

Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos

Luis Guillermo Hernández Montiel¹
Tomas Rivas García¹
Mirella Romero Bastidas²
César Josué Chiquito Contreras³
Francisco Higinio Ruiz Espinoza²
Roberto Gregorio Chiquito Contreras^{3§}

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. La Paz, Baja California Sur, México. CP. 23096. Tel. 01(612) 1238484. (lhernandez@cibnor.mx; eltom.r@hotmail.com). ²Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur, México. CP. 23080. Tel. 01(612) 1238800. (mirerome22@hotmail.com; fruiz@uabcs.mx). ³Facultad de Ciencias Agrícolas-Campus Xalapa, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. CP. 91090. Tel. 01(228) 8421749 (chiquito@uv.mx; rchiquito@uv.mx).

§Autor para correspondencia: rchiquito@uv.mx.

Resumen

La aplicación de fungicidas sintéticos es una práctica común en el control de hongos fitopatógenos. Sin embargo, su uso de manera indiscriminada ha traído problemas para la salud humana, animal, medio ambiente y ha generado resistencia en los fitopatógenos. En la búsqueda de alternativas, el control biológico usando microorganismos puede ser una opción eficiente al uso de fungicidas sintéticos. Aunque bacterias y levaduras aisladas de suelo y plantas han sido evaluadas como agentes de control biológico, la búsqueda de nuevos antagonistas continúa. La microflora oceánica puede ser una opción para la selección de nuevos agentes antagonistas. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antagónico de diferentes bacterias (*Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. subtilis*) y levaduras (*Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus diffluens* y *Rhodotorula minuta*) aisladas previamente de una laguna hiperhialina contra 13 hongos fitopatógenos de importancia agronómica. Los resultados muestran que diferentes cepas de la bacteria *S. rhizophila* fueron las que ejercieron mayor inhibición sobre la germinación de esporas y crecimiento micelial de todos los hongos fitopatógenos, superando a los tratamientos con fungicidas sintéticos. Dentro de las levaduras destacaron las cepas de *D. hansenii*. De acuerdo con su capacidad antagónica, los microorganismos marinos pueden ser una opción para el manejo de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos.

Palabras clave: control biológico, fungicidas sintéticos, hongos fitopatógenos, microorganismos marinos.

Recibido: diciembre de 2017

Aceptado: enero de 2018

Introducción

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan considerables pérdidas económicas debido al daño que ocasionan a los cultivos durante las diferentes etapas de su desarrollo (ej. floración, madurez, cosecha) (Pusztahelyi *et al.*, 2015; Mumford *et al.*, 2016). De manera tradicional, su control se ha basado en la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, el uso de estos productos puede causar daños a la salud humana, animal y a los ecosistemas (Tu *et al.*, 2013; Moshi y Matoju, 2017), además de generar resistencia en los fitopatógenos (Liu *et al.*, 2016; Romanazzi *et al.*, 2016).

El control biológico utilizando microorganismos antagónicos puede representar una alternativa viable y ambientalmente segura en comparación con los fungicidas sintéticos (Weaver *et al.*, 2016; Bach *et al.*, 2016). Bacterias y levaduras han sido utilizadas con éxito para el control de enfermedades (Eljounaidi *et al.*, 2016; Wisniewski *et al.*, 2016). Algunos de sus principales mecanismos antagónicos son la competencia por espacio y nutrientes (Droby *et al.*, 2016), inhibición por compuestos volátiles orgánicos (CVO's) (Raza *et al.*, 2016a; Arrarte *et al.*, 2017), sideróforos (Sasha *et al.*, 2016; Sasirekha y Srividya, 2016), antibióticos (Sharifazizi *et al.*, 2017), enzimas hidrolíticas (Ferraz *et al.*, 2016; Tokpah *et al.*, 2016), inducción de resistencia (Punja *et al.*, 2016) entre otros.

Bacterias y levaduras son comúnmente aisladas de las superficies de las plantas y suelo (Sharma *et al.*, 2009; Larkin, 2016); sin embargo, existen otros ambientes como el océano donde pudieran aislarse microorganismos con capacidad antagónica igual de eficientes que los fungicidas sintéticos. Los estudios en los últimos años sobre la microflora oceánica se han basado principalmente en describir sus propiedades farmacéuticas, tales como antimicrobianos, antituberculoso, antiviral, antiparasitario, antihelmíntico, entre otros (Dewapriya y Kim, 2014; Jin *et al.*, 2016). Sin embargo, bacterias y levaduras de ambientes marinos están siendo consideradas como nuevas fuentes de productos que pueden ser aplicados en diversas áreas como la agricultura debido a que han demostrado ser microorganismos altamente eficientes en el control biológico de fitopatógenos (Wang *et al.*, 2008; Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Medina-Córdova *et al.*, 2016).

