

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE
ACEITES ESENCIALES CONTRA *Clavibacter michiganensis* subespecie
*michiganensis***

**[EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY *IN VITRO* OF ESSENTIAL
OILS VS *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*]**

**J. Borboa-Flores¹; E. O. Rueda-Puente^{1*}; E. Acedo-Félix²; J. F. Ponce³;
M. Cruz-Villegas³, J. L. García-Hernández⁴ y M. M. Ortega-Nieblas⁵**

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos Universidad de Sonora. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro CP 83000, Hermosillo, Sonora, México. jborboa@guayacan.uson.mx, erueda04@santana.uson.mx; ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km. 06, 83000 Hermosillo, Sonora. evelia@ciad.mx; ³Instituto de Ciencias Agrícolas Carretera a Delta s/n 21705 Ejido Nuevo León, Baja California, México. jfponce8@hotmail.com; mcruz1410@hotmail.com; ⁴Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, CP 23090, La Paz, B.C.S., México. jlgarcia04@cibnor.mx; ⁵ Departamento de Investigación Científica y Tecnológica Universidad de Sonora. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro CP 83000, Hermosillo, Sonora, México. mortega@guayacan.uson.mx
Email: erueda04@santana.uson.mx Teléfono y fax (641) 324-12-42.

*Corresponding author

RESUMEN

Las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleados en el combate de diferentes enfermedades en la producción de hortalizas. Con la finalidad de buscar alternativas naturales para el control de la bacteria *Cmm* se evaluó en pruebas preliminares la actividad antibacteriana *in vitro* de 19 aceites esenciales, de los cuales fueron seleccionados 6 por su actividad bactericida. La técnica utilizada para el análisis de la actividad antimicrobiana fue la de difusión en agar, utilizando discos de papel filtro estériles embebidos con el aceite esencial, diluidos 1:1, 1:5 y 1:10 (v/v), en medio de cultivo específico (NBY) previamente inoculado con la cepa de estudio. El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los aceites evaluados, entre las diferentes concentraciones y en la interacción entre ambos parámetros en la inhibición del crecimiento de *Cmm*. Los aceites esenciales que presentaron actividad antimicrobiana fueron las diferentes presentaciones de *Lippia palmeri*, *Thymus vulgaris* y *Cinnamomum zeylanicum*. El tratamiento con *Lippia palmeri* silvestre inhibió significativamente el crecimiento de *Cmm* en diferentes dosis evaluadas. Los aceites de mayor actividad antibacteriana, representan una alternativa para el control de la bacteria *Cmm*.

Palabras clave: biobactericida; compuestos naturales; cancro bacteriano; biocontrol.

SUMMARY

Plants generate compounds with antimicrobial properties that can be used to control different horticultural diseases. In order to look for natural alternatives for the control of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*, was screened antibacterial activity of 19 essential oils of which 6 were selected by their bactericidal activity. Oregon *Lippia palmeri* oil was obtained by steam trawling of two plants obtained from their natural habitats and the third was cultivated in the state of Sonora, Mexico. Antibacterial activity was elaborated by disc diffusion method at three different dilutions (1:1, 1:5 and 1:10). The variance analysis revealed significant difference ($p < 0.05$) between the types of oils, among different concentrations as well as interaction between these two parameters in the growth inhibition of *Cmm*. The essential oils showed the best antimicrobial activity were the different presentations of *Lippia palmeri*, *Thymus vulgaris* y *Cinnamomum zeylanicum*. The treatment of *Lippia palmeri* was better to inhibit the growth of *Cmm* in all doses evaluated. The oils that displayed antibacterial activity evaluated represent an alternative for the control of bacteria *Cmm*.

Key words: biobactericide; natural compounds; Canker bacterial; biocontrol.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido capaces de protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos, produciendo grandes cantidades de metabolitos secundarios, antes que el hombre jugara un papel activo en su protección, mediante sustancias químicas con actividad antimicrobiana (Wilson *et al.*, 1999; Dixon, 2001). En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos orgánicos biológicamente activos, extraídos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar a microorganismos patógenos por sí mismas, esto debido principalmente, a la resistencia que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos (Daferera *et al.*, 2003). Entre los metabolitos secundarios importantes relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

Los mecanismos de acción de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos, los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana, a través de los compuestos lipofílicos; se ha postulado que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN, mientras que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la exclusión competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999). Otro estudio indica que los componentes de los aceites esenciales interfieren con las funciones de permeabilidad de membrana celular (Lambert *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales también llamados compuestos volátiles, son líquidos de consistencia aceitosa, aromáticos, obtenidos de los materiales vegetal (flores, los brotes, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutas y raíces). Pueden ser obtenidos por varios métodos, pero el más utilizado en la producción comercial es por destilación con vapor. Se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes en el mercado de las fragancias (Van y Leijten, 1999). Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los géneros *Origanum* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Cinnamomum verum* (canela), entre otros, tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas (Aballa y Rosen, 2001).

