



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

ESCUELA INGENIERIA AGROPECUARIA

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA

MÍNIMA DE ACEITES ESENCIALES ANTE BACTERIAS Y

HONGOS FITOPATÓGENOS

TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

AUTOR:

ALEX GERARDO RUILOVA REYES

DIRECTORA:

ING. AIDA CAZAR RAMIREZ

CUENCA, ECUADOR

2007

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con mucho cariño a mis Padres Gerardo y Teresa, a mis hermanos Sucethy, Bismark y Jorge. Quienes con paciencia y entusiasmo han sabido apoyarme y guiarme por la vida.

Al igual quiero dedicar este trabajo a Silvita, a toda mi familia y amigos que confiaron en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios, por permitirme culminar mi carrera como también a mis Padres, Hermanos, familiares y amigos quienes me han brindado su apoyo incondicional.

Agradezco de forma muy especial a todos mis queridos maestros quienes con responsabilidad y alegría me ilustraron en las aulas de esta universidad y de manera muy especial quiero agradecer a la Dra. María Elena Cazar R. y a la Ing. Aidita Cazar R. que sin ningún interés me brindaron sus conocimientos científicos que fueron muy importantes para culminar con éxito esta investigación. De igual forma dejo constancia de mis agradecimientos a todos los miembros de los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología, a la Ing. Fernanda Rosales. Ing. Ximena Orellana, Ing. Mónica Tinoco, Tec. Diego Vidal, y a los Biólogos María Elisa Duran y Pablo Mosquera por brindarme su apoyo y amistad.

RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue para determinar la IC₅₀ y la CIM a la cual los aceites esenciales inhiben el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos. Se seleccionaron cinco aceites esenciales en base a los resultados obtenidos en la tesis Cárdenas-Zhimnay (2006). Estos aceites fueron probados ante las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Erwinia sp.*, y los hongos *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp.*, agentes causales de importantes enfermedades en los cultivos. La actividad antimicrobiana fue evaluada en un ensayo de dilución seriada con lector ELISA; obteniendo resultados promisorios.

Este trabajo aporta nuevas alternativas naturales para utilizar en nuestros cultivos sin contaminar al medio ambiente.

ABSTRACT.

The aim of the present work was to determine the IC₅₀ and MIC from several essential oils, which inhibit the growth of phytopathogenic bacteria and fungi. Five essential oils were selected, based on the results obtained from Cárdenas and Zhimnay (2006, B.S Thesis, Agricultural Sciences School, Universidad del Azuay). These essential oils were tested against the bacteria *Pseudomonas syringae* and *Erwinia sp.*, and the fungi *Botrytis cinerea* and *Alternaria sp.*, causal agent of many important plant diseases. Antimicrobial activity was evaluated in a serial dilution assay using an ELISA microplate reader, achieving good results.

This work presents new natural, environmentally friendly alternatives to pest control.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la dosis mínima a la cual los aceites esenciales inhiben el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Puesta a punto de la metodología para determinar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos mediante el uso del lector ELISA
2. Establecer las concentraciones mínimas inhibitorias ante las bacterias *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* y los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria* sp., para **cinco** aceites esenciales.

INDICE DE CONTENIDOS

Contenidos	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Objetivos.....	vi
Índice de Contenidos.....	vii
índice de cuadros y figuras.....	ix
Índice de anexos.....	x
Introducción.....	1

CAPÍTULO I: FUNDAMENTO TEORICO

1.1 Aceites esenciales: generalidades.....	6
1.2 Descripción Botánica de las Especies Vegetales seleccionadas.....	9
1.2.1 Cedrón (<i>Lippia citriodora</i>).....	9
1.2.2 Hierba luisa (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Staff).....	11
1.2.3 Hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller.).....	13
1.2.4 Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	15
1.2.5 Pamba poleo (<i>Mentha pulegium</i> .).....	17
1.3 Aplicaciones de aceites esenciales en biocontrol.....	19
1.4 Microorganismos fitopatógenos evaluados como objetivos en ensayos biológicos.....	20
1.4.1 <i>Botritis cinérea</i>	20
1.4.2 <i>Alternaria sp.</i>	23
1.4.3 <i>Pseudomonas sp.</i>	25
1.4.4 <i>Erwinia sp.</i>	27
1.5 Método para determinar la actividad antimicrobiana. Microtitulación en lector ELISA.....	29

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales.....	31
2.1.1 Microorganismos de prueba.....	31
2.1.2 Obtención de aceites esenciales.....	32
2.1.3 Bioensayo de actividad antibacteriana: Ensayo de microdilución con lector ELISA.....	33
2.1.3.1 Preparación de inóculo.....	33
2.1.3.2 Preparación de solución madre de los aceites esenciales.....	33
2.1.4.3 Preparación de microdilución.....	33
2.1.3.4 Lectura del bioensayo de actividad antimicrobiana.....	35
2.1.4 bioensayo de actividad antifúngica.....	35
2.1.4.1 Recolección y cuantificación de esporas de los hongos fitopatógenos.....	35
2.1.4.2 Preparación de soluciones y medios para el bioensayo.....	36
2.1.4.3 Bioensayo de actividad antifúngica.....	37
2.1.5 Tratamiento estadístico de datos.....	37
2.1.6 Determinación de la IC ₅₀ para actividad antibacteriana.....	38

CAPITULO III: RESULTADOS OBTENIDOS

3.1 Resultados.....	40
3.1.1 Rendimiento de aceites esenciales.....	40
3.1.2 Puesta a punto de condiciones experimentales para los bioensayo.....	41
3.2.1 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales.....	42
3.2.2.1 Actividad antibacteriana.....	42
3.2.2.2 Actividad anti fúngica de aceites esenciales.....	43
3.2.2.3 IC ₅₀ y MIC de los aceites esenciales estudiados, expresada como concentración volumen /volumen.....	44