El potencial antagónico de los microorganismos marinos debe ser estudiado para seleccionar aquellos como promisorios agentes de control biológico que en un mediano plazo puedan ser un tratamiento que propicien la seguridad alimentaria, la producción ecológica-sustentable (Usall *et al.*, 2016) y el desarrollo de nuevos productos biológicos (Vero *et al.*, 2013). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial antagónico de cepas de bacterias y levaduras marinas contra diversos hongos fitopatógenos de importancia agronómica.

Materiales y métodos

Microorganismos utilizados

Los hongos fitopatógenos que se utilizaron en este estudio fueron *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neoscytalidium dimidiatum* A. *alternata*, *F. solani* y *Curvularia* sp. (Cuadro 1), los cuales, pertenecen al

Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Los hongos fueron cultivados en cajas Petri con medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA) a 27 °C por 7 días. Sus concentraciones fueron ajustadas a 1×10^4 esporas mL^{-1} . La colección de bacterias y levaduras marinas fueron proporcionadas por el CIBNOR y originalmente fueron aisladas de la laguna hiperhialina Ojo de Liebre, ubicada entre los 27 °35' y los 27 °52' latitud norte y los 113° 58' y los 114° 0' de latitud oeste en el municipio de Mulegé, Baja California Sur, México.

Cuadro 1. Procedencia de diferentes hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

Clave ^b	Fitopatógeno	Hospedero	Enfermedad
CIB-CGP	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Carica papaya</i> L.	Antracnosis
CIB-CGM	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Mangifera indica</i> L.	Antracnosis
CIB-PIL	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Podredumbre azul
CIB-PDN	<i>P. digitatum</i>	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Podredumbre verde
CIB-AST	<i>Alternaria solani</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	Tizón temprano
CIB-FOC	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Capsicum annuum</i> L.	Pudrición de raíz
CIB-FOA	<i>F. oxysporum</i>	<i>Agave tequilana</i> Weber	Pudrición de raíz
MR-HF12	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	<i>Ficus Carica</i> L.	Muerte descendente
MR-AA16	<i>A. alternata</i>	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Mancha foliar
MR-FG16	<i>F. solani</i>	<i>Cicer arietinum</i> L.	Pudrición de raíz
MR-FE16	<i>F. oxysporum</i>	<i>Asparagus officinalis</i> L.	Pudrición de raíz
MR-FA16	<i>F. oxysporum</i>	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Pudrición de raíz
MR-CP16	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Washingtonia robusta</i> Wendl.	Mancha foliar

^b=hongos con la clave CIB pertenecen a la colección del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y con la clave MR pertenecen a la colección de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Las bacterias seleccionadas fueron *Stenotrophomonas rhizophila* (cepa KM01 y KM02), *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa RB01 y RB02) y *B. subtilis* (cepa RBM01 y RBM02), las cuales fueron cultivadas en matraz Erlenmeyer de 250 mL con medio caldo soya tripticaseína (CST) a 25 °C por 24 h y 180 rpm. Las levaduras seleccionadas fueron *Debaryomyces hansenii* (cepa L01, L02 y L03), *Cryptococcus diffluens* (cepa N02) y *Rhodotorula minuta* (cepa R04 y R06), las cuales fueron cultivadas en matraz Erlenmeyer de 250 mL con medio caldo de papa y dextrosa (CPD) a 25 °C por 24 h y 180 rpm. Bacterias y levaduras fueron utilizadas a una concentración de 1×10^6 células mL^{-1} .

Inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos

Para determinar en los microorganismos su capacidad antagónica sobre la germinación de esporas de los diferentes fitopatógenos se llevó a cabo la metodología propuesta por Hernández-Montiel *et al.* (2010). Se combinaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, 500 μL de cada suspensión de bacteria o levadura (ambas ajustadas previamente a 1×10^6 células mL^{-1}) con 500 μL de cada suspensión de hongo (ajustada previamente a 1×10^4 esporas mL^{-1}) y se incubaron a 28 °C por 48 h. Se realizó otra

combinación con 500 μL de cada hongo con un fungicida sintético, el cual, fue seleccionado para cada especie de fitopatógeno (Tecto 60 [ia. 2-4-tiazolil-1H-bencimidazol] a 5 g L^{-1} para *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium italicum* y *P. digitatum*, Amistar G. [i.a. Metil E-2-2-6-2-cianofenoxi pirimidin-4-iloxi-fenil-3-metoxiacrilato] a 3 g L^{-1} para *Alternaria solani* y *A. alternata*, Derosal 50 [ia. Metil-2-bencimidazol-carbamato] a 2 g L^{-1} para *Fusarium oxysporum* y *F. solani* y Cantus [ia. 2-Cloro-N-4'-clorobifenil-2-il nicotinamida] a 1 g L^{-1} para *Neoscytalidium dimidiatum* y *Curvularia* sp.).