Las enfermedades bacterianas son de gran importancia económica debido a las pérdidas económicas que

implica la disminución ó pérdida en la producción agrícola, ocasionada muchas veces por una mala implementación de medidas de control; asimismo, son considerables los daños poscosecha por patógenos bacterianos en productos vegetales (Sigeo, 2005). La bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*), ha causado pérdidas serias a las cosechas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en invernadero y en campo cultivados a cielo abierto, matando a las plantas jóvenes o reduciendo su producción comercial. El cancro bacteriano se ha dispersado en el mundo y la reducción en la producción se puede asociar a la pérdida directa de la planta, números reducido y de menor tamaño del fruto. La infección primaria es transmitida por semilla contaminada, posteriormente la bacteria penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja (Gleason *et al.*, 1993; Ramírez y Sáinz, 2006).

Estudios realizados en Francia han demostrado pérdida de rendimiento del 20-30% en las cosechas de tomate, debido a *Cmm* (Rat *et al.*, 1991). Durante las décadas de los 30s, 60s, 80s y 90s en el estado de Michigan (EE,UU), causó pérdidas considerables que oscilan entre un 10 y un 80% (Gleason *et al.*, 1993). En la Republica Mexicana específicamente en el estado de Sinaloa, México, se detectó e identificó el cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*) (Ramírez y Sáinz, 2006); este agente fue detectado específicamente en forma alarmante en al Valle de Culiacán de 1994 a 1996 en campo abierto, ocasionando daños del 1 al 40 % de incidencia; desde que apareció en el estado de Sinaloa, se ha presentado con diversos grados de incidencia y severidad (Ramírez y Sáinz, 2006). En la temporada 2006-2007, en el Valle de Culiacán, se presentó en aproximadamente 180 hectáreas bajo invernaderos de producción, que introdujeron injertos procedentes del estado de Michoacán. En invernaderos, la enfermedad es particularmente más severa debido a condiciones de mayor humedad relativa y más baja intensidad luminosa (Ramírez y Sáinz, 2006).

Clavibacter michiganensis subespecie *michiganensis*, genera la enfermedad denominada “ojo de pájaro” o “cancro bacteriano del tomate”; es una enfermedad que causa la muerte prematura de la planta y severas pérdidas en el rendimiento, presentándose en otras solanáceas, pero solamente en el tomate representa importancia económica (Nazari *et al.*, 2007). Es considerada la enfermedad bacteriana más importante del tomate ya que provoca graves pérdidas tanto en invernadero como en campo con importantes reducciones en el rendimiento del cultivo (De León *et al.*, 2007). Esta enfermedad se diseminó rápidamente y se estableció en las principales áreas hortícolas de exportación de nuestro país, Sinaloa, Jalisco, Baja California Sur y Baja California Norte. En el ciclo

agrícola 2006-2007 el cancro bacteriano se ha presentado en diferentes híbridos comerciales de tomate injertados en el patrón conocido como Multifort (García *et al.*, 2007). En el estado de Sonora, México, fue detectada con incidencias de 0.11 % en sistemas de producción bajo invernadero, y con 0.27 % en sistema de producción de casa sombra. De igual forma fue detectada en semilla por técnicas de aislamiento en medios de cultivo y ELISA, así como por la reacción en cadena de la polimerasa (Borboa *et al.*, 2009).

Se conocen varias formas para disminuir el daño de la enfermedad, siendo la primera y más importante, el uso de semilla sana, libre de contaminación con la bacteria *Cmm*. En caso de no estar seguros de la calidad fitosanitaria de la semilla, se puede recurrir a la desinfección de ésta con hipoclorito de sodio al 1% (lejía) por 20 a 25 minutos, o tratamientos con agua caliente a 56° C por treinta minutos (Thyr *et al.*, 1973; Dhanvantari, 1989; Sandoval, 2004)

En cuanto al control químico, se puede recurrir a aplicaciones preventivas de productos cúpricos como oxiclورو de cobre, óxido de cobre o hidróxido de cobre. Una vez que el problema está presente, estas ayudaran a reducir la velocidad de diseminación de la enfermedad (Sandoval., 2004). El uso de los compuestos de cobre, que son ampliamente utilizados en plantas para el control de enfermedades bacterianas, ha sido limitado en los países de la unión europea por la regla 473/2002, debido a su impacto en el ambiente.

