

**Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas**

**“Efecto de los compuestos volátiles, producidos por
bacterias de maíz almacenado en silo bolsa, sobre
Sitophilus zeamais y *Fusarium verticillioides*”**

Tesinista: GERGOLET DIAZ, Donald Gabriel

Firma:

Directora: Dra. MERLO, Carolina

Firma:

Lugar de trabajo: Cátedras de Química Orgánica y Productos Naturales e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC). Laboratorio de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC).

“Efecto de los compuestos volátiles, producidos por bacterias de maíz almacenado en silo bolsa, sobre *Sitophilus zeamais* y *Fusarium verticillioides*”

Tribunal Examinador:

Dra. LABUCKAS, Diana

Firma:

Dr. MERILES, José Manuel

Firma:

Dr. LOPEZ, Abel

Firma:

Calificación:

Fecha: 21 de Junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Luis y Miriam y a mis hermanos Joaquín y Marianela por haberme dado su cariño, apoyo y aliento y por sobre todo su paciencia.

A la Cátedra de Química Orgánica, al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (FCEFN-UNC) y el Laboratorio de Microbiología Agrícola (FCA-UNC), por brindarme el espacio para el desarrollo de la tesina.

A mi Directora Carolina, por su eterna disposición, enseñanzas, paciencia y trabajo arduo para que la tesina diese buenos frutos.

A Carolina Vázquez, por su eterna disposición, enseñanzas, paciencia y trabajo arduo para que la tesina diese buenos frutos.

A Virginia Usseglio, por su constante disposición y ayuda incondicional.

A mis compañeros de laboratorio de Microbiología (Facultad de Ciencias Agropecuarias) y de Aromas (ICTA), por su constante buena onda, apoyo y enseñanzas.

A mis amigos y hermanos de la vida, Guada, Ani, Hugo, Ine, Vale, Vero, Mica y Guada por simplemente estar en cada momento y bancarme en todas.

A mi prima Cecilia, por su apoyo y compañía.

A mis amigos de la facultad, por su apoyo en cada instancia, risas, sufrimiento y momentos compartidos.

A mi abuela, Dorina, tan solo por ser ella.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
Hipótesis	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Obtención de granos de maíz, insectos y cepa fúngica	10
Estudio de los COV producidos por diferentes cepas de bacterias aisladas del silo bolsa	11
Evaluación de los cambios conductuales de <i>Sitophilus zeamais</i> frente a la exposición de los COV bacterianos	12
Evaluación de los cambios en el desarrollo de <i>Fusarium verticillioides</i> y en la producción de FB ₁	14
Análisis estadístico	15
RESULTADOS	17
Estudio de los COV producidos por diferentes cepas de bacterias aisladas del silo bolsa	17
Evaluación de los cambios conductuales de <i>Sitophilus zeamais</i> frente a la exposición de los COV bacterianos	20
Evaluación de los cambios en el desarrollo de <i>Fusarium verticillioides</i> y en la producción de FB ₁ frente a la exposición de los COV bacterianos	22
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	32
FIGURAS ANEXO	39

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es uno de los más importantes en el mundo siendo Argentina el sexto exportador a nivel mundial y el tercero en América del Sur (Lezcano, 2012). En Argentina se producen aproximadamente entre 25 y 30 millones de toneladas de maíz por año (INDEC, 2015) y su área central es la más importante en la producción de maíz alcanzando un área de siembra de 2,2 millones de hectáreas y una producción de 15,8 millones de toneladas de maíz en la campaña 2016/2017 (Bolsa de Cereales de Córdoba). En la mayoría de los sistemas de producción, los granos deben ser almacenados para evitar su deterioro y mantener su contenido nutritivo. El almacenamiento se realiza utilizando silos durante períodos que pueden comprender varios meses antes de su comercialización y/o utilización (Pieper y col., 2011). Si bien, las nuevas tecnologías han generado un incremento importante en la producción de granos, el ataque de numerosas plagas ejerce una fuerte presión en la disminución de los rendimientos generando innumerables pérdidas tanto alimentarias como económicas. Las principales plagas que afectan los granos de maíz son insectos de la familia Curculionidae y hongos filamentosos, siendo *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) y *Fusarium verticillioides* las más importantes (Chulze, 2010; Tefera et al., 2011).

Sitophilus zeamais, es uno de los insectos plagas más agresivos presentes en los silos, su dieta y sitio de reproducción se basan en granos almacenados, resultando en una significativa disminución de la calidad nutritiva de éstos y una pérdida en la economía global (Boyer y col., 2012). La presencia de estos insectos también puede deteriorar los granos por una acción indirecta al actuar como medio de transporte de microorganismos hacia el interior del silo y de esa manera generar un incremento en la contaminación del alimento (Nesci y col., 2011; Ferreria-Castro y col., 2012).

Los granos de maíz pueden ser infectados por el hongo *Fusarium verticillioides*, un ascomiceto cosmopolita persistentemente asociado al cultivo de maíz, especialmente en zonas de climas tropical y subtropical (Botta & Gonzalez, 2012). Esta infección causa pérdida de calidad y rendimiento del grano, y contaminación con micotoxinas como las fumonisinas tipo B₁ (FB₁) (Botta & Gonzalez, 2012; Peschiutta y col., 2016). Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por hongos filamentosos anamorfos y

teleomorfos que causan condiciones patológicas en algunos hospedadores, tanto en plantas como animales (Griffin, 1996; Bianchini & Bullerman, 2014).

El empleo de los plaguicidas sintéticos en la protección de los productos agrícolas ha sido una herramienta imprescindible para la agricultura durante mucho tiempo. Sin embargo, el uso intensivo e indiscriminado de estos plaguicidas ha dado lugar a graves resultados tales como la formación de residuos tóxicos, desarrollo de resistencia por parte de las plagas, surgimiento de plagas secundarias y enfermedades en la población que consume esos productos (Correa y col., 2011; Boyer y col., 2012). Como respuesta a estos problemas surge la necesidad de buscar nuevos métodos de control de plagas más comprometidos con el ambiente y con la salud del consumidor. Como alternativa, se comenzaron a desarrollar investigaciones sobre los llamados “métodos biorracionales”, cuya estrategia de acción se sustenta entre otros aspectos en el estudio de los sistemas de comunicación intra e interespecífica, con el objetivo de obtener, compuestos capaces de interferir en aspectos fisiológicos, bioquímicos y/o conductuales de las plagas. En este sentido, los compuestos orgánicos volátiles (COV) emitidos por los microorganismos juegan un rol fundamental en las interacciones multitróficas (Kanchiswamy y col., 2015). Los ecologistas químicos consideran a los COV como semioquímicos que funcionan como atractivos o repelentes de insectos y otros invertebrados. También los COV son potenciales agentes de biocontrol de diversos fitopatógenos y pueden ser utilizados como biofertilizantes para la promoción del crecimiento de las plantas. Por último, en la industria alimenticia, las propiedades biocontroladoras de los COV pueden ser utilizadas para prevenir enfermedades poscosecha (Kai y col., 2009; Davis y col. 2013; Zheng y col. 2013; Gao y col., 2017; Rojas-Solís y col., 2018). En general, el uso de COV en el control de plagas tiene las siguientes ventajas: son específicos en su interacción, relativamente de baja toxicidad o no tóxicos sobre otros organismos, se pueden utilizar en bajas concentraciones, no son residuales sobre el alimento o material que se aplican, son amigables con el ambiente, son biodegradables y no se ha descrito a la fecha que generen resistencia (Davis y col., 2013; Guerrero y col., 2014; Song & Ryu, 2013; Kanchiswamy y col., 2015).

Los COV emitidos por microorganismos son un grupo heterogéneo de compuestos pequeños (hasta 20 átomos de carbono) sintetizados por diversas bacterias por vías metabólicas primarias y secundarias (Sannino y col., 2017) (Fig. 1). Se caracterizan por su

fácil evaporación y difusión en medios acuosos o gaseosos (debido a su baja masa molecular, entre 100 y 500 Da, alta presión de vapor, bajo punto de ebullición y naturaleza lipofílica). Esto los convierte en compuestos químicos ideales para mediar las interacciones intercelulares y orgánicas a corta y larga distancia (Maffei y col., 2011; Schmidt y col., 2015). Los COV pueden ser alcanos, aldehídos, alcoholes, cetonas, terpenos, benzenoides, pirazinas, ésteres, ácidos carboxílicos y compuestos que contienen azufre (Papaleo y col., 2013; Schmidt y col., 2015). La cantidad y composición de estos puede variar según las especies bacterianas, la fase de crecimiento y condiciones tales como el sustrato, nutrientes, pH, humedad y temperatura (Papaleo y col., 2013; Wang y col., 2016). Los COV producidos por los microorganismos han mostrado tener diferentes tipos de bioactividad frente a distintos tipos de organismos. Algunos de ellos inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Herrera y col., 2014; Herrera y col., 2015), inducen resistencia en las plantas (Bitas y col., 2013), son insecticidas (Zunino y col., 2015) y/o pueden afectar la conducta del insecto (Leroy y col., 2011; Davis y col., 2013; Herrera y col., 2014; Usseglio y col., 2018).

Los COV probablemente también tengan funciones como agentes de información química en la comunicación inter- y/o intraorganismos, en señales de comunicación célula/célula o como agentes de promoción o inhibición del crecimiento poblacional (Kai y col., 2009). Además, muchos estudios han demostrado que los COV producidos por bacterias inhiben la germinación de esporas y el crecimiento fúngico. Además, la exposición a los COV afecta la morfología de las hifas, la producción de micotoxinas, actividad enzimática y expresión de genes (Kai y col., 2007; Zheng y col., 2013; Gong y col., 2015).

La interacción bacteria/insecto se desarrolla a través de la quimio-recepción del artrópodo que recepta los COV producidos por los microorganismos como una fuente de información (Tomberlin y col., 2012). Los insectos tienen sistemas quimiosensores muy complejos que son extremadamente sensibles a diferentes señales químicas. Muchos insectos son especialmente sensibles a los olores que les indican fuentes de nutrientes, la presencia de competidores, predadores, oportunidades de apareamiento y sustentabilidad del hábitat (Leroy y col., 2011). De esta forma los COV presentan un gran potencial para ser utilizados en el control de plagas (Davis y col., 2013).

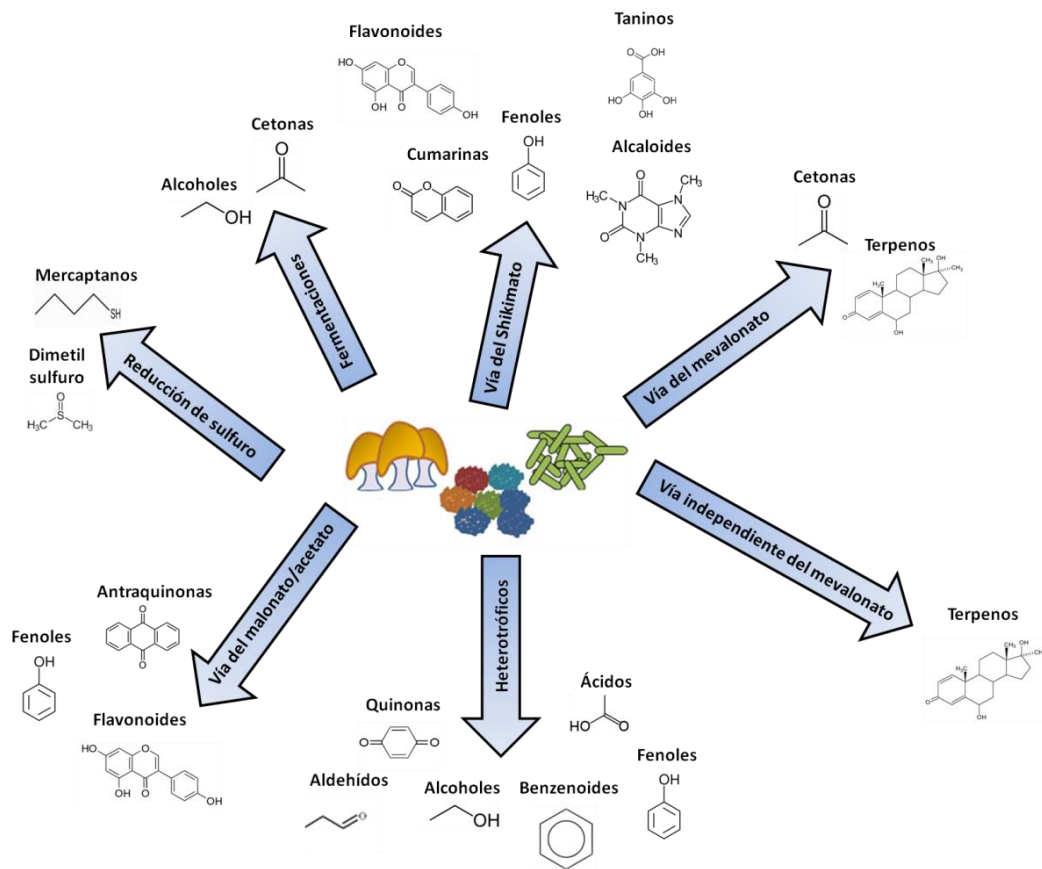


Figura 1: Principales vías metabólicas para la producción de compuestos orgánicos volátiles (Extraído de Schmidt y col., 2015).