Como control, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL solo se colocó 500 μL de cada suspensión de hongo. Se tomaron alícuotas de cada tratamiento para determinar el número de esporas enteras y germinadas, considerando una espora entera como aquella que no mostraba cambio de color o ruptura en su pared celular y una espora germinada cuando el tamaño de hifa era igual o mayor que el diámetro de la espora (Yao *et al.*, 2004). Se realizaron diez repeticiones por tratamiento, observando 200 esporas por repetición.

Inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos

Se colocó en el centro de placas Petri con medio PDA un taquete de 0.5 cm de diámetro de PDA que contenía el cultivo de cada hongo de 7 días. Posteriormente en los dos extremos de la placa Petri se inocularon y estriaron 10 μL de cada concentración de bacteria o levadura. Como control, se inocularon placas Petri solo con el hongo. Todas las placas Petri fueron incubadas a 25 °C por 7 días. Al final, se cuantificó el área del crecimiento micelial de cada hongo utilizando el programa ImajeJ[®] y se determinó el (%) de inhibición mediante la fórmula $I\% = \frac{DC-DT}{DC} \times 100$, donde $I\%$ = inhibición del hongo en porcentaje, DC = diámetro del micelio del tratamiento control y DT = diámetro del micelio en presencia del antagonista. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Inhibición de hongos fitopatógenos *in vitro* por compuestos volátiles orgánicos (CVO's)

Para determinar la capacidad de los microorganismos marinos para inhibir el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos a través de la producción de los COV's, se llevó a cabo la metodología propuesta por Parafati *et al.* (2015). En placas Petri con medio agar soya tripticaseína (AST) y PDA se estriaron en toda la superficie 20 μL de cada concentración de bacteria o levadura, respectivamente. Posteriormente, en otro lote de placas Petri se colocó en el centro un taquete de 0.5 cm de diámetro de PDA que contenía el cultivo de cada hongo de 7 días. Las placas Petri conteniendo los microorganismos se colocaron boca a boca y fueron selladas con parafilm. Como tratamiento testigo, se sellaron placas Petri solo con el hongo y cada medio de cultivo sin microorganismo.

Todas las placas Petri se incubaron a 25 °C por 7 días. Se determinó en los hongos el área del crecimiento micelial utilizando el programa ImajeJ[®] y el % de inhibición mediante la fórmula descrita en el apartado anterior. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar en todos los experimentos y los datos fueron procesados por un análisis de varianza (Anova) de una vía. Se utilizó el paquete estadístico Statistica[®] v. 10.0 para Windows (StatSoft) y para la comparación de medias se utilizó la prueba post-hoc LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

La germinación de esporas en todos los hongos fitopatógenos fue inhibida entre 90 a 94% por la cepa KM01 de *S. rhizophila*, superando significativamente ($p < 0.05$) a la inhibición ejercida por los demás microorganismos marinos y los fungicidas sintéticos (Cuadro 2). Las cepas de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* inhibieron entre 81 a 93% y 51 a 69%, respectivamente. En relación con las levaduras, destacaron las cepas L01 y L02 de *D. hansenii* con un rango de inhibición entre un 50 a 91%. Los valores más bajos de inhibición fueron observados con las cepas de *R. minuta* y *C. diffluens*. Los diversos fungicidas utilizados en este estudio inhibieron la germinación de esporas entre un 80 a 90%. Por otra parte, el crecimiento micelial fue inhibido en todos los hongos por las cepas KM01 y KM02 de *S. rhizophila* en un 90 a 98% y 88 a 97%, respectivamente, superando significativamente ($p < 0.05$) a la inhibición ejercida por los demás microorganismos marinos y los fungicidas sintéticos (Cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto *in vitro* de microorganismos marinos sobre la inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos.