El control de enfermedades bacterianas utilizando antibióticos, se ha vuelto difícil por los elevados costos de la mayoría de los antibióticos, y a su escasa disponibilidad en el mercado. Además, el uso de antibióticos en la protección de las hortalizas es limitado, debido a la transferencia potencial de genes resistentes a las otras bacterias patógenas para animales y humanos (Iacobellis *et al.*, 2005).

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos sanos y libres de productos químicos, seguros para la salud, y que sólo contengan ingredientes naturales (Ponce *et al.*, 2004). La utilización de aceites esenciales obtenidos de plantas con propiedades bactericidas representa una nueva alternativa para el control de bacterias fitopatógenas, en el manejo integrado del cultivo del tomate, por menor impacto sobre el ambiente, los alimentos y la salud. El objetivo del estudio consistió en evaluar la actividad antibacteriana “*in vitro*” de diferentes aceites esenciales contra la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, responsable

de la enfermedad conocida como marchitez bacteriana del tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de la actividad antibacteriana de 19 aceites esenciales se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo CIAD en la ciudad de Hermosillo, Sonora mediante pruebas preliminares *in vitro* bajo condiciones controladas de temperatura a 28 °C y humedad de 70 %. Las diferentes plantas de las cuales se evaluaron sus aceite fueron: Árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), Azahar (*Citrus aurantifolium* L.var. amara), Chile (*Capsicum annuum*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine), Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), Fenogreco (*Trigonella foenum graecum* L.), Higuera (*Ricinus communis*), Jojoba (*Buxus chinensis*), Lavanda (*Lavandula officinalis*), Menta (*Chaix Mentha piperita* L.), Mostaza (*Brassica nigra*), Niaoli (*Melaleuca viridiflora* Gaerin), Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), Orégano (*Lippia palmeri* Watson), Orégano (*Origanum vulgare* L) Perejil (*Petroselinum sativum*), Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Salvia (*Salvia officinalis* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Obtención de aceites

De los 19 aceites esenciales previamente citados, seis presentaron actividad bactericida y con ellos se los aceites corresponden a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine), tres aceites de orégano (*Lippia palmeri* W.), recolectados de plantas procedentes de las áreas de Puerto orégano, Álamos, Sonora y uno cultivado en el Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora (DAG-UNISON); una muestra comercial de orégano (*Origanum vulgare* L), y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Los aceites que se destacaron fueron los que presentaron una mínima actividad en la inhibición del crecimiento de la bacteria en estudio, en las tres diferentes diluciones, esto de acuerdo a la sensibilidad de los aceites según las especificaciones utilizadas por Celikel y Kavas (2008), considerando el diámetro de inhibición del crecimiento (No sensible, si el diámetro total es menor de 8.0 mm; sensible para diámetros entre 9 y 14 mm; muy sensible para diámetros de 15-19 mm y extremadamente sensible para diámetros de inhibición mayores de 20 mm). Cabe indicar que el aceite de orégano *Lippia palmeri* de la familia Verbenáceas fue obtenido de plantas en dos hábitats naturales y una cultivada en el estado de Sonora México, en la región conocida como Puerto orégano, localizado en las coordenadas geográficas a 29° 02 ' 52" N y 110° 50' 40 16" Oeste; otro sitio de recolección de *Lippia palmeri*, fue en Álamos, Sonora, a 380 msnm y a una latitud de 27° 01' latitud Norte y 108° 56' longitud Oeste. La tercer muestra de orégano

fue obtenida de un área de cultivo situada en el área agrícola del DAG-UNISON a 29° 00' 44" LN y 111° 08' 02" LE. El aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor, siguiendo el Método Oficial de la Asociación de Análisis Químicos A.O.A.C. 6.006 (1975), dividiendo los compuestos volátiles del aceite esencial y empleando un destilador tipo Clavender de capacidad de 2 litros. La calidad de los aceites esenciales seleccionados para este estudio oscilaron entre 98 y 99% de pureza acorde a (Ortega *et al.*, 2005; Yesil *et al.*, 2007). Los aceites esenciales restantes, *Cinnamomum zeylanicum* Brine (CA), (*Origanum vulgare* L) (OV) y *Thymus vulgaris* L.) (TO) se adquirieron del comercio local, de la marca Soria Natural distribuidos por la casa Herbofarm Madrid, España, los cuales son obtenidos por arrastre de vapor de agua en gran escala con un grado de pureza de 99%.