Durante los últimos años, se ha registrado un mayor conocimiento acerca de la emisión de sustancias volátiles bacterianas. Investigaciones recientes han demostrado que las bacterias emplean COV durante las interacciones con otros organismos para influir en las poblaciones y las comunidades (Kai y col., 2009; Romoli y col., 2014). Se ha identificado una amplia gama de compuestos químicos en la emisión bacteriana. Es conocido que las bacterias afectan positiva o negativamente la aptitud física de otros organismos, y que los COV bacterianos desempeñan un papel importante en las interacciones bacteria-planta, bacteria-bacteria y bacteria-hongo (Kanchiswamy y col., 2015). Con lo que respecta a su relación con los insectos, las bacterias han mostrado tener una función muy importante en la producción de COV que actúan como semioquímicos (Mann y col., 2010; Guerrero y col., 2014). Además, muchos de estos semioquímicos

tienen el potencial de transformarse en insecticidas (Mann y col., 2010; Davis y col., 2013). Del mismo modo los antecedentes sobre el potencial antifúngico que presentan los COV bacterianos los hace potenciales candidatos para su utilización como bioplaguicidas. Hasta nuestro conocimiento, no existe información sobre la interacción bacteriana con los insectos y hongos, en sistemas artificiales como el silo para granos. La importancia de estudiar esta relación se basa en que los COV producidos naturalmente por las bacterias epífitas de los granos pueden ser una opción muy interesante en la generación de una nueva herramienta para el control del insecto plaga *S. zeamais* y del hongo patógeno *F. verticillioides*, resultado de una interacción potencial que puede suceder en un ambiente nuevo: el silo de almacenaje de granos.

HIPÓTESIS:

- Los COV producidos por las bacterias epífitas de los granos de maíz almacenados en el silo bolsa tienen actividad semioquímica sobre *Sitophilus zeamais*.
- Los COV emitidos por las bacterias epífitas presentan actividad antifúngica y antimicotoxigénica sobre el hongo *Fusarium verticillioides*.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar las interacciones bioquímicas, funcionalidad y el contexto ecológico entre bacterias, hongos e insectos que forman parte de los silos de almacenajes de granos a través de los compuestos volátiles bacterianos.

Objetivos específicos:

1. Estudiar los COV producidos por diferentes cepas de bacterias aisladas del silo bolsa.
2. Evaluar los cambios conductuales de *Sitophilus zeamais* frente a la exposición de los COV bacterianos.
3. Evaluar los cambios en el desarrollo de *Fusarium verticillioides* y en la producción de fumonisinas frente a la exposición de los COV bacterianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de granos de maíz, insectos y cepa fúngica

Material vegetal: Los granos maíz (*Zea mays* L.) var. tizereta fueron obtenidos desde el programa de mejoramiento de la Estación Experimental Manfredi (INTA). El material se conservó en envases cerrados y secos a una temperatura de -20°C.

Insectos: Se utilizaron adultos de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae), los cuales fueron criados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $70 \pm 5\%$ de H.r. y en continua oscuridad en contenedores de plástico, con dieta de cría de granos de maíz libres de insecticida. La elección del insecto para este proyecto se basó en que *S. zeamais* es una plaga primaria que se alimenta de granos de maíz sanos.

Cepa fúngica: Los inóculos fúngicos fueron preparados con la cepa *F. verticillioides* M3125 (obtenida desde el departamento de Agricultura, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, USA.). Para preparar el inóculo se agregó una solución estéril de Tween 80 (2,5 % en PBS) sobre las colonias fúngicas desarrolladas durante 7 días en medio agar papa dextrosa (APD). Las suspensiones obtenidas se dejaron decantar durante 30 segundos, y se determinó su concentración por conteo directo. Las suspensiones de conidios fueron conservadas a 4°C hasta su utilización.

Cepas bacterianas: Se utilizaron 4 cepas bacterianas del género *Enterococcus* (Tabla 1), aisladas a partir de silo bolsa de granos de maíz con aproximadamente 6 meses de almacenamiento en 2 sitios de la provincia de Córdoba. El silo bolsa de donde se obtuvieron las cepas 55 y 49 estaba ubicado en Villa del Rosario (31°, 32', 17,02" S; 63°, 29', 44,29" O), mientras que el silo bolsa de donde se obtuvieron las cepas M4A y M4G estaba ubicado en Costa Sacate (31°, 37', 58,96" S; 63°, 41', 55,62" O). Para la obtención del inóculo, las bacterias se incubaron en caldo De Man, Rogosa and Sharpe media (MRS) (Oxoid) a 28-30°C durante 24 horas.

Tabla 1: Especies de bacterias aisladas de silos bolsa de granos de maíz, basadas en la máxima similitud de la secuencia de gen ARN 16S.

Cepa	Especie	% de identidad
55	<i>Enterococcus faecium</i>	98
49	<i>Enterococcus faecium</i>	99
M4G	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99
M4A	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99

Estudio de los COV producidos por diferentes cepas de bacterias aisladas del silo bolsa

Los COV producidos por las cepas bacterianas se determinaron mediante el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masa (CG-EM) (Perkin Elmer 600) en dos sustratos: a) granos de maíz y b) agar MRS. Frascos de 100 mL con sellos de aluminio y tapones de siliconas conteniendo 25 g de maíz estéril, fueron inoculados con 5 mL del cultivo bacteriano (aproximadamente 1×10^9 bacterias mL^{-1}) más 3 mL de agua destilada estéril. Frascos de 25 mL conteniendo 5 mL de agar MRS se inocularon con 30 μL del cultivo bacteriano. Además, frascos con maíz estéril (con el agregado de 8 mL de agua) y frascos con agar MRS estéril adicionados con 30 μL de agua destilada estéril fueron utilizados como control. Los COV producidos por las cepas cultivadas en maíz fueron analizados a los 14 días post-inoculación, mientras que los COV producidos por las cepas cultivadas en agar MRS fueron analizados a los 7 días post-inoculación.

Luego del tiempo de incubación, los viales fueron calentados durante 20 minutos en un baño termostatzado con una temperatura de 45°C. Posteriormente, se insertó una fibra de microextracción de fase sólida SPME, divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 50/30 μm Supelco/Sigma en el interior del vial y se la expuso durante 30 minutos. Después de coleccionar los volátiles con la fibra SPME ésta fue retraída al interior

del porta fibra e inmediatamente inyectada al equipo de CG-EM (Perkin Elmer SQ8) utilizando una columna no polar DB5 (60 m x 0.25 mm i.d. y 0.25 μm). El inyector fue operado en modo splitless a 250°C. La temperatura del horno fue programada, 35°C durante 2 minutos, 10°C/minuto hasta alcanzar los 200°C, 15°C/minutos hasta 230°C y se mantuvo a 230°C por 5 minutos. La temperatura del detector de ionización en llama (FID) se estableció a 280°C. El espectrómetro de masa fue operado a 70 eV en el modo de ionización, la temperatura de la fuente fue de 200°C, la temperatura del cuadrupolo fue de 100°C y la temperatura de interface fue de 200°C, con un escaneo desde m/z 40 a 300 (Zheng y col., 2013; Farag y col., 2017). El índice de retención de cada compuesto identificado fue calculado usando una serie de alcanos C₅-C₂₀. También se realizó la identificación de los compuestos usando una librería de base de datos de espectros de masas (NIST) y mediante la comparación con estándares obtenidos de Sigma-Aldrich (≥ 97 % pureza). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Evaluación de los cambios conductuales de *Sitophilus zeamais* frente a la exposición de los COV bacterianos

Bioensayo repelencia/atracción: Se utilizó un olfatómetro de dos vías, descrito por Herrera y col. (2015) (Fig. 2). Para evaluar el efecto del conjunto de volátiles producidos por las bacterias epifitas de maíz, se utilizó un erlenmeyer de vidrio de 250 mL conteniendo 25 g de maíz estéril inoculados con 5 mL del cultivo bacteriano (aproximadamente 1×10^9 bacterias mL^{-1}) más 3 mL de agua destilada estéril. Frascos con maíz estéril adicionados con 8 mL de agua se utilizaron como control. Los tratamientos y controles fueron incubados por 14 días a 30 °C. Para evaluar el efecto individual de los compuestos volátiles producidos por las cepas, antes de conectar los erlenmeyer con el tubo, se colocaron 4 g de maíz en el interior de los erlenmeyer a los cuales se les adicionó el COV a evaluar en las siguientes concentraciones: 0,4 $\mu\text{l L}^{-1}$, 4 $\mu\text{l L}^{-1}$ y 40 $\mu\text{l L}^{-1}$. El control consistió en 4 g de maíz con la adición de agua estéril. Se conectaron dos erlenmeyer de vidrio de 250 mL (1 tratamiento y un control) mediante un tubo de vidrio de 30x1 cm. En el centro del tubo de vidrio existe una pequeña perforación de 1x1 cm, a través de la cual se agregaron al sistema 20 insectos no sexuados con un ayuno de 24

horas. De esta forma los insectos debieron elegir entre los dos erlenmeyer. El olfatómetro se colocó en oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $60 \pm 3\%$ H.r. y evaluado después de 1 hora 45 minutos. Los experimentos se realizaron entre las 10:00 am y 4:00 pm y la posición de los erlenmeyer fue modificada con cada una de las réplicas para evitar cualquier asimetría ambiental.

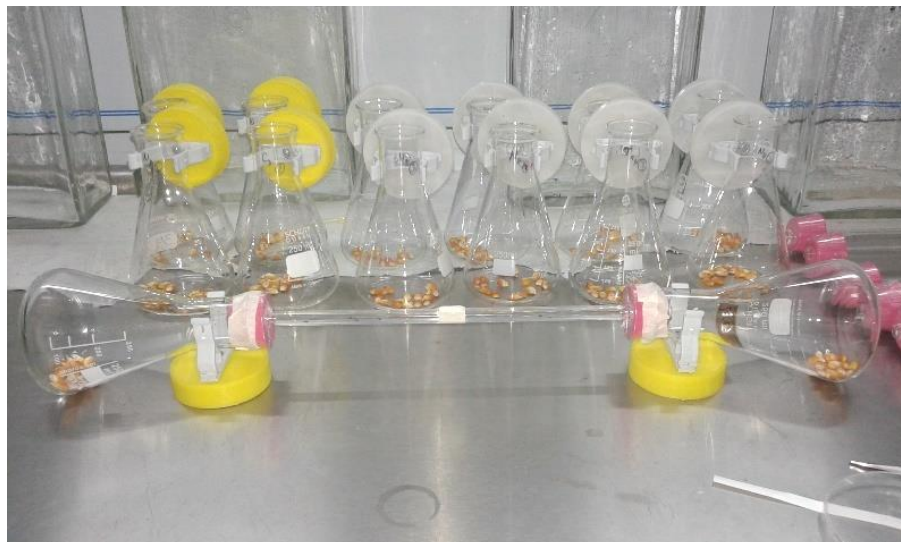


Figura 2: Olfatómetro de dos vías. Se observa la conexión entre los erlenmeyers y el tubo.

Los insectos fueron expuestos a elegir: a) entre los volátiles producidos por las bacterias o el maíz estéril y b) distintas dosis del compuesto a evaluar o agua estéril como solvente de control. Los ensayos fueron realizados 3 veces y los insectos se utilizaron por única vez. En cada ensayo se utilizaron dos controles independientes (sin bacterias y sin compuestos) para verificar que el movimiento de los insectos a través del dispositivo es al azar. Con los datos obtenidos, se calculó el índice de respuesta (IR) usando la siguiente ecuación: $IR = [(T-C) / Tot] \times 100$, donde T es el número que responde al tratamiento, C es el número que responde al control y Tot es el número total de insectos (Phillips y col., 1993). Valores positivos de IR indican atracción al tratamiento, mientras que los valores negativos indican repelencia.

Evaluación de los cambios en el desarrollo de *Fusarium verticillioides* y en la producción de FB₁

Efecto de COV en el desarrollo del hongo: La acción de los COV fue evaluada siguiendo el método descrito por Cordero y col. (2014) modificado. Se sembró 0,1 mL del inóculo bacteriano en placas de Petri conteniendo agar MRS que fueron incubadas durante 72 horas a 28-30°C. Por otro lado, en el centro de placas de Petri conteniendo agar extracto de maíz (AEM) (harina de maíz 30 g, agar 20 g, agua 1 litro) se seccionó con un sacabocados una pieza de AEM de 5 mm de diámetro; luego, dentro de este espacio se sembraron 10 µL de una suspensión conteniendo una concentración de 1×10^7 esporas por mL. Para cada tratamiento se enfrentaron las placas sembradas con hongos vs. las placas sembradas con bacterias, se sellaron con parafilm y se incubaron a 28-30 °C durante 7 a 10 días (Meng y col., 2016). Como control se enfrentó una placa sembrada con el hongo a una placa con agar MRS sembrada con 0,1 mL de agua estéril. Se realizaron 10 réplicas por tratamiento y control y todos los días se midió el diámetro de micelio con un calibre.