Cepa	Inhibición de la germinación de esporas (%)												
	CIB-CGP	CIB-CGM	CIB-PIL	CIB-PDN	CIB-AST	CIB-FOC	CIB-FOA	MR-HF12	MR-AA16	MR-FG16	MR-FE16	MR-FA16	MR-CP16
KM01	91.6a [¥]	93.5a	94.2a	94.7a	90.2a	91.4a	91.8a	91.8a	92.3a	90.5 a	90.1 a	91.4 a	91.8a
KM02	90.8a	83.6e	90.6c	94.6a	74.6d	75.6e	86.7e	81.6e	80.2d	84.7c	81.9c	90.7b	90.1b
RB01	88.3b	93.4a	87.3e	90.4c	81.7b	81.9d	90.1b	85.8d	86.5b	82.7d	87.3b	91.2a	91.7a
RB02	83.9d	85.6d	91.8b	88.9d	81.9b	87.4c	87.7d	89.7c	85.6c	81.1e	87.5b	84.9c	89.1c
RBM01	60.4e	69.4f	57.6g	60.2f	58.9f	58.1h	54.6h	66.1h	62.5f	63.7f	66.5d	55.7f	59.5f
RBM02	60.2e	61.7g	54.7h	57.4h	58.6f	54.9i	58.4f	57.3i	51.9h	51.8i	59.1f	60.1e	61.7e
L01	89.1b	90.1b	91.7b	91.7b	69.5e	64.7f	52.6i	65.8f	66.2e	57.7h	54.1g	62.7d	58.1g
L02	89.3b	87.9c	87.1e	86.3e	49.7g	54.7i	53.7g	53.8j	53.1g	50.9 j	50.4h	51.4g	51.2h
L03	58.3f	60.3h	63.9f	58.7g	41.9h	61.8g	30.3j	63.7g	43.7i	60.7	60.7e	50.1h	61.7e
N02	13.4h	13.5k	15.7i	17.2i	13.8i	15.3j	14.8k	16.2k	12.9k	17.3k	16.9i	17.3i	10.7k
R04	18.5g	18.7j	15.6i	16.6j	13.4i	11k	13.6l	15.9k	17.4 j	13.2l	15.3j	13.4j	15.8i
R06	12.9i	19.9i	13.2j	10.7k	13.6i	6.9l	9.8m	10.9l	11.7l	11.7m	9.7k	12.7k	11.8j
Fungicida	85.4c [§]	90.2b [§]	89.6 d [§]	90.6c [§]	80.2c ^b	90.1b ^c	87.8c ^e	90.2b ^l	85.8c ^b	88.1b ^e	87.7b ^e	90.3b ^e	87.7d ^l

[§]= Tecto 60 (ia. 2-(4-tiazolil)-1H-bencimidazol) a 5 g L⁻¹. ^b= Amistar G. (ia. Metil (E)-2-2-6-(2-cianofenoxi) pirimidin-4-iloxi-fenil-3-metoxiacrilato) a 3 g L⁻¹; ^e= Derosal 50 (ia. Metil-2-bencimidazol-carbamato) a 2 g L⁻¹. ^l= Cantus (ia. 2-Cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamida) a 1 g L⁻¹. [¥]= letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según la prueba post-hoc LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Las cepas de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* inhibieron entre un 80 a 92% y 50 a 75%, respectivamente. En relación con las levaduras, las cepas de *D. hansenii* presentaron una inhibición de 10 a 20%, los valores más bajos fueron observados con las cepas de *R. minuta*. Los diversos fungicidas inhibieron entre un 86 a 91%. Esta capacidad de inhibición de la germinación de esporas

y del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos por bacterias y levaduras ya ha sido estudiada en cepas aisladas de planta o suelo (Mnif y Ghribi, 2015; Kröber *et al.*, 2016; Palazzini *et al.*, 2016; Reiss y Jørgensen, 2017).

Cuadro 3. Efecto *in vitro* de microorganismos marinos sobre la inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos.