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
--	-----------

BIBLIOGRAFÍA.....	50
--------------------------	-----------

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Rendimiento en mL de los aceites esenciales.....	40
Cuadro 2. Actividad antibacteriana de aceites esenciales ante bacterias fitopatógenas, expresada como IC ₅₀	42
Cuadro 3. Actividad antifúngica de los aceites esenciales ante los hongos fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria sp.</i>	43
Cuadro 4. Concentración antimicrobiana de aceites esenciales estimada a partir de los bioensayos de microdilución en placa.....	45
Figura. 1. Variedad estructural de los principales componentes de los aceites esenciales.....	8
Figura 2. Esquema de distribución de la placa de microdilución.....	34
Figura. 3. (a) Cámara de Neubauer.....	36
Figura. 4 Placa de ensayo antibacteriano, revelada con MTT.....	43
Figura. 5 Placa de bioensayo de actividad antifúngica, luego del período de incubación.....	44

INDICE DE ANEXOS

Anexo I Reactivos químicos utilizados para medios de cultivo.....	54
Anexo II Medios de cultivo para conservación de bacterias fitopatógenas.....	56
Anexo III Medios de cultivo para mantenimiento de hongos fitopatógenos.....	60
Anexo IV Lector Elisa.....	63

Ruilova Reyes Alex Gerardo

Trabajo de Graduación

Aída Cazar Ramírez

Diciembre, 2007

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MÍNIMA DE ACEITES ESENCIALES ANTE BACTERIAS Y HONGOS FITOPATÓGENOS

INTRODUCCION

Los aceites esenciales son mezclas de varios compuestos volátiles, entre ellos, los **monoterpenos**, formados por unidades de 10 átomos de carbono, son componentes mayoritarios de estas mezclas. Estos compuestos constituyen hasta el 5% del peso seco de las plantas, y se aíslan del material vegetal por destilación o extracción. (Buchanan, B. 2000).

Los Aceites Esenciales o esencias vegetales son productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales. El término aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semisintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales.

Las propiedades antimicrobianas de especies vegetales han sido reconocidas, por sus usos desde tiempos ancestrales para la preservación de alimentos y en medicina. Actualmente existe un renovado interés en el estudio de aceites esenciales ya que se buscan alternativas de origen natural para la preservación de alimentos, lucha contra plagas agrícolas y por los problemas que implica la resistencia de microorganismos a controles químicos y por el creciente rechazo de la sociedad al uso de compuestos químicos como aditivos de alimentos y pesticidas (Suhr y Nielsen, 2003).

A pesar de las variadas actividades biológicas que presentan los aceites esenciales, existen muy pocos trabajos que reporten la actividad antimicrobiana con metodologías estandarizadas, que permitan la reproductibilidad de resultados y su posible aproximación al uso en el campo como biopesticidas (Hammer *et.al.*, 1999). Es necesario investigar sobre las concentraciones mínimas que inhiban el crecimiento de microorganismos, usando métodos sensibles y robustos que nos permitan reportar estos datos y valorar la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Estos aceites esenciales, son muy buenas alternativas como antimicrobianos ya que en la actualidad alrededor del mundo estamos buscando formas de cuidar y controlar nuestros cultivos de plagas y enfermedades, sin destruir más el medio ambiente, tratando de tener tendencia hacia los productos naturales y dejar a un lado a los químicos que tanto daño nos han causado.

Gracias a la automatización de los métodos de laboratorio, actualmente se puede contar con equipos que permiten realizar ensayos biológicos con varias repeticiones y poca cantidad de muestra. Las técnicas ELISA permiten realizar lecturas de absorbancia y

densidad óptica de cultivos líquidos de microorganismos. Valiéndonos de las bondades de este equipo, pretendemos desarrollar un método de determinación de la dosis media (IC_{50}) y concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales ante bacterias y hongos fitopatógenos.

El biocontrol, conocido como la inhibición de una plaga por otro organismo, ha atraído gran interés en los últimos años como una alternativa potencial del uso de pesticidas químicos. Además, existe una preocupación general por los efectos del uso de pesticidas químicos en poblaciones no-objetivo (bioacumulación en tejidos, contaminación de cursos de aguas y suelos, persistencia en el ambiente, entre otros) (Ligon, J., 2003)

En años recientes, se han desarrollado estudios orientados a la búsqueda de agentes biocontroladores efectivos en la lucha contra plagas agrícolas. Los agentes de control biológico incluyen hongos e insectos, extractos vegetales y aceites esenciales.

Existe menor información sobre el uso de aceites esenciales en control de plagas. A pesar de que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se ha presentado en diversos trabajos de investigación, existen pocos estudios sobre sus efectos en patógenos de plantas. La ventaja del uso de estas sustancias naturales es su bioactividad en fase de vapor, una característica que los hace atractivos como posibles fumigantes para protección de productos almacenados. Existen reportes de la actividad de los aceites esenciales de *Melaleuca leucadendron*, *Ocimum canum* y *Citrus medica* en la protección de alimentos almacenados del biodeterioro causado por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus versicolor*. Además se ha reportado que el uso de aceites esenciales en fase de

postcosecha mantiene en buen estado los frutos y vegetales por inhibir la pudrición fungal (Tripathy y Dubey, 2004).

Los aceites esenciales son responsables de los mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de microorganismos fitopatógenos. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, conocidos como terpenoides, actúan en el metabolismo vegetal como antibióticos, y se producen en respuesta al ataque de microorganismos. Además, estas biomoléculas pueden actuar como fitoalexinas y compuestos antialimentarios, que defienden a la planta del ataque de herbívoros (Buchanan, 2000).

En nuestro país, el sector agrícola desarrolla cultivos intensivos y extensivos, esto hace que muchos agricultores tiendan a utilizar productos químicos por la necesidad de garantizar la producción, pero lamentablemente el uso indiscriminado de químicos ha generado altos índices de contaminación ambiental, cuyos responsables del efecto invernadero, y la contaminación directa de los consumidores por la cantidad de residuos de estos productos en las cosechas.

Los aceites esenciales surgen como una alternativa al control de plagas y enfermedades pues su aplicación nivel de laboratorio ha demostrado eficiencia en el control de agentes fitopatógenos, creando la posibilidad de contar con productos que garanticen inocuidad en el medio ambiente y garantizando producciones sanas y libres de residuos contaminantes.

En este trabajo investigativo, existió una fase en la cual seleccionamos las especies para la extracción de aceites esenciales y nos basamos en información como especies más

rendidoras y mejor capacidad antimicrobiana según la tesis Cárdenas Zhimnay 2006, además especies cultivadas en la zona y fáciles de conseguir.

