumento el contenido de glicerol y disminuyó el ácido acético, teniendo consecuencias directas en el metabolismo de los microorganismos adyacentes (Comitini et al., 2021).

El sinergismo entre los metabolitos secundarios y diversos microorganismos conllevan una serie de modificaciones transcripcionales y metabólicas que permiten potenciar sus actividades fisiológicas. La fermentación es uno de los procesos metabólicos que se encuentra estrechamente relacionado con la producción de COV's, por lo que conocer las implicaciones de estas interacciones resulta de suma importancia, principalmente en la familia Enterobacteriaceae, ya que se desconoce aún muchos de sus metabolitos y su potencial sinérgico (Tallon et al., 2023).

## 2.6 *Kosakonia cowanii*

*Kosakonia cowanii* es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, sus características la sitúan dentro del grupo de las bacterias Gram-negativas, anaerobia facultativa y con una morfología de bastón (Petrzik et al., 2021). Está registrada como una especie perteneciente a microbiomas asociados a plantas y microorganismos que resultan benéficos para el rendimiento del cultivo y su calidad nutricional, por lo cual se le confiere la cualidad de ser una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Shi & Sun, 2017). De igual forma existen pocos casos en donde algunas cepas de la especie se presentan en infecciones humanas. Esto se encuentra posiblemente relacionado al registro de factores de virulencia que existen para el género, por lo cual puede considerarse como una especie patógena oportunista (Yang et al., 2018).



Estudios anteriormente realizados detectaron la presencia de *K. cowanii* en muestras de chile en polvo, a partir de la secuenciación 16S rDNA, mostrando su capacidad para poder colonizar diferentes nichos biológicos por sus distintas características metabólicas que le permiten soportar estrés abiótico, crecimiento en un rango amplio de temperaturas, tolerancia a distintos valores de pH y salinidad (Hernández Gómez et al., 2021). De igual forma, se realizó un análisis de su genoma, en el cual se indica la presencia de genes de virulencia y enzimas con actividad antibacteriana, brindando herramientas útiles en la competencia por los nutrientes de diferentes sustratos (González Espinosa et al., 2023).

En un análisis de la cepa *K. cowanii* B-6-1, aislada del tomate, se observó actividad de biocontrol contra diversos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium verticillioides* y *Alternaria tenuissima*, sin embargo, no fueron analizados los COV's pertenecientes a la bacteria ni como estos pudieran influenciar directamente en esta capacidad antifúngica (Shi & Sun, 2017).

Por otra parte, *K. cowanii* Ch1 aislada del chile en polvo mexicano, mostró capacidades de biocontrol contra el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata*. Esta característica fue atribuida a la producción de los compuestos volátiles de la bacteria, por lo que fue caracterizado su volatiloma. Los resultados mostraron la presencia de compuestos pertenecientes a grupos como alquenos, ácidos grasos, terpenos, bencenoides, cetonas y pirazinas, siendo estos últimos grupos aquellos en donde se encontraban los compuestos más abundantes, por ejemplo, acetoína y 2,5-dimetil pirazina respectivamente (González Espinosa et al., 2023).

A pesar de la caracterización de los compuestos producidos por esta bacteria, aún se desconoce los alcances en la inhibición de hongos fitopatógenos que podría llegar a realizar cada uno de sus COV's y como podría variar la dinámica de esta capacidad al interaccionar con la misma bacteria. Por otro parte, es de suma importancia estudiar cómo podría variar su perfil metabólico en las distintas fases de crecimiento, pues se conoce que los requerimientos metabólicos en cada una de

estas etapas podrían resultar en una variación en la producción de metabolitos secundarios (Misztal et al., 2018).

## 2.7 Dinámica de COV's en diferentes fases de crecimiento microbiano

La emisión de los COV's microbianos se encuentra regulada por una gran variedad de factores, tanto ambientales como propios de las colonias productoras. Entre estos factores se puede encontrar los cambios de temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes y la cantidad de células presentes en el espacio, así como la capacidad metabólica propia de cada cepa (Russo et al., 2022).

Además de los aspectos anteriormente mencionados que influyen en la producción de estos compuestos, los cambios dinámicos a lo largo de las fases de crecimiento también representan un papel fundamental en la producción de metabolitos, principalmente en la composición y tasa de emisión de COV's microbianos genéricos o específicos de cada especie. Las emisiones de estos volátiles sufren grandes cambios de magnitud desde el principio del ciclo de vida hasta su fin, por ende, también los hace independientes de la abundancia y actividad microbiana en sus diversas etapas de crecimiento (Misztal et al., 2018).

En un estudio realizado por Bjurman et al. (1997) se observaron los COV's emitidos por el género *Penicillium* durante distintas fases de crecimiento, enfatizando la importancia de conocer cuando dicho microorganismo podría ser más nocivo a la salud por la producción de volátiles dañinos. Por otra parte, los mecanismos biológicos de emisión están estrechamente relacionados con la demanda celular, por lo que factores relacionados con la nutrición, el estrés o incluso la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>, pueden estar relacionados con la producción y acumulación de volátiles, modificando su metabolismo (Widhalm et al., 2015) .

Las fases de crecimiento de las bacterias (latencia, exponencial, estacionaria y muerte) están profundamente influenciadas por la capacidad de detectar y adaptarse a cambios ambientales mediante los mecanismos de señalización y

adaptación. A medida que las bacterias avanzan a través de estas fases, activan diferentes sistemas de detección y respuesta que les permiten ajustar su metabolismo, optimizar el uso de recursos, y prepararse para condiciones desfavorables. En este aspecto, la relación entre la adaptación al entorno y la producción de COV's se encuentran estrechamente relacionadas con la modulación del metabolismo en cada fase de crecimiento.

Según Barnard et al. (2007), también algunas señalizaciones pueden ocasionar cambios en la producción de estos metabolitos. Un claro ejemplo es la señalización química mediante la detección de quórum N-acil homoserina lactonas. Esta molécula se encuentra presente en algunas especies de los géneros *Pseudomona* y *Pectobacterium*, las cuales tienen una relación antagónica o benéfica con plantas, resultando en una regulación de producción de COV's en respuesta a la citotoxicidad o estrés. Sin embargo, aún es desconocida la mediación de estos compuestos a partir de la detección de quorum.

### 3. HIPÓTESIS

*Kosakonia cowanii* produce compuestos orgánicos volátiles (COV's) con perfiles de abundancia relativa diferenciales durante sus fases de crecimiento en medio de cultivo líquido, los cuales tienen propiedades fisicoquímicas con efectos antifúngicos contra *Sclerotium rolfsii* y aumentan la capacidad de competencia durante la colonización bacteriana en tejidos vegetales.

## 4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar los compuestos Orgánicos Volátiles (COV's) producidos durante las diferentes fases de crecimiento de *Kosakonia cwanii* y su actividad antifúngica contra *Sclerotium rolfsii*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar los COV's producidos por *Kosakonia cwanii* durante la fase de latencia, exponencial y estacionaria a través de HS-SPME-GC-MS.
- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los COV's que presenten mayor abundancia relativa en cada fase de crecimiento de *Kosakonia cwanii* contra *Sclerotium rolfsii*.
- Evaluar cinéticas de competencia de colonización en frutos de *Capsicum annuum* L. entre *Kosakonia cwanii* y *Sclerotium rolfsii* para determinar la participación de COV's.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Crecimiento de *Kosakonia cowanii*

La cepa Ch1 anteriormente aislada por el Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro se cultivó en agar Soya Trypticase (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.). Las bacterias se dejaron incubar a 37 °C durante 24 h (Hernández-Gómez et al., 2022).

### 5.2 Material fúngico

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Agrícola de la Universidad Autónoma de Querétaro proporcionó cepas de *Sclerotium rolfsii*. Dichas cepas fueron cultivadas en un medio papa dextrosa (PDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.) a 28 °C durante 3 d.

### 5.3 Evaluación de actividad antifúngica de *Kosakonia cowanii* *in vitro*

Con el propósito de conocer la actividad antifúngica de *Kosakonia cowanii* bajo distintas condiciones, se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento micelial radial de *Sclerotium rolfsii* bajo diferentes tratamientos. Inicialmente, se inoculó un disco micelial (~7 mm de diámetro) en una caja Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) (Difco Laboratorios, Detroit, MI, EE.UU.). En paralelo, en otra caja Petri con medio TSA (Difco Laboratorios, Detroit, MI, EE.UU.), se inoculó una suspensión bacteriana de *K. cowanii* a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, se empleó la metodología descrita por Mookherjee et al. (2018), en la cual se colocaron dos placas Petri, una con la cepa fúngica en la parte superior y la otro con el cultivo bacteriano en la inferior, permitiendo evaluar la efectividad de los compuestos volátiles emitidos por la bacteria contra el hongo.

En un segundo tratamiento, se inoculó el disco micelial bajo las mismas condiciones previamente mencionadas, pero además se añadieron 30 µL de la suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) alrededor del hongo. En la parte inferior de la caja Petri se dispuso medio TSA.

Finalmente, en un tercer tratamiento, se combinaron ambas estrategias: el disco micelial se inoculó en PDA con 30 µL de suspensión bacteriana alrededor y, en la parte inferior de la caja, se colocó medio TSA inoculado con *K. cowanii*. Como control, se inoculó únicamente el medio PDA con el disco micelial sin exposición a la bacteria. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 28 °C durante 3 días. El crecimiento micelial radial se cuantificó mediante la ecuación 1 (Dennis & Webster, 1971):

$$\text{Crecimiento micelial radial (\%)} = \frac{cc-dt}{cc} * 100 \quad (1)$$

Donde los términos cc y dt (en mm) representan los diámetros promedio de las colonias de los grupos de control y tratamiento, respectivamente.

#### 5.4 Análisis de crecimiento de *Kosakonia cowanii*

Para comprender y definir la dinámica de crecimiento de *K. cowanii*, se realizó una curva de crecimiento bacteriano por absorbancia, la cual consiste en medir la turbidez que se presenta en una muestra líquida, lo que está directamente relacionado con la concentración de células bacterianas en el cultivo.

Primeramente, se inoculó Caldo Soya Trypticase con una suspensión bacteriana en fase estacionaria (cultivo de 18 h) de  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> a 37 °C y se mantuvo en una agitación constante de 100 rpm. En intervalos de una hora se tomó un mL de este inóculo y se midió la absorbancia por triplicado a 650 nm en el espectrofotómetro (TECHCOMP Inc., Fulton, WA, EE. UU.) para obtener lecturas de absorbancia

precisas. La absorbancia obtenida se registró y graficó en función al tiempo en el que el inóculo fue examinado (Kacena et al., 1999).

#### 5.5 Identificación del perfil de los COV's mayoritarios pertenecientes a *Kosakonia cowanii* durante sus fases de crecimiento.

Los resultados del apartado 5.5 nos permitieron conocer los tiempos específicos en los que se presentó cada fase de crecimiento de *K. cowanii*. En cada uno estos periodos se analizó la composición del volatiloama mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (HS-SPME-GC-MS).

Para en análisis de COV's de cada fase de crecimiento, se inoculó un recipiente de borosilicato de 80 mL con la bacteria en medio Caldo Tripticasa y se sometió al análisis en el tiempo estipulado en el apartado 5.5. Las condiciones que se usaron para el crecimiento de la bacteria fueron de 37 °C y permanecieron en continua agitación de 100 rpm. Para el control se utilizó Caldo Tripticasa (Torál et al., 2021). Posteriormente, se realizó una microextracción en fase solida (SPME por sus siglas en inglés) donde las muestras se incubaron a 50 °C durante 1 h para que los COV's fueran liberados y recolectados en una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (fibra SPME). Los volátiles fueron desorbidos durante 15 min a 260 °C en un puerto de inyector de GC interconectado con un detector de masas con un rango de exploración de 30–400 m/z, utilizando helio como gas portador a un mL min<sup>-1</sup> caudal constante. La separación se llevó a cabo en una columna capilar Hp-5MS (60m de longitud x 250 µm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de la película; Perkin-Elmer Inc.) (González-Espinosa et al., 2023).

El procesamiento de datos se realizó en el software MassHunter. Los compuestos volátiles se identificaron inicialmente comparando los picos de los espectros de masas con los de la biblioteca NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library.



#### 5.6 Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de los COV's mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento de *Kosakonia cowanii* contra *Sclerotium rolfsii*.

Una vez identificados los COV's en cada una de las fases de crecimiento, se probó su capacidad antifúngica individualmente, para ello se adquirieron compuestos mayoritarios pertenecientes a la fase de latencia, para la fase exponencial e igualmente para la fase estacionaria. Los compuestos puros fueron obtenidos de la compañía Sigma Aldrich (EE.UU.) y evaluados a diferentes concentraciones para determinar concentraciones mínimas inhibitorias en el crecimiento micelial.

Los ensayos antifúngicos se realizaron siguiendo la metodología descrita por Mookherjee et al. (2018), con ligeras modificaciones. Se emplearon dos bases de cajas Petri estériles de 8 cm de diámetro, colocadas una sobre otra. En la caja inferior, se colocó un papel filtro estéril impregnado con las concentraciones previamente establecidas del compuesto orgánico volátil (COV) mayoritario. La caja superior contenía medio PDA (Difco Laboratorios, Detroit, MI, EE.UU.), en el cual se inoculó un disco de 7 mm de diámetro del hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*. Como control negativo, se utilizó una configuración idéntica, pero sin adición del COV en la base.

Para evitar contaminación y pérdida de compuestos volátiles, las cajas fueron selladas herméticamente con Parafilm y posteriormente incubadas a 28 °C durante 3 días. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y la inhibición del crecimiento micelial se cuantificó empleando la Ecuación 1.

Con el fin de evaluar si la interacción de la bacteria con los COV influía en la inhibición del crecimiento micelial, se empleó una metodología similar. En la parte superior, con medio PDA, se inoculó un disco micelial de 7 mm de diámetro de *S. rolfsii*; adicionalmente, se colocó un inóculo de 100 µL de una suspensión bacteriana

de *K. cowanii*, ajustada a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. En la caja inferior, se dispuso un papel filtro impregnado con las mismas concentraciones del COV utilizadas previamente. Las condiciones de incubación fueron idénticas a las mencionadas anteriormente. Este ensayo también se realizó por triplicado y el crecimiento micelial se midió para calcular la inhibición mediante la Ecuación 1.

Los residuos biológicos resultantes para *K. cowani* y para *S. rolfsii* se manejaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, "Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo", además de los parámetros estipulados por la Facultad de Química.