Cepa	Inhibición del crecimiento radial (%)													
	CIB-CGP	CIB-CGM	CIB-PIL	CIB-PDN	CIB-AST	CIB-FOC	CIB-FOA	MR-HF12	MR-AA16	MR-FG16	MR-FE16	MR-FA16	MR-CP16	
KM01	97.2a [¥]	98.4	97.1a	96.7a	93.6a	95.4a	90.7a	93.1a	93.2a	90.6a	91.1a	93.2a	95.9a	
KM02	97.4a	94.7b	94.5b	96.3a	87.5b	93.2b	90.5a	90.5b	88.1b	90.5a	90.9a	91.8b	93.7b	
RB01	91.5b	83.1d	89.3d	88.2d	84.1c	85.1e	82.1c	84.3d	86.7c	83.1c	86.5c	86.3d	85.1d	
RB02	91.1b	83.4d	89.7d	92.5b	87.3b	86.9d	82.6c	84.4d	83.2d	82.7c	83.2d	80.1e	85.4d	
RBM01	64.3d	57.4f	73.4e	61.4e	75.4e	50.7g	56.7e	58.2f	71.3e	55.6e	54.7f	61.7g	71.3e	
RBM02	64.7d	61.7e	59.6f	58.3f	74.1f	60.6f	68.3d	68.7e	64.1f	60.7d	63.3e	68.1f	62.8f	
L01	15.5f	19.3g	13.4h	15.2i	12.7i	13.1i	18.7f	14.3g	12.8h	15.1g	17.4g	18.3h	15.3h	
L02	15.2f	14.2i	13.2h	18.7h	20.2g	18.1h	10.8h	14.4g	19.6g	15.4g	16.2h	14.5i	17.4g	
L03	18.1e	18.4h	20.7g	19.2g	15.6h	18.5h	15.1g	10.1h	11.1i	17.3f	16.5h	18.3h	17.7g	
N02	10.7g	11.8j	12.1i	8.1j	9.1j	9.4j	14.9g	8.5i	11.3i	11.3h	10.1i	11.7j	10.8i	
R04	6.1h	5.2k	4.3k	7.8k	5.1l	6.8k	5.6i	5.1k	6.2j	5.8i	7.8j	7.6k	6.6j	
R06	5.7i	4.7l	7.1j	7.6k	6.2k	9.7j	5.7i	6.2j	4.9k	6.1i	6.3k	7.4k	5.1k	
Fungicida	86.1c [§]	91.1c [§]	90.3c [§]	89.7c [§]	81.5d [‡]	90.7c [©]	89.3b [©]	86.6c ^ℓ	86.3c [‡]	88.9b [©]	88.1b [©]	90.1c [©]	90.2c ^ℓ	

§= Tecto 60 (ia. 2-(4-tiazolil)-1H-bencimidazol) a 5 g L⁻¹; ‡= Amistar G. (ia. Metil (E)-2-2-6-(2-cianofenoxi) pirimidin-4-iloxi-fenil-3-metoxiacrilato) a 3 g L⁻¹. © = Derosal 50 (ia. Metil-2-bencimidazol-carbamato) a 2 g L⁻¹. ℓ = Cantus (ia. 2-Cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il) nicotinamida) a 1 g L⁻¹; ¥ = letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según la prueba post-hoc LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Dentro de los principales mecanismos antagónicos de bacterias y levaduras, está la producción de enzimas hidrolíticas, competencia por espacio y nutrientes y sideróforos (Droby *et al.*, 1989; Kai *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009; Herzog *et al.*, 2016; Medina-Córdova *et al.*, 2016; Grzegorzczuk *et al.*, 2017). En relación con las enzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasas y proteasas), estas presentan una actividad directamente sobre la pared celular del hongo, la cual, está compuesta principalmente por quitina, β-glucano y proteínas, los cuales, son hidrolizados para producir oligosacáridos de menor tamaño mismos que son aprovechados como carbono por bacterias y/o levaduras (Sharma *et al.*, 2009).

La competencia por nutrimentos y espacio es otro mecanismo antagónico que presentan los microorganismos (Jamalizadeh *et al.*, 2011) y está directamente relacionado con la competencia de carbono en el medio, el cual, es disminuido rápidamente por bacterias y levaduras, limitando al hongo en sus procesos de germinación e infección del hospedero (Janisiewicz y Korsten, 2002; Liu *et al.*, 2013).

Por su parte, los sideróforos producidos por bacterias o levaduras son moléculas de bajo peso molecular afines al ion Fe^{3+} , el cual, es atrapado y transportado por los microorganismos en un proceso de transporte activo, usando multitud de receptores de membrana. Una vez en el interior celular, el hierro es liberado mediante un proceso redox. Sin hierro en el medio, los microorganismos no pueden continuar con sus procesos biológicos vitales como la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, respiración, transporte fotosintético, reducción de nitratos, desintoxicación de radicales libres, entre otros. Esta estrategia de producción de sideróforos por bacterias y levaduras ha estado involucrada en el control de los fitopatógenos y se ha reconocido como un importante rasgo antagonista que se encuentra en muchos de los agentes de control biológico (Yu *et al.*, 2011; Sasha *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