Para seleccionar los aceites esenciales que puedan ser utilizados como antimicrobianos se realizó una revisión de la información etnobotánica existente, en la que se registran por lo general, las aplicaciones en medicina tradicional. En algunos casos se pudo tener acceso a información relativa a la aplicación de estos aceites como fungicidas, con lo cual se pudo elegir los aceites con los que se desarrolló el presente trabajo.

Considerando que los aceites esenciales son metabolitos secundarios que se localizan en el follaje de las plantas, el método que se utilizó para su extracción es el de arrastre de vapor, este método se basa en la extracción del aceite a través del vapor, el que se genera por la ebullición del agua, debido a que la densidad del aceite es menor que la del agua, la separación del mismo es fácil y segura.

Para evaluar la actividad biocontroladora de los aceites esenciales se aplicó la prueba de ELISA, usando las placas de esta prueba y diseñando un sistema de microdiluciones de los aceites a probar frente a las cepas de los fitopatógenos seleccionados. De esta manera se pudo obtener resultados que establecen la IC_{50} , para cada uno de los aceites.

CAPITULO I

FUNDAMENTOS TEORICOS

1.1 Aceites esenciales: generalidades

Los Aceites Esenciales o esencias vegetales son parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos son volátiles. (Bandoni, 2000)

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, en su mayoría insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales. Por lo general no son oleosos al tacto.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de terpenos, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, entre otros, cuyos usos se registran desde la antigüedad. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales cumplen roles importantes en el metabolismo vegetal. Los sesquiterpenos actúan como fitoalexinas; antibióticos producidos por las plantas en respuesta al ataque de microorganismos, y como antialimentarios para la defensa ante herbívoros.

En nuestro país existe una elevada biodiversidad vegetal, siendo las plantas medicinales un soporte para la salud de la población. El conocimiento ancestral sobre el uso de plantas medicinales se basa en tradiciones propias de cada región y en la amplia gama de especies vegetales, características de sus distintas zonas geográficas.

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y sus constituyentes se discuten en varios trabajos de investigación. En estos estudios se busca la aplicación de estas sustancias como preservantes de alimentos, antioxidantes, biocontroladores de plagas en almacenamiento de frutos, etc. Por esto es promisorio evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales con el fin de probar su efectividad para inhibir la contaminación de alimentos.

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Retaceas, Umbelíferas, y Asteraceas.

Los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales. Los aceites se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; puede ser para atraer los insectos para la polinización, o para repeler a los insectos nocivos, o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio (Bandoni, 2000).

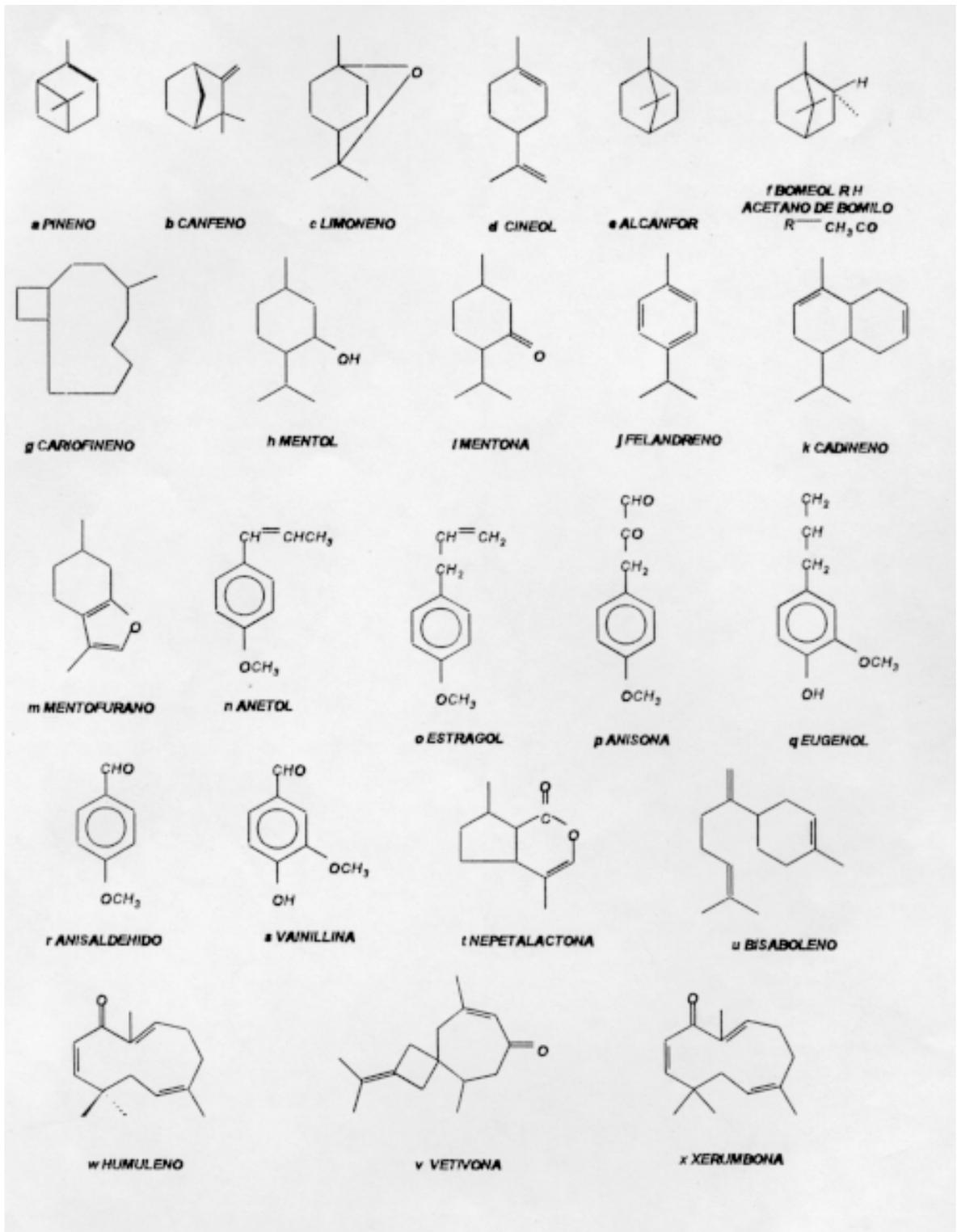


Figura 1. Variedad estructural de los principales componentes de los aceites esenciales

Fuente: (Bandoni Arnaldo, 2000.)