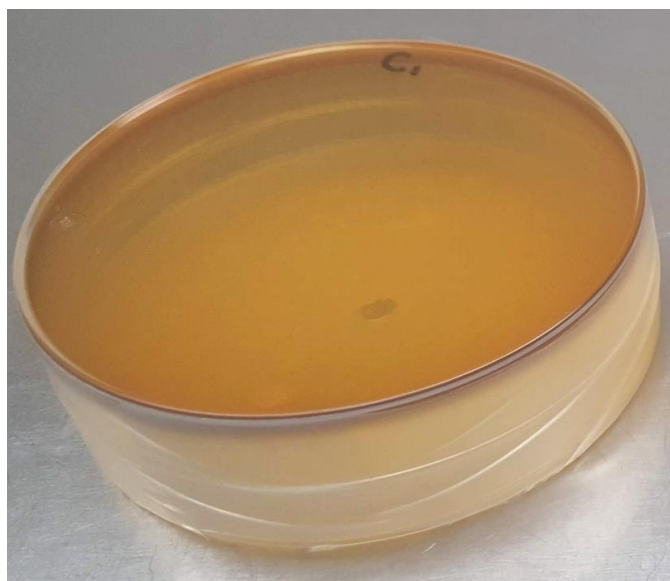


Figura 3: Se observa una placa conteniendo agar MRS (control) enfrentada a una placa conteniendo AEM sembrada con el hongo y sellada con parafilm.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PIC), utilizando la siguiente fórmula: $PIC = [(C-T)/100] \times 100$, siendo C la media del área del control (mm^2), y T el área de cada tratamiento (mm^2) (Yuriko y col., 2017). Para calcular la tasa de crecimiento del hongo, los radios del micelio se representaron en función del tiempo y se aplicó una regresión lineal para obtener la tasa de crecimiento como la pendiente de la línea. La fase Lag (tiempo que tarda un microorganismo en alcanzar la fase de crecimiento exponencial) se determinó como la abscisa de las curvas de la tasa de crecimiento (Pizzolitto y col., 2015).

Efecto de COV en la producción de FB₁: Para determinar la biosíntesis de micotoxina FB₁, 5 placas se incubaron hasta alcanzar los 28 días a 28-30°C. Luego, las placas se secaron en estufa de aire forzado por 96 horas a 60 °C. Posteriormente, su contenido se molió hasta obtener un polvo fino. Finalmente, se agregaron 10 mL de agua mili Q y se extrajo la micotoxina FB₁ agitando durante 120 minutos y centrifugando a 5000 rpm durante 15 minutos. La cuantificación de la FB₁ se realizó según Shephard y col. (2000). Una alícuota de 50 μL , fue derivatizada con 200 μL de una solución preparada adicionando 5 mL de 0,1M de tetraborato de sodio y 50 μL de 2-mercaptoetanol a 1 mL de metanol conteniendo 40 mg de o-ftaldialdehído. Las muestras derivatizadas fueron estudiadas por HPLC utilizando un detector de fluorescencia. Las longitudes de onda utilizadas fueron 335 y 440 nm por emisión. Se utilizó una columna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm de diámetro interno). La fase móvil fue metanol, NaH_2PO_4 , 0,1 M (75:25 v/v) con un pH 3,35 y un caudal de 1,5 mL minuto^{-1} . La cuantificación de FB₁ se realizó por comparación con áreas de picos obtenidos desde las muestras con aquellas de los estándares analíticos de FB₁ (PROMEC, Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis, Tygerberg; Republic of South Africa). Los resultados se expresaron como $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la micotoxina FB₁.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis de varianza de una vía (ANAVA) seguida de una prueba *a posteriori* (LSD; $p < 0,05$). Los datos que no se ajustaron a una distribución

normal (prueba de Shapiro-Wilks modificado) fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis. Los supuestos de homogeneidad de varianza se corroboraron mediante la construcción de gráficos QQ-plot. Para el análisis de repelencia, se realizaron pruebas T-Student para comparaciones de a pares. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo y col., 2013).

RESULTADOS

Estudio de los COV producidos por diferentes cepas de bacterias aisladas de silo bolsa

Al analizar los COV producidos por las cepas bacterianas incubadas en granos de maíz durante 14 días, se observaron picos pertenecientes a los compuestos 2,3-butanodiona (diacetilo), ácido acético y 3-hidroxi, 2-butanona (acetoína). Sin embargo, es importante destacar que el área de los cromatogramas fue mayor en las cepas 49 y 55 (Ver Anexo). En todas las cepas, la acetoína fue el compuesto que se produjo en mayor proporción. Además, en los cromatogramas de los COV producidos por la cepa M4G, se detectaron otros 3 compuestos, pero en baja proporción (Tabla 2). Al comparar la producción de COV entre los dos sustratos, se observó que las cepas bacterianas cultivadas en agar MRS, produjeron mayor número de COV. Al igual que en maíz los principales COV producidos fueron diacetilo, ácido acético y acetoína, pero en diferente proporción según la cepa. En este sentido, la cepa M4A produjo mayor proporción de diacetilo y las cepas 55 y 49 las mayores proporciones de acetoína. Las cepas cultivadas en agar MRS produjeron, además de los tres volátiles principales, un gran número de COV en baja proporción. Los perfiles de volátiles variaron entre las cepas analizadas y en algunos casos los COV fueron específicos para una cepa (Tabla 3).

Tabla 2: Compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas analizadas y cultivadas en granos de maíz durante 14 días.

Compuesto	Similitud	IR	IRlit	Porcentaje relativo				Método de identificación
				55	M4A	49	M4G	
Diacetilo	951	591,80	593	8,83	7,76	11,29	5,56	IR, GC-MS, EST
Ácido acético	924	620,35	594	18,66	19,54	10,56	19,49	IR, GC-MS, EST
Acetoína	880	691,92	678	72,50	72,69	78,38	70,55	IR, GC-MS, EST
3-metil -1-butanol	864	722,80	740	-	-	-	1,29	IR, GC-MS, EST
2-metil-1-butanol	820	727,71	732	-	-	-	0,87	IR, GC-MS
2-metil pirazina	853	824,86	826	-	-	-	2,20	IR, GC-MS

IR: índices de retención de Kovats calculado a partir del tiempo de retención de una serie de alcanos C₅-C₂₀.

IRlit: índice de retención de Kovats obtenido de la literatura.

Los picos fueron identificados en base a: IR, comparación de índices de retención con datos publicados; GC-MS, comparación de espectros de masas con los listados en la librería NIST; EST, estándares obtenidos de Sigma-Aldrich ($\geq 97\%$ pureza).

Tabla 3: Compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas analizadas y cultivadas en agar MRS durante 7 días.

Compuesto	Similitud	IR	IRlit	Porcentaje relativo				Método de identificación
				55	M4A	49	M4G	
2 metil propanal	876	558,85	543	1,73	-	-	-	GC-MS
Diacetilo	951	591,80	593	5,96	35,11	5,16	4,26	IR, GC-MS, EST
2-butanona	843	598,20	581	-	-	1,19	3,67	GC-MS
2-metil furano	874	602,38	610	-	-	1,10	2,00	GC-MS
Ácido acético	924	620,35	594	28,06	20,08	27,35	31,49	IR, GC-MS, EST
No identificado		658,95		-	-	-	1,00	GC-MS
2-pentanona	880	669,75	687	-	0,46	-	-	IR, GC-MS
Acetoína	911	691,92	678	51,54	35,82	49,99	38,38	IR, GC-MS, EST
3-metil-3-buten-1-ol	829	717,89	731	-	0,31	-	-	IR, GC-MS
3-metil-1-butanol	864	722,80	740	1,19	1,69	2,24	2,55	IR, GC-MS, EST
2-metil-1-butanol	820	727,71	732	0,67	0,27	1,42	1,68	IR, GC-MS
Dimetilo disulfuro	744	732,63	722	-	0,48	1,19	1,17	GC-MS
Ácido 2-metil propanoico	900	753,68	752	0,69	0,45	0,79	1,11	GC-MS
2-butenal, 3-metil	878	782,11	784	0,46	0,24	0,78	0,65	IR, GC-MS
Ácido butanoico	805	790,88	772	0,74	0,52	0,99	1,01	IR, GC-MS
Ácido 3-metil butanoico	882	848,10	835	2,43	1,64	2,87	2,39	IR, GC-MS
Ácido 2-metil butanoico	806	856,54	841	0,36	0,32	-	-	IR, GC-MS
Ácido pentanoico, 2-hidroxi-4-metil-, metil éster	798	947,51	987	5,62	0,30	3,86	7,29	IR, GC-MS
Ácido hexanoico	733	979,72	973	0,36	0,26	0,59	0,80	IR, GC-MS
2-Nonanona	812	1090,18	1090	-	1,67	-	-	IR, GC-MS
Ácido octanoico	811	1168,70	1171	0,21	0,38	0,50	0,54	IR, GC-MS

IR: índices de retención de Kovats calculado a partir del tiempo de retención de una serie de alcanos C₅-C₂₀.

IRlit: índice de retención de Kovats obtenido de la literatura.

Los picos fueron identificados en base a: IR, comparación de índices de retención con datos publicados; GC-MS, comparación de espectros de masas con los listados en la librería NIST; EST, estándares obtenidos de Sigma-Aldrich ($\geq 97\%$ pureza).

Evaluación de los cambios conductuales de *Sitophilus zeamais* frente a la exposición de los COV bacterianos

El IR obtenido para los maíces tratados con la cepa 55 y 49 fue positivo y significativo, indicando una atracción de *S. zeamais* hacia los COV producidos por estas cepas bacterianas. Por el contrario, los COV emitidos por la cepa M4G produjeron repelencia (IR negativo), mientras que el tratamiento con la cepa M4A no fue significativo (Fig. 4).

Para los ensayos con los volátiles individuales sólo se utilizaron aquellos compuestos producidos en mayor proporción por las cepas bacterianas (diacetilo, acetoína y ácido acético). Luego de analizar la respuesta conductual de *S. zeamais* frente a la exposición de los compuestos volátiles individuales en diferentes concentraciones, se pudo observar que los valores de IR que se obtuvieron para el volátil acetoína indicaron una respuesta de atracción por parte de los insectos. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas al evaluar la concentración de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por otro lado, el compuesto ácido acético presentó un valor IR negativo y significativo en las 3 concentraciones evaluadas, indicando repelencia por parte de *S. zeamais* cuando fue expuesto a este volátil. Por último, los resultados obtenidos para los ensayos realizados con el compuesto volátil diacetilo no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

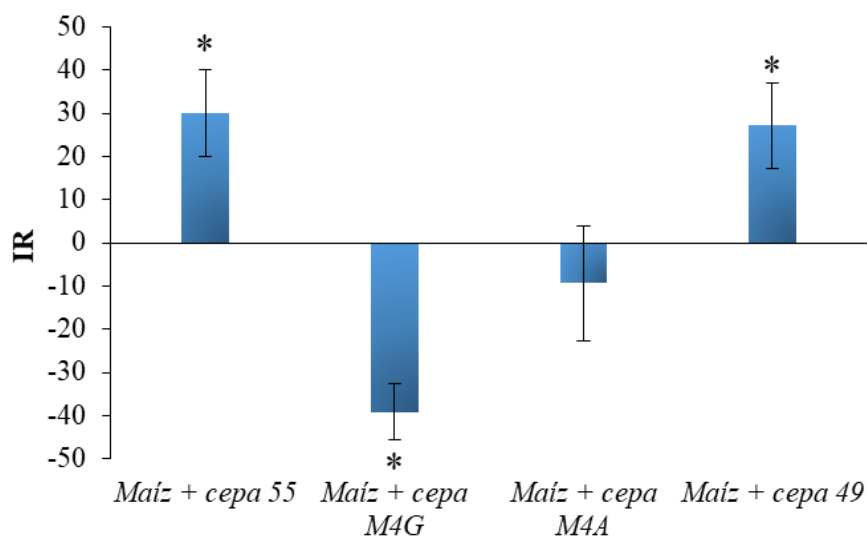


Figura 4: Respuesta conductual de *S. zeamais* frente a los compuestos volátiles producidos por las cepas 55, M4G, M4A y 49. * indica diferencias significativas para la prueba de comparaciones de a pares (T-Student; $p \leq 0,05$). Las barras indican el error estándar (EE).

Tabla 4: Índice de respuesta conductual de *S. zeamais* frente a los compuestos volátiles individuales a diferentes concentraciones.

Concentración	Acetoína	Ácido acético	Diacetilo
Maíz + 0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,63 ± 6,97	-30,90 ± 6,17*	-5,27 ± 12,14
Maíz + 4 $\mu\text{g L}^{-1}$	13,39 ± 6,70	-61,81 ± 6,51*	9,67 ± 7,28
Maíz + 40 $\mu\text{g L}^{-1}$	15,59 ± 5,11*	-70,40 ± 5,56*	-6,44 ± 12,89

Los datos representan la media ± EE de 9 réplicas. * indica diferencias significativas en pruebas para comparaciones de a pares (T-Student; $p \leq 0,05$).

Evaluación de los cambios en el desarrollo de *Fusarium verticillioides* y en la producción de FB₁ frente a la exposición de los COV bacterianos

La figura 5 muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento de *F. verticillioides* con respecto al control, expuesto a los COV producidos por las cepas bacterianas. Los ensayos realizados con las cepas 55, 49 y M4A presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Además, la cepa M4A mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos, y un mayor porcentaje de inhibición de casi un 60 % frente a un 20 % de las cepas 55 y 49 (Fig. 6, 7, 8 y 9).

