

## **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE VOLÁTILES DE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis***

**Borboa- Flores J<sup>1</sup>**; Rueda-Puente, E. O.; Acedo-Félix, E.; Ponce-Medina J. F.; Cruz-Villegas, M., J. L. M. M. Ortega-Nieblas. F.J. Cinco-Moroyoqui

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora<sup>1</sup>  
jborboa@guayacan.uson.mx

### **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 la actividad antibacteriana in vitro de seis aceites esenciales. 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 tres 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 1; Compuestos naturales 2; Cancro bacteriano 3 y biocontrol 4.*

### **Abstract**

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. *Oregan 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 vvariance 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:** *Biobactericide1; Natural compounds 2; Canker bacterial 3 and 4.Biocontrol*

### **INTRODUCCIÓN**

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). Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, anti-bacteriano, antifúngico y antiviral (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). La bacteria fitopatogena *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 plantas jóvenes o reduciendo su producción comercial. *Cmm*, 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). 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).

El control de enfermedades bacterianas utilizando antibióticos, se ha vuelto difícil por los elevados costos de la mayoría de estos productos, 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. 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*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las diferentes plantas de las cuales se evaluaron sus aceite fueron: Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine), Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y 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). 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 campo agrícola del DAG-UNISON a 29° 00' 44" LN y 111° 08' 02" LE.

### **Obtención de aceites**

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. 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.

### **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 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025 %, agar 1.5 %), y se ajustó a una concentración de 10<sup>5</sup> UFC/ml con solución salina estéril. 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**

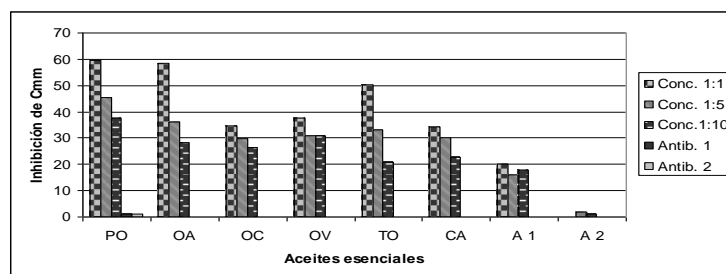
La técnica utilizada para el análisis de la actividad antimicrobiana fue de acuerdo a las recomendaciones de Prabuseenivasan *et al.* (2006). Los aceites esenciales fueron disueltos en una solución de dimetilsulfoxido (DMSO) al 10%, adicionado con Tween 80 (0.5% v/v), esterilizada por filtración (filtro 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 estreptomina (10 µg/disco) y otro de ócielos nalidixico (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 periodo 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 X 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 ( $p \leq 0.05$ ). 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 DISCUSION**

Respecto a las diferentes diluciones de los extractos de aceite esencial que mostraron mayor inhibición de crecimiento de la bacteria *C.mm*, 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 oregano *Lippia palmei* recolectado en Alamos (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 (estreptomicina); 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 concertaciones 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 *C. michiganensis* subespecie *sepedonicus* (*Cms*) y *C. michiganensis* subespecie *insidiosus* (*Cmi*), detectando que los aceites de *Origanum vulgare*, *O. compactum*, *Eugenia caryophyllata* y *Artemisia absintio* fueron los mas 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 ultimo acorde a los resultados obtenidos por Sivropoulou *et al.* (1996).

**Tabla 1.** Comparación de medias de aceites esenciales a diferentes concertaciones 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 Orégano	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

---

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).

### CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de seis aceites esenciales, los cuales quedaron en el siguiente orden de importancia: orégano de puerto orégano > orégano de Álamos > 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 palmeri* obtenido de plantas recolectadas en su hábitat 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.

### 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. .
- Celikel, N. and Kavas G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Food Science*. 26: 174-181.
- 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.
- 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.18a Ed.* pp.82.
- 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.
- 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.

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.