1.2 DESCRIPCION BOTANICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

SELECCIONADAS

1.2.1 Cedrón



Nombre Científico: *Lippia citriodora*

Nombre Vulgar: Cidron, Maria Luisa, Cedròn.

Familia Botánica: Verbenácea.

Origen: se origina de la región montañosa de Argentina.

Características Botánicas

Hojas: Simples, rugosas, reunidas en verticilos de tres, limbo un poco dentado, de color verde pálido, presenta una nervadura mediana, de la cual se destaca una serie de nervaduras secundarias paralelas.

Tallo: Largos, leñosos, angulosos y provistos de finas rayas lineares.

Flores: pequeñas, blancas por fuera y azules violáceo por dentro, se ubican al extremo de los tallos en espigas agrupadas en panojas.

Raíces: De tipo fibrosa, de color blanco, las cuales forman una cabellera alrededor del nudo que se desarrolla.

Fruto: Del fruto es una drupa que encierra dos granos que a veces no llegan a la madurez.

Propiedades Medicinales.

Es un estimulante del apetito, mejora las digestiones lentas.

Bueno para tratar el estrés. Es carminativo antiespasmódico. Se toma como agua de tiempo. (Agapito T. y Sung I., 2005)

Principios Activos:

Su aceite esencial contiene: Cíñelo, citral (20-39 %), 1-limoneno (10-15%), sesquiterpenos (40-45%), linalol (4-11%), lipiol, geranial.

Las hojas y flores contienen, ácidos fenolicos, flavonoides, taninos, flacones, y alcaloides. (Agapito T. y Sung I., 2005)

1.2.2 Hierba Luisa



Nombre Científico: *Cymbopogon citratus* (DC) Staff.

Nombre Vulgar: Caña Santa, cañita de limón, hierba luisa.

Familia Botánica: Poaceae (Graminae)

Origen: Sureste Asiático.

Características Botánicas

Hojas: Aromáticas (con aroma alimonado), agrupadas cerca de la base, lineares, de hasta casi 1 metro de longitud, con el borde cortante, de 6 a 10 decímetros, sus ramas alargadas y un tanto penduladas.

Tallos: muy ramificado de 1 a 2 metros de alto con los nudos ceríferos.

Flores: Se reúnen en espiguillas en pares.

Propiedades Medicinales.

Carminativo, diaforético, expectorante, estimulante, antiespasmódico, tranquilizante,

Reumatismo, dolor de estomago, analgésico, antiinflamatorio, sedante, diurético, tranquilizante, inflamaciones faríngeas, disminución de niveles de colesterol. (Agapito T. y Sung I., 2005)

Principios Activos:

Las hojas contienen aceite esencial (0.5-0.7 %) citral, Geranial y neral. Triterpenoides (cimbopogana, cimbopogonal) y flavonoides (luteolina, isoorientina y derivados). El aceite esencial contiene: citral, (65-72 %), mirceno (12.7 %), acetato de geranillo (3.0 %), metil heptenosa (2.6 %), gerenial (1.8 %), elemol (1.2 %). (Agapito T. y Sung I., 2005)

1.2.3 Hinojo



Nombre Científico: *Foeniculum vulgare* Miller.

Nombre Vulgar: Hinojo, Hierba Santa, Hinojo de Florescencia.

Familia Botánica: Umbelliferae

Origen: Sur de Europa.

Características Botánicas

Hojas: Poseen hojas compuestas verde-grisáceas de sección triangular con numerosos foliolos filiformes.

Tallo: Erecto, glauco, estriado.

Flores: amarillas en umbelas axilares de hasta 8 cm. Carentes de brácteas.

Raíces: esta formado por una raíz primaria gruesa(es un bulbo, suele tener un diámetro de 10 a 15 centímetros).

Propiedades Medicinales.

Diurético, Emenagogo, Estomacal, Antiespasmódico, Digestivo.

Afrodisíaco, activa funciones intestinales, adelgazante, aperitivo, astringente, carminativo, depurativo de la sangre, tónico estomacal, retención de orina, promueve el buen funcionamiento de los riñones, hígado y bazo, ácido úrico, elimina mucosidades, sinusitis. (Agapito T. y Sung I., 2005)

Principios Activos:

Contiene flavonoides, cumarinas, y aceite esencial (1.-5 %), camfeno, anetol, safrol, pineno, mirceno, estragol, fenchoná, ácido anísico. Las hojas contienen flavonoides. La raíz contiene cumarinas. (Agapito T. y Sung I., 2005)

1.2.4 Romero



Nombre Científico: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre Vulgar: Romero

Familia Botánica: Lamiaceae (Labiatae)

Origen: Originaria de los países que rodean el mar Mediterráneo.

Características Botánicas

Hojas: Finas como agujas, pero flexibles, de color verde oscuro en la parte superior, grisáceo en el inferior, aromáticas.

Tallo: cilíndrico de color café, de mayor diámetro en la base, leñoso con gran cantidad de nudos donde se originan las ramificaciones.

Flores: flores pequeñas, irregulares, entre blanco y azul pálido, solitarias o en pequeños grupos situados en el punto de unión de la hoja con la rama.

Raíz: fasciculada, desarrollada de los nudos del tallo en la cual forman una cabellera.

Fruto: tetraquenio.

Propiedades Medicinales.

Afrodisíaco, antiséptico, colágeno, estomacal, estimulante, emenagogo, astringente, antiespasmódico, narcótico, estomacal, diurético, hipertensivo, tónico. (Agapito T. y Sung I., 2005)

Principios Activos:

Las hojas contienen aceite esencial: alcanfor, de romero compuesto de pineno, camfeno, cíñelo, borneol, acetato de benzilo, limoneno, falandreno, mirceno.