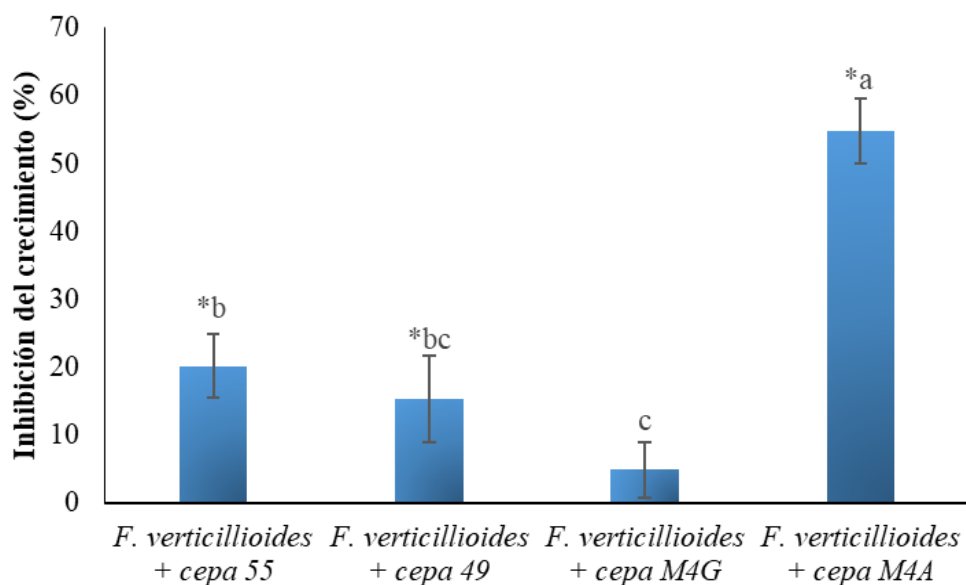


Figura 5: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* expuesto a COV producidos por las diferentes cepas bacterianas. * indica diferencias significativas con respecto al control; letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba ANAVA; Test LSD; $p \leq 0,05$). Las barras indican el EE.

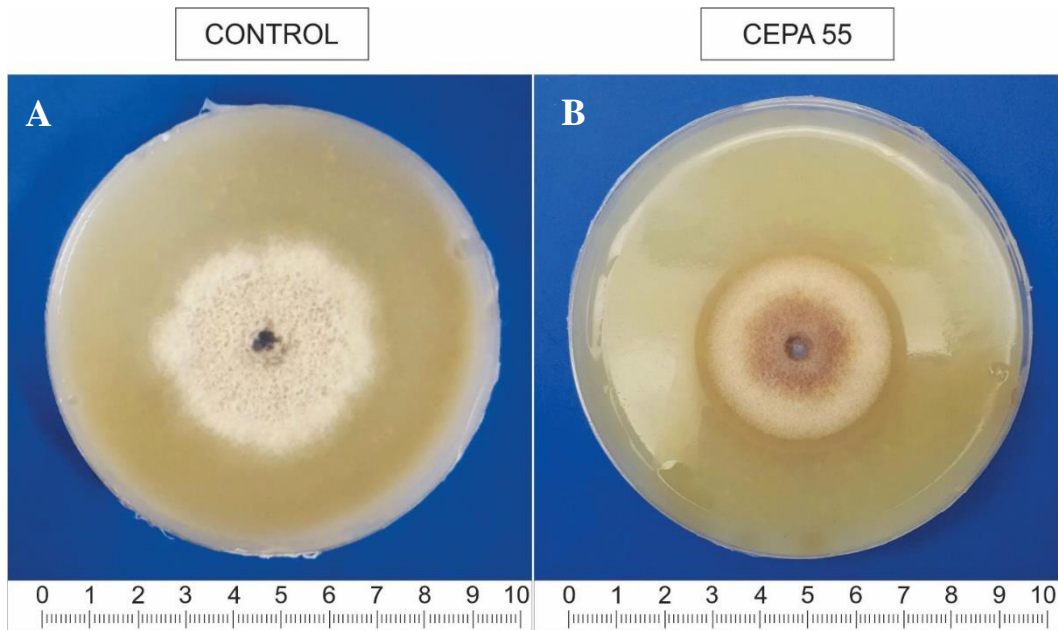


Figura 6: *F. verticillioides* cultivados en agar maíz. **A:** Control. **B:** micelio expuesto a los COV producidos por la cepa 55.

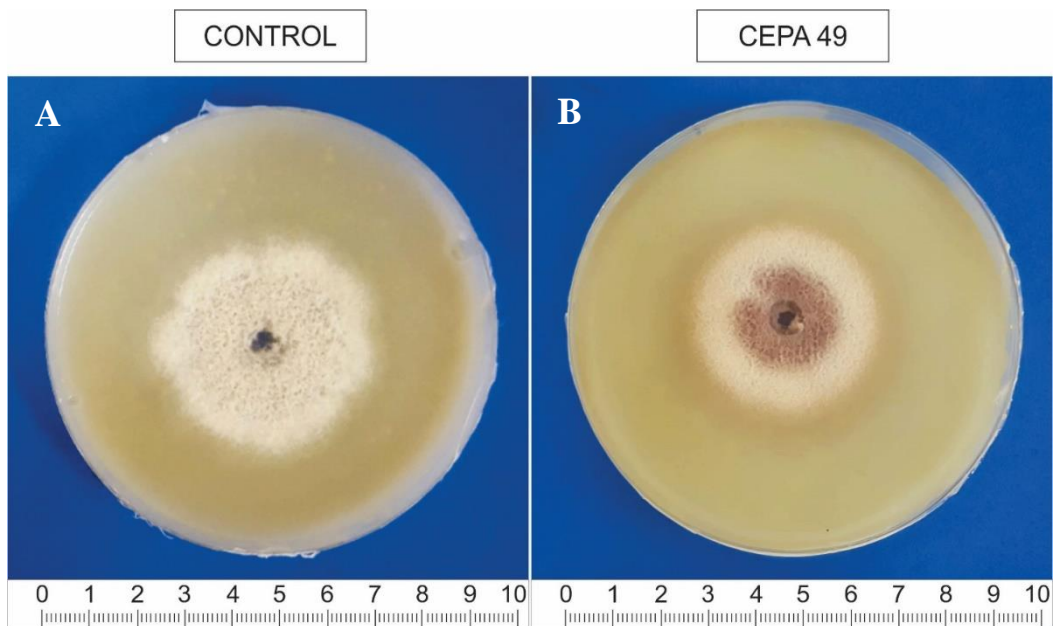


Figura 7: *F. verticillioides* cultivados en agar maíz. **A:** Control. **B:** micelio expuesto a los COV producidos por la cepa 49.

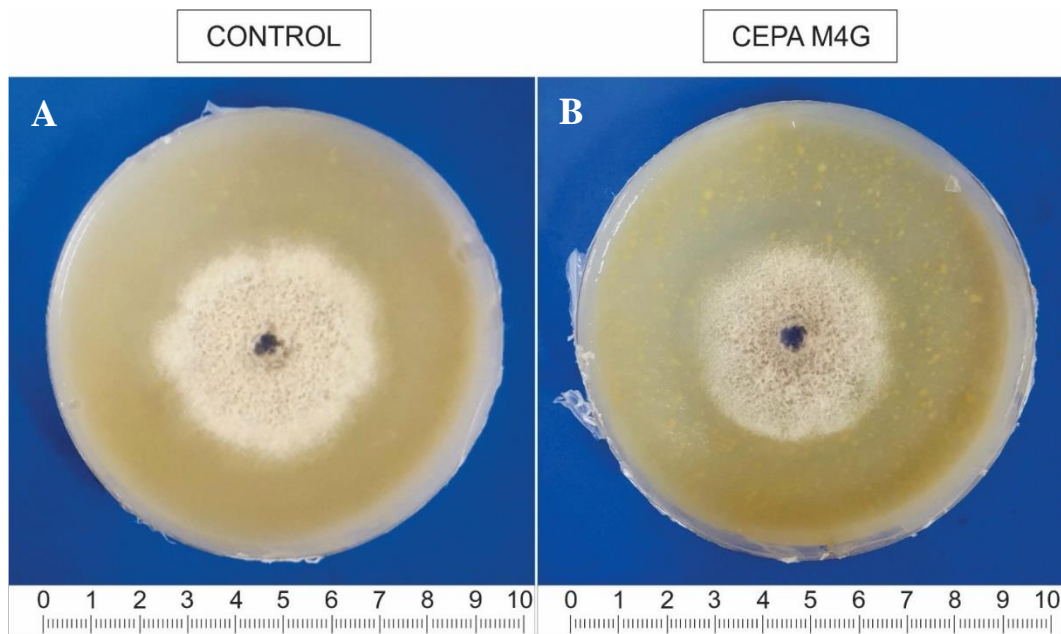


Figura 8: *F. verticillioides* cultivados en agar maíz. **A:** Control. **B:** micelio expuesto a los COV producidos por la cepa M4G.

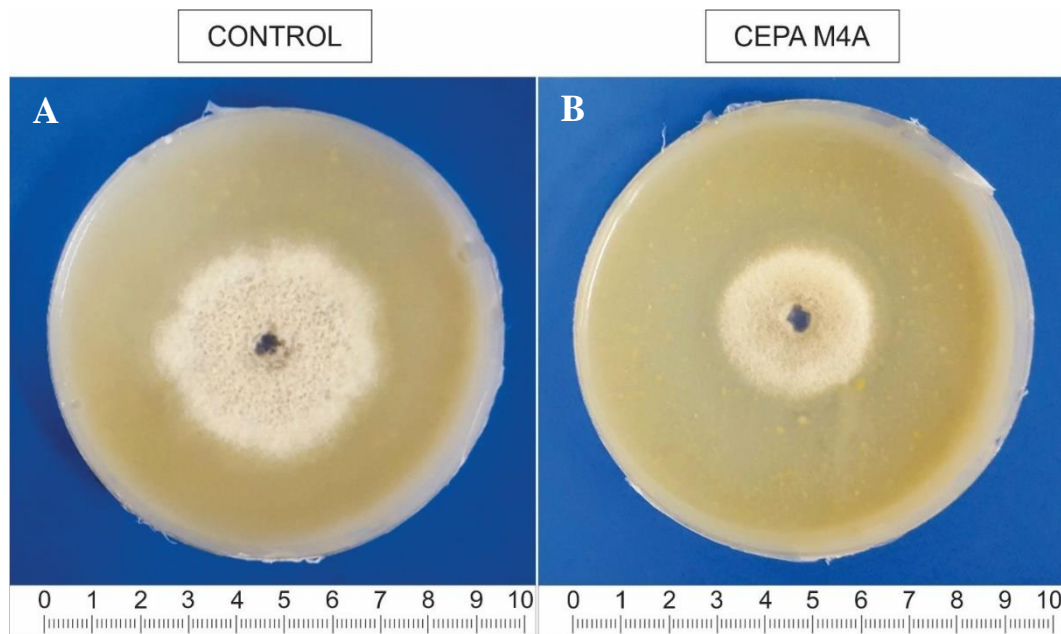


Figura 9: *F. verticillioides* cultivados en agar maíz. **A:** Control. **B:** micelio expuesto a los COV producidos por cepa la cepa M4A.

Con respecto a los resultados obtenidos para la fase Lag del crecimiento de *F. verticillioides*, se observó una fase significativamente más larga en los hongos expuestos a los volátiles emitidos por la cepa M4A y M4G con respecto al control, siendo la fase de los hongos enfrentados con la cepa M4A más del doble (Fig. 10). Al analizar la producción de la micotoxina FB₁, se detectó que los COV producidos por la cepa M4A reducen significativamente la producción de esta toxina con respecto al control y al resto de las cepas. En este sentido, los COV emitidos por la cepa M4A reducen en un 75 % la producción de la toxina (Fig. 11).

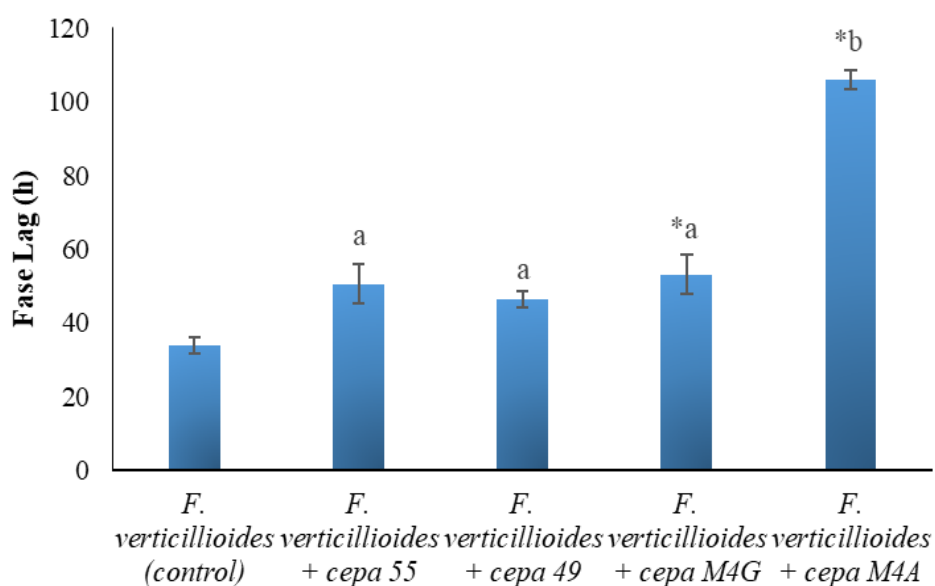


Figura 10: Desarrollo de la fase Lag de *F. verticillioides* expuesto a los COV de las diferentes cepas bacterianas. * indica diferencias significativas con respecto al control; letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Kruskal Wallis; $p \leq 0,05$). Las barras indican el EE.