Cultivos bacterianos

La cepa bacteriana utilizada en el estudio fue *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, la cual fue aislada de campos de tomate con presencia de la enfermedad en estudio y posteriormente caracterizada (Borboa *et al.*, 2009).

Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

Preparación del inóculo. La cepa bacteriana se desarrolló en un cultivo de 24 h a 30° C, en caldo NBY (Caldo nutritivo 0.8 %, extracto de levadura 0.2 %, K₂HPO₄ 0.2 %, KH₂PO₄ 0.025 %, agar 1.5 %), y se ajustó a una concentración de 10⁵ UFC/ml con solución salina estéril. El inóculo bacteriano se sembró de forma masiva en placas de agar NBY, utilizando un hisopo de algodón estéril, para conseguir un crecimiento microbiano uniforme. Las placas inoculadas con la bacteria se les colocaron discos de papel filtro, de aproximadamente 5 mm de diámetro, donde se aplicaron los aceites esenciales preparados como se detalla a continuación.

Actividad antimicrobiana. La técnica utilizada para el análisis de la actividad antimicrobiana fue de acuerdo a las recomendaciones de Prabuseenivasan *et al.* (2006). Los aceites esenciales fueron disueltos en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, adicionado con Tween 80 (0.5% v/v), esterilizada por filtración (filtro de membrana de 0.45 µm Whatman). Las diluciones de los aceites fueron 1:1, 1:5 y 1:10 y

de forma aséptica se colocaron 15 µl de cada una de las concentraciones de los aceites esenciales sobre el papel. Se utilizó DMSO en uno de los discos de papel filtro como control negativo y para descartar la actividad antimicrobiana del mismo. Además, se utilizó un disco de estreptomycin (10 µg/disco) y otro de ácido nalidíxico (30 µg/disco), como control de referencia. Se dejaron las placas por 30 min a temperatura ambiente para permitir la difusión del aceite esencial y luego fueron incubadas a 30° C por 18-24 h. Posterior al período de incubación, se midieron los halos de inhibición del crecimiento en milímetros utilizando un regla. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue un completamente al azar con arreglo factorial de 3 × 6 donde el factor A fueron las tres diluciones con tres niveles (1:1, 1:5 y 1:10), a su vez el factor B fue representado por los 6 niveles de aceites (Puerto Orégano, Orégano Álamos, Orégano Cultivado, Orégano comercial, Tomillo y Canela). Con tres repeticiones por tratamiento. A los datos obtenidos se les realizó un ANOVA GLM, estimándose significativamente a una (p ≤ 0.05). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS (2001) y (Jerry y Kaysuville, 2007)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a las diferentes diluciones de los extractos de aceite esencial que mostraron mayor inhibición de crecimiento de la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, en concentración de 1:1, se muestran en el siguiente orden de inhibición: orégano *Lippia palmei* recolectado en puerto orégano (PO) con 59.6 mm, de halo de inhibición, seguido del orégano *Lippia palmei* recolectado en Álamos (OA), con 58.3 mm de inhibición, tomillo *Thymus vulgaris* (Tom.) con 50.3 mm. los cuales estadísticamente son iguales. Mientras que los tratamientos más eficientes en concentración 1:5 fueron: (PO) con 45.3 mm, (OA) con 36.3 mm y (TOM) con 33.0 mm. y los más eficientes en la concentración 1:10 fueron: (PO) con 37.3 mm. (OV) con 31.0 mm. y (OA) con 28.3 mm. Figura 1.