Contiene alcaloides diterpénicos (isorosmaricina, metilrosmaricina, rosmaricin); flavonas (rebitrina); taninos. (Agapito T. y Sung I., 2005)

1.2.5 Pamba poleo



Nombre Científico: *Mentha pulegium*.

Nombre Vulgar: Pamba poleo.

Familia Botánica: Lamiaceae.

Origen: Sudáfrica y Australia.

Características Botánicas

Hojas: Ovaladas color verde grisáceo, estas son opuestas, es decir, se disponen una en frente de otra, y poseen forma lanceolada.

Tallos: Tallo liso redondeado y aromático.

Flores: Rastreras.

Propiedades Medicinales.

Toda la planta contiene aceite esencial (0,5%-1%) a base de pulegona, una cetona no saturada. Contiene también mentona, limoneno y otras cetonas, Digestivo y tónico estomacal.

Expectorante y antitusígeno, Emenagogo, antiespasmódico, Vermífugo, Antiséptico.
(Agapito T. y Sung I., 2005)

Principios Activos:

Aceite esencial (0,5-1%): pulegona (70-90%), mentona, isomentona, piperitenona, alfa y beta-pineno, limoneno. (Agapito T. y Sung I., 2005)

1.3 Aplicaciones de aceites esenciales en biocontrol

Entre los variados usos de los aceites esenciales, se encuentra el control de plagas agrícolas. Dependiendo de la composición química, física y sensorial, ciertos aceites esenciales son adecuados para este propósito. Existen algunos trabajos de investigación orientados a la búsqueda de aceites esenciales con potencial como inhibidores de microorganismos responsables del daño de frutos en post-cosecha (Sur y Nielsen, 2003).

Existe un gran interés en evaluar la capacidad de los aceites esenciales como preservantes de alimentos, biocontroladores de microorganismos y virus fitopatógenos, y llegar a establecer ensayos confiables para determinar la dosis mínima a la cual el aceite esencial presenta actividad biológica (Dorman y Deans, 2000). Es necesario desarrollar más profundamente estos estudios con el fin de llegar a la aplicación de los aceites esenciales como biocontroladores, ofreciendo una alternativa al uso de pesticidas de síntesis química, los cuales han presentado diversos problemas en su uso (persistencia ambiental y en la cadena trófica, baja selectividad y resistencia por parte de los microorganismos objetivo) (Crinnion, 2000).

1.4 MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS EVALUADOS COMO OBJETIVOS DE ENSAYOS BIOLÓGICOS

1.4.1 *Botrytis cinerea*



Algunas de las enfermedades más importantes ocasionadas por *Botrytis* incluyen al moho gris de la fresa, la pudrición por el moho gris de las hortalizas tales como la alcachofa, fríjol, remolacha, col, zanahoria, pepino y berenjena, la pudrición del extremo de la punta de los plátanos, lechuga, pimiento, calabaza, tomate, etc., la pudrición del cuello y tizón de la cebolla, la pudrición del extremo del cáliz de las manzanas, el tizón de las ramitas e inflorescencias de arándanos, el tizón o moho gris de plantas ornamentales como la violeta africana, begonia, ciclamino, crisantemo, dalia, geranio, jacinto, lirio, rosal, tulipán, etc. *Botrytis* también ocasiona las pudriciones blandas secundarias de frutos y hortalizas. (Benito y otros, 2000)

Características de la enfermedad.

Es una de las enfermedades más importantes económicamente hablando, para las frutas blandas, entre ellas: la fresa y la uva. Este hongo generalmente ataca al fruto en su desarrollo, maduración, y transporte.

Puede permanecer en porciones de frutos y hojas podridas, en ocasiones esta enfermedad puede atacar hasta el 95 % de frutos después de 48 horas de cosechados.

Agente Causal.

Botrytis cinerea, es un hongo patógeno que se caracteriza por sus abundantes conidios (esporas sexuales), de forma oval en el extremo y conidióforos grises ramificados. El hongo además produce esclerocios altamente resistentes, como formas de resistencia en cultivos viejos.

Botrytis cinerea es un saprofito nato capaz de provocar grandes daños en numerosos cultivos. Cuando todas las clases de solanáceas y hortícolas vegetan bien, casi no son afectadas. Pero, por el contrario, cuando los días son cortos, la luminosidad escasa y las temperaturas son del orden de 15-20° C, las plantas pueden sufrir graves daños. Este hongo destructor precisa de bases nutritivas formadas por hojas senescentes, flores no fecundadas, heridas o muñones de hojas resultantes de las podas, es decir materia orgánica muerta que casi siempre existe en los cultivos, para poder iniciar la incursión de las partes vivas de la planta y destruirla totalmente.

Síntomas.

Puede atacar a cualquier parte de la planta, aunque prefiere los frutos y hojas blandas, tallos tiernos y carnosos. En una parte del fruto, se manifiesta como una mancha amarillenta de consistencia acuosa que se va extendiendo a toda la fruta cubriéndola de un polvo gris.

Un síntoma particularmente sorprendente en los frutos es el denominado "mancha fantasma". En realidad, se trata de ataques de *Botrytis* abortados. Alrededor de un punto central muy pequeño y necrótico se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino sobre el fruto verde y amarillo en el fruto maduro. La calidad gustativa del fruto no sufre, pero si la presentación. (Deacon, J.W. 1998.)

1.4.2 *Alternaria*



El genero *Alternaria sp.* Ataca principalmente a las hojas y en menor grado a los frutos es uno de los más comunes agentes causales de la denominada mancha foliar, es un deuteromiceto se caracteriza por formar un micelio septado y ramificado de un color café-verdoso. Los conidios de *Alternaria sp.* presenta un número variable de septas transversales y ninguna o pocas septas longitudinales. Los principales hospederos son el tomate, papa, berenjena, ají verde, ají picante y otras plantas de la familia solanácea (Ponti y Laffi, 1990)

Características de la enfermedad.

Esta enfermedad, puede atacar a nivel de las plántulas, pero su mayor incidencia, se ha observado atacando a los tejidos senescentes y particularmente a plantas de poco vigor, nutrición deficiente o plantas que crecen bajo algún tipo de adversidad, debido a condiciones desfavorables del clima, insectos, virus, y otras enfermedades.