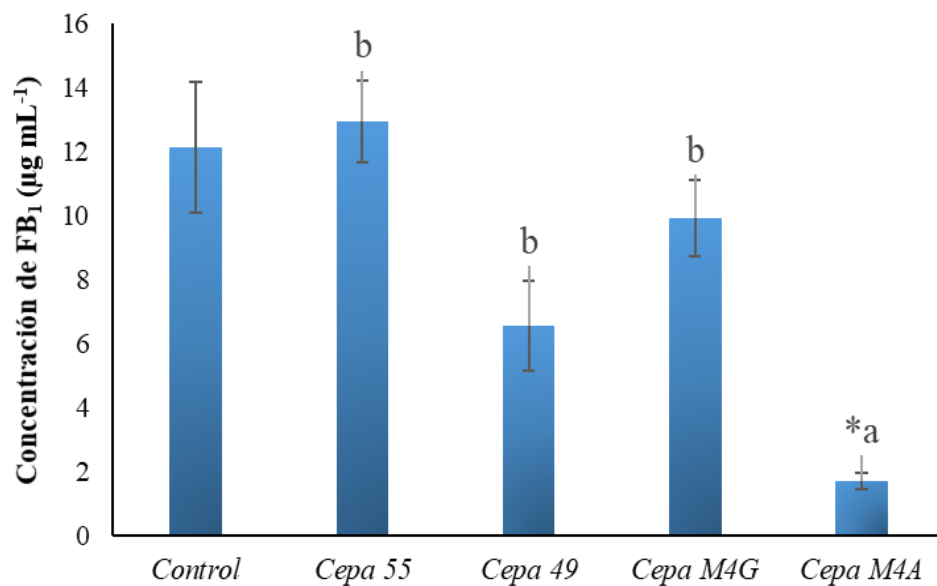


Figura 11: Concentración de la micotoxina FB₁ producida por *F. verticillioides* expuesto a los COV de las diferentes cepas bacterianas. * indica diferencias significativas con respecto al control; letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba ANAVA; Test LSD; $p \leq 0,05$). Las barras indican el EE.

DISCUSIÓN

Los compuestos volátiles juegan un papel importante en la estructuración de la vida en nuestro planeta cumpliendo diversas funciones en sistemas naturales y artificiales. Estos compuestos son producidos por numerosos organismos como plantas, animales, hongos y, por último, pero no menos importante, por bacterias (Schulz & Dickschat, 2007). Las bacterias en su actividad metabólica producen un gran número de compuestos volátiles que pueden tener diversas funciones, y la gran diversidad de los COV los hace una fuente de compuestos naturales nuevos. Particularmente en las bacterias, el perfil de COV se atribuye a su metabolismo específico o a la ruta metabólica que está activa. Dependiendo del medio y las condiciones de crecimiento, el conjunto de volátiles producidos por las bacterias puede variar (Kai y col., 2009). En este estudio, el número de compuestos volátiles producidos por las cepas en agar MRS (21 COV) fue superior al producido en maíz (6 COV), ya que el agar MRS es un medio óptimo para el cultivo de bacterias ácido lácticas proporcionándole los requerimientos nutricionales para su crecimiento y producción de metabolitos primarios y secundarios (Schillinger & Holzapfel, 2003) Es importante destacar, que también varió la proporción de los volátiles emitidos entre ambos sustratos. Por ejemplo, la cepa M4A produjo mayor proporción de diacetilo cuando fue cultivada en agar MRS (32,37 % vs. 7,76 %). Estudios realizados por Bustos y col. (2004) con *Lactobacillus pentosus* (bacteria láctica utilizada en la producción vitivinícola), demostraron que la asimilación de azúcares simples por parte de las bacterias cultivadas en medio MRS fue mayor que las cultivadas en sustrato vegetal, mostrando que, en este medio de cultivo, las bacterias lácticas presentan un mejor desarrollo y un metabolismo más activo. Nuestros resultados acuerdan con lo observado por Küntzel y col. (2016), quienes encontraron que diferentes medios de cultivo estuvieron asociados con diferencias importantes en el número y concentración de los COV emitidos por *Mycobacterium avium*. Estos autores también reportan que algunos COV decrecieron significativamente con el aumento de la densidad bacteriana, así como también la concentración de COV a mayores tiempos de incubación.

Las cepas bacterianas del género *Enterococcus* provenientes de granos de maíz de silo bolsa utilizadas en este estudio produjeron acetoina, diacetilo y ácido acético en mayor proporción, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores. Martino y col.

(2016) analizaron los compuestos volátiles producidos por *Enterococcus faecium*, bacteria capaz de fermentar el citrato, el cual se metaboliza en piruvato y finalmente se deriva en la producción de los compuestos aromáticos diacetilo y acetoína. Asimismo, Nieto-Arribas y col. (2011) reportaron que, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* y *Enterococcus avium*, producían elevadas proporciones de acetoína y diacetilo en productos lácteos.

Uno de los insectos plagas más importante en los silos de almacenaje de granos es *S. zeamais*, por lo que generar estrategias para su control resulta de gran relevancia para asegurar la calidad de los granos. El análisis conductual de *S. zeamais* expuesto a los volátiles producidos por las cepas bacterianas aisladas de silos de almacenaje de granos reveló que los COV bacterianos producidos por algunas cepas ejercen atracción (cepa 49 y 55) mientras que la M4G repelencia y la cepa M4A no produjo preferencia por parte de los insectos. Los resultados de atracción observados por la cepa 55 y 49 podrían deberse a la alta proporción de acetoína producida por estas cepas cuando fueron cultivadas en granos de maíz, lo cual se corrobora por la preferencia observada de estos insectos hacia granos adicionados con este volátil a la concentración más alta evaluada ($40 \mu\text{g L}^{-1}$). Estos resultados son acordes con antecedentes informados por Becher y col. (2012) quienes reportan que *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) es atraída por el volátil acetoína producida por *Saccharomyces cerevisiae*. Del mismo modo, estudios realizados por Lorenzo y col. (1999) confirman que *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) es fuertemente atraído por los diferentes COV bacterianos. Está reportado en la bibliografía que los volátiles bacterianos actúan como semioquímicos afectando el comportamiento de los insectos (Davis y col., 2013). Si bien la proporción de acetoína fue alta en las cepas M4G y M4A, la menor área de este compuesto observado en los cromatogramas podría explicar la falta de atracción.

El análisis de los compuestos individuales indica que el ácido acético es un compuesto fuertemente repelente para los insectos y dependiente de la concentración, el cual estuvo presente en iguales concentraciones en las cepas 55, M4A y M4G cuando éstas fueron cultivadas en maíz. Además, en la cepa M4G se detectó el compuesto 3-metil-1-butanol, reportado como un fuerte repelente (Zunino y col., 2015). La producción de estos 2 volátiles repelentes para *S. zeamais* (ácido acético + 3-metil-1-butanol) podría explicar que

solo esta cepa ejerza repelencia. También, Hwang y col. (1980) encontraron que el ácido acético mostraba un efecto repelente en mosquitos *Culex tarsalis* y *Culex pipiens quinquefasciatus*, afectando además el sitio de ovoposición de dichas especies. Contrariamente cuando *Drosophila melanogaster* es expuesta a ácido acético, se siente atraída por este volátil (Joshep y col., 2009; Ai y col., 2010).

El desarrollo del hongo fitopatógeno *F. verticillioides* estuvo afectado por los volátiles emitidos de tres de las cepas bacterianas estudiadas (55, 49 y M4A). Sin embargo, los volátiles producidos por la cepa M4A fueron los que inhibieron en mayor medida el crecimiento fúngico, afectando también la fase Lag y la producción de micotoxina. Nuestros hallazgos involucran el efecto de los compuestos en la fase de vapor, lo cual tiene importancia debido a que los COV tienen efecto más allá de su punto de emisión. Estudios realizados en *Fusarium oxysporum* expuesto a COV bacterianos de *Serratia* spp. demostraron que dichos volátiles presentan una acción antagónica en la respuesta del hongo (Minerdi y col., 2009). Asimismo, Wheatley (2002), comprobó que la exposición de los hongos *Phanerochaete magnoliae* y *Trichoderma viride* a COV bacterianos producidos por *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas fluorescens* puede tener efectos que incluyen tanto la estimulación como la inhibición del crecimiento, en un 40% y un 60%, respectivamente. Por su parte, Fernando y col. (2005) reportaron que los volátiles pueden desempeñar un papel importante en la inhibición de la actividad esclerotial, limitando la producción de ascosporas y reduciendo los niveles de infección. Además, la reducción en la producción de la FB₁ es de gran relevancia debido a que éstas son causantes de graves enfermedades. Estudios experimentales han comprobado que la fumonisina genera lesiones renales en la mayoría de los modelos animales de estudio, defectos cardíacos en babuinos y cerdos, edema pulmonar e hipertrofia media en arterias pulmonares de cerdo, cáncer hepático y renal en ratas alimentadas crónicamente con FB₁. En cuanto a salud humana, existen evidencias que las asocian con el aumento de la incidencia de cáncer de esófago en Sudáfrica, China, NE de Italia y SE de Estados Unidos (Bullerman, 2007).

El volátil en mayor proporción producido por la cepa M4A cuando fue cultivada en agar MRS es el diacetilo, por lo que éste sería el responsable de la alta inhibición. Además, este compuesto presenta actividad antimicrobiana pudiendo así afectar el crecimiento y producción de micotoxinas del hongo (Jay, 1982; Kang & Fung, 1999). Ensayos recientes

en nuestro laboratorio han demostrado que el uso del compuesto diacetilo a bajas concentraciones ($0,1 \text{ mM L}^{-1}$) presenta un alto efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. verticillioides* (datos no publicados). El bajo efecto inhibitorio que presentan la cepa 55 y 49 podría deberse a la baja proporción de diacetilo producido por estas bacterias cuando fueron cultivadas en agar MRS, mientras que la cepa M4G emitió la más baja proporción del volátil. Esta baja proporción de diacetilo producida por la cepa M4G, podría ser suficiente para afectar la fase Lag de crecimiento. El efecto antimicrobiano del diacetilo fue evaluado en trabajos realizados por diferentes autores, aunque no existen datos de su efecto sobre *F. verticillioides*. En este sentido, O'Bryen y col. (2009) comprobaron que el compuesto diacetilo producía inhibición en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Así también, estudios realizados en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* demostraron que el diacetilo inhibía el crecimiento de estas bacterias (Kang & Fung, 1999). En investigaciones realizadas por Aunbjerg y col. (2015), se identificó al diacetilo como el principal volátil producido por *Lactobacillus paracasei* mostrando actividad antifúngica hacia dos cepas de *Penicillium* spp. Por otro lado, la cepa M4A produjo en baja proporción el volátil 2-Nonanona el cual está reportado por Zheng y col. (2013) como inhibidor del desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

En cuanto al volátil acetoína, presente en alta proporción en los ensayos realizados, trabajos previos demostraron que no presenta efecto inhibitorio y en algunos hongos puede incluso promover el crecimiento. Estudios publicados por Gotor-Vila y col. (2017) sobre el efecto inhibitorio generado por los COV (entre ellos acetoína) producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* sobre los hongos *Manilinia laxa*, *Manilinia fructicola* y *Botrytis cinerea*, demostraron que el compuesto acetoína no presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las distintas especies estudiadas. Además, Aunbjerg y col. (2015) reportaron estudios realizados con *Lactobacillus paracasei* donde la producción de acetoína por parte de esta cepa no presentó actividad antifúngica frente a dos cepas de *Penicillium* spp.

En comparación con los compuestos solubles, los compuestos volátiles pueden difundir más rápido a través de distancias más largas lo cual facilita la interacción con otros organismos. Por lo tanto, tienen un rol importante en la comunicación y competencia con otros organismos. Las razones por las cuales los microorganismos producen COV no están completamente dilucidadas, pero al menos en este trabajo se observaron 2 funciones

principales de los COV producidos por bacterias presentes en los silos de almacenaje de granos: a) la competencia mediante la acción antimicrobiana, que provee una ventaja por supresión del otro competidor, y b) efectos conductuales de atracción o repelencia. Este trabajo contribuye al entendimiento de las interacciones, mediadas por los COV, que pueden ocurrir en el silo de almacenaje de granos, las cuales pueden ser una herramienta más segura para la conservación de granos almacenados y el manejo de plagas.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha podido determinar el efecto que inducen los COV producidos por las bacterias epifitas de los granos de maíz almacenados en silo bolsa. Los COV producidos por las cepas 55, 49 y M4G presentaron actividad semioquímica sobre *S. zeamais*. Los insectos demostraron atracción al volátil acetoína y los COV emitidos por las cepas 55 y 49, mientras que mostraron repelencia al ácido acético y los COV emitidos por la cepa M4G.

Los COV emitidos por las cepas 55, 49 y M4A presentaron actividad antifúngica afectando el crecimiento de *F. verticillioides*. Asimismo, la cepa que produjo mayor proporción del compuesto diacetilo (M4A) ejerció una mayor inhibición del crecimiento fúngico reduciendo también la producción de la micotoxina FB₁.