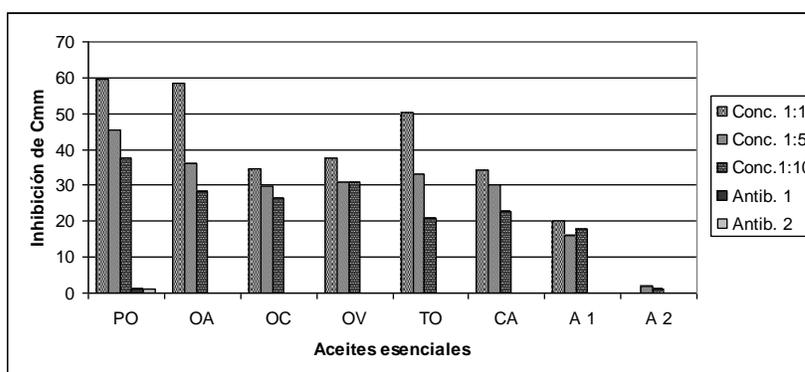


Figura 1. Comparación de valores de los diferentes aceites, antibióticos y concentraciones en la inhibición de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) a las 24 horas del ensayo. PO: Puerto orégano; OA: orégano álamos; TOM: tomillo; OV: *Oregano vulgare*; OC: orégano cultivado; CA: canela. A1: Antibiótico 1 (estreptomocina); A2: antibiótico 2 (ácido nalidíxico).

La comparación de medias mostró diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los tipos de aceites, entre las diferentes concentraciones y en la interacción entre ambos parámetros. *Cinnamomum zeylanicum* (Brine), los tres aceites de orégano (*Lippia palmeri* W.), la muestra comercial de orégano (*Origanum vulgare* L.), y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) mostraron una fuerte actividad contra *Cmm* (extremadamente sensibles, diámetro de inhibición > 20 mm), las variaciones en la escala de inhibición, disminuyó de acuerdo a la dilución del aceite. Al realizar la comparación entre los 6 aceites, se observó que el extracto de Orégano *Lippia palmeri* recolectado en Puerto orégano (PO) en concentraciones de 1:1, 1:5 y 1:10 inhibió significativamente el crecimiento de *Cmm* que el resto de los aceites, seguido del orégano de Álamos y del tomillo, lo cual nos permite subrayar la presencia de un potencial anti-bacteriano contra *Cmm* Tabla 1. Estos resultados coinciden con el estudio *in vitro* por Dagmar *et al.* (2008), donde observaron el efecto de treinta y cuatro aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicus* (*Cms*) y *Clavibacter michiganensis* subespecie *insidiosus* (*Cmi*), detectando que los aceites de *Origanum vulgare*, *O. compactum*, *Eugenia caryophyllata* y *Artemisia absintio* fueron los más eficientes en controlar a las bacterias *Cms* y *Cmi*. Los resultados, concuerdan con Dagmar *et al.* (2008) donde el género *Origanum* es el que predomina en la inhibición de las bacterias *Cmm*. Sin embargo, es importante indicar que la inhibición de *Cmm* por los tres tipos de *Lippia palemeri*, varió el efecto inhibitorio (diferencia significativa en los diámetros de los halos de inhibición) esto se debió posiblemente a la composición de los aceites vegetales por efecto de las condiciones ambientales de su hábitat natural y de especie de planta; esto último acorde a los resultados obtenidos por Sivropoulou *et al.* (1996).

Tabla 1. Comparación de medias de aceites esenciales a diferentes concentraciones según diámetros de inhibición de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* a las 24 h del ensayo.

Aceites esenciales	Concentraciones		
	1:1	1:5	1:10
Puerto Oregano	59.6a	45.6b	37.6b
Orégano Álamos	58.3a	36.3b	28.3c
Orégano Cultivado	34.6b	29.6c	26.3de
Orégano comercial	37.6b	31.0b	31.0bc
Tomillo	50.3ab	33.0b	21.0e
Canela	37.6b	30.0bc	22.6de

Valores con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine) (CA); Orégano (*Lippia palmeri* Watson); Recolectado en Puerto Orégano (PO); Recolectado en Álamos, Sonora (OA); Cultivado (OC); Orégano (*Origanum vulgare* L) (OV); Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (TO)

Otros trabajos han demostrado la capacidad de diversas especies de aceites del orégano y del tomillo de retardar y de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de plantas tales como: *Agrobacterium tumefaciens*, *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. caratovora* E. *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Axonopodis picovoltio*, *Xanthomonas vesicatoria* (Smith *et al.*, 1997; Vokou *et al.*, 1993; Sivropoulou *et al.*, 1996; Yegen *et al.*, 1998; Türküsay *et al.* 1998; Yıldız *et al.*, 2001; Soyly *et al.*, 2003). Resultados similares fueron los obtenidos en el estudio, donde se detectó una inhibición de crecimiento de *Cmm* con aceites de orégano y tomillo

De la misma manera, la aplicación de aceites esenciales provenientes de orégano y tomillos, entre

otros, se ha estudiado para controlar las enfermedades producidas por hongos incidentes en poscosecha del tomate, *Fusarium* sp. *R. stolonifer*, *B. cinerea*, *Alternaria arborescens* y *Geotrichum candidum*. Los resultados han sido variables en función del hongo y del aceite evaluado (Plotto *et al.*, 2003; Daferera *et al.*, 2003). La efectividad de los aceites esenciales fueron comparados con dos antibióticos: estreptomycin (10 µg), y el ácido nalidixico (30 µg), encontrándose que todos los aceites esenciales en las diferentes concentraciones dieron mejores resultados que lo esperado por los antibióticos (Figura 2).