En relación con el efecto *in vitro* de los COV's, la inhibición ejercida por las cepas marinas KM01 y KM02, ambas de *S. rhizophila*, hacia todos los hongos fitopatógenos fue de 92 a 95%, superando significativamente ($p < 0.05$) a la inhibición ejercida por los demás microorganismos marinos (Cuadro 4). Las cepas de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* inhibieron entre un 81 a 89% y 60 a 69%, respectivamente. En relación con las levaduras, las cepas de *D. hansenii* presentaron un rango de inhibición entre un 44 a 59%. Los valores más bajos de inhibición fueron observados con las cepas de *R. minuta*. La producción de COV's ya ha sido identificada como una vía que inhibe la germinación de esporas y el crecimiento micelial de los hongos (Raza *et al.*, 2016a; Arrarte *et al.*, 2017).

Cuadro 4. Efecto *in vitro* de los microorganismos marinos sobre la inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos por COV's.

Cepa	Inhibición del crecimiento (%)												
	CIB-CGP	CIB-CGM	CIB-PIL	CIB-PDN	CIB-AST	CIB-FOC	CIB-FOA	MR-HF12	MR-AA16	MR-FG16	MR-FE16	MR-FA16	MR-CP16
KM01	94.1a [¥]	92.2a	95.4a	93.6a	96.1a	93.1a	94.9a	94.4a	94.8a	91.5a	95.5a	95.2a	93.2a
KM02	93.8a	91.8b	93.9b	92.9b	94.7b	92.7b	94.4a	93.8b	92.6b	91.5a	95.9a	94.8a	93.1a
RB01	83.4b	85.4c	87.8c	85.6d	84.1c	89.1c	83.5c	84.8d	86.1c	80.2c	82.4c	83.4c	89.4b
RB02	81.1c	81.6d	85.6d	87.8c	84.2c	83.9d	85.6b	87.1c	83.8d	84.5b	88.1b	87.6b	87.5c
RBM01	61.9d	68.7e	69.4f	63.4f	68.4d	69.7e	66.4d	69.1e	63.5e	67.1d	64.7d	63.8e	66.3d
RBM02	60.8e	60.1f	70.1e	68.7e	65.5e	65.8f	62.9e	67.5f	61.5f	63.4e	64.1d	67.4d	63.1e
L01	52.9g	48.5h	51.7h	57.2g	54.4f	52.7g	51.2g	58.2g	54.4h	56.8f	55.7f	54.9g	56.1f
L02	56.6f	49.1g	54.3g	53.6h	52 g	52.9g	59.5f	55.3h	57.5g	54.1g	58.9e	57.2f	54.7g
L03	50.1h	49.3g	47.5i	51.2i	50.3h	49.8h	48.3h	48.7i	45.6i	48.5h	44.1g	49.7 h	45.7h
N02	20.4i	22.6i	21.5j	23.6j	20.8i	20.7i	26.9i	22.4j	21.5j	19.5i	17.4h	20.5i	22.8i
R04	10.1j	10.6j	9.1l	9.5k	8.7k	10.1j	9.9j	9.3k	8.5k	9.8j	7.9i	9.5j	8.4k
R06	9.8j	10.4j	10.7k	9.7k	9.9j	9.8j	10.4j	10.1l	8.9k	9.7k	8.2i	9.6j	10.4j
Testigo	0 k	0 k	0 m	0 l	0 l	0 k	0 k	0 m	0 l	0 l	0 j	0 k	0 l

[¥] = letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según la prueba post-hoc LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Los COV's producidos por bacterias como el disulfuro de dimetilo, dimetilhexadecilamina, alcohol feniletil, furan 2 -etil-5- metil, entre otros y, los producidos por levaduras como el 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, entre otros, ya han sido reportados en la inhibición de fitopatógenos (Hernández-León *et al.*, 2015; Raza *et al.*, 2016b). En general, la actividad antimicrobiana de estos compuestos se atribuye a su interacción con la membrana celular del fitopatógeno, la cual, irrumpe la aceleración de la difusión de sus iones y metabolitos esenciales de su membrana (Heipieper *et al.*, 1994).