Además, pueden sobrevivir en el suelo, semillas, residuos de cultivos infestados, y malezas; y ser diseminado con ayuda del viento, agua, insectos, trabajadores, y maquinaria agrícola. (Rueda, Alfredo. y Shelton, Anthony.)

Agente Causal.

Alternaria sp. Es un hongo perteneciente a la clase Deuteromycete del orden Moniliales, sus esporas marrones oscuras, en sus cadenas simples o ramificadas de las extremidades llevan conidioporas oscuras simples y son divididas en varias células por las paredes transversales y verticales. Las esporas nuevas son producidas por la protuberancia del material de la pared, a través de un poro en la extremidad de la espora anterior. El tizón temprano es más severo cuando las plantas están estresadas por mucha fructificación, ataque de nemátodos, o deficiencias de nitrógeno. (Deacon, J. W. 1998).

Síntomas.

El hongo ataca los tallos, hojas y frutas. Este puede ahorcar las plántulas causando mal del cuello (damping-off) en el semillero. En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienen la característica de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de éstas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar los tallos y las frutas. Las manchas en las frutas son similares a las de las hojas con color café y anillos concéntricos oscuros. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorientas y oscuras. Las esporas se pueden observar si a la lesión se le acerca un objeto de coloración clara. (Deacon, J. W. 1998)

1.4.3 *Pseudomonas*



Afecta a todas las partes de la planta. En hojas se ven manchas negras pequeñas, de 1 ó 2 milímetros, que pueden juntarse, secando la hoja. En tallos y peciolo también manchas negras. Tan sólo son atacados los frutos verdes, en los que se observan pequeñas manchas deprimidas de 1 milímetro. El viento, la lluvia y el riego por aspersión diseminan la enfermedad.

Características de la enfermedad.

Las colonias del género *Pseudomonas* colonizan y se multiplican en la superficie de hojas, flores, frutos y cortezas de varias especies vegetales, sin llegar a infectar la planta hospedera. Sin embargo, representan potenciales fuentes de inóculos ya que al presentarse heridas u otras alteraciones en la superficie de las plantas, pueden invadir tejidos profundos y haces vasculares, causando enfermedades significativas. (Urquijo y otros, 1971)

Pseudomonas syringae presenta un amplio rango de hospederos, infecta principalmente al fríjol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*), Manzana (*Malus domestica*), albaricoque (*Prunus armeniaca*), durazno (*Prunus persica*), pera (*Pyrus communis*), cerezo (*Prunus avium*), ciruelo (*Prunus domestica*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cebolla (*Allium cepa*), cítricos, cucurbitáceas, café (*Coffea arabica*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), vicia (*Vicia villosa*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*), así como a un gran número de malezas (Anuario Agrícola 2005).

Agente Causal.

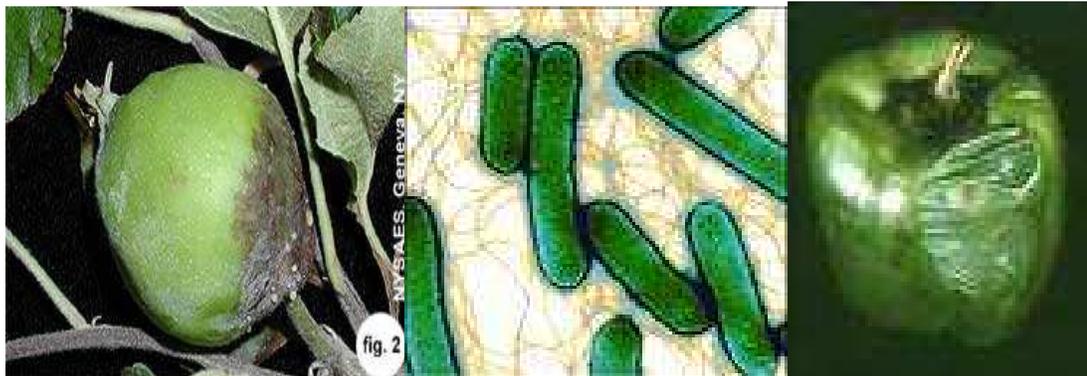
Pseudomonas syringae es una bacteria aeróbica, de forma de bastón, Gram negativo, mide 0.7 x 1.5 micras, es móvil con uno o varios flagelos polares. Las colonias sobre estratos de glucosa agar son de color crema, redondeadas, ligeramente levantadas, de superficie lisa y de márgenes enteros.

Se disemina principalmente por salpicadura de agua de lluvia, por insectos, el viento y la movilización de suelo semilla y material vegetal propagativo. Penetra los tejidos del hospedero a través de los estomas, nectarios, hidátodos o a través de los de heridas causadas por las podas o insectos. Esta bacteria ataca a las planta en todas sus etapas de desarrollo, afecta a hojas, tallos, y semillas, sobre árboles frutales ataca hojas, tallos, troncos, corteza, ramificaciones, yemas, flores y frutos. (Anuario Agrícola 2005)

Síntomas.

Los síntomas de esta enfermedad progresan en la planta de arriba a bajo, es decir, a partir de las hojas hacia el resto de órganos, los cuales se tornan de un color pardo, antes de que la planta se marchite completamente. El marchitamiento se debe a la obstaculización del flujo de la savia por microorganismos que ocupan los haces vasculares; cuando la enfermedad alcanza cierto grado, el color pardo de los tejidos se hacen visibles en la superficie en forma de manchas oscuras. (Urquijo y otros, 1971)

1.4.4 *Erwinia*



Esta bacteria sobrevive en el suelo o medio de cultivo, en tiestos, residuos de plantas, en el agua, por lo menos 1 año sin la planta hospedera y en las hojas de plantas hospederas, no hospederas y en invernaderos. *Erwinia* puede venir en el agua de riego y es diseminada por insectos. En los invernaderos se disemina en el agua de salpicado, herramientas contaminadas y al manejar las plantas.

Características de la enfermedad.