En este sentido, aceites esenciales de orégano, tomillo, lavanda, romero y *Dictamnus* fueron probados por Daferera (2003) para conocer su eficiencia de control contra *Botritis cinerea*, *Fusarium* sp. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, en medios artificiales del crecimiento. El crecimiento de *Botritis cinerea*, *Fusarium* sp y de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fue inhibido totalmente por los aceites esenciales del orégano, tomillo y *Dictamnus* spp en bajas concentraciones (85-300 µg/ml). El Timol fue el componente principal del aceite del orégano, mientras que los aceites de tomillo y *Dictamnus* spp, eran ricos en carvacrol. Estos resultados se pueden comparar con el actual estudio, ya que los aceites esenciales que mejor controlaron a *Cmm* fueron los de

orégano y tomillo. En relación a las fracciones, de aceites esenciales se observó un efecto diferencial, en las dosis más altas de PO y OA, predominando la concentración 1:1 (v/v), la cual resultó ser significativa ($p < 0.05$) en todos los aceites evaluados (Figura 3). La concentración de metabolitos en el aceite esencial puede ser variable como lo es caso de la concentración de cinamaldehido del aceite esencial procedente de canela que puede variar entre 60 y el 75% (Duke, 1986), mientras que la composición del aceite esencial de *T. vulgaris* son γ -terpineno (4,30%), p-cimeno (23,50%), carvacrol (2,20%) y timol (63,60%), lo que representa el 93,6% de la composición total del aceite esencial de tomillo Daferera *et al.*, (2000). Los resultados encontrados en la investigación establecen que utilizar dosis bajas del aceite, pudo originar una disminución del potencial de inhibición de la bacteria. Asimismo se encontró una interacción entre los aceites esenciales y las dosis, donde se observó una tendencia inicial de mayor a menor en el control de la bacteria *Cmm*, esto indica que a medida que disminuye el principio activo del aceite decrece la concentración. Los resultados antes mencionados indican que la actividad antibacteriana de los aceites esenciales puede depender de la concentración relativa de los componentes activos. Sin embargo, la interacción química posible entre los componentes no se excluye con efectos sinérgicos y/o antagónicos.

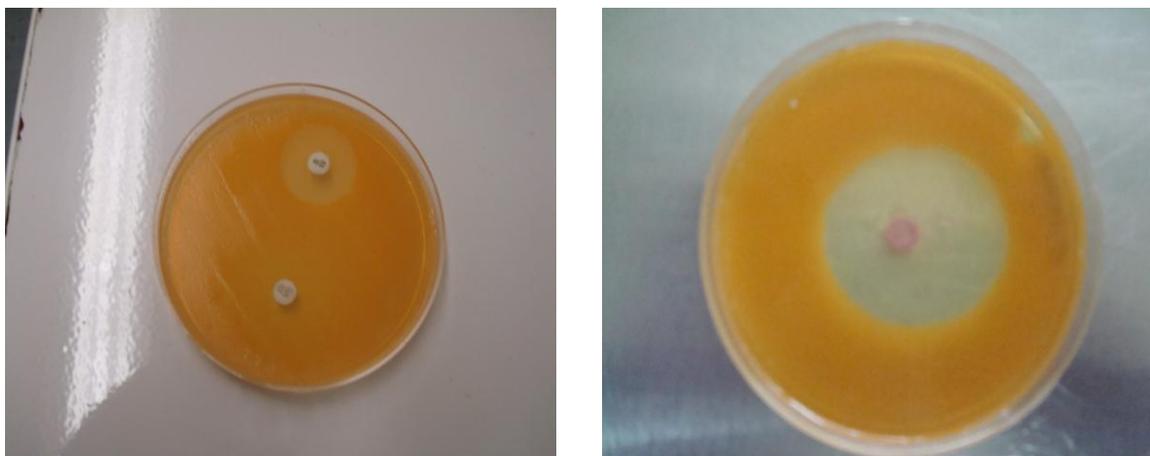


Figura 2. Comparación del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* con el aceite esencial de *Limppia palmeri* (Derecha) y los antibióticos de estreptomycin y el ácido nalidixico (Izquierda).