5.7 Evaluación de cinéticas de competencia de colonización en frutos de *Capsicum annuum* L. entre *Kosakonia cowanii* y *Sclerotium rolfsii* para determinar la participación de COV's.

Con el fin de evaluar la influencia de los COV's en la competencia de *K. cowanii* se realizaron ensayos *in vivo*, permitiendo analizar con profundidad las interacciones existentes entre los microorganismos, simulando así las condiciones naturales en las que generalmente se encuentran. Para estas pruebas se utilizó *Capsicum annuum* L. (chile serrano), en el cual se han reportado infecciones por *Sclerotium rolfsii* (Liao et al., 2022). Los frutos fueron seleccionados a partir de factores como la ausencia de enfermedades y heridas visibles. Estos fueron obtenidos de un mercado local (La Negreta, Querétaro) con un tamaño promedio de 7 cm de largo.

La desinfección de los chiles se llevó a cabo mediante hipoclorito de sodio al 20 % por 10 min, después con alcohol al 70 % y, por último, un enjuague con agua destilada estéril, secados y mantenidos en una campana de flujo laminar para evitar

contaminación. Posteriormente, se realizaron tres heridas equidistantes a lo largo del chile, de aproximadamente 2 mm de profundidad usando palillos estériles.

Luego, fueron inoculados con 10  $\mu$ L de una dilución de *K. cowanii* de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Asimismo, cada una de las heridas fue infectada con *S. rolfsii*, colocando esclerocios del hongo mediante una aguja de disección estéril en cada una de las heridas, es decir, tres esclerocios en total. Se evaluaron las interacciones entre *K. cowanii* y *S. rolfsii* mediante diferentes tratamientos de inoculación. En un primer tratamiento, ambas especies fueron inoculadas simultáneamente (0 h). El segundo tratamiento consistió en inocular a *K. cowanii* primero, seguido de *S. rolfsii* a las 3, 6, 9 y 12 h posteriores. Como controles, se incluyeron: (1) frutos inoculados únicamente con *K. cowanii*, (2) frutos inoculados únicamente con *S. rolfsii* y (3) frutos con heridas sin inoculación (Ruiz-Moyano et al., 2020). Adicionalmente, se realizó una segunda inoculación de *K. cowanii* a las 24 y 48 h posteriores a la primera. En estos casos, se replicó los periodos de inoculación, permitiendo el crecimiento de la bacteria por 3, 6, 9 y 12 h antes de la infección de *S. rolfsii*.

Se evaluó el efecto de los COV's mayoritarios emitidos por *K. cowanii*, previamente identificados en el punto 4.5, y con actividad antifúngica demostrada. Para ello, los frutos fueron desinfectados y se les realizaron heridas siguiendo la metodología previamente descrita. Se aplicaron 20  $\mu$ L de filtrados libres de células obtenidos a las 3, 6, 9 y 12 h de *K. cowanii* mediante centrifugación y filtros con poros de 0.22  $\mu$ m (Corning Incorporated). Posteriormente, cada una de las tres heridas fue infectada con esclerocios de *S. rolfsii* utilizando una aguja de disección estéril. Además, se realizó una segunda y tercera aplicación a las 24 y 48 h, respectivamente.

Se evaluó 2,5-dimetilpirazina, ciclododecano, benzaldehído, acetoína y etanol (todos en concentración pura, 100 %) para determinar su efecto antifúngico en combinación con *Kosakonia cowanii*. Para cada tratamiento, se preparó una suspensión de 80  $\mu$ L de peptona (0,1 %) mezclada con 10  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de *K. cowanii* ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) y el COV correspondiente.

Posteriormente, se inocularon 20  $\mu$ L de esta mezcla en las heridas previamente infectadas de los frutos. Los controles fueron los siguientes: un chile inoculado con bacteria, otro infectado con el hongo, uno que presentó solamente las heridas y aquellos que contenían los COV's estándar sin la dilución bacteriana (Mena Navarro et al., 2024).

También se realizaron ensayos de combinación binaria de 2,5-dimetil-pirazina y acetofina siguiendo la metodología anteriormente mencionada, pero con ligeras modificaciones. Para este procedimiento serán añadidos los dos compuestos en la suspensión de peptona con el inóculo de *K. cowanii*. La mezcla de los compuestos se preparó con cada COV a la misma concentración de los valores utilizados anteriormente, es decir, la concentración del compuesto probado individualmente para su efecto antifúngico. La suspensión final fue inoculada en el chile previamente infectado con el fitopatógeno. Los controles para estos ensayos fueron los mismos (Medina-Romero et al., 2017).

Todos los tratamientos fueron almacenados en un contenedor de plástico previamente desinfectado y fueron sellados herméticamente. Se mantuvieron a una temperatura constante de 28 °C y condiciones naturales de luz solar. Cada bioensayo se realizó dos veces con tres repeticiones por tratamiento. Después de 3 d fueron tomadas dos mediciones perpendiculares del diámetro de cada colonia de *S. rolfsii* con un calibrador pie de rey (Calibrador electrónico digital Vernier herramienta micrométrica;  $\pm 0.02$  mm, Mitutoyo, Tokio, Japón). El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó comparándolo con el control negativo (fruto infectado con *S. rolfsii*). La tasa de inhibición de crecimiento micelial *in vivo* se calculó mediante la ecuación 1 anteriormente descrita.

## 5.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Para lograr resultados estadísticamente significativos, se utilizaron al menos 3 concentraciones diferentes de los compuestos mayoritarios identificados en cada

fase de crecimiento bacteriano y de familias químicas diferentes. Las concentraciones evaluadas con mejor efecto fueron utilizadas para los ensayos *in vivo* en los frutos de *Capsicum annuum* L. Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos de los bioensayos *in vitro* e *in vivo* fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey ( $p<0.05$ ) para medir diferencias específicas entre los tratamientos y los controles, así como la interacción entre los factores. Dichos análisis fueron realizados en el software DPS V12.01.

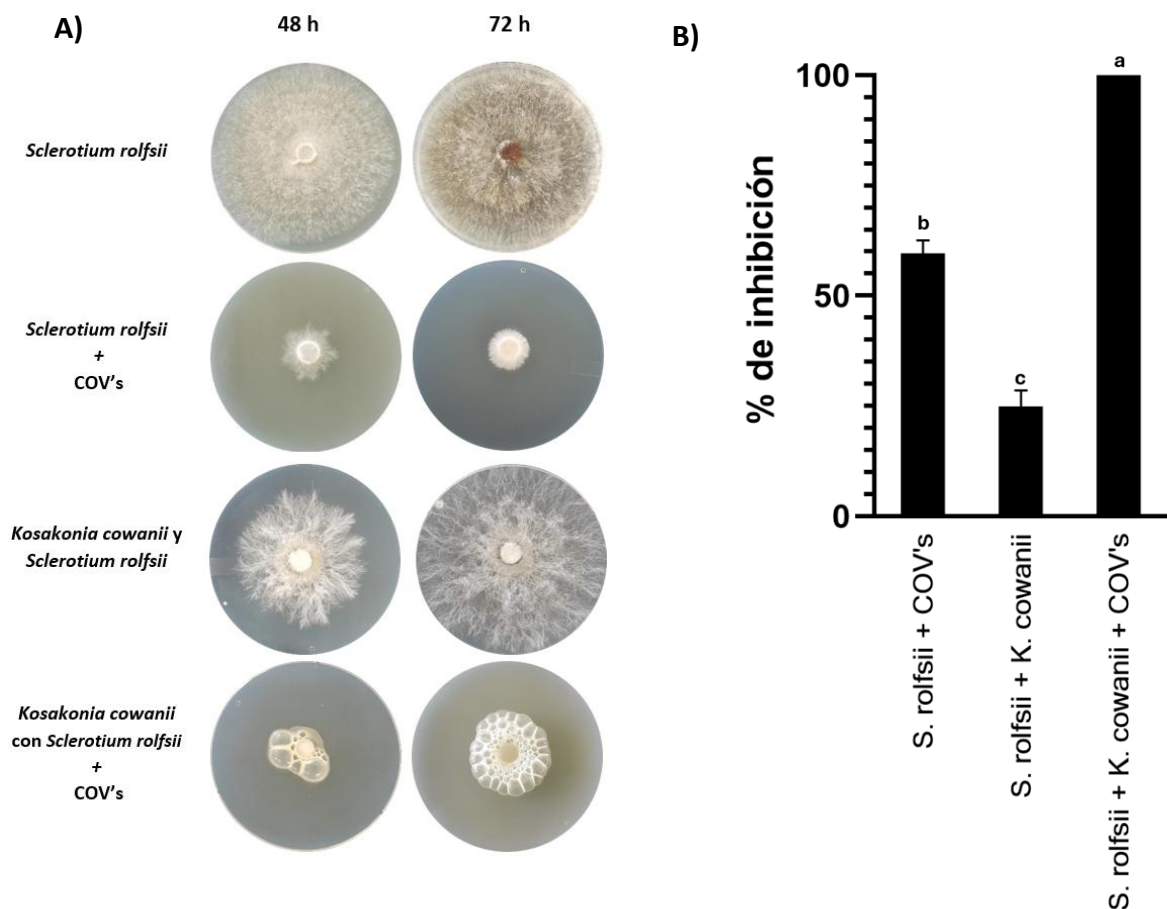
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación de actividad antifúngica de *Kosakonia cowanii* *in vitro*

Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para evaluar la inhibición del crecimiento micelial radial de *Sclerotium rolfii* bajo tres condiciones experimentales: (1) confrontación directa con *K. cowanii*, (2) exposición a los COV's emitidos por *K. cowanii*, y (3) una combinación de ambas condiciones, es decir, la interacción simultánea con la bacteria y sus volátiles. La Figura 4 muestra los efectos de estos tratamientos sobre el crecimiento micelial.

En el tratamiento de confrontación directa, la inhibición no fue significativa, alcanzando únicamente un 25 % de inhibición en el crecimiento micelial a las 48 horas. Sin embargo, esta inhibición no se mantuvo a las 72 h, observándose la reanudación del crecimiento de *S. rolfii*, el cual sobrepasó la zona de aplicación bacteriana alrededor del disco micelial. En contraste, la exposición a los COV's de *K. cowanii* generó una inhibición del 60 %, la cual se mantuvo constante hasta las 72 horas, lo que sugiere una actividad antifúngica estable de los volátiles.

El tratamiento más eficaz fue la combinación de la confrontación directa con la exposición simultánea a los COV's, alcanzando un 100 % de inhibición del crecimiento micelial, efecto que se mantuvo más allá de las 72 h. Además, en este tratamiento se observó la formación de burbujas en el medio de cultivo, fenómeno ausente en los demás tratamientos.



**Figura 4.** Ensayo de actividad antifúngica de *K. cowanii* contra *S. rolfsii*. (A) representa el crecimiento micelial. Se observa una inhibición total del crecimiento micelial cuando *S. rolfsii* está en presencia de *K. cowanii* y sus volátiles. (B) presenta el porcentaje de inhibición de los distintos tratamientos mostrados en (A). Las diferencias estadísticas se representan con letras ( $p < 0,05$ ).

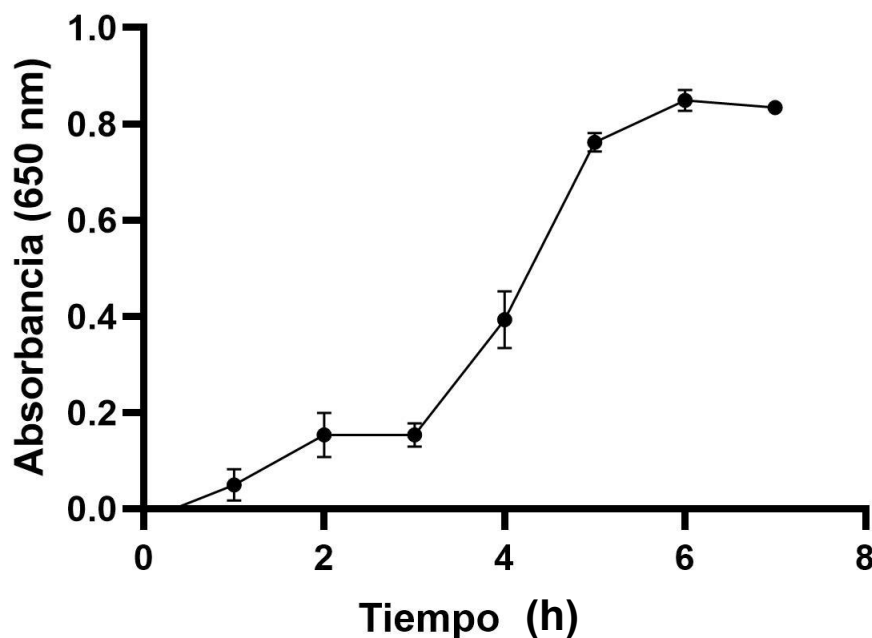
Los resultados obtenidos demostraron que *K. cowanii* produce COV's con actividad antifúngica significativa contra *S. rolfsii*. Asimismo, se observó que la interacción

simultánea entre la bacteria y sus volátiles potencia el efecto inhibitorio, sugiriendo una acción sinérgica entre ambos mecanismos. A partir de estos hallazgos, se planteó como objetivo identificar los COV's emitidos por *K. cowanii* y determinar la etapa del crecimiento bacteriano en la que se producen, con el fin de evaluar si tanto la fase de desarrollo como la composición de los volátiles predominantes influyen en su actividad antifúngica.

## 6.2 Análisis de la producción de COV's y crecimiento de *Kosakonia cowanii*

Para identificar los COV's producidos a lo largo del crecimiento bacteriano, primero fue necesario establecer los intervalos de tiempo correspondientes a las fases lag, exponencial y estacionaria, esto en función a una dinámica de crecimiento por absorbancia. Se observó que la fase lag duró 3 h, la exponencial inicio a partir de las 3 h y la estacionaria a las 6 h (Figura 5). El crecimiento registrado a partir de las 3 h fue logarítmico, indicando el inicio de la fase exponencial. Aproximadamente a partir de las 6 h se observó una absorbancia constante, indicando que las bacterias no mostraban un crecimiento adicional, característica presentada en la fase estacionaria. Las absorbancias obtenidas durante el análisis fueron consistentes en las mediciones por triplicado, permitiendo realizar la evaluación de volátiles para cada fase de crecimiento.





**Figura 5.** Dinámica de crecimiento de *Kosakonia cowanii*. La curva representa la tendencia de crecimiento bacteriano en medio TSA (tripticase soya con agar) líquido, incubado a 28 °C y con agitación constante a 200 rpm. Los puntos representan el promedio de tres réplicas independientes (n = 3) y las barras de error indican la desviación estándar.