Por lo general presentan en cualquier lugar del mundo donde se cultiven solanáceas. Se encuentran en el suelo en estado latente, iniciándose la pudrición cuando a causa de la saturación del suelo por exceso de lluvias o riego, se producen condiciones anaeróbicas. Sin embargo, cuando persisten las condiciones adversas para el cultivo, la infección avanza hasta los tallos ocasionando la pudrición. Luego los tallos generalmente adquieren una coloración oscura y debido a ello la enfermedad se denomina pierna negra o pata negra.

Organismo Causal.

Las bacterias penetran por heridas, provocando podredumbres acuosas y blandas de olor nauseabundo. En general, la planta muere. En frutos también pueden producirse estas podredumbres

Según la virulencia de la bacteria, la resistencia de la planta y los factores ecológicos, la infección puede propagarse a toda la planta en pocos días, pero si la planta es una especie resistente al ataque, puede desarrollarse normalmente pero sin dejar de manifestar los síntomas de la enfermedad. Es una bacteria muy polífaga (zanahorias, rábanos, patatas, cebollas, tomates, berenjenas, pepinos, espinacas y acelgas) (García, 2000).

Síntomas.

El síntoma inicial es la aparición de una pequeña lesión de aspecto húmedo que va creciendo en hojas, tallos y frutos. Por las grietas producidas sale un exudado pegajoso formado por millones de bacterias. Cuando la podredumbre afecta a las raíces, se observa un oscurecimiento del pie de la planta, en la base del tallo, clorosis y muerte final. (García, 2000).

1.5 Método para determinar la actividad antimicrobiana. Microtitulación en lector ELISA

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactiva económica y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Además se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA a la obtenida en el RIA (radioinmunoensayo) hormonal.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico,

detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales. El uso del lector ELISA para medir el crecimiento bacteriano ha sido reportado en trabajos de investigación enfocados en la búsqueda de sustancias naturales inhibitoras del crecimiento de microorganismos (Cazar, 2006).

Para reportar la actividad antimicrobiana de una sustancia pura o de composición definida, el resultado a obtener debe relacionar a la sustancia en estudio con una medida de su bioactividad. Generalmente, la actividad antibacteriana se reporta con la IC_{50} y la actividad antifúngica con la CIM. La IC_{50} antibacteriana reporta la concentración que inhibe el 50% de crecimiento bacteriano, y la CIM (concentración inhibitoria mínima) expresa la concentración más baja de sustancia que inhibe el crecimiento fungal.

Esta metodología tiene como ventajas el uso de pequeñas cantidades de sustancias de prueba para desarrollar una microdilución. El crecimiento del inóculo se verifica por el aumento de la turbidez en el medio, lo cual se registra en un lector ELISA. (Eloff, 1998).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Microorganismos de prueba.

Para el desarrollo de los bioensayos, los hongos de prueba seleccionados *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp* fueron mantenidos en los medios de cultivo que se describen en el Anexo 3. Se desarrollaron repiques sucesivos de las cepas y se verificó su pureza mediante observaciones al microscopio.

La bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* fue repicada a partir de un cultivo puro. El mantenimiento de esta bacteria se realizó mediante repiques sucesivos. Para garantizar la pureza y viabilidad de esta cepa, la prueba de crecimiento en el medios selectivos (ver Anexo 2) fue realizada en diversas etapas del trabajo experimental.

Erwinia sp fue aislada a partir de material vegetal (*Licopersicum esculentum*) proveniente de un invernadero localizado en sector Zhumir perteneciente al cantón Paute. Se escogieron las partes con síntomas visibles de la enfermedad. (raíz, tallo, hojas, frutos). El material recolectado fue trasladado en fundas de plástico hasta el laboratorio de Investigaciones la Universidad del Azuay. Se procedió a lavar el material vegetal con agua destilada estéril, seleccionando las partes más infestadas con la bacteria. Siguiendo el protocolo descrito en la tesis de Duran-Mosquera (2006) se

desinfectó el material vegetal y se colocó en un medio líquido con indicador de crecimiento bacteriano.

El cultivo se mantuvo en agitación y temperatura constante (150 rpm, 27°C). Transcurridas 24 horas se verificó el crecimiento bacteriano y se procedió a repicar las bacterias en medios sólidos (2. Para identificar el género de la bacteria aislada se procedió a realizar pruebas fisiológicas, bioquímicas y la tinción de Gram, según lo descrito en Schaad y otros, (2001) y la tesis de Durán y Mosquera (2006).

2.1.2 Obtención de aceites esenciales:

Los aceites esenciales estudiados se obtuvieron a partir de material vegetal fresco de las especies seleccionadas, comprado en mercados de la localidad. Después de seleccionar y preparar el material, eliminando tallos y hojas dañadas, se sometió a una extracción por el método de arrastre de vapor. Aproximadamente 1 kilogramo de material vegetal fue colocado en un equipo de extracción marca Albrigi-Luigi, modelo AISI 304. El tiempo medio de extracción fue de 30 minutos, una vez que se alcanza la temperatura de ebullición del agua (92°C). El volumen obtenido de los aceites es variable en relación a la especie. Los aceites fueron colectados y almacenados en frascos ámbar, para evitar posibles alteraciones ocasionadas por la luz solar.

2.1.3 Bioensayo de actividad antibacteriana: Ensayo de microdilución con lector

ELISA

La metodología que se presenta para desarrollar el bioensayo de actividad antimicrobiana realizando microdiluciones y lecturas en lector ELISA, resultó de varios ensayos en los cuales se logró poner a punto las condiciones adecuadas. Se probaron cuatro longitudes de onda y el uso de turbidez o de colorante de actividad celular para discriminar el crecimiento de las bacterias en los micropocillos.

2.1.3.1 Preparación de inóculo: A partir de un cultivo puro de la bacteria de prueba, una colonia fue transferida a 100 mL de medio líquido NB (ver anexo 2.5) El cultivo fue desarrollado en condiciones de agitación y temperatura constante (150 rpm y 27°C) por 24 horas. El enturbiamiento del medio y el tiempo de incubación indica la concentración del cultivo bacteriano (aprox 1×10^6 UFC)

2.1.3.2 Preparación de las soluciones madre de aceites esenciales: Los aceites esenciales a evaluar en el bioensayo fueron diluidos en medio líquido NB, en una proporción 1:1. Las soluciones fueron preparadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y agitadas en vórtex previa su colocación en la placa de 96 pocillos.