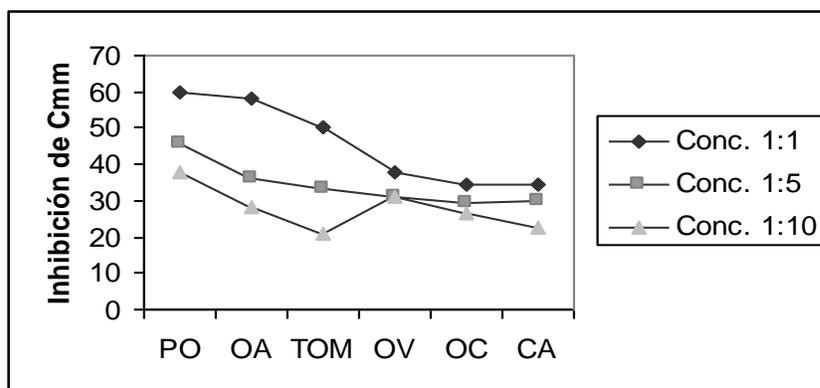


Figura 3. Comportamiento de los aceites esenciales en la interacción a diferentes concentraciones frente a las cepas bacterianas de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm) a las 24 h del ensayo. PO: Puerto orégano; OA: orégano álamos; TOM: tomillo; OV: *Oregano vulgare*; OC: orégano cultivado; CA: canela.

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de 19 aceites esenciales, de los cuales fueron seleccionados seis por su actividad bactericida, quedando en el siguiente orden: Orégano de Puerto Orégano>Orégano de Alamos>Tomillo>Orégano cultivado>Orégano comercial>Canela; mismos que representan una buena alternativa para evitar el uso de antibióticos en el control de la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*.

El aceite esencial de orégano *Lippia palmei* obtenido de plantas recolectadas en su habitat natural en Puerto Orégano Sonora, mostró significativo efecto inhibitorio ($p < 0.05$), *in vitro* sobre la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, en concentración de 1:1, que el resto de los aceites evaluados en estas pruebas.

Son necesarios otros estudios para evaluar la actividad fito-tóxica sobre la germinación de la semilla y el posible uso para el saneamiento de la misma, para evitar el uso de semilla contaminada por patógenos que se diseminan por este medio, como lo es el caso de la bacteria en este estudio. Asimismo, el aislamiento e identificación de los compuestos activos que presentan los aceites evaluados y, considerar los campos moleculares, morfológicos y bioquímicos que estos compuestos causan al patógeno y el hospedero.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., a Rosalba Pérez Morales. Al CONACYT por la beca asignada a Jesús Borboa para la realización de sus estudios de doctorado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Secretaría de

Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por el proyecto aprobado 12067: Detección de bacterias de importancia cuarentenaria en la zona noroeste de México.

REFERENCIAS

- Aballa, A. and Rosen, J. P. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technology* . 212: 551-560.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1975. William Horwitz, Alam Sen Zel and Helen Reynolds. *Research in Veterinary Science*. 6.006. Ed. 25. p. 77.
- Borboa, F. J., Rueda, P. E., Acedo, F. E., Ponce, M. J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O. y García, O. A. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecies *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32: 319-326.
- Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
- Celikel, N. and Kavas G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Food Science*. 26: 174-181.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*. 12: 564-565.