### 6.3 Identificación del perfil de los COV's mayoritarios pertenecientes a *Kosakonia cowanii* durante sus fases de crecimiento.

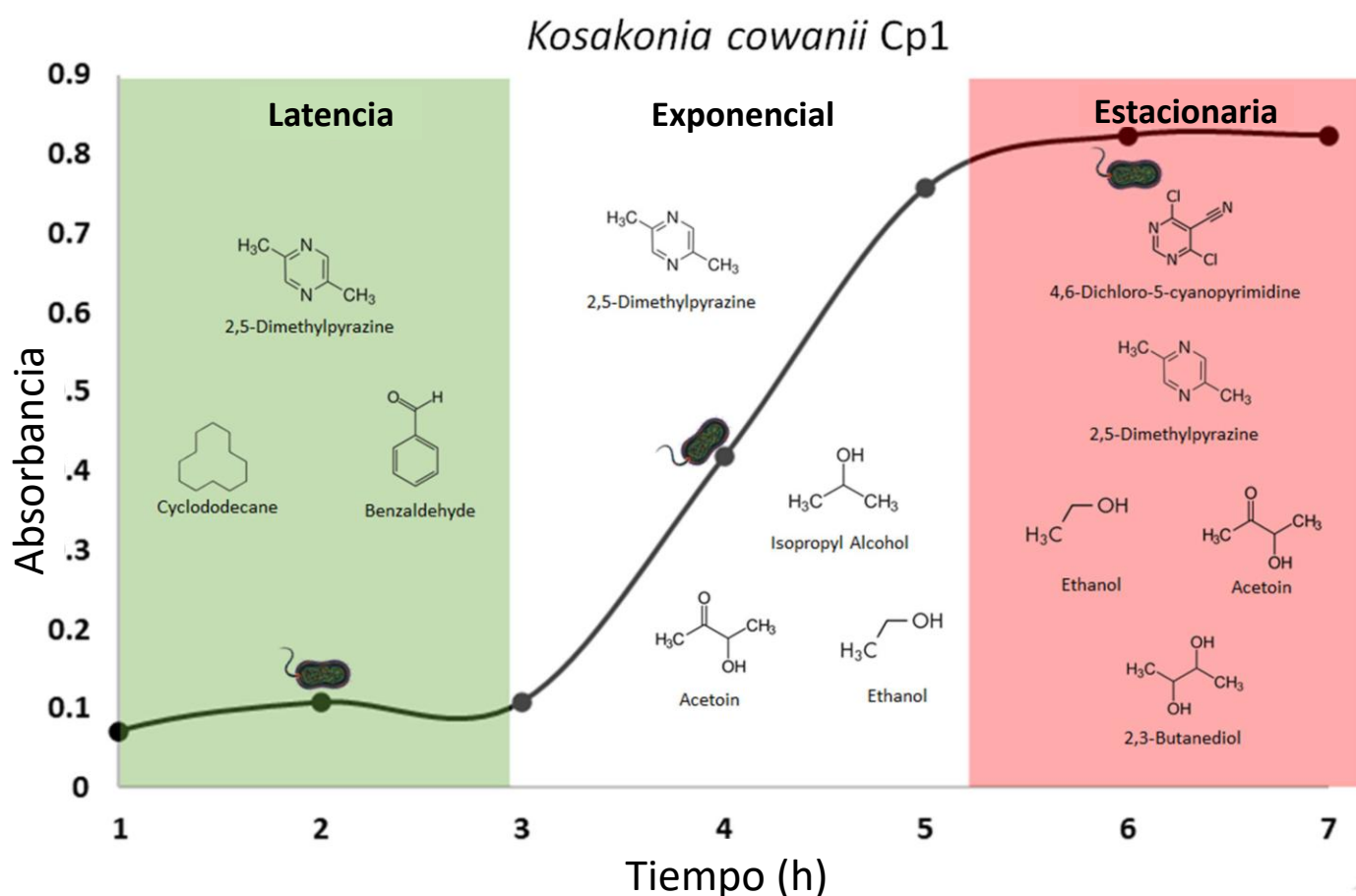
A partir de la dinámica de crecimiento de *K. cowanii*, se realizó la caracterización de los COV's en los tiempos establecidos para cada fase de crecimiento, esto como una aproximación de los metabolitos secundarios que están presentes en cada una de las etapas de desarrollo de la bacteria. Los resultados del análisis de CG-EM muestran un total de 183 compuestos identificados durante la fase lag, 179 para la exponencial y 153 en la estacionaria. De estos, se detectaron aproximadamente 16 compuestos mayoritarios (área relativa >1 %) durante la fase lag, mientras que en las fases exponencial y estacionaria se identificaron 21 compuestos mayoritarios en

cada una, tal como se muestra en el cuadro 3. Los volátiles mostrados, pertenecen a grupos químicos como alcoholes (25 %), cetonas (12 %), pirazinas (25 %), ácidos (8.3 %), aldehídos (4.1%), hidrocarburos (8.3 %), ésteres (4.1 %) y otros (13.1 %).

**Cuadro 3.** Compuestos orgánicos volátiles (COV's) predominantes en cada fase de crecimiento, según su área relativa (%).

COV's	Porcentaje de Área Relativa (%)		
	<i>Fase lag</i>	<i>Fase exponencial</i>	<i>Fase estacionaria</i>
<b>Antranilato de metilo</b>	3.22	2.11	0.00
<b>Ácido octanoico</b>	1.14	0.84	1.24
<b>Ciclododecano</b>	13.44	7.01	2.74
<b>Benzaldehído</b>	5.38	0.76	1.09
<b>3-etil-2,5-dimetilpirazina</b>	1.44	2.07	1.10
<b>Trimetilpirazina</b>	1.83	1.52	0.86
<b>2-Etil-5-metil-pirazina</b>	1.44	1.00	0.5
<b>2,5-dimetil-pirazina</b>	19.06	12.58	9.15
<b>Metilpirazina</b>	2.17	1.58	1.35
<b>Pirazina</b>	2.34	0.00	0.00
<b>Heptano</b>	1.82	3.26	2.74
<b>2-octamina</b>	0.00	1.70	0.00
<b>Hexametil-ciclotetrasiloxanos</b>	0.00	1.63	1.24
<b>Isopropyl Alcohol</b>	0.00	7.93	0.00
<b>Etanol</b>	0.04	5.28	7.57
<b>Octametil ciclotetrasiloxano</b>	2.78	1.57	1.24
<b>3-metil-1-butanol</b>	2.50	3.09	4.94
<b>Acetoina</b>	0.00	5.46	6.04
<b>1-octanol</b>	0.18	1.26	0.86
<b>1-decanol</b>	0.00	1.92	1.73
<b>2-butanona</b>	1.15	1.01	1.43
<b>2,3-butanediol</b>	0.00	1.35	4.17
<b>1-butanol</b>	0.28	0.50	1.62
<b>4,6-dicloro-5-cianopirimidina</b>	0.00	0.07	12.26
<b>Ácido nonanoico</b>	0.00	0.00	2.37
<b>Otros</b>	39.79	34.5	33.56

En la Figura 6, se presentan los COV's con mayor abundancia relativa a lo largo del crecimiento bacteriano. Durante la etapa lag, destacaron la 2,5-dimetil-pirazina (19.06 %), ciclododecano (13.44 %) y benzaldehído (5.38 %). En la fase exponencial, se observaron niveles elevados de isopropil alcohol (7.93 %), acetoína (5.46 %), etanol (5.28 %) y 2,3-butanediol (1.35 %), mientras que la fase estacionaria mostró un incremento en acetoína (6.04 %), etanol (7.57 %), 2,3-butanediol (4.17 %) y 4,6-dicloro-5-cianopirimidil (12.26 %).



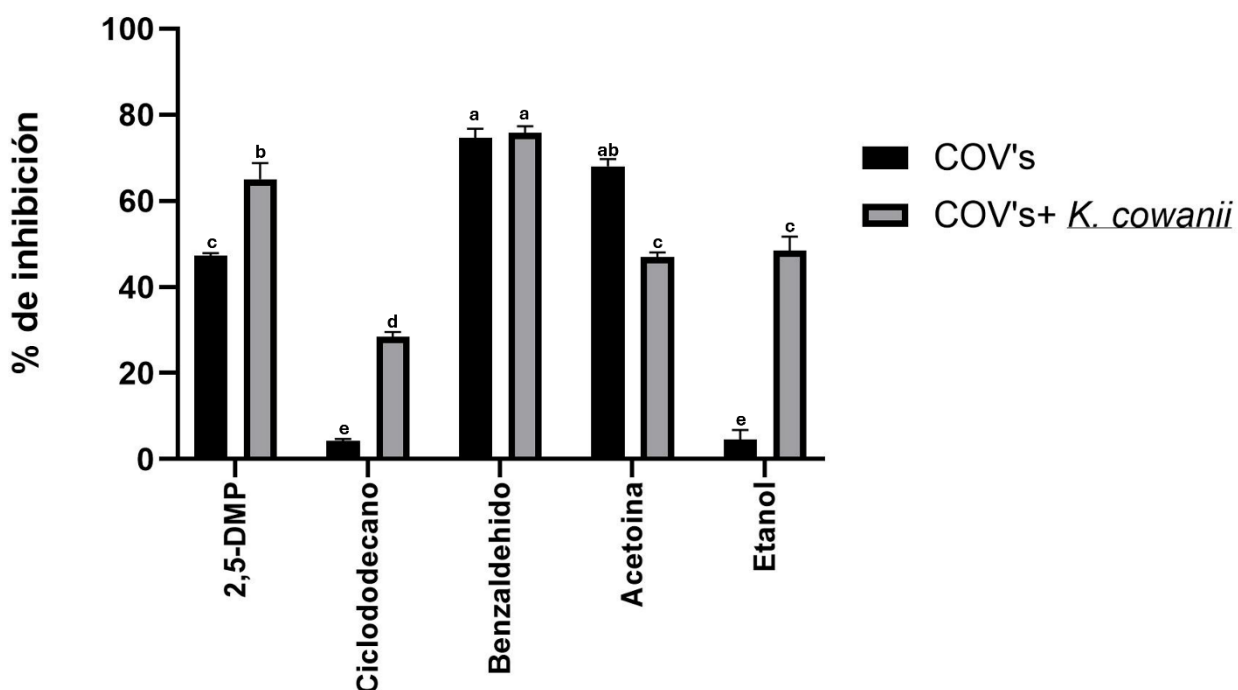
**Figura 6.** COV's mayoritarios producidos por *K. cowanii* durante sus fases de crecimiento analizados a las 2, 4 y 6 h mediante CG-EM.

#### 6.4 Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de los COV's mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento de *Kosakonia cowanii* contra *Sclerotium rolfsii*.

Una vez identificados los COV's para cada fase de crecimiento, el objetivo fue identificar la capacidad antifúngica de cada compuesto mayoritario de *K. cowanii* y, además, si esta actividad se veía potenciada a partir de la interacción con la bacteria.

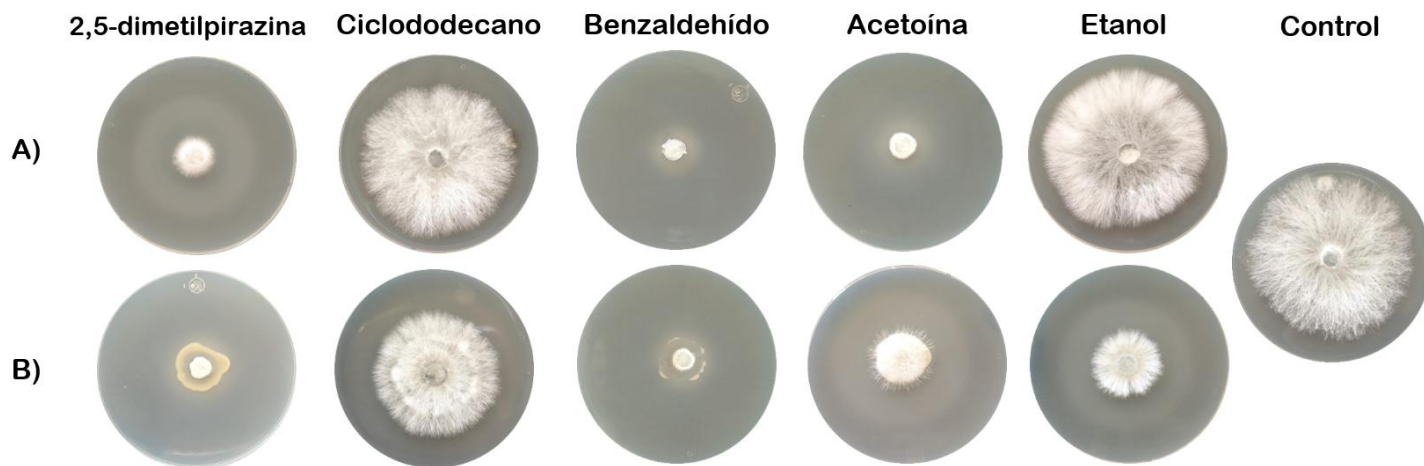
De acuerdo con el perfil de COV's caracterizados para cada fase de crecimiento, fueron cinco los compuestos que presentaron un área de pico relativa más altas: 2,5-DMP (2,5-dimetil-pirazina), ciclododecano y benzaldehído para la fase de latencia y; 2,5-DMP, acetoína y etanol, para la fase exponencial y estacionaria. Para comprender el efecto de estos COV's en el crecimiento micelial, dichos compuestos fueron obtenidos comercialmente y probados en *S. rolfsii*. Para el efecto individual, se encontró que 2,5-DMP tenía una tasa de inhibición del 47 % en concentraciones de 100 µL, mientras que se observó una tasa de inhibición del 65% cuando el compuesto estaba en interacción con *K. cowanii*. Por otra parte, el ciclododecano, en una concentración de 50 µL, presentó un porcentaje de inhibición del 4.6 %, en comparación con una tasa de inhibición micelial del 29% en conjunto con la bacteria. A su vez, el benzaldehído por sí solo mostró una inhibición del 74% con una concentración de 10 µL, presentándose una tasa de inhibición similar del 76% en presencia con la bacteria, mostrando que el efecto durante la interacción era poco significativo. Para la acetoína, la tasa de inhibición micelial por el compuesto (en una concentración de 150 µL) fue del 68%. Sin embargo, este efecto disminuyó cuando se presentaba una interacción con la bacteria (46%) indicando que el efecto de este volátil es complejo en la actividad antifúngica total. Por último, también fue probado el compuesto etanol, presentando una tasa de inhibición del crecimiento micelial del 4.6% para una concentración de 200 µL, en un contraste significativo

con la presencia de la bacteria, presentando una inhibición del 48%, tal como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Inhibición del crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* por COV's estándar y su efecto en interacción con *Kosakonia cowanii*. Los tratamientos aplicados fueron: ciclododecano con una concentración de 50  $\mu$ L; benzaldehído con 10  $\mu$ L, 2,5-dimetilpirazina (2,5-DMP) con 100  $\mu$ L, acetoína con 150  $\mu$ L y etanol con 200  $\mu$ L. Para cada uno de los compuestos se midió la tasa de inhibición individualmente y en conjunto con *K. cowanii*, en ambos casos con las concentraciones correspondientes.