BIBLIOGRAFÍA

- Ai, M., Min, S., Grosjean, Y., Leblanc, C., Bell, R., Benton, R., & Suh, G. S. (2010). Acid sensing by the *Drosophila* olfactory system. *Nature*, 468, 691.
- Aunbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., Skov, T., & Knøchel, S. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International journal of food microbiology*, 194, 46.
- Becher, P. G., Flick, G., Rozpędowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., Larsson, M. C., Hansson, B. S., Piškur, J., Witzgall, P., & Bengtsson, M. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26, 822.
- Bianchini, A., & Bullerman, L. B. (2014). Mycotoxin: Classification. En Batt, C. A. & Tortorello, M. L. (eds.). *Encyclopedia of food microbiology* (2th ed.) Volume 2. USA: Academic press.
- Bitas, V., Kim, H. S., Bennett, J. W., & Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular plant-microbe interactions*, 26, 835.
- Botta, G., & Gonzalez, M. (2012). Enfermedades fúngicas, bacterianas y abióticas del maíz. En Eyhéabide, G. H. *Bases para el manejo de cultivos de maíz*. Bs As, Argentina: Ediciones INTA.
- Boyer, S., Zhang, H., & Lempérière, G. (2012). A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of entomological research*, 102, 213.
- Bullerman, L. B. (2007). Fusaria and toxigenic molds other than aspergilli and penicillia. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition* (pp. 563-578). American Society of Microbiology.
- Bustos, G., De la Torre, N., Martínez, M., Casares, A., & Domarco, Y. (2004). Evaluation of hemicellulosic sugars from vine-trimming wastes and vinification lees as a nutritional medium for lactic acid production by *Lactobacillus pentosus*. *CYTA-Journal of Food*, 4, 283.

- Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Additives and Contaminants*, 27, 651.
- Cordero, P., Príncipe, A., Jofré, E., Mori, G., & Fischer, S. (2014). Inhibition of the phytopathogenic fungus *Fusarium proliferatum* by volatile compounds produced by *Pseudomonas*. *Archives of Microbiology*, 196, 803.
- Correa, A. S., Tolledo, J., Pereira, E. J. G., & Guedes, R. N. C. (2011). Bidirectional selection for body mass and correlated response of pyrethroid resistance and fitness in *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology*, 135, 285.
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., & Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of chemical ecology*, 39, 840.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarine, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2013). InfoStat, versión 2013. Grupo InfoStat FCA, UNC.
- Farag, M. A., Song, G. C., Par, Y. S., Audrain, B., Lee, S., Ghigo, J. M., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2017). Biological and chemical strategies for exploring inter- and intra-kingdom communication mediated via bacterial volatile signals. *Nature Protocols*, 12, 1359.
- Fernando, W. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 955.
- Ferreira-Castro, F. L., Potenza, M. R., Rocha, L. O., & Correa, B. (2012). Interaction between toxigenic fungi and weevils in corn grain samples. *Food Control*, 26, 594.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27.
- Gong, A. D., Li, H. P., Shen, L., Zhang, J. B., Wu, A. B., He, W. J., Yuan, Q. S., He, J. D., & Liao, Y. C. (2015). The *Shewanella algae* strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against *Aspergillus* pathogens and aflatoxins. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1091.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus*

amyloliquefaciens CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219.

- Griffin, D. H. (1996). *Fungal Physiology* (2^o ed.). New York, USA: John Wiley & Sons.
- Guerrero, A., Malo, E. A., Coll, J., & Quero, C. (2014). Semiochemical and natural product-based approaches to control *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 87(2), 231.
- Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., & Zygadlo, J. A. (2015). Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 62, 74.
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Massuh, Y., Pizzolitto, R. P., Dambolena, J. S., Gañan, N. A., & Zygadlo, J. A. (2014). Fumigant toxicity from five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Agriscientia*, 31, 35.
- Hwang, Y. S., Kramer, W. L., & Mulla, M. S. (1980). Oviposition attractants and repellents of mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology*, 6, 71.
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied Environmental Microbiology*, 44, 525.
- Joseph, R. M., Devineni, A. V., King, I. F., & Heberlein, U. (2009). Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 11352.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, 187, 351.
- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 1001.
- Kang, D. H., & Fung, D. Y. (1999). Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *Journal of Food Protection*, 62, 975.
- Küntzel, A., Fischer, S., Bergmann, A., Oertel, P., Steffens, M., Trefz, P., Miekisch, W., Schubert, J. K., Reinhold, P., & Köhler, H. (2016). Effects of biological and

methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Journal of Breath Research*, 10, 037103.

- Leroy, P. D., Sabri, A., Verheggen, F. J., Francis, F., Thonart, P., & Haubruge, E. (2011). The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects. *Chemoecology*, 21, 113.
- Lezcano, E. (2012). *Alimentos Argentinos* 54, 18.
- Lorenzo, M. G., Manrique, G., Pires, H. H. R., de Brito Sánchez, M. G., Diotaiuti, L., & Lazzari, C. R. (1999). Yeast culture volatiles as attractants for *Rhodnius prolixus*: electroantennogram responses and captures in yeast-baited traps. *Acta Tropical*, 72, 119.
- Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*, 28, 1359.
- Mann, R. S., Kaufman, P. E., & Butler, J. F. (2010). Evaluation of semiochemical toxicity to houseflies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, 66, 816.
- Martino, G. P., Quintana, I. M., Espariz, M., Blancato, V. S., & Magni, C. (2016). Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: Genetic characterization of type I citrate gene cluster. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 27.
- Minerdi, D., Bossi, S., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2009). Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. *Environmental Microbiology*, 11, 844.
- Kanchiswamy, N. C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, 20, 206.
- Nesci, A., Montemarani, A., Passone, M. A., & Etcheverry, M. (2011). Insecticidal activity of synthetic antioxidants, natural phytochemicals, and essential oils against an *Aspergillus* section Flavi vector (*Oryzaephilus surinamensis* L.) in microcosm. *Journal of Pest Science*, 84, 107.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., & Palop, L. (2011). *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, 28, 891.

- O'Bryan, C. A., Sostrin, M. L., Nannapaneni, R., Ricke, S. C., Crandall, P. G., & Johnson, M. G. (2009). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Scott A to nisin and diacetyl after starvation in sodium phosphate buffered saline. *Journal of Food Science*, 74, M493.
- Papaleo, M. C., Romoli, R., Bartolucci, G., Maida, I., Perrin, E., Fondi, V., Orlandini, V., Mengoni, A., Emiliani, G., Tutino, M. L., Parrilli, E., de Pascale, D., Michaud, L., Lo Giudice, A. & Fani R. (2013). Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. *New Biotechnology*, 3, 824.
- Peschiutta, M. L., Arena, J. S., Ramirez Sanchez, R., Gomez Torres, E., Pizzolitto, R. P., Merlo, C., Zunino, M. P., Omarini, A. B., Dambolena, J. S., & Zygadlo, J. A. (2016). Effectiveness of Mexican oregano essential oil from the Dominican Republic (*Lippia graveolens*) against maize pests (*Sitophilus zeamais* and *Fusarium verticillioides*). *Agriscientia*, 33, 89.
- Pizzolitto, R. P., Barberis, C. L., Dambolena, J. S., Herrera, J. M., Zunino, M. P., Magnoli, C. E., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A., & Dalcerro, A. M. (2015). Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *Journal of Chemistry*, 1-7.
- Phillips, T. W., Jiang, X. L., Burkholder, W. E., Phillips, J. K., & Tran, H. Q. (1993). Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (curculionidae) and *Tribolium castaneum* (tenebrionidae). *Journal of Chemical Ecology*, 19, 723.
- Pieper, R., Hackl, W., Korn, U., Zeyner, A., Souffrant, W. B., & Pieper, B. (2011). Effect of ensiling triticale, barley and wheat grains at different moisture content and addition of *Lactobacillus plantarum* (DSMZ 8866 and 8862) on fermentation characteristics and nutrient digestibility in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 164, 96.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Macías-Rodríguez, L., & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 46.

- Romoli, R., Papaleo, M. C., De Pascale, D., Tutino, M. L., Michaud, L., LoGiudice, A., Fani, R., & Bartolucci, G. (2014). GC–MS volatolomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. TB41. *Metabolomics*, *10*, 42.
- Sannino, F., Parrilli, E., Apuzzo, G. A., de Pascale, D., Tedesco, P., Maida, I., Perrin E, Fondi M, Fani R, Marino G, & Tutino, M. L. (2017). *Pseudoalteromonas haloplanktis* produces methylamine, a volatile compound active against *Burkholderia cepacia* complex strains. *New Biotechnology*, *35*, 13.
- Schiliinger, U., & Holzapel, W. H. (2003). Culture media for lactic acid bacteria. En Corry, E.L, Curtis, G.D & R. M. Baird (Eds.). Handbook of Culture Media for Food Microbiology. Elsevier Science. pp.: 127-140.
- Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, *24*, 814.
- Shephard, G. S., Marasas, W. F., Leggott, N. L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H., & Safavi, N. (2000). Natural occurrence of Fumonisin in corn from Iran. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 1860.
- Song, G., & Ryu, C. M. (2013). Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 9803.
- Tefera, T., Mugo, S., Likhayo, P., & Beyene, Y. (2011). Resistance of three-way cross experimental maize hybrids to post-harvest insect pests, the larger grain borer (*Prostephanus truncatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *International Journal of Tropical Insect Science*, *31*, 3.
- Tomberlin, J. K., Crippen, T. L., Tarone, A. M., Singh, B., Adams, K., Rezenom, Y. H., Benbowd M.E., Flores M., Longnecker M., Pechal J. L., Russell D. H., Beier R. C., & Wood, T. K. (2012). Interkingdom responses of flies to bacteria mediated by fly physiology and bacterial quorum sensing. *Animal Behaviour*, *84*, 1449.
- Usseglio, V. L., Dambolena, J. S., Merlo, C., Peschiutta, M. L., & Zunino, M. P. (2018). Insect-corn kernel interaction: Chemical signaling of the grain and host recognition by *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, *79*, 66.

- Wang, Y., Li, Y., Yang, J., Ruan, J., & Sun, C. (2016). Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 1-16.
- Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 357.
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65, 200.
- Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A., & Dambolena, J. S. (2015). Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7743.

FIGURAS ANEXO

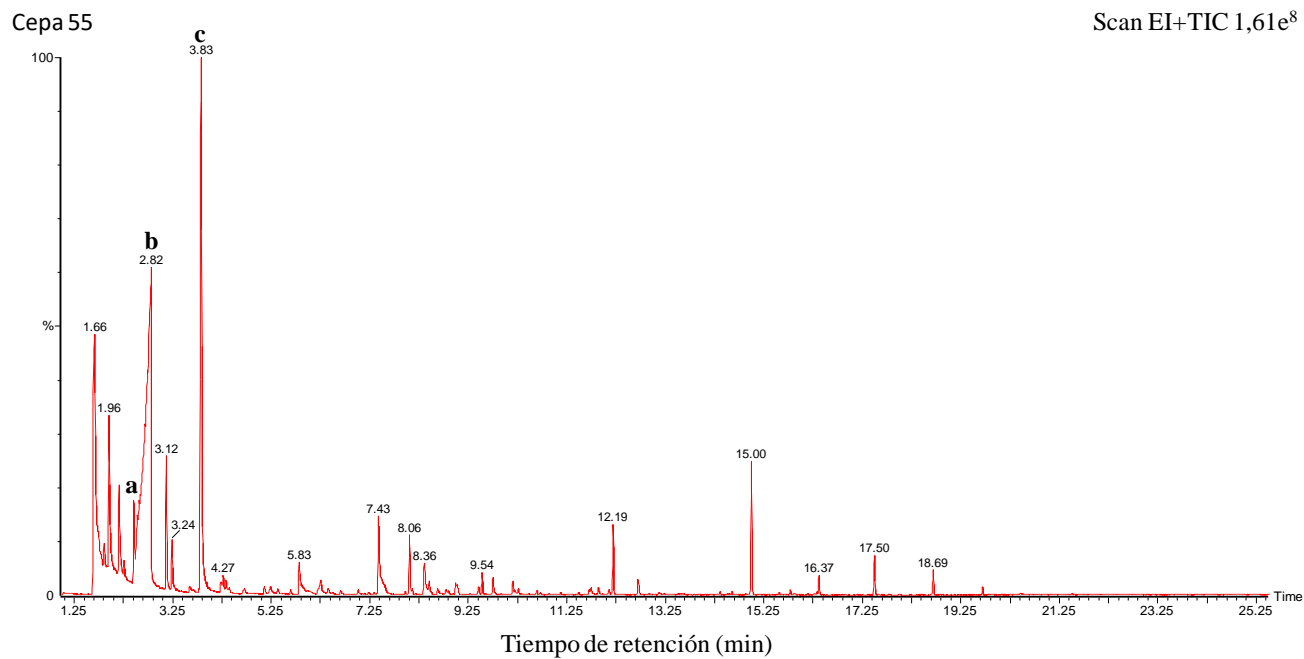


Figura 12: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa 55 en agar MRS. (a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