- Dagmar, P., Blanka, K., Roman, P. and Rysanek, P. 2008. Effectivity of plant Essential Oils Against *Clavibacter Michiganensis*, *in vitro*. *Zemdirbyste-Agriculture*. 95: 440–446.
- De León, L., Rodríguez, A., López M. M. and Siverio, F. 2007. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal of Applied Microbiology*. 104:776-786.
- Dixon, N. R. A. 2001: Natural products and plant disease resistance. *Journal of Young Investigators*. 411: 843–847.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N. and Polissiou, M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*. 22: 39–44.
- Daferera, D. J., B. N. Ziogas, and M. G. Polissiou. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2576-2581.
- Duke, J.A. 1986. *Handbook of Medicinal Herbs*. Editorial. CRC Press, Florida, USA. ISBN. 0-8493-2946-9. p. 33.
- Dhanvantari, B. N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 11: 400-408.
- García, E. R., Carrillo F. y Siller C. 2007. Presencia de cáncer bacteriano en tomate injertado. *Confederación de Asociaciones Agrícolas del Estado de Sinaloa CAADES*. 18^a Ed. pp.82.
- Gleason, M. Braun, E. J. and Peterson, R. H. 1993. Survival and dissemination. of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*. 1: 1519-1523.
- Iacobellis, N. S., Lo Cantore P., Capasso and F., Senatore F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils // *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 53: 57–61.
- Jerry, L. H. and Kaysville, U. 2007. *Quick Start & Self Help anual. cal System for Windows*. NCSS. User's Guide-I. Published by Number Cruncher Statistical System. Kaysville. UTAH. USA. pp. 25-50.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Fakir, A. Ala, A. and Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish. *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53: 9452- 9458.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Cote P. J. and Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration carvacol. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453-462.
- Nazari, F., Niknam, G. R., Ghasemi, A., Taghavi, S. M., Momeni, H. and Torabi, S. 2007. An Investigation on Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and North West of Iran. *Journal of Phytopathology*. 155:563–569.
- NCSS. 2001. *Number Cruncher Statistical System*. Guiders Lines. Version 6.0.2. USA.
- Ortega, N. M. M., McCaughey, E. D., Bargaño, M. R. y Serna, F. 2005. Estimación de materia vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Watson) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del estado de Sonora. *Memorias del 5to Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas áridas*. pp. 234-249
- Ponce, A. G, Del Valle, C. and Roura, S. I. 2004. Shelf life of leafy Plotto A, R Roberts, D Roberts. 2003. Evaluation of plant essential oil as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *International Society for Horticultural Science*. 628: 737-745.
- Plotto A., Roberts A. and Roberts B. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *ISHS Acta Hort*. 628:737-745.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 6. pp.39.
- Ramírez, V.J. y Sáinz, R. R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ra. Ed. Once Ríos. México. pp. 19-160

- Rat, B., Poissonnier, J., Goisque, M.J. and Burgaud, A. 1991. Le Point. sur le chancro bactérien. *Frutas y Hortalizas*. Prepared by CABI and EPPO for the EU. 86. pp. 38-40.
- Sandoval, B. C. 2004. Manual técnico de manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Talca, Chile. pp. 41-42.
- Sigee, D. C. 2005. Bacterial plant pathology: Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions. Cambridge University Press. Editorial Cambridge University Press. Vol. 1. ISBN: 978-0-521-61967-7. pp. 1, 2, 4, 9-11.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1202-1205.
- Smith, M.D. and Navilliat, P.L. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods* s. 28: 21–24.
- Soylu, S., Soylu, E.M., Baysal, Ö. and Zeller, W. 2006. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biocontrol of Bacterial Plant Diseases*, 1st Symposium, 23–26 October, 2005, Darmstadt, Germany. Vol. 408. pp 82-85.
- Thyr, B. D., Webb, R. E., Jaworski, C. A. and Ratcliffe, T.J. 1973. Bacterial Tomato aftas: control. by the treatment of seeds. *Plant Disease Reporter*. 57: 974-977.
- Türküsay H. and Onoğur E. 1998. Bazı bitki ekstraktlarının *in vitro* antifungal etkileri üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Agriculture, Forestry*. 22: 267-271.
- Van de Braak S.A. and Leijten G.C.J.J. 1999. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- Wilson, C. L., Ghaouth, A., Wisniewski M. E. and Wisniewski, M. E. 1999. Prospectin in mature's storehouse for Biopesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17: 49-53.
- Yesil, C. O., Hames, K. E. E., Bedir, E., Vardar, S. F., Ozek, T. and Baser, K. H. C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and Essentials oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 100: 553–559.
- Vokou D., Varelzidou S. and Katinakis, P. 1993 Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agricult. Ecosyst. Environ*. 47: 223.
- Yegen O., Ünlü, A. and Berger, B.M. 1998. Use and side effects on the sil microbial activity of the essential oil from *Thymbra spicata* to control pepper blight *Phytophthora capsici* . *Journal of Plant Dis. Protect*. 105: 602-610.
- Yıldız, N., Aysan, Y. and Çınar, Ö. 2001. Domates gövde nekrozu etmenleri *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia chrysanthemi*, ve *E.caratovora* subsp. *caratovora* üzerine bazı bitki ekstrakt ve eterik yağları ile compost ekstarktrlarının etkileri. *Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Bildirileri, Tekirdağ*. 63-72.

Submitted Augusts 8, 2009 – Accepted December 10, 2009

Revised received January 1, 2010