Estos resultados muestran que la interacción de *K. cowanii* con cada uno de los COV's identificados durante su crecimiento tiene un efecto diferente en el hongo, siendo en algunos casos, como el etanol, un potencial inhibidor. Curiosamente, en el caso de la acetoína la tasa de inhibición del crecimiento micelial fue disminuida, tal como se muestra en la Figura 8, demostrando que las interacciones entre compuestos pueden depender de varios factores.

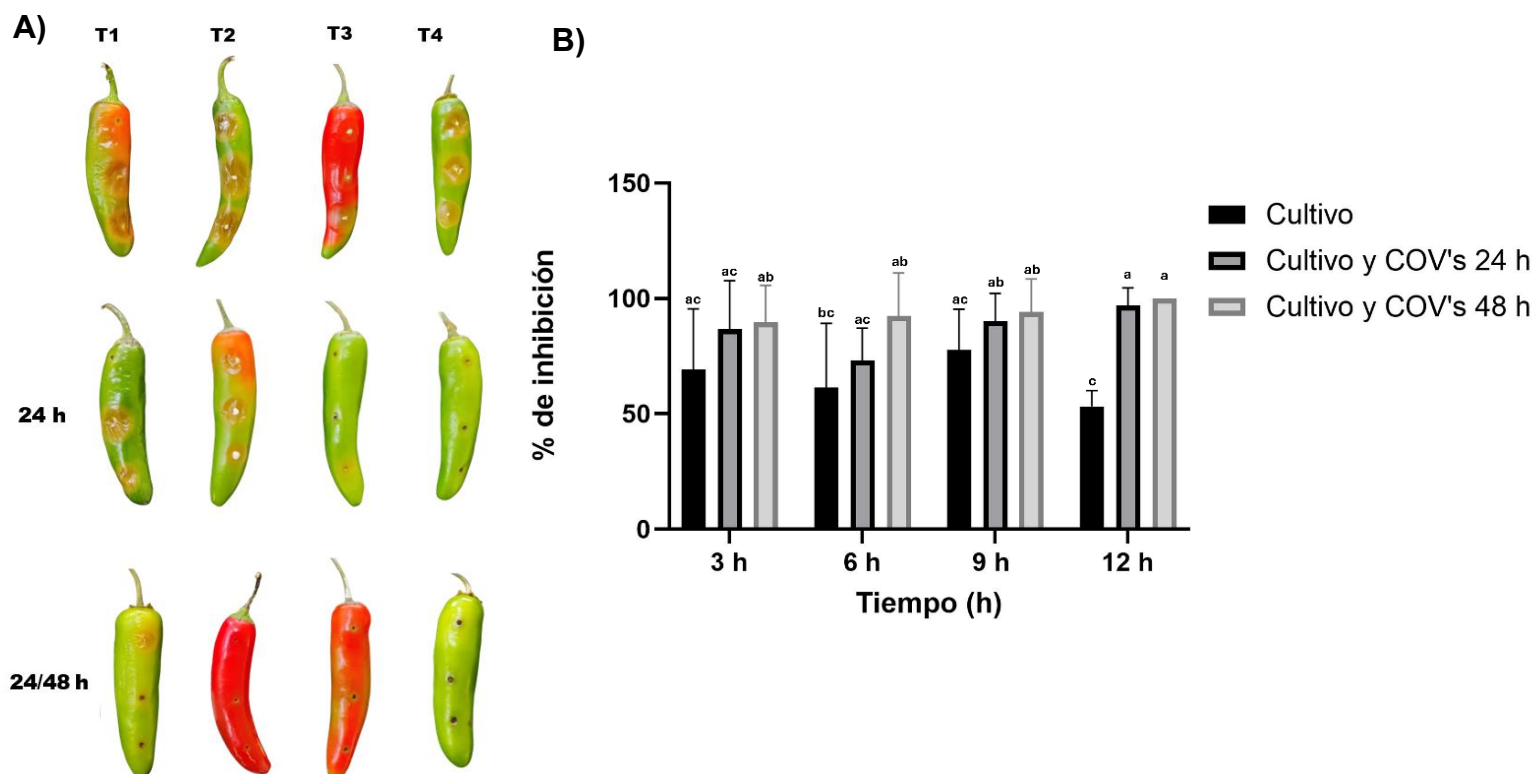


**Figura 8.** Efecto en el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* en presencia de COV's. A) muestra el efecto de los COV's estándar sobre el crecimiento de *S. rolfsii*. B) representa el efecto de los mismos compuestos, pero cuando se encuentran en interacción con *K. cowanii*. Los compuestos utilizados corresponden a los identificados como mayoritarios en cada una de las fases de crecimiento bacteriano.

6.5 Evaluación de cinéticas de competencia de colonización en frutos de *Capsicum annuum* L. entre *Kosakonia cowanii* y *Sclerotium rolfsii* para determinar la participación de COV's.

Se evaluó la capacidad de *K. cowanii* y sus COV's para inhibir la infección causada por *S. rolfsii* en frutos de chile serrano (*Capsicum annuum* L.), mediante ensayos de competencia. Para ello, los frutos fueron inoculados inicialmente con *K. cowanii* y, tras un intervalo de 3, 6, 9 o 12 h, se realizó la infección con *S. rolfsii*. Los resultados muestran que esta aplicación previa reduce la intensidad y el ritmo de aparición de los síntomas de pudrición. No obstante, en todos los tratamientos, el hongo logró establecerse y progresar, afectando por completo el tejido del fruto. Como se observa en la Figura 9a, una sola aplicación de la bacteria no fue suficiente para impedir el desarrollo de la enfermedad, ya que los síntomas de pudrición inducidos por *S. rolfsii* persistieron.

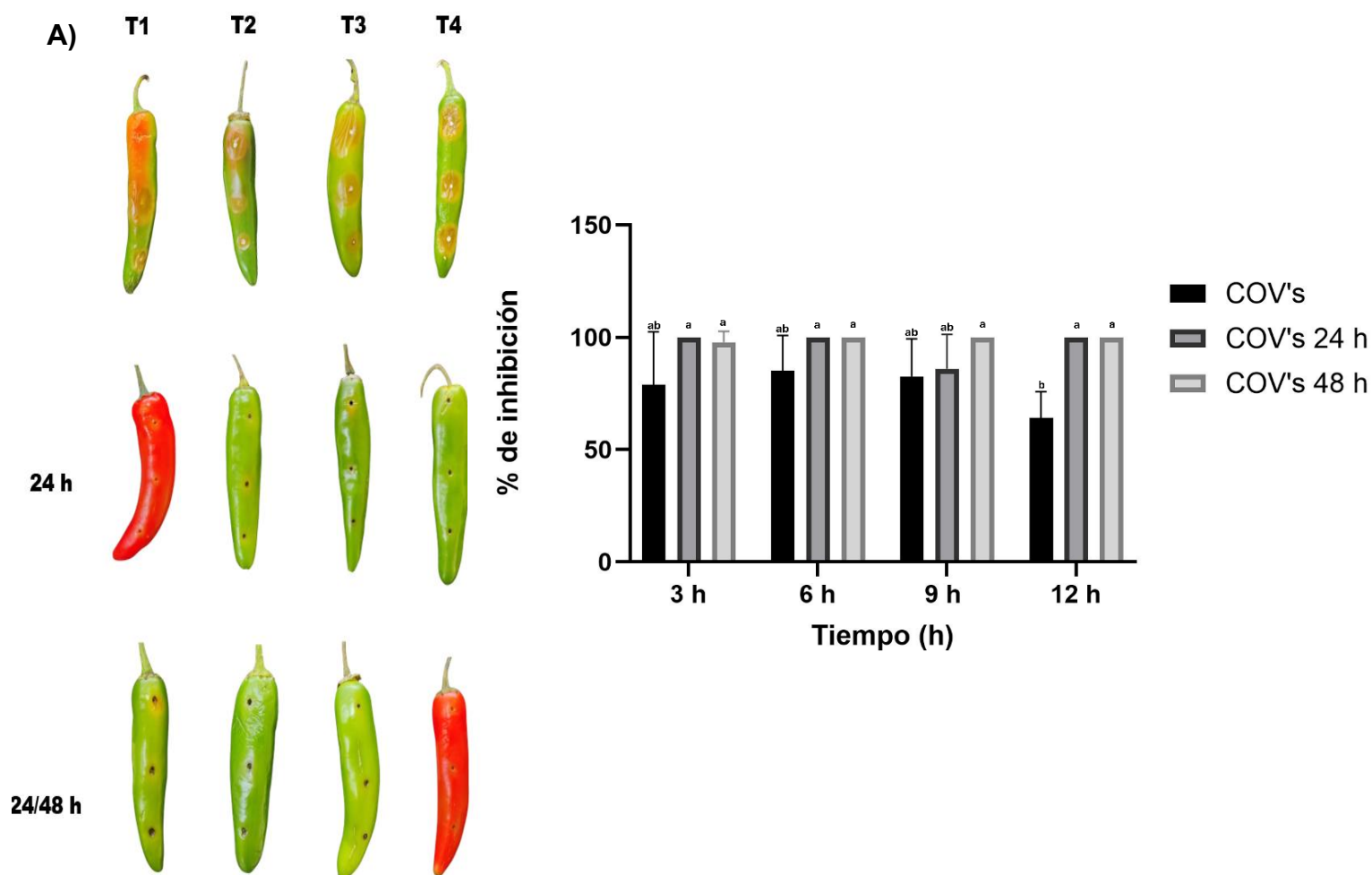
Por otra parte, se determinó el efecto de una segunda aplicación a las 24 horas, utilizando filtrados libres de células que contenían los COV's producidos por *K. cowanii*. Estos filtrados fueron obtenidos en los mismos intervalos de crecimiento bacteriano utilizados en el primer tratamiento (3, 6, 9 y 12 h) y aplicados de forma correspondiente a cada condición (por ejemplo, los COV's recolectados a las 3 h fueron aplicados en combinación con la primera inoculación realizada a las 3 h). Como se muestra en la Figura 9, esta segunda aplicación potenció significativamente la inhibición de *S. rolfsii*, principalmente en los tratamientos correspondientes a los tiempos de 9 y 12 h, donde se logró un porcentaje de inhibición del 90 % y 96 %, respectivamente. La actividad antifúngica se incrementó aún más con una tercera aplicación a las 48 h, la cual mejoró la eficacia en todos los tiempos evaluados. En particular, los tratamientos de 9 y 12 h alcanzaron niveles de inhibición del 96 % y 100 %, respectivamente, reflejando un efecto acumulativo y dependiente del tiempo de exposición a los COV's.



**Figura 9.** Evaluación de la inhibición de *Sclerotium rolfsii* en frutos de *Capsicum annuum* L. mediante la aplicación de *Kosakonia cowanii* y sus COV's. (A) Inoculación con *Sclerotium rolfsii* a las 3, 6, 9 y 12 h (T1, T2, T3 y T4 respectivamente). La infección fúngica ocurrió después de la aplicación bacteriana. Se evaluó el efecto de una segunda y tercera aplicación a las 24 y 48 h, respectivamente con sus COV's. (B) Porcentaje de inhibición para cada tratamiento analizado mediante ANOVA de dos vías y prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se representan mediante letras ( $p<0.05$ ).

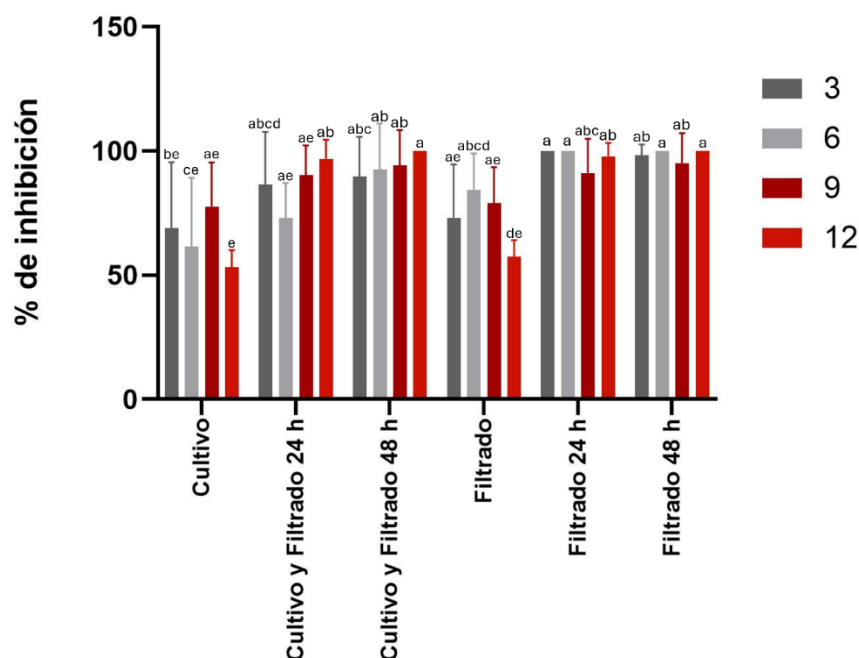
También se evaluó la actividad antifúngica de los COV's de *K. cowanii* de forma independiente (Figura 10). Los COV's fueron recolectados a las 3, 6, 9 y 12 h de crecimiento bacteriano y aplicados. En la primera aplicación, los COV's lograron retrasar el inicio de los síntomas causados por *S. rolfsii*; sin embargo, la inhibición observada no fue significativa, con un promedio general del 65 %. Por el contrario, la segunda aplicación realizada a las 24 h mostró una eficacia mayor, alcanzando un promedio de inhibición del 97 % en todos los tiempos evaluados. Finalmente, con una tercera aplicación a las 48 h, la inhibición mejoró aún más, alcanzando hasta un 99 % de eficacia general, y logrando una inhibición total (100 %) en los tratamientos correspondientes a los COV's recolectados a las 6, 9 y 12 h.