Finalmente, el manejo de las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos en las plantas a través de microorganismos antagónicos es una prioridad a nivel mundial (Bardin *et al.*, 2015; Stenberg *et al.*, 2015; Van Bruggen y Finckh, 2016). Este es el primer estudio en demostrar el potencial antagónico de bacterias marinas de las especies *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. subtilis* y de levaduras marinas de las especies *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus diffluens* y *Rhodotorula minuta* hacia diferentes hongos fitopatógenos de suelo y plantas, superando la inhibición de los diferentes fungicidas sintéticos utilizados en este trabajo. En estudios posteriores se estudiará los mecanismos antagónicos (ej. competencia de espacio y nutrimentos, enzimas hidrolíticas, sideróforos, entre otros) de las mejores cepas marinas de bacterias y levaduras, además se determinará *in vivo* su capacidad de control hacia las enfermedades ocasionadas por hongos. La selección de los mejores microorganismos marinos como agentes antagónicos puede ser una alternativa en la producción de alimentos de una manera sustentable, reduciendo la dependencia de los fungicidas sintéticos y bajando los costos de producción de los cultivos.

Conclusiones

La mayor capacidad antagónica de las diferentes cepas marinas de bacterias y levaduras hacia los diferentes hongos fitopatógenos, se observó con la cepa KM01 de la bacteria *S. rhizophila*, la cual, inhibió entre 90 a 94% la germinación de esporas y entre un 90 a 98% el crecimiento micelial de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *A. alternata*, *F. solani* y *Curvularia* sp., superando al efecto de los fungicidas sintéticos. Dentro de las levaduras marinas destacaron las cepas L01, L02 y L03 de *D. hansenii*. La eficiencia antagónica de los microorganismos marinos sugiere que pueden ser una opción a mediano plazo en el manejo de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto SEP-2012-181972 y al Geol. Ernesto Díaz Rivera por su excelente asistencia técnica.

Literatura citada

Arrarte, E.; Garmendia, G.; Rossini, C.; Wisniewski, M. and Vero, S. 2017. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biol. Control*. 109:14-20.

- Bach, E.; dos Santos, S. G. D.; de Carvalho, F. G.; Lisboa, B. B. and Passaglia, L. M. P. 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Appl. Soil Ecol.* 99:141-149.
- Bardin, M.; Ajouz, S.; Comby, M.; Lopez, F. M.; Graillot, B.; Siegwart, M. and Nicot, P. C. 2015. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides?. *Front. Plant Sci.* 6(566):1-14.
- Dewapriya, P. and Kim, S. 2014. Marine microorganisms: an emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Res. Int.* 56:115-125.
- Droby, S.; Chalutz, E.; Wilson, C. L. and Wisniewski, M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35(8):794-800.
- Droby, S.; Wisniewski, M.; Teixidó, N.; Spadaro, D. and Jijakli, M. H. 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122:22-29.
- Ferraz, L. P.; da Cunha, T.; da Silva, A. C. and Kupper, K. C. 2016. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol. Res.* 188-189:72-79.
- Eljounaidi, K.; Lee, S. K. and Bae, H. 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases-Review and future prospects. *Biol. Control.* 103:62-68.
- Grzegorzczak, M.; Żarowska, B.; Restuccia, C. and Cirvilleri, G. 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol.* 61:93-101.
- Heipieper, H.J.; Weber, F. J.; Sikkema, J.; Keweloh, H. and de Bont, J. A. M. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 12(10):409-415.
- Hernández, L. R.; Rojas, S. D.; Contreras, P. M.; del Carmen O., M. M.; Macías, R. L. I.; Reyes-de la C. H.; Valencia, C. E. and Santoyo, G. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control.* 81:83-92.
- Hernández, M. L. G.; Ochoa, J. L.; Troyo, D. E. and Larralde, C. C. P. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biol. Tec.* 56(2):181-187.
- Herzog, B.; Overy, D. P.; Haltli, B. and Kerr, R. G. 2016. Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. *Syst. Appl. Microbiol.* 39(1):49-57.
- Jamalizadeh, M.; Etebarian, H. R.; Aminian, H. and Alizadeh, A. 2011. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bull.* 41(1):65-71.
- Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40(1):411-441.
- Jin, L.; Quan, C.; Hou, X. and Fan, S. 2016. Potential pharmacological resources: natural bioactive compounds from marine-derived fungi. *Mar. Drugs.* 14(4):76-87.
- Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G. and Piechulla, B. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187(5):351-360.
- Kröber, M.; Verwaaijen, B.; Wibberg, D.; Winkler, A.; Pühler, A. and Schlüter, A. 2016. Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. *J. Biotechnol.* 231:212-223.