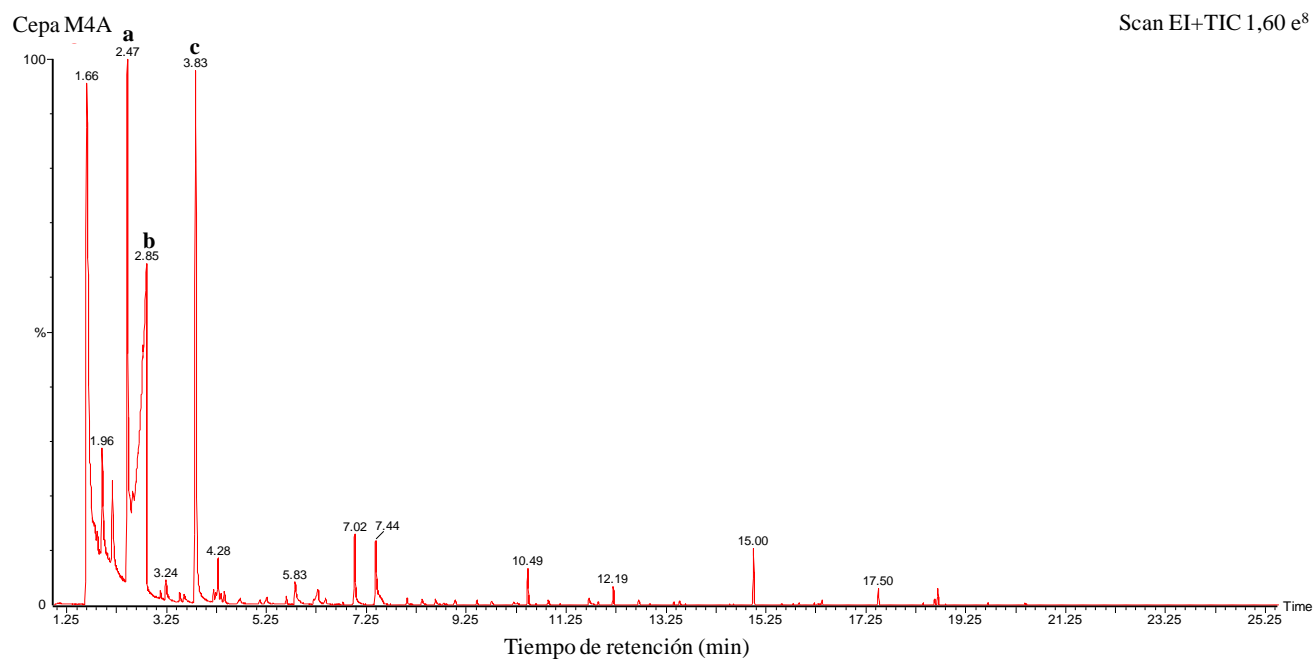


Figura 13: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa M4A en agar MRS. (a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

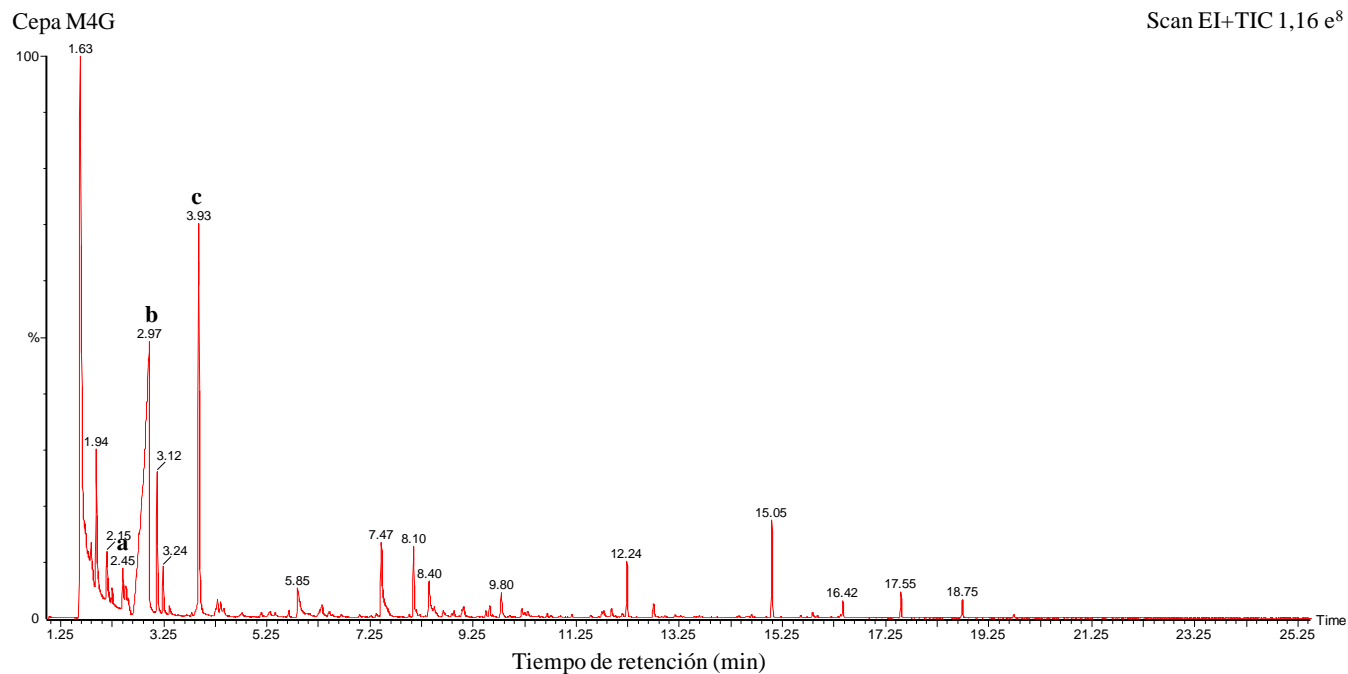


Figura 14: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa M4G en agar MRS. (a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

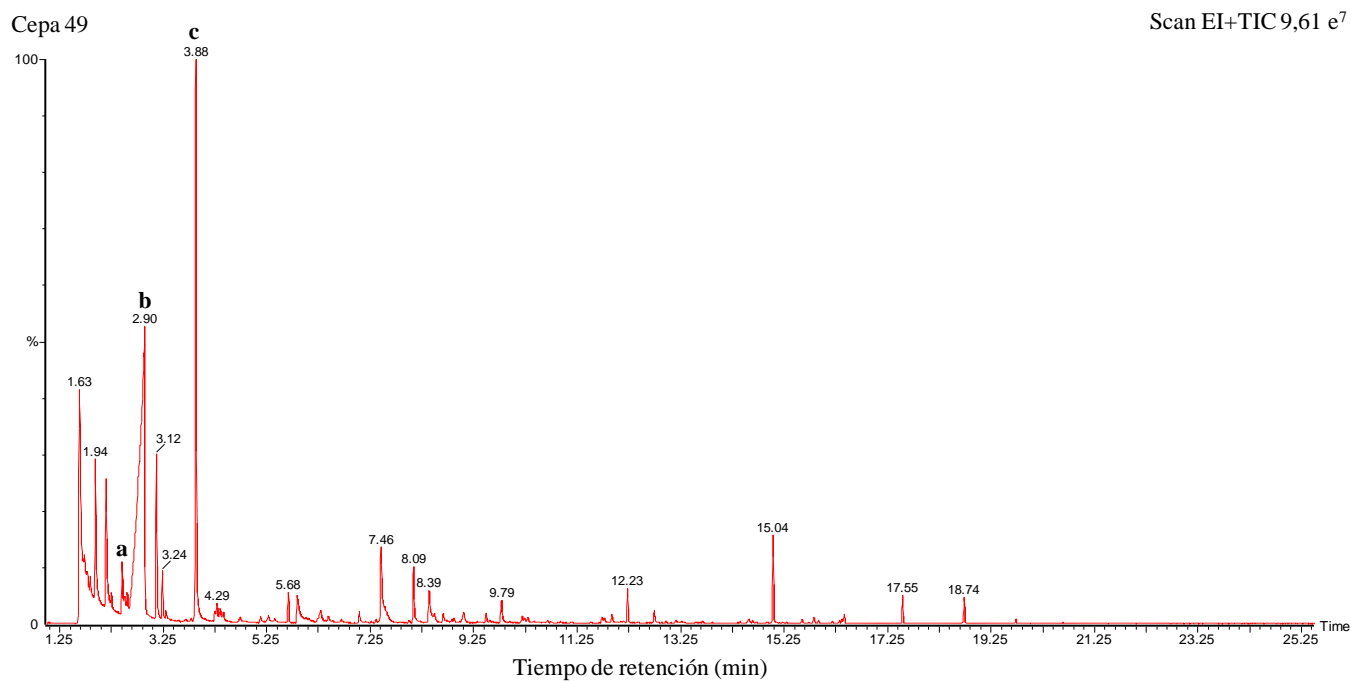


Figura 15: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa 49 en agar MRS. (a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

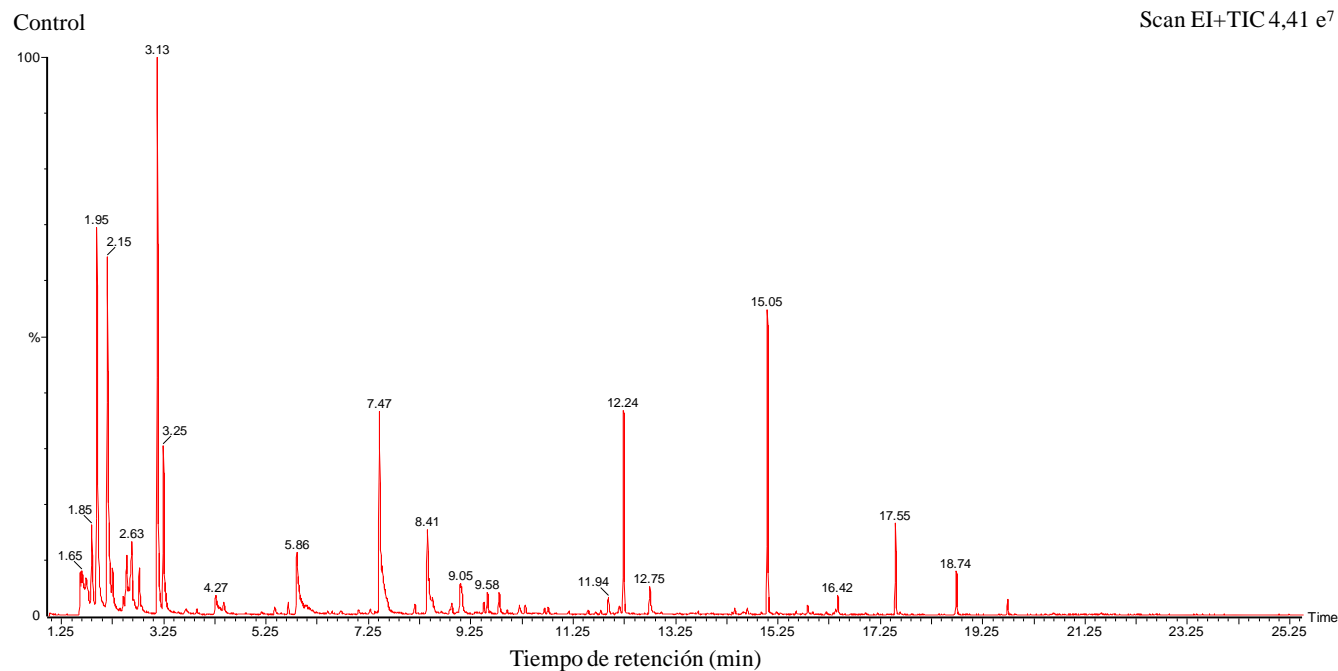


Figura 16: Cromatograma correspondiente a los COV emitidos por el control agar MRS.

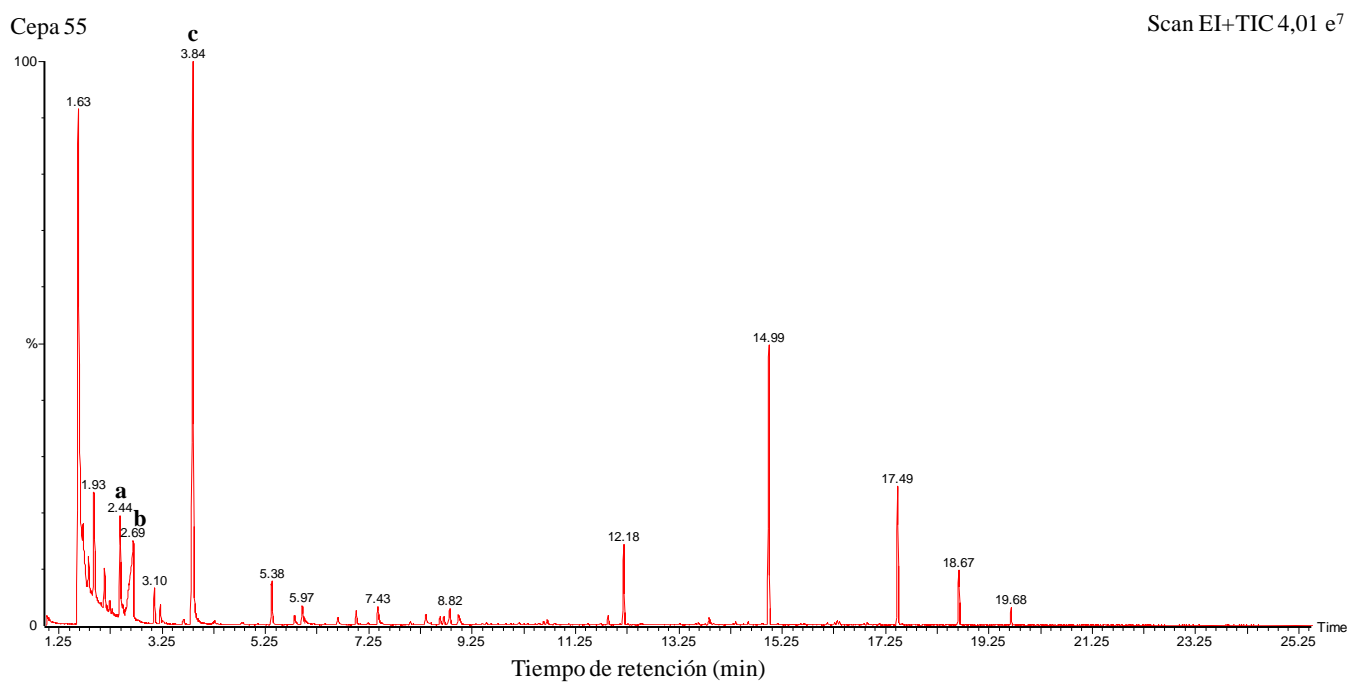


Figura 17: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa 55 en granos de maíz.