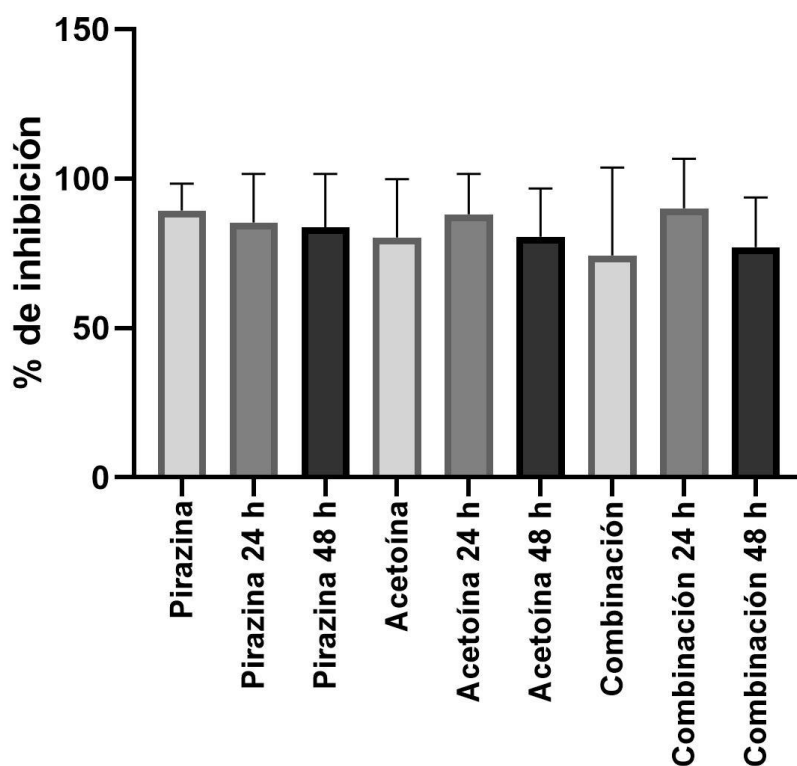
**Figura 10.** Efecto de los COV's de *Kosakonia cowanii* sobre la infección en frutos de *Capsicum annuum* L., inoculados con *Sclerotium rolfsii*. (A) Imágenes representativas de los tratamientos evaluados: T1 (COV's obtenidos a las 3 h), T2 (COV's a las 6 h), T3 (COV's 9 h) y T4 (COV's 12 h). Se muestra la segunda y tercera aplicación a las 24 y 48 h respectivamente con los COV's correspondientes a cada tiempo. (B) Porcentaje de inhibición para cada tratamiento analizado mediante ANOVA de dos vías y prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se representan mediante letras ( $p < 0.05$ )

La evaluación comparativa de los tratamientos con *K. cowanii* en interacción directa con sus COV's, así como de los COV's aplicados de forma independiente, reveló que los tratamientos más eficaces fueron aquellos con aplicaciones múltiples. En particular, el tratamiento con *K. cowanii* más una tercera aplicación de sus COV's a las 48 h alcanzó un promedio de 94 % de inhibición. Por otro lado, los tratamientos con COV's por sí solos mostraron una eficacia aún mayor, con un promedio del 97 % de inhibición tras la segunda aplicación a las 24 h, y de un 99 % tras la tercera aplicación a las 48 h, como se muestra en la Figura 11. Estos resultados indican que, si bien la actividad antifúngica del cultivo completo es ligeramente inferior a la del filtrado con COV's, sigue siendo una estrategia efectiva para reducir la infección causada por *S. rolfsii*.



**Figura 11.** Porcentaje de inhibición de *Sclerotium rolfsii* en respuesta a los tratamientos con cultivo y COV's de *Kosakonia cowanii* (filtrados). Los valores de inhibición se presentan en función del tiempo de aplicación (0, 3, 6, 9 y 12 h). Los análisis estadísticos siguieron los parámetros de la prueba ANOVA de dos vías y prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas se representan con letras ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, el análisis del porcentaje de inhibición de *S. rolfsii* frente a tratamientos con compuestos estándar (2,5-dimetil-pirazina o acetoína) y en combinación, aplicados una sola vez, dos veces (24 h) o tres veces (48 h), mostró niveles de inhibición consistentes en todos los tratamientos evaluados (Fig. 12). En todos los casos, el porcentaje de inhibición superó el 80 %, sin diferencias estadísticamente significativas entre los distintos compuestos ni entre las frecuencias de aplicación. Aunque se observó una ligera tendencia a una mayor inhibición con la combinación de compuestos y aplicaciones múltiples (24 h y 48 h), esta diferencia no fue significativa. Estos resultados sugieren que tanto la 2,5-dimetil-pirazina como la acetoína, así como su combinación, poseen una actividad antifúngica robusta contra *S. rolfsii*, la cual se mantiene con independencia del número de aplicaciones.



**Figura 12.** Porcentaje de inhibición de *Sclerotium rolfsii* en frutos de *Capsicum annuum* L. en presencia de compuestos volátiles estándar: 2,5-dimetil-pirazina, acetoína y su combinación. Los tratamientos consistieron en una sola aplicación, una segunda aplicación

a las 24 h, o una tercera aplicación a las 48 h. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (ANOVA,  $p>0.05$ ).

Estos resultados indican que los tratamientos con el volátiloma obtenido a las 9 y 12 h presentan la mayor eficacia en la inhibición del hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*, logrando tasas de inhibición más elevadas y representando una alternativa de menor costo para su control.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Identificación del perfil de los COV's mayoritarios pertenecientes a *Kosakonia cowanii* durante sus fases de crecimiento

En este estudio, se analizó por primera vez el volátiloma de *Kosakonia cowanii* en cada una de sus fases de crecimiento, lo que permitió identificar compuestos mayoritarios pertenecientes a diversas clases químicas, incluidas cetonas, pirazinas, alcoholes, aldehídos e hidrocarburos, entre otras (Figura 6). La composición química y concentración de los COV's está influenciada por múltiples factores, siendo los ambientales (como la disponibilidad de oxígeno, la humedad, la temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, etc.) algunos de los más determinantes (Schulz-Bohm et al., 2017). Además, se ha reportado que tanto la naturaleza como la abundancia de estos compuestos pueden variar según la etapa de crecimiento del microorganismo (Misztal et al., 2018).

Uno de los componentes más relevantes fue 2,5-dimetil-pirazina, detectada de manera consistente a lo largo de todas las fases de crecimiento de *K. cowanii*, alcanzando su mayor abundancia relativa durante la fase de latencia (19 %). Sin embargo, también se detectó en la fase exponencial (12 %) y en la fase estacionaria (9 %), lo que sugiere una producción continua a lo largo del ciclo de crecimiento bacteriano. Este comportamiento podría deberse su origen en rutas metabólicas centrales, principalmente a partir de la degradación de aminoácidos como la treonina y serina (Silva-Junior et al., 2018). Desde una perspectiva ecológica, las pirazinas han sido descritas como compuestos bioactivos con funciones clave en la comunicación microbiana y en la competencia por el nicho ecológico, al participar como moléculas señalizadoras e inhibidores del crecimiento de otros microorganismos, incluidos hongos fitopatógenos (Audrain et al., 2015). La aplicación de 2,5-dimetil-pirazina como compuesto estándar confirmó su potencial antifúngico contra *S. rolfsii*, logrando una inhibición del 47 % en ensayos *in vitro* y

del 83 % en condiciones *in vivo*, lo que refuerza su posible papel competitivo (Audrain et al., 2015).

En contraste, compuestos como el ciclododecano y el benzaldehído solo fueron detectados durante la fase lag y no después de este punto. La producción de benzaldehído en bacterias se ha asociado con la activación de rutas metabólicas específicas, particularmente aquellas involucradas en la degradación o transformación de precursores aromáticos como la fenilalanina, lo cual podría reflejar una respuesta metabólica de la bacteria ante condiciones ambientales iniciales (Gummalla & Broadbent, 2001). Por otro lado, el ciclododecano es un hidrocarburo con propiedades hidrofóbicas y potencialmente tóxicas, capaz de adsorberse en partículas del suelo y bioacumularse en los tejidos de organismos vivos, confiriendo ventajas competitivas a la bacteria (Ofosu et al., 2021). Durante la fase lag, *K. cowanii* podría estar utilizando precursores lipídicos para la biosíntesis de compuestos cíclicos, sugiriendo que la producción de ciclododecano podría derivarse de la ciclación de ácidos grasos, compuestos que, además de participar en la estructura celular, juega un papel relevante en la competencia microbiana a partir de modificar parámetros ambientales como el pH o inducir la síntesis de metabolitos inhibitorios como el acetato (Vázquez & Rial, 2014). Sin embargo, se requieren estudios que confirmen la ruta metabólica específica responsable de su producción e impacto ecológico

La acetoína fue uno de los compuestos predominantes en las fases exponencial y estacionaria, lo que sugiere que su producción está estrechamente vinculada a las condiciones metabólicas específicas de estos períodos. Esto coincide con los momentos de alta actividad metabólica, donde la vía fermentativa de butanodiol y su respectiva producción de metabolitos secundarios está en su punto máximo (Tuttobene et al., 2019). En contraste, la ausencia de acetoína en la fase lag podría deberse a una baja actividad metabólica, característica de esta etapa de adaptación, en la que la célula prioriza la regulación de mecanismos de supervivencia antes de entrar en un crecimiento activo (Molina et al., 2019).

Durante la fase estacionaria también se detectaron alcoholes como etanol y 2,3-butanodiol, productos igualmente provenientes de la vía fermentativa del butanodiol, comúnmente encontrada en miembros de la familia Enterobacteriaceae (Audrain et al., 2015). Esta vía, además de generar energía bajo condiciones limitadas de oxígeno, produce compuestos que pueden influir en las relaciones microbianas, fomentando interacciones mutualistas y promoviendo la estabilidad poblacional (Venkataraman et al., 2011). Por otro lado, la aparición de isopropanol durante la fase exponencial sugiere una ruta fermentativa secundaria a partir de acetona. Dado su conocido efecto antimicrobiano, este alcohol podría contribuir a la competencia ecológica al limitar el desarrollo de otros microorganismos en el entorno (Luther et al., 2015).

7.2 Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de los COV's mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento de *Kosakonia cowanii* contra *Sclerotium rolfsii*.

*Kosakonia cowanii* es una bacteria conocida por su capacidad de colonizar diversos nichos ecológicos, como suelo, agua y tejidos de plantas, así como por establecer asociaciones con insectos y otros organismos (Jan-Roblero et al., 2020). Aunque se han descrito en esta especie plásmidos portadores de factores de virulencia, también presenta rasgos de bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR), lo que sugiere un metabolismo versátil que favorece su adaptación a múltiples ambientes (Yang et al., 2018). Estudios recientes respaldan esta dualidad ecológica; por ejemplo, González Espinosa et al. (2023) identificaron en *K. cowanii* una elevada diversidad de COV's entre los cuales destacan grupos químicos con actividad antifúngica previamente reportada en la literatura. Estos hallazgos refuerzan el potencial de *K. cowanii* como organismo de interés para la protección y conservación agrícola.

Según los ensayos de interacción microbiana realizados indican que COV's de *K. cowanii* es capaz de inhibir hasta en un 60 % el crecimiento micelial de *S. rolfsii*. Por otra parte, dicha inhibición se intensificó notablemente cuando estos compuestos interactuaron con la dilución de *K. cowanii* que estaba en competencia directa con el hongo, alcanzando una inhibición completa del crecimiento micelial (100 %) y evidenciando la formación de burbujas en el medio de cultivo. Este fenotipo, mostrado en la Figura 4, podría estar asociado a mecanismos metabólicos específicos, posiblemente relacionados con una respuesta al estrés oxidativo inducido por la interacción fúngica, sin embargo, son necesarios estudios para esclarecer los posibles mecanismos implicados (Bearson et al., 2006).

El análisis del volatiloma a lo largo de las diferentes fases de crecimiento de *K. cowanii* reveló que varios de los compuestos volátiles más abundantes se mantuvieron constantes en todas las etapas. Esta recurrencia sugiere que dichos COV's cumplen funciones clave en el ciclo de vida bacteriano, posiblemente relacionadas con la adaptación, el crecimiento, la reproducción y la colonización del nicho ecológico, como se discutió previamente. Con el fin de identificar el momento del crecimiento bacteriano en el que se maximiza la inhibición de *S. rolfsii*, se evaluó la actividad antifúngica de los compuestos mayoritarios identificados en cada fase de crecimiento.

La 2,5-dimetil-pirazina mostró una inhibición del 47 % sobre el crecimiento de *S. rolfsii*, además fue el único compuesto volátil identificado en todas las fases del crecimiento bacteriano, lo que sugiere un papel central en el metabolismo, señalización y comunicación celular de *K. cowanii*. Su presencia constante también podría estar relacionada con su participación en la formación de biopelícula, los cuales favorecen la adherencia y colonización del nicho (Huang et al., 2025). Asimismo, el potencial antifúngico de este compuesto ha sido previamente reportado en *Pseudomonas putida* BP25, donde se demostró su eficacia frente a hongos del género *Colletotrichum*, causantes de la antracnosis (Janamatti et al., 2022). Las pirazinas, debido a su baja polaridad y naturaleza lipofílica, pueden



atravesar fácilmente las membranas celulares e interactuar con enzimas clave del hongo, como la succinato deshidrogenasa. Esta interacción puede interferir con funciones metabólicas esenciales, afectando la respiración celular y contribuyendo a la inhibición del crecimiento fúngico (Su et al., 2022).

La acetoína (3-hidroxi-2-butanona) fue otro de los compuestos volátiles más abundantes, detectado tanto en la fase exponencial como en la estacionaria de crecimiento. Este compuesto mostró una inhibición significativa del 68 % sobre *S. rolfsii*, lo que sugiere una alta eficacia antifúngica. Su producción está asociada a rutas fermentativas secundarias que permiten contrarrestar la acidificación intracelular generada por la acumulación de ácido pirúvico, un fenómeno común en condiciones de alta disponibilidad de glucosa, pH bajo o ambientes anaeróbicos (Cesselin et al., 2021). Además de su función en el metabolismo bacteriano, se ha reportado que la acetoína puede inducir estrés oxidativo en células fúngicas, alterando tanto su morfología como su actividad metabólica (Xiao & Lu, 2014).