- Larkin, R. P. 2016. Impacts of biocontrol products on *Rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities, and their persistence in soil. *Crop Prot.* 90:96-105.
- Liu, P.; Luo, L. and Long, C. A. 2013. Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. *Biol. Control* 67(2):157-162.
- Liu, S.; Che, Z. and Chen, G. 2016. Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Prot.* 84:56-61.
- Liu, Y.; Wang, W.; Zhou, Y.; Yao, S.; Deng, L. and Zeng, K. 2017. Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biol. Control.* 110:18-24.
- Medina, C. N.; López, A. R.; Ascencio, F.; Castellanos, T.; Campa, C., A. I. and Angulo, C. 2016. Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biol. Control.* 97:70-79.
- Mnif, I. and Ghribi, D. 2015. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Prot.* 77:52-64.
- Moshi, A. P. and Matoju, I. 2017. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. *Crop Prot.* 92:16-28.
- Mumford, R. A.; Macarthur, R. and Boonham, N. 2016. The role and challenges of new diagnostic technology in plant biosecurity. *Food Sec.* 8(1):103-109.
- Palazzini, J.; Dunlap, C.; Bowman, M. and Chulze, S. 2016. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Microbiol. Res.* 9:30-36.
- Parafati, L.; Vitale, A.; Restuccia, C. and Cirvilleri, G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47:85-92.
- Punja, Z. K.; Rodríguez, G. and Tirajoh, A. 2016. Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Crop Prot.* 84:98-104.
- Pusztahelyi, T.; Holb, I. J. and Pócsi, I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interaction. *Front Plant Sci.* 6(573):1-23.
- Raza, W.; Wang, J.; Wu, Y.; Ling, N.; Wei, Z.; Huang, Q. and Shen, Q. 2016a. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(17):7639-7650.
- Raza, W.; Ling, N.; Yang, L.; Huang, Q. and Shen, Q. 2016b. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Sci. Rep.* 6:1-13.
- Reiss, A. and Jørgensen, L. N. 2017. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade® ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713). *Crop Prot.* 93:1-8.
- Romanazzi, G.; Smilanick, J. L.; Feliziani, E. and Droby, S. 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biol. Tec.* 113:69-76.
- Ryan, R. P.; Monchy, S.; Cardinale, M.; Taghavi, S.; Crossman, L.; Avison, M. B.; Berg, G.; Lelie, V. D. and Dow, J. M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Rev. Microbiol.* 7(7):514-525.

- Sasha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(5):3984-3999.
- Sasirekha, B. and Srividya, S. 2016. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agric. Nat. Res.* 50(4):250-256.
- Sharifazizi, M.; Harighi, B. and Sadeghi, A. 2017. Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biol. Control.* 104:28-34.
- Stenberg, J. A.; Heil, M.; Åhman, I. and Björkman, C. 2015. Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. *Trends Plant Sci.* 20(11):698-712.
- Sharma, R. R.; Singh, D. and Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control.* 50(3):205-221.
- Tokpah, D. P.; Li, H.; Wang, L.; Liu, X.; Mulbah, Q. S. and Liu, H. 2016. An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice. *Biol. Control.* 103:21-29.
- Tu, Q.; Chen, J. and Guo, J. 2013. Screening and identification of antagonistic bacteria with potential for biological control of *Penicillium italicum* of citrus fruits. *Sci. Hort.* 150:125-129.
- Usall, J.; Torres, R. and Teixidó, N. 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Curr. Opin. Food Sci.* 11:51-55.
- Van Bruggen, A. H. C. and Finckh, M. R. 2016. Plant diseases and management approaches in organic farming systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54(1):25-54.
- Vero, S.; Garmendia, G.; González, M. B.; Bentancur, O. and Wisniewski, M. 2013. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus domestica*). *FEMS Yeast Res.* 13(2):189-199.
- Wang, Y.; Bao, Y.; Shen, D. and Feng, W. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodosporidium paludigenum* Fell and Tallman. *Int. J. Food Microbiol.* 123(3):234-239.
- Wang, Y.; Tang, F.; Xia, J. and Yu, T. 2011 A combination of marine yeast and food additive enhances preventive effects on postharvest decay of jujubes (*Zizyphus jujuba*). *Food Chem.* 125(3):835-840.
- Wisniewski, M.; Droby, S.; Norelli, J.; Liu, J. and Schena, L. 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol. Tec.* 122:3-10.
- Weaver, M. A.; Abbas, H. K.; Jin, X. and Elliott, B. 2016. Efficacy of water-dispersible formulations of biological control strains of *Aspergillus flavus* for aflatoxin management in corn. *Food Addit. Contam.* 33(2):346-351.
- Yao, H.; Tian, S. and Wang, Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *Int. J. Food Microbiol.* 93(3):297-304.
- Yu, X.; Ai, C.; Xin, L. and Zhou, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur. J. Soil Biol.* 47(2):138-145.