(a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

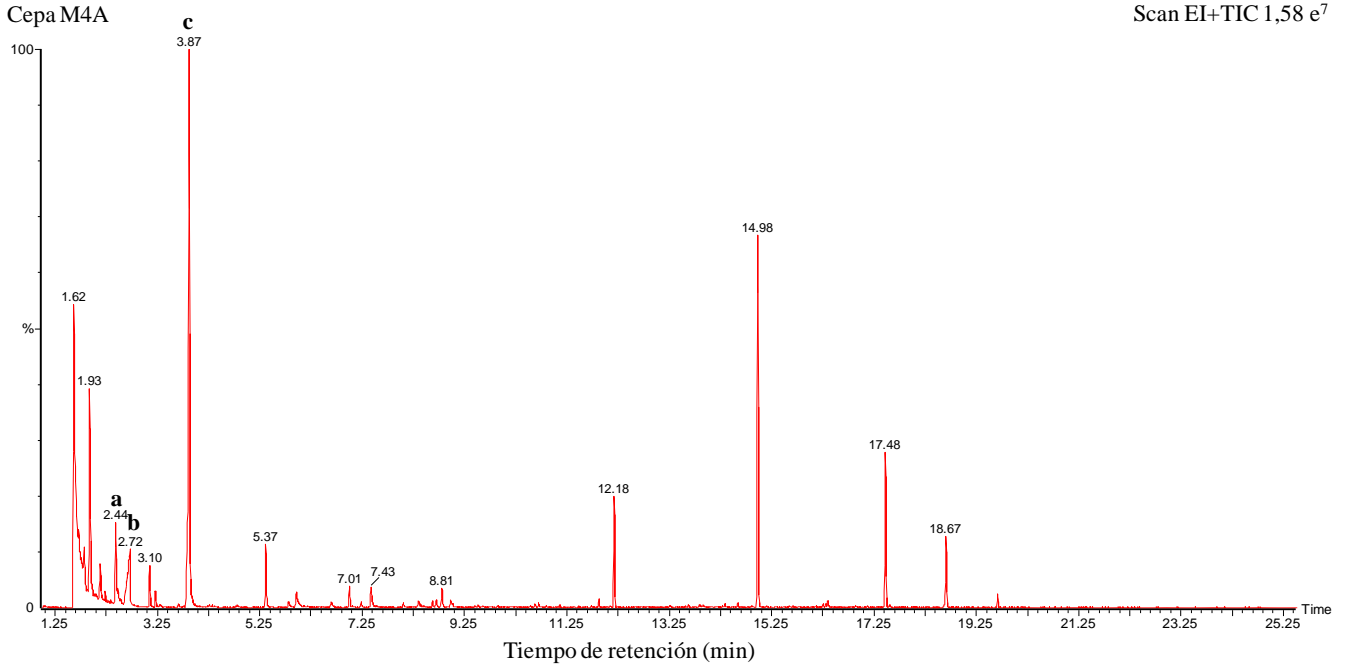


Figura 18: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa M4A en granos de maíz. (a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

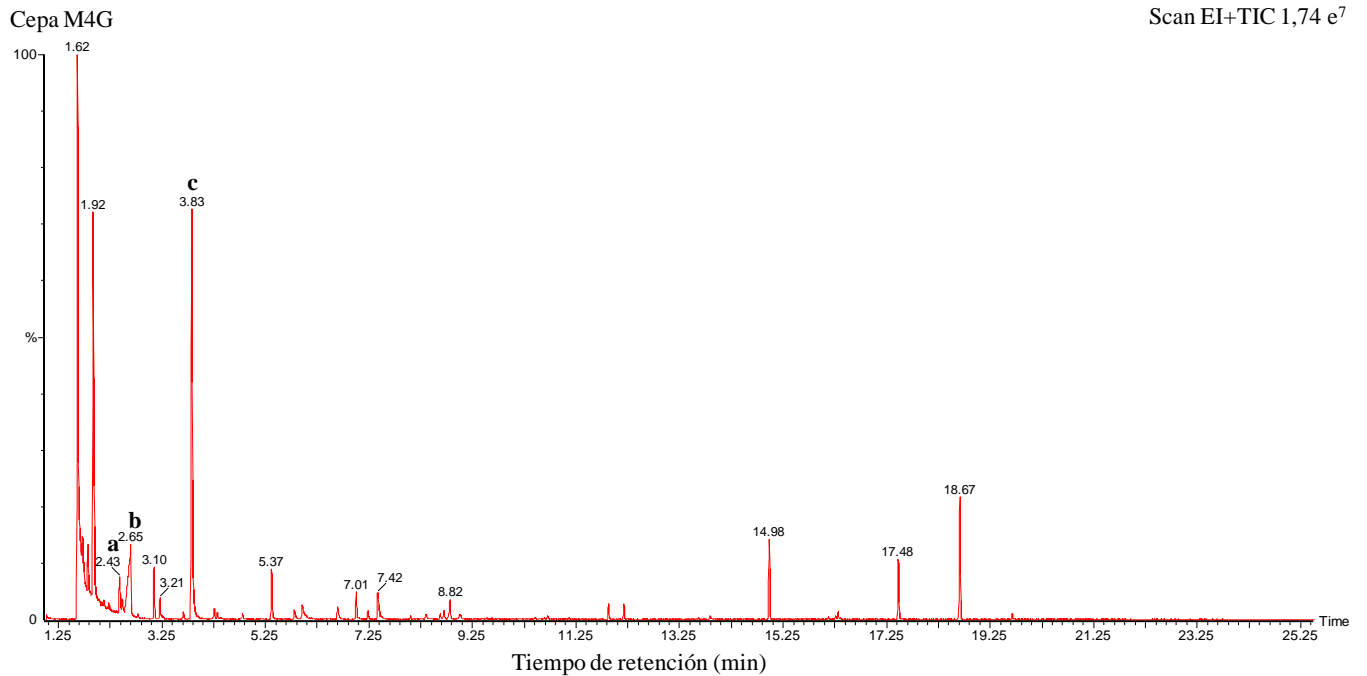


Figura 19: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa M4G en granos de maíz. (a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

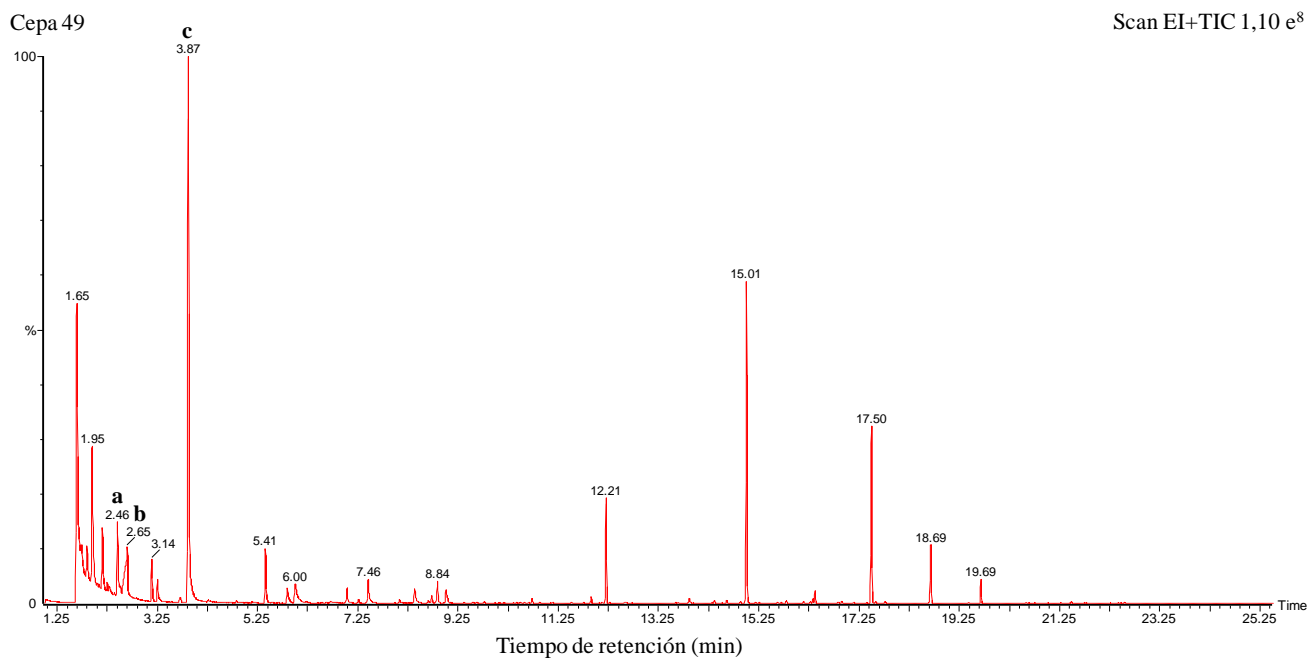


Figura 20: Cromatograma correspondiente a los COV producidos por la cepa 49 en granos de maíz.
(a) diacetilo; (b) ácido acético; (c) acetoína.

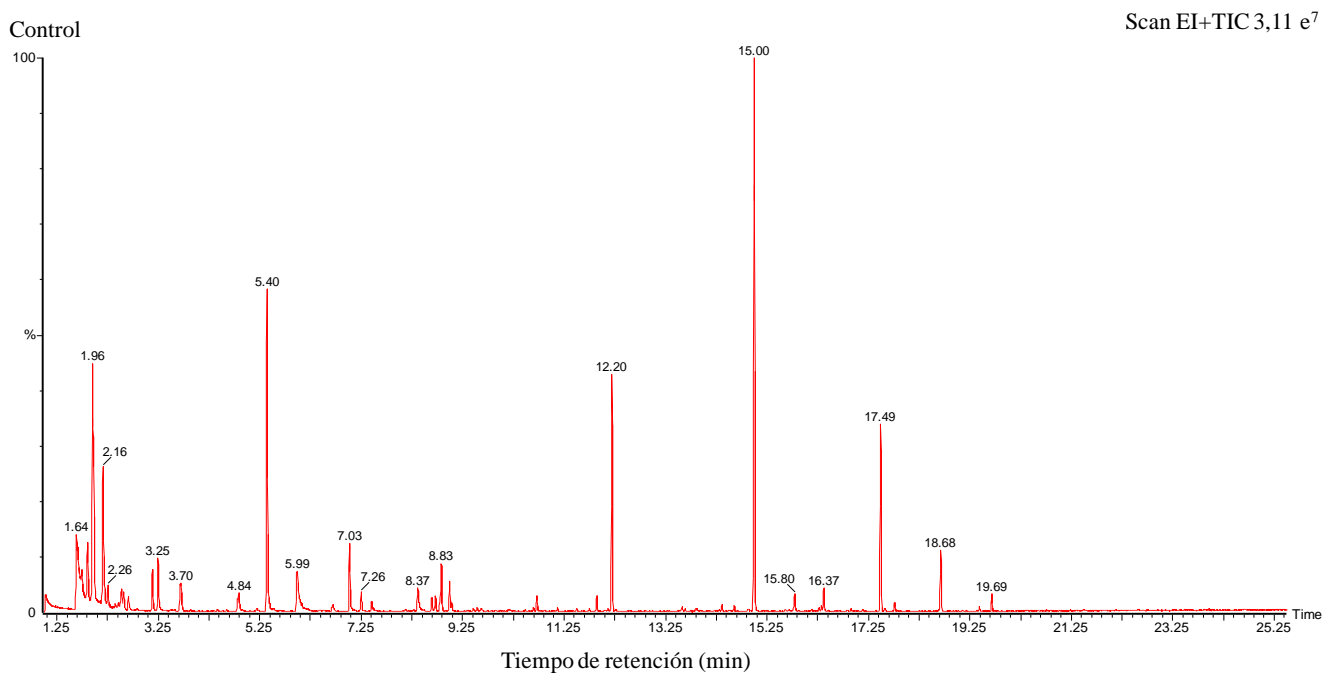


Figura 21: Cromatograma correspondiente a los COV emitidos por el control granos de maíz.