También se identificaron alcoholes derivados de rutas fermentativas, tales como isopropanol, etanol y 2,3-butanodiol, presentes principalmente en las fases exponencial y estacionaria. Estos compuestos son productos esperados durante el crecimiento bacteriano bajo condiciones fermentativas. No obstante, los ensayos de inhibición indicaron que el etanol presentó una actividad antifúngica poco significativa, con apenas un 4.6 % de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii*, esto a pesar de que ha sido reportado el potencial antifúngico de estos alcoholes por mecanismos como la desnaturalización de proteínas, la disrupción de membranas celulares o la inducción de estrés oxidativo (Bashir et al., 2022; Tuan et al., 2022; Yi et al., 2016). La baja eficacia observada podría explicarse por su alta volatilidad, rápida evaporación o una posible inestabilidad del compuesto en el sistema experimental, lo que reduciría el tiempo de exposición efectiva del hongo al compuesto activo (Do Dat et al., 2023).

Otro de los compuestos identificados durante la fase lag fue el ciclododecano, que presentó una inhibición limitada del crecimiento micelial de *S. rolfsii*, con apenas un

4.6 %. Este hidrocarburo ha sido previamente reportado como componente volátil en extractos de salvado de arroz, mazorca de maíz, mijo verde y amarillo, y se le ha atribuido actividad antibacteriana, particularmente contra *E. coli*. Dicho efecto ha sido relacionado con interacciones hidrofóbicas entre el ciclododecano y cadenas laterales de aminoácidos como alanina, valina y metionina presentes en la pared celular (Ofosu et al., 2021). Sin embargo, su baja eficacia frente a *S. rolfii* sugiere que este tipo de interacciones podrían no ser suficiente para afectar la integridad estructural o funcional de hongos filamentosos, cuyo metabolismo y arquitectura celular son más complejos que los de bacterias Gram negativas. Asimismo, su naturaleza hidrofóbica podría limitar su difusión efectiva en medios acuosos, reduciendo su disponibilidad para interactuar con estructuras fúngicas.

Por otro lado, el benzaldehído presentó un elevado porcentaje de inhibición del fitopatógeno (74 %), lo cual podría atribuirse a su capacidad para alterar los sistemas celulares antioxidantes. Este compuesto interfiere con la homeostasis redox celular y desestabiliza los mecanismos antioxidantes del hongo, actuando como un agente quimiosensibilizador (Kim et al., 2011). Asimismo, un estudio previo reportó su capacidad para inducir alteraciones en la integridad de la membrana celular, lo que refuerza su potencial como una alternativa prometedora en el control antifúngico (Neto et al., 2021).

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en los porcentajes de inhibición del crecimiento radial cuando los compuestos volátiles identificados interactúan directamente con *K. cowanii*. Este fenómeno sugiere una actividad antifúngica beneficiada entre los metabolitos bacterianos y los compuestos aplicados externamente. De acuerdo con lo reportado por Mookherjee et al. (2018), ciertos compuestos volátiles pueden actuar no solo como inhibidores directos del fitopatógeno, sino también como precursores metabólicos o señales químicas que activan rutas metabólicas en la bacteria, favoreciendo la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica como el 2-feniletanol y 3-metil-1-butanol.

A pesar de los resultados obtenidos, los ensayos de inhibición del crecimiento micelial mediante COV's emitidos por bacterias *in vitro* representan apenas un primer acercamiento para evaluar el potencial antifúngico de ciertos microorganismos, permitiéndonos identificar compuestos con actividad biológica en condiciones controladas. Sin embargo, factores como el pH, los niveles de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la humedad e incluso las interacciones con otros microorganismos y sus metabolitos pueden influir significativamente en los resultados. Por ello, la realización de ensayos *in vivo* se vuelve esencial, ya que permiten simular de manera más cercana las condiciones de cultivo y del entorno natural.

7.4 Evaluación de cinéticas de competencia de colonización en frutos de *Capsicum annuum* L. entre *Kosakonia cowanii* y *Sclerotium rolfsii* para determinar la participación de COV's.

Según los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* realizados en frutos de *Capsicum annuum* L., donde se evaluó la inoculación de *K. cowanii* y sus COV's en diferentes intervalos (3, 6, 9 y 12 h), se identificó que el tiempo es un factor determinante en la eficacia antifúngica del tratamiento. A medida que aumenta el intervalo entre la aplicación de *K. cowanii* y la posterior inoculación de *S. rolfsii*, se observa una mayor inhibición del halo de infección. En particular, los tratamientos realizados a las 9 y 12 horas, en combinación con aplicaciones consecutivas de COV's a las 24 y 48 horas, lograron reducciones en la infección de hasta el 96 % y 100 %, respectivamente.

Estos resultados sugieren que un mayor tiempo de colonización permite a *K. cowanii* establecerse adecuadamente en el tejido vegetal y alcanzar una fase metabólicamente activa en la que se incrementa la producción de metabolitos antifúngicos. Estudios previos, como el realizado por X. Li et al. (2020), han destacado el papel fundamental de los COV's bacterianos en las comunidades microbianas del suelo para inhibir a hongos fitopatógenos. Se demostró que el volátiloma bacteriano tiene un efecto inhibitorio mayor sobre hongos, provocando

alteraciones estructurales y metabólicas, mientras que su impacto sobre otras bacterias es limitado. En este contexto, la aplicación repetida de COV's refuerza el efecto antifúngico, al mantener una concentración sostenida de metabolitos activos en el tejido vegetal, ofreciendo así una protección continua frente a la infección.

De manera complementaria, los ensayos realizados exclusivamente con los COV's recolectados a las 3, 6, 9 y 12 h posteriores al crecimiento de *K. cowanii* evidenciaron una eficacia antifúngica aún mayor que los tratamientos con el cultivo bacteriano. En particular, los COV's generados a las 9 y 12 horas alcanzaron porcentajes de inhibición promedio del 97% y 99 %, respectivamente, cuando se aplicaron por segunda vez a las 24 h y una tercera vez a las 48 h. Esto se atribuye a que los metabolitos pueden actuar de forma más rápida y eficiente que la bacteria viva, debido a su capacidad para difundirse libremente en los tejidos vegetales y generar un entorno inhóspito para el desarrollo de *S. rolfsii* (Zhao et al., 2022). A diferencia de los microorganismos vivos, que requieren un periodo de adaptación a las condiciones fisicoquímicas del fruto, como el pH, la presencia de metabolitos secundarios o compuestos antimicrobianos endógenos del chile, los COV's no enfrentan estas limitaciones, permitiendo una acción inmediata (Schroth & Hancock, 1982). La biotecnología basada en COV's microbianos ha sido ampliamente documentada como una estrategia eficaz tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, no solo por su efecto directo sobre patógenos, sino también por su papel en la facilitación de la colonización, interacción y establecimiento de microorganismos benéficos en entornos competitivos (Almeida et al., 2023). En este contexto, los resultados aquí presentados subrayan el valor del volátiloma de *K. cowanii* como una herramienta prometedora para el control postcosecha de enfermedades en frutos, destacando su potencial para aplicaciones agrícolas sostenibles.

Por otro lado, los ensayos *in vivo* se realizaron únicamente con el volátiloma completo y su interacción con *K. cowanii*, esto debido a los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* y que los compuestos estándar junto con la bacteria no mostraron resultados significativos (Anexo 2). Aunque compuestos individuales

como la 2,5-dimetilpirazina y la acetoína mostraron actividad antifúngica (65 % y 68 % de inhibición, respectivamente), se observó que el conjunto total de compuestos volátiles generó una respuesta más contundente en la inhibición de *S. rolfsii* (100 %), tal como se muestra en la Figura 4b. Esta mayor eficacia podría explicarse por la activación de rutas metabólicas específicas inducidas por ciertos compuestos, o bien por efectos sinérgicos entre moléculas que actúan sobre distintos blancos celulares del hongo (Ebadzadsahrai et al., 2020).

Además, la aplicación directa de compuestos estándares sobre tejidos vegetales mostró efectos adversos, provocando daños que podrían favorecer la entrada de otros fitopatógenos (Anexo 1). Por otra parte, replicar las condiciones reales de concentración y dispersión de cada compuesto por separado resulta complejo y podría comprometer la efectividad biológica del tratamiento, ya que dentro del volatiloma también se identificaron compuestos con potencial antifúngico como el 1-deceno (Montes-Osuna et al., 2022), así como moléculas implicadas en la comunicación, como el 1-undeceno (Dupont et al., 2023), los cuáles, a pesar de no ser los más abundantes, podrían ser importantes reguladores en las poblaciones bacterianas. Por estas razones, se optó por continuar la evaluación utilizando el volatiloma completo, buscando simular condiciones más cercanas a las que ocurren en el ambiente natural. Además, aunque los COV's individuales pueden ser efectivos, su uso aislado implica ciertos riesgos, como toxicidad ambiental o efectos no deseados en las plantas, como la sobreproducción de hormonas (Zhao et al., 2022). En este contexto, el uso del volatiloma natural se presenta como una alternativa más segura y sustentable.

Por otro lado, *K. cowanii* Cp1 ha sido reportada como parte del microbioma asociado al chile serrano, ya que fue aislada directamente de sus semillas (González Espinosa et al., 2023). Esto plantea la posibilidad de que los COV's que produce no sólo tengan actividad antifúngica, sino que también desempeñen un papel específico en su estrategia de colonización competitiva frente a fitopatógenos. Además, es posible que dichos compuestos volátiles tengan un papel fundamental

en procesos de señalización más complejos, posiblemente actuando en conjunto con metabolitos antimicrobianos no volátiles que no fueron identificados en este estudio (Foster & Bell, 2012).

Por otra parte, algunos COV's destacan por estar previamente descritos como promotores de crecimiento vegetal o inductores de resistencia sistémica, por ejemplo, la acetoína, el 2,3-butanodiol y el 1-butanol. Esto sugiere que *K. cowanii* podría desempeñar un papel multifuncional en su entorno natural, ofreciendo beneficios tanto en el control de patógenos como en la promoción del desarrollo vegetal (Rani et al., 2023). Sin embargo, las múltiples interacciones que esta bacteria puede establecer en diferentes nichos ecológicos aún deben ser exploradas con mayor profundidad.

Estas observaciones permiten comprender con mayor profundidad el papel funcional de los COV's en las dinámicas de colonización microbiana y sus posibles aplicaciones como estrategia de control poscosecha. Por ende, los hallazgos aquí presentados permiten establecer nuevas alternativas en el manejo de enfermedades fúngicas en frutos, que sean efectivas, ambientalmente responsables y compatibles con el microbioma natural del cultivo.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el volatiloema de *K. cowanii* varía a lo largo de sus fases de crecimiento, produciendo COV's con potencial antifúngico. En particular, durante la fase de latencia se detectaron COV's con marcada actividad inhibidora, como la 2,5-dimetil pirazina, el benzaldehído y el ciclododecano. No obstante, también en las fases exponencial y estacionaria se identificaron compuestos de interés, como la acetoína, el etanol y el 2,3-butanodiol. Estos hallazgos subrayan la relevancia del estado fisiológico de *Kosakonia cowanii* en la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV's), ya que dicha producción varía conforme a las demandas adaptativas propias de cada fase de crecimiento. En la fase de latencia, metabolitos como el benzaldehído, ciclododecano y 2,5-dimetil-pirazina podrían favorecer el establecimiento inicial y la exclusión de posibles competidores. En cambio, durante las fases exponencial y estacionaria se identificaron compuestos como la acetoína y el 2,3-butanodiol, los cuales no solo presentan actividad antifúngica, sino que también han sido asociados con interacciones benéficas entre microorganismos y plantas. Esta variabilidad metabólica confiere a la bacteria una ventaja ecológica al facilitar respuestas adaptativas frente a diversos escenarios competitivos y ambientales.

Comprender los procesos de colonización microbiana frente a organismos patógenos es esencial para revelar los mecanismos que intervienen en estas interacciones y, con ello, desarrollar alternativas biotecnológicas sostenibles y realmente efectivas contra fitopatógenos. Profundizar en el entendimiento de estas interacciones, así como de los compuestos involucrados, permite aplicar tecnologías con mayor precisión y generar condiciones que favorezcan la inhibición microbiana de forma más dirigida.

En este sentido, la actividad antifúngica potenciada por la interacción de los COV's con *K. cowanii* sugiere la existencia de cambios metabólicos complejos que aún deben ser explorados con mayor detalle. Los resultados observados tras

aplicaciones reiteradas indican que los tratamientos continuos podrían ser especialmente útiles para combatir enfermedades causadas por fitopatógenos con estructuras de resistencia o mecanismos de defensa bien establecidos.

Sin embargo, uno de los principales retos para trasladar el uso de COV's al ámbito agrícola es precisamente su alta volatilidad. En este contexto, la combinación de aplicaciones periódicas con la acción conjunta de la bacteria podría representar una estrategia viable para superar las limitaciones actuales de escalabilidad, abriendo paso a soluciones más eficaces y sostenibles en campo.



## 9. REFERENCIAS

- Abbas, A., Khan, S. U., Khan, W. U., Saleh, T. A., Khan, M. H. U., Ullah, S., Ali, A., & Ikram, M. (2019). Antagonist effects of strains of *Bacillus spp.* against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. *Comptes Rendus Biologies*, 342(5), 124–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crv.2019.05.002>
- Acquaroni, M., Svartz, G., & Pérez Coll, C. (2021). Developmental Toxicity Assessment of a Chlorothalonil-Based Fungicide in a Native Amphibian Species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), 680–690. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00734-x>
- Agrosemex. (2019). *Las plagas producen pérdidas de hasta un 40 por ciento en la producción agrícola, revela estudio de la FAO.*
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C.-M., & de Castro Oliveira, J. V. (2023). The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.951130>
- Andreolli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S., & Vallini, G. (2019). *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. *Microbiological Research*, 219, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.003>
- Archana Jain Surendra Sarsaiya, Q. W. Y. L., & Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409–424. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>

- Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C.-M., & Ghigo, J.-M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 222–233. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>
- Augusto, J., Brenneman, T. B., Culbreath, A. K., & Sumner, P. (2010). Night Spraying Peanut Fungicides I. Extended Fungicide Residual and Integrated Disease Management. *Plant Disease*, 94(6), 676–682. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0676>
- Aycock, R. (1966). *Stem rot and other diseases caused by Sclerotium rolfsii or the status of Rolf's fungus after 70 years*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:90823713>
- Barnard, A. M. L., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., & Salmond, G. P. C. (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1165–1183. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2042>
- Bashir, M. H., Hollingsworth, A., Thompson, J. D., Shortridge, D., Lake, S. P., Deeken, C. R., Zimble, D., Mashiatulla, M., Li, L., Singh, M. P., & Zook, E. C. (2022). Antimicrobial performance of two preoperative skin preparation solutions containing iodine and isopropyl alcohol. *American Journal of Infection Control*, 50(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.10.031>
- Bayer. (2023). *Tizón sureño (Marchitez por Sclerotium)*. Vegetables España. Bayer. <https://www.vegetables.bayer.com/es/es-es/recursos/disease-guides/pimientos/geminiviruses-2.html>
- Bearson, S., Bearson, B., & Foster, J. W. (2006). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 147(2), 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10238.x>

- Bharagava, R. N., & Chowdhary, P. (2019). *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management* (R. N. Bharagava & P. Chowdhary, Eds.; 4a ed., Vol. 12). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8669-4>
- Bjurman, J., Nordstrand, E., & Kristensson, J. (1997). Growth-Phase-Related Production of Potential Volatile-Organic Tracer Compounds by Moulds on Wood. *Indoor Air*, 7(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.1997.t01-3-00002.x>
- Bolívar-Anillo, H. J., Garrido, C., & Collado, I. G. (2020). Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry Reviews*, 19(3), 721–740. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>
- Cesselin, B., Henry, C., Gruss, A., Gloux, K., & Gaudu, P. (2021). Mechanisms of Acetoin Toxicity and Adaptive Responses in an Acetoin-Producing Species, *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(24). <https://doi.org/10.1128/AEM.01079-21>
- Chaluat, M., Gaetán Silvia, & Seijas Beatriz. (1981). *Sclerotium rolfsii* Sacc. en girasol (*Helianthus annuus* L.): sintomatología y patogenicidad. *Rev. Facultad de Agronomía*, 2(1), 53–58.
- Chand Gireesh, Akhtar Nadeem, & Kumar Santosh. (2020). *Diseases of Fruits and Vegetable Crops* (G. Chand, N. Akhtar, & S. Kumar, Eds.). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9780429322181>
- Chen, F., Ma, R., & Chen, X.-L. (2019). Advances of Metabolomics in Fungal Pathogen–Plant Interactions. *Metabolites*, 9(8), 169. <https://doi.org/10.3390/metabo9080169>
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>

- Do Dat, T., Hai, N. D., Nam, N. T. H., Thanh, N. M., Huyen, N. T. T., Duong, L. T. T., Nam, H. M., & Hieu, N. H. (2023). Flavonoid content and antifungal activity of *Celastrus hindsii* leaf extract obtained by supercritical carbon dioxide using ethanol as co-solvent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 52, 102824. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102824>
- Dupont, C. A., Bourigault, Y., Osmond, T., Nier, M., Barbey, C., Latour, X., Kontoghiorghi, Y., Verdon, J., & Merieau, A. (2023). *Pseudomonas fluorescens* MFE01 uses 1-undecene as aerial communication molecule. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1264801>
- Dwivedi, S. K., & Prasad, G. (2016). *Integrated management of Sclerotium rolfsii: an overview*. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 3.
- El-Baky, N. A., Abdel Rahman, R. A., Sharaf, M. M., & Amara, A. A. A. F. (2021). The Development of a Phytopathogenic Fungi Control Trial: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* Infection in Jojoba Tissue Culture as a Model. *The Scientific World Journal*, 2021, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/6639850>
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., El-Tahan, A. M., Ebrahim, A. A. M., Abd El-Mageed, T. A., Negm, S. H., Selim, S., Babalghith, A. O., Elrys, A. S., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>
- Estrada-Gamboa, J., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C., & Orozco-Aceves, M. (2023). Aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas con potencial de degradación de los plaguicidas clorotalonil y clorpirifos. *Uniciencia*, 37(1), 1–16. <https://doi.org/10.15359/ru.37-1.26>
- Fisher, M. C., Gurr, S. J., Cuomo, C. A., Blehert, D. S., Jin, H., Stukenbrock, E. H., Stajich, J. E., Kahmann, R., Boone, C., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Klein, B. S., Kronstad, J. W., Sheppard, D. C., Taylor, J. W., Wright, G. D., Heitman, J.,

- Casadevall, A., & Cowen, L. E. (2020). Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *mBio*, 11(3), 10.1128/mbio.00449-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.00449-20>
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739–742. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>
- Flores-Moctezuma, H. E., Montes-Belmont, R., Rogel-Hernández, M. A., & Martínez-Romero, M. E. (2007). Diversidad Genética de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en México. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA*, 26(1), 7–14.
- González, A. (2013). *Sclerotium rolfsii*, un patógeno de judía que produce daños de forma ocasional. *Tecnología Agroalimentaria*, 19–20.
- González Espinosa, J., Hernández Gómez, Y. F., Javier Martínez, Y., Flores Gallardo, F. J., Pacheco Aguilar, J. R., Ramos López, M. Á., Arvizu Gómez, J. L., Saldaña Gutierrez, C., Rodríguez Morales, J. A., García Gutiérrez, M. C., Amaro Reyes, A., Álvarez Hidalgo, E., Nuñez Ramírez, J., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2023). *Kosakonia cowanii* Ch1 Isolated from Mexican Chili Powder Reveals Growth Inhibition of Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071758>
- Guo, Y., Jud, W., Weigl, F., Ghirardo, A., Junker, R. R., Polle, A., Benz, J. P., Pritsch, K., Schnitzler, J. P., & Rosenkranz, M. (2021). Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02198-8>
- He, C.-N., Ye, W.-Q., Zhu, Y.-Y., & Zhou, W.-W. (2020). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats. *Molecules*, 25(15), 3360. <https://doi.org/10.3390/molecules25153360>

- Hernández, A. G. C., Ortiz, V. G., Gómez, J. L. A., López, M. Á. R., Morales, J. A. R., Macías, A. F., Hidalgo, E. Á., Ramírez, J. N., Gallardo, F. J. F., Gutiérrez, M. C. G., Gómez, S. R., Jones, G. H., Flores, J. L. H., & Guillén, J. C. (2021). Detection of *Bacillus cereus sensu lato* Isolates Posing Potential Health Risks in Mexican Chili Powder. *Microorganisms*, 9(11), 2226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112226>
- Hernández Gómez, Y. F., González Espinosa, J., Ramos López, M. Á., Arvizu Gómez, J. L., Saldaña, C., Rodríguez Morales, J. A., García Gutiérrez, M. C., Pérez Moreno, V., Álvarez Hidalgo, E., Nuñez Ramírez, J., Jones, G. H., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2022). Insights into the Bacterial Diversity and Detection of Opportunistic Pathogens in Mexican Chili Powder. *Microorganisms*, 10(8), 1677. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081677>
- Hernández Jiménez, J., Montes Belmont, R., Flores Moctezuma, H. E., Nava Juárez, R. A., & Chanona Pérez, J. (2004). Caracterización de Aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en Diferentes Medios de Cultivo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 345–350. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222305>
- Huang, H., Sheng, L., Ye, Y., Yang, Y., Wu, B., Sun, J., Zhang, Y., Xiao, L., Ji, J., & Sun, X. (2025). Bacterial pyrazine volatiles: A novel approach to inhibit *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production. *Food Bioscience*, 65, 106059. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106059>
- INRAE. (2024). *Tomate, Principales síntomas*. ephytia. <https://ephytia.inra.fr/es/C/5116/Tomate-Principales-sintomas>
- Insam, H., & Seewald, M. S. A. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 46(3), 199–213. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0442-3>
- Janamatti, A. T., Kumar, A., Kaur, C., Gogoi, R., Varghese, E., & Kumar, S. (2022). Fumigation by bacterial volatile 2, 5-dimethylpyrazine enhances anthracnose

- resistance and shelf life of mango. *European Journal of Plant Pathology*, 164(2), 209–227. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02551-5>
- Jan-Roblero, J., Cruz-Maya, J. A., & Barajas, C. G. (2020). *Kosakonia*. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 213–231). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00012-5>
- Kacena, M. A., Merrell, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., Klaus, D. M., & Todd, P. (1999). *Bacterial growth in space light: logistic growth curve parameters for Escherichia coli and Bacillus subtilis*.
- Khoshru, B., Mitra, D., Joshi, K., Adhikari, P., Rion, M. S. I., Fadiji, A. E., Alizadeh, M., Priyadarshini, A., Senapati, A., Sarikhani, M. R., Panneerselvam, P., Mohapatra, P. K. Das, Sushkova, S., Minkina, T., & Keswani, C. (2023). Decrypting the multi-functional biological activators and inducers of defense responses against biotic stresses in plants. En *Heliyon* (Vol. 9, Número 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13825>
- Kim, J. H., Chan, K. L., Mahoney, N., & Campbell, B. C. (2011). Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-23>
- Kosakivska, I. V. (2008). *Biomarkers Of Plants with Different Types Of Ecological Strategies*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:5986375>
- Li, H., Bian, R., Liu, Q., Yang, L., Pang, T., Salaipeth, L., Andika, I. B., Kondo, H., & Sun, L. (2019). Identification of a Novel Hypovirulence-Inducing Hypovirus From *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01076>
- Li, X., Garbeva, P., Liu, X., Klein Gunnewiek, P. J. A., Clocchiatti, A., Hundscheid, M. P. J., Wang, X., & de Boer, W. (2020). Volatile-mediated antagonism of soil

- bacterial communities against fungi. *Environmental Microbiology*, 22(3), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14808>
- Liao, H., Wen, X., Deng, X., Wu, Y., Xu, J., Li, X., Zhou, S., Li, X., Zhu, C., Luo, F., Ma, Y., & Zheng, J. (2022). Integrated proteomic and metabolomic analyses reveal significant changes in chloroplasts and mitochondria of pepper (*Capsicum annuum* L.) during *Sclerotium rolfsii* infection. *Journal of Microbiology*, 60(5), 511–525. <https://doi.org/10.1007/s12275-022-1603-4>
- Ling, L., Zhao, Y., Tu, Y., Yang, C., Ma, W., Feng, S., Lu, L., & Zhang, J. (2021). The inhibitory effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CL2 on pathogenic fungi of wolfberry. *Journal of Basic Microbiology*, 61(2), 110–121. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000522>
- Mardanovna, A. M., Fanisovna Hadieva, G., Tafkilevich Lutfullin, M., Valer'evna Khilyas, I., Farvazovna Minnullina, L., Gadelevna Gilyazeva, A., Mikhailovna Bogomolnaya, L., & Rashidovna Sharipova, M. (2017). *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 08(01), 1–20. <https://doi.org/10.4236/as.2017.81001>
- Marquez-Villavicencio, M. del P., Weber, B., Witherell, R. A., Willis, D. K., & Charkowski, A. O. (2011). The 3-Hydroxy-2-Butanone Pathway Is Required for *Pectobacterium carotovorum* Pathogenesis. *PLoS ONE*, 6(8), e22974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022974>
- Medina-Romero, Y. M., Roque-Flores, G., & Macías-Rubalcava, M. L. (2017). Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8209–8222. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8542-8>
- Mena Navarro, M. P., Espinosa Bernal, M. A., Martinez-Avila, A. E., Aponte Pineda, L. S., Montes Flores, L. A., Chan Ku, C. D., Hernández Gómez, Y. F., González Espinosa, J., Pacheco Aguilar, J. R., Ramos López, M. Á., Arvizu Gómez, J. L.,



- Saldaña Gutierrez, C., Rodríguez Morales, J. A., Amaro Reyes, A., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2024). Role of Volatile Organic Compounds Produced by *Kosakonia cowanii* Cp1 during Competitive Colonization Interaction against *Pectobacterium aroidearum* SM2. *Microorganisms*, 12(5), 930. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050930>
- Merga, L. B., & Van den Brink, P. J. (2021). Ecological effects of imidacloprid on a tropical freshwater ecosystem and subsequent recovery dynamics. *Science of The Total Environment*, 784, 147167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147167>
- Michael Meyer, B. T., Loftin, K. A., Lee, E. A., Hinshaw, G., Dietze, J. E., & Scribner, E. A. (s/f). Determination of Glyphosate, its Degradation Product Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate, in Water by Isotope Dilution and Online Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.
- Misztal, P. K., Lymperopoulou, D. S., Adams, R. I., Scott, R. A., Lindow, S. E., Bruns, T., Taylor, J. W., Uehling, J., Bonito, G., Vilgalys, R., & Goldstein, A. H. (2018). Emission Factors of Microbial Volatile Organic Compounds from Environmental Bacteria and Fungi. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8272–8282. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00806>
- Molina, L., Rosa, R. La, Nogales, J., & Rojo, F. (2019). *Pseudomonas putida* KT2440 metabolism undergoes sequential modifications during exponential growth in a complete medium as compounds are gradually consumed. *Environmental Microbiology*, 21(7), 2375–2390. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14622>
- Montes-Osuna, N., Cernava, T., Gómez-Lama Cabanás, C., Berg, G., & Mercado-Blanco, J. (2022). Identification of Volatile Organic Compounds Emitted by Two Beneficial Endophytic *Pseudomonas* Strains from Olive Roots. *Plants*, 11(3), 318. <https://doi.org/10.3390/plants11030318>

- Mookherjee, A., Bera, P., Mitra, A., & Maiti, M. K. (2018). Characterization and Synergistic Effect of Antifungal Volatile Organic Compounds Emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an Endophytic Fungus from the Eggplant. *Microbial Ecology*, 75(3), 647–661. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1065-0>
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., & Someya, T. (2019). Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5(6), e01817. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>
- Muskan Singhal, Swapnali Jadhav, Swaroop S. Sonone, Mahipal Singh Sankhla, & Rajeev Kumar. (2021). Microalgae Based Sustainable Bioremediation of Water Contaminated by Pesticides. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(1), 149–169. <https://doi.org/10.33263/briac121.149169>
- Neto, L. J. de L., Ramos, A. G. B., Freitas, T. S. de, Barbosa, C. R. dos S., de Sousa Júnior, D. L., Siyadatpanah, A., Nejat, M., Wilairatana, P., Coutinho, H. D. M., & da Cunha, F. A. B. (2021). Evaluation of Benzaldehyde as an Antibiotic Modulator and Its Toxic Effect against *Drosophila melanogaster*. *Molecules*, 26(18), 5570. <https://doi.org/10.3390/molecules26185570>
- Netzker, T., Shepherdson, E. M. F., Zambri, M. P., & Elliot, M. A. (2020). Bacterial Volatile Compounds: Functions in Communication, Cooperation, and Competition. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 409–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-011320-015542>
- Ofosu, F. K., Chelliah, R., Daliri, E. B., Saravanakumar, K., Wang, M., & Oh, D. (2021). Antibacterial activities of volatile compounds in cereals and cereal by-products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15081>
- Paul, S. K., Mahmud, N. U., Gupta, D. R., Surovy, M. Z., Rahman, M., & Islam, Md. T. (2021). Characterization of *Sclerotium rolfsii* Causing Root Rot of Sugar Beet

- in Bangladesh. *Sugar Tech*, 23(5), 1199–1205. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-00984-6>
- Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17(1), 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>
- Petrzik, K., Brázdová, S., & Krawczyk, K. (2021). Novel viruses that lyse plant and human strains of *Kosakonia cowanii*. *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/v13081418>
- Picazo-Aragonés, J., Terrab, A., & Balao, F. (2020). Plant volatile organic compounds evolution: Transcriptional regulation, epigenetics and polyploidy. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 23, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21238956>
- Pontes, J. G. de M., Fernandes, L. S., dos Santos, R. Vander, Tasic, L., & Fill, T. P. (2020). Virulence Factors in the Phytopathogen–Host Interactions: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(29), 7555–7570. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02389>
- Quintanilha-Peixoto, Torres, Reis, Oliveira, Bortolini, Duarte, Ariston de Carvalho Azevedo, Brenig, Aguiar, Soares, Góes-Neto, & Branco. (2019). Calm Before the Storm: A Glimpse into the Secondary Metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the Etiologic Agent of the Sisal Bole Rot. *Toxins*, 11(11), 631. <https://doi.org/10.3390/toxins11110631>
- Rodríguez-Aguilar, B. A., Martínez-Rivera, L. M., Muñoz-Valencia, R., Mercado-Silva, N., Iñiguez-Dávalos, L. I., & Peregrina-Lucano, A. A. (2022). Pesticide distribution and ecotoxicological risk in the Ayuquila-Armería river. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 301–315. <https://doi.org/10.20937/RICA.54180>

- Russo, A., Pollastri, S., Ruocco, M., Monti, M. M., & Loreto, F. (2022). Volatile organic compounds in the interaction between plants and beneficial microorganisms. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 840–852. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2107243>
- Rybakova, D., Rack-Wetzlinger, U., Cernava, T., Schaefer, A., Schmuck, M., & Berg, G. (2017). Aerial Warfare: A Volatile Dialogue between the Plant Pathogen *Verticillium longisporum* and Its Antagonist *Paenibacillus polymyxa*. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01294>
- Saka, D., Adu-Gyamfi, J., Skrzypek, G., Antwi, E. O., Heng, L., & Torres- Martínez, J. A. (2023). Disentangling nitrate pollution sources and apportionment in a tropical agricultural ecosystem using a multi-stable isotope model. *Environmental Pollution*, 328, 121589. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121589>
- Salvatore, M. M., Alves, A., & Andolfi, A. (2021). Secondary Metabolites Produced by *Neofusicoccum* Species Associated with Plants: A Review. *Agriculture*, 11(2), 149. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020149>
- Schroth, M. N., & Hancock, J. G. (1982). Disease-Suppressive Soil and Root-Colonizing Bacteria. *Science*, 216(4553), 1376–1381. <https://doi.org/10.1126/science.216.4553.1376>
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>
- Shi, J.-F., & Sun, C.-Q. (2017). Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 706–714. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.002>
- SON, N. H., TUAN, N. T., & TRAN, T. M. (2022). Investigation of chemical composition and evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities

- of ethanol extract from *Bidens pilosa* L. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.22722>
- Stackpoole, S. M., Shoda, M. E., Medalie, L., & Stone, W. (2021). Pesticides in US Rivers: Regional differences in use, occurrence, and environmental toxicity, 2013 to 2017. *Science of The Total Environment*, 787, 147147. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147147>
- Su, F., Su, Z., Zhao, Q., Zhao, Z., Wu, Z., Zhao, M., & Lai, M. (2022). Synthesis, thermal property and antifungal evaluation of pyrazine esters. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(12), 104351. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104351>
- Tallon, A. K., Manning, L.-A., & Mas, F. (2023). Electrophysiological and Behavioral Responses of Virgin Female *Bactrocera tryoni* to Microbial Volatiles from Enterobacteriaceae. *Microorganisms*, 11(7), 1643. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071643>
- Toral, L., Rodríguez, M., Martínez-Checa, F., Montaña, A., Cortés-Delgado, A., Smolinska, A., Llamas, I., & Sampedro, I. (2021). Identification of Volatile Organic Compounds in Extremophilic Bacteria and Their Effective Use in Biocontrol of Postharvest Fungal Phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773092>
- Tuttobene, M. R., Fernández-García, L., Blasco, L., Cribb, P., Ambroa, A., Müller, G. L., Fernández-Cuenca, F., Bleriot, I., Rodríguez, R. E., Barbosa, B. G. V., Lopez-Rojas, R., Trastoy, R., López, M., Bou, G., Tomás, M., & Mussi, M. A. (2019). Quorum and Light Signals Modulate Acetoin/Butanediol Catabolism in *Acinetobacter* spp. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01376>
- Tyskiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ścisł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

- Vázquez, J. A., & Rial, D. (2014). Inhibition of selected bacterial growth by three hydrocarbons: Mathematical evaluation of toxicity using a toxicodynamic equation. *Chemosphere*, 112, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.008>
- Wambaugh, M. A., Denham, S. T., Ayala, M., Brammer, B., Stonhill, M. A., & Brown, J. C. S. (2020). Synergistic and antagonistic drug interactions in the treatment of systemic fungal infections. *eLife*, 9, e54160. <https://doi.org/10.7554/eLife.54160>
- Wang, E., Liu, X., Si, Z., Li, X., Bi, J., Dong, W., Chen, M., Wang, S., Zhang, J., Song, A., & Fan, F. (2021). Volatile Organic Compounds from Rice Rhizosphere Bacteria Inhibit Growth of the Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Agriculture*, 11(4), 368. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040368>
- Wang, F., Cale, J. A., Hussain, A., & Erbilgin, N. (2020). Exposure to Fungal Volatiles Can Influence Volatile Emissions From Other Ophiostomatoid Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.567462>
- Wang, K., Qin, Z., Wu, S., Zhao, P., Zhen, C., & Gao, H. (2021). Antifungal Mechanism of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* Assessed Using Omics Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 5267–5278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00640>
- Weisskopf, L., Schulz, S., & Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 391–404. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00508-1>
- Widhalm, J. R., Jaini, R., Morgan, J. A., & Dudareva, N. (2015). Rethinking how volatiles are released from plant cells. *Trends in Plant Science*, 20(9), 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.009>

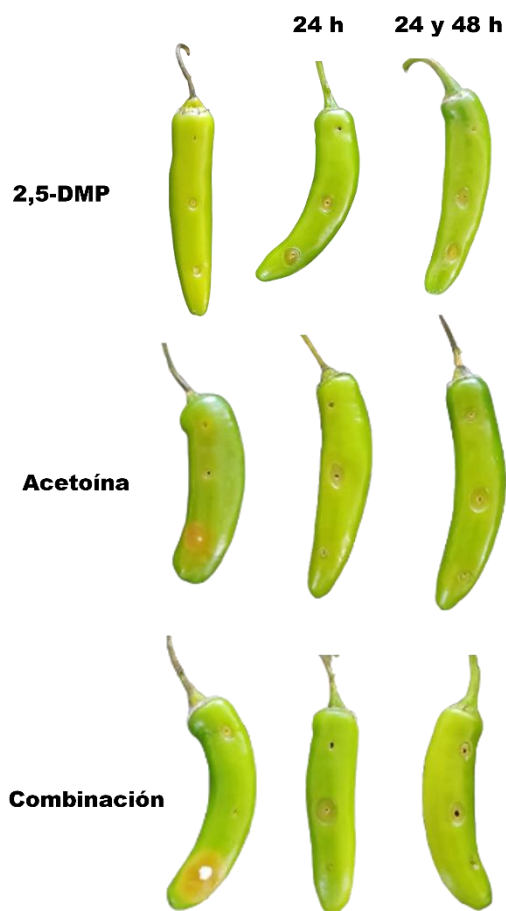
- Xiao, Z., & Lu, J. R. (2014). Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review. *Biotechnology Advances*, 32(2), 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.01.002>
- Yan, L., Wang, Z., Song, W., Fan, P., Kang, Y., Lei, Y., Wan, L., Huai, D., Chen, Y., Wang, X., Sudini, H., & Liao, B. (2021). Genome sequencing and comparative genomic analysis of highly and weakly aggressive strains of *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of peanut stem rot. *BMC Genomics*, 22(1), 276. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07534-0>
- Yang, X.-J., Wang, S., Cao, J.-M., & Hou, J.-H. (2018). Complete genome sequence of human pathogen *Kosakonia cowanii* type strain 888-76 T. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 16–17. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.010>
- Yi, H.-S., Ahn, Y.-R., Song, G. C., Ghim, S.-Y., Lee, S., Lee, G., & Ryu, C.-M. (2016). Impact of a Bacterial Volatile 2,3-Butanediol on *Bacillus subtilis* Rhizosphere Robustness. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00993>
- Yue, Y., Wang, Z., Zhong, T., Guo, M., Huang, L., Yang, L., Kan, J., Zalán, Z., Hegyi, F., Takács, K., & Du, M. (2023). Antifungal mechanisms of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX as biological fumigants against *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 267, 127253. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127253>
- Zhang, H., Du, H., & Xu, Y. (2021). Volatile Organic Compound-mediated antifungal activity of *Pichia* spp. and its effect on the metabolic profiles of fermentation communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.02992-20>
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., & Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450>

- Zhou, Y., Wang, H., Xu, S., Liu, K., Qi, H., Wang, M., Chen, X., Berg, G., Ma, Z., Cernava, T., & Chen, Y. (2022). Bacterial-fungal interactions under agricultural settings: from physical to chemical interactions. *Stress Biology*, 2(1), 22. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00046-1>
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., & Munné-Bosch, S. (2019). Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations. *Plant Science*, 289, 110270. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110270>

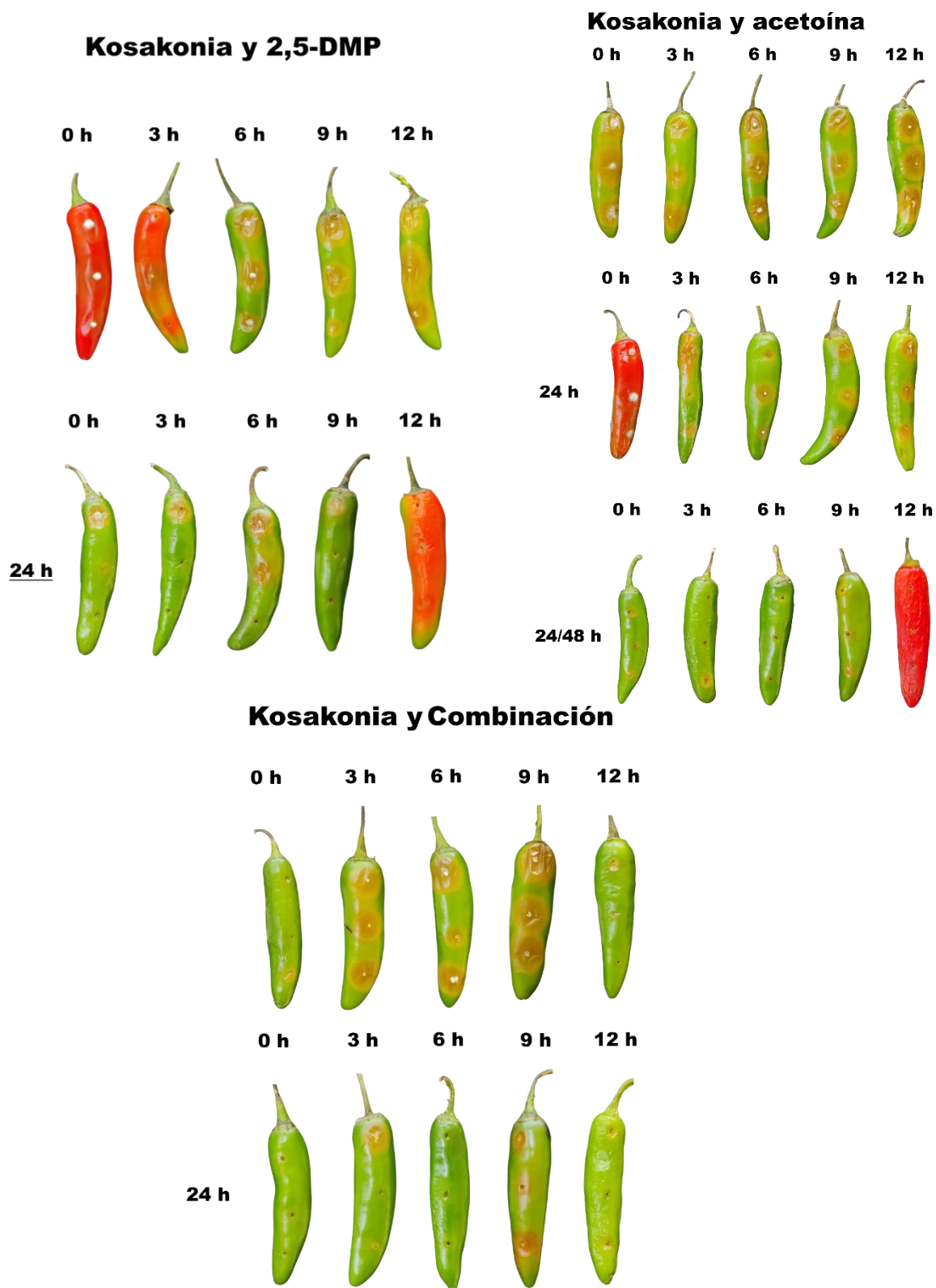


## 10. ANEXOS

A continuación, se presentan las imágenes correspondientes a los frutos de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) que fueron sometidos a tratamientos con compuestos estándar, así como a combinaciones de estos con la bacteria evaluada. Dichas figuras documentan ensayos experimentales que no fueron considerados en el análisis principal de la investigación debido a los resultados obtenidos. No obstante, su inclusión en este apartado permite complementar la información previamente discutida en distintos apartados de la tesis.



**Anexo 1.** Aplicación directa de compuestos estándares sobre *Capsicum annuum* L. Se observan lesiones en el tejido vegetal.



**Anexo 2.** Evaluación de la inhibición de *Sclerotium rolfii* en frutos de *Capsicum annuum* L. mediante la aplicación de *Kosakonia cowanii* y compuestos estándar. Se evaluó el efecto de una segunda y tercera aplicación a las 24 y 48 h respectivamente.