2.1.3.3 Preparación de la microdilución: El bioensayo fue desarrollado en condiciones de esterilidad, bajo cámara de flujo laminar. La placa de microdilución fue organizada como sigue:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
A	Dilución seriada de Aceite esencial 1 tres repeticiones										Control de medio de crecimiento	Control de				
B																
C																
D	Dilución seriada de Aceite 2 tres repeticiones												Control de medio de crecimiento	Control de		
E																
F																
G															Control de medio de crecimiento	Control de
H																

Figura 2. Esquema de distribución de la placa de microdilución

En las columnas 1 a 10 se desarrolló la microdilución de los aceites esenciales. Para el efecto, se colocaron 100 μL de la solución patrón con tres repeticiones, que se desarrollaban en tres filas consecutivas. El resto de los pocillos de la placa era llenado con 50 μL de medio de cultivo NB; a excepción de la fila 11, donde se colocaban 100 μL de medio NB, con el fin de controlar las condiciones de esterilidad del trabajo.

La dilución seriada se realizó con la ayuda de una pipeta multicanal de 50 μL . Se tomaron 50 μL de los pocillos de la columna 1 y se transfirieron a la columna 2. Luego de realizar la dilución en el mismo pocillo, se repitió esta operación hasta llegar a la fila 10. El volumen final remanente en las puntas fue descartado.

Finalmente, todos los pocillos de la placa, a excepción de los de la fila 11, fueron inoculados con el inóculo bacteriano, previamente diluido en proporción 1:10 (Hammer *et al.*, 1999)

2.1.3.4 Lectura del bioensayo de actividad antimicrobiana.

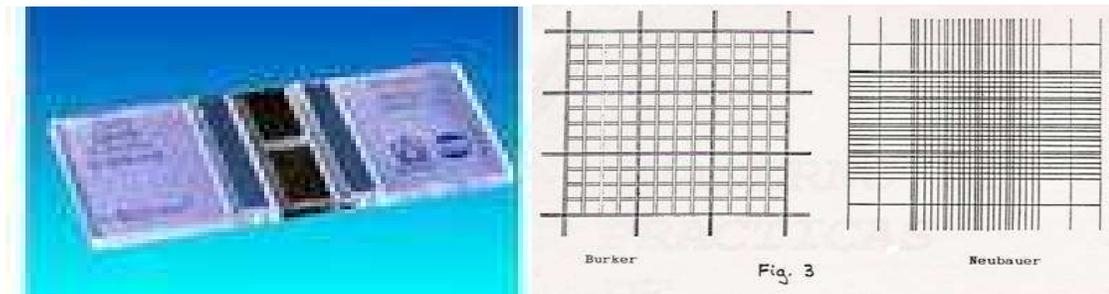
Las placas preparadas como se describe en 4.1.3.3 fueron incubadas por 24 horas a 27°C. Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada pocillo 50 µL de una solución acuosa (0.5 mg /mL) de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium). Después de una incubación por 30 minutos se registró la absorbancia en un lector ELISA (Stat Fax 3200, Awareness Technologies) a $\lambda = 490$ nm.

2.1.4 Bioensayo de actividad antifúngica

2.1.4.1 Recolección y cuantificación de esporas de los hongos fitopatógenos.

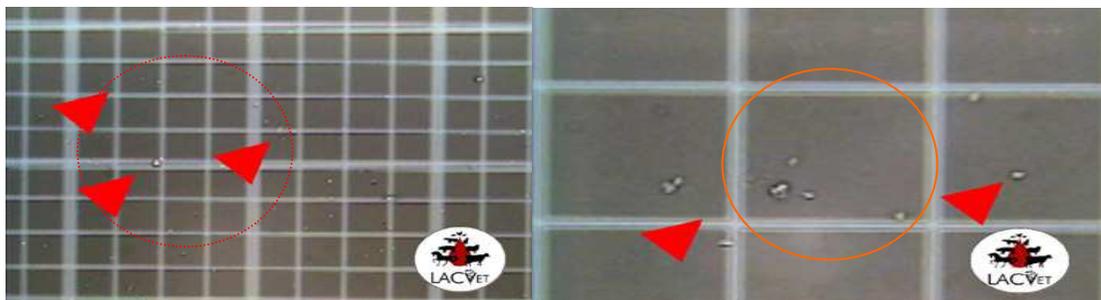
Las esporas de los hongos de prueba son recolectadas de placas bien crecidas, en condiciones estériles. 10 mL de agua destilada estéril fueron colocados en la superficie de las placas, la solución resultante fue filtrada con gasa para retener el micelio del hongo.

Las esporas de hongos fueron cuantificadas mediante recuento en la cámara de Neubauer. Para el efecto, 100 µl de la solución de esporas fueron colocadas en la rejilla de la cámara. Posteriormente, se procede a observar en el microscopio en los diferentes campos usando un objetivo de 40x. Del campo central se escogen 4 cubículos y se estima el medio de esporas de los cubículos. Este promedio se multiplica por un factor de 4×10^6



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura. 3. (a) Cámara de Neubauer (b) Esquema de los campos de la cámara de Neubauer (c) esporas observadas en los campos (d) recuento en cuadrantes

2.1.4.2 Preparación de soluciones y medios para el bioensayo.

Este bioensayo fue realizado utilizando un medio mínimo (ver Anexo 3.3) Las soluciones de trabajo se realizaron como se describe en 4.1.3.2, con la diferencia del medio usado (medio mínimo). Las soluciones fueron agitadas en vórtex previa su utilización en la microplaca.

2.1.4.3 Bioensayo de actividad antifúngica.

Para la realización de este ensayo se siguió el esquema de distribución de la microplaca presentado en la Fig. 2. 100 μL de la solución de aceite esencial fueron colocados en los pocillos de la columna 1, con tres repeticiones para cada aceite, en tres filas consecutivas. La columna 11 se reservó para el control de esterilidad del medio, y en la fila 12 se realizó el control de crecimiento del inóculo fungal.

La dilución seriada se realizó en las columnas 1 – 10, con la ayuda de una micropipeta de 50 μL . Finalmente, cada pocillo, a excepción de los de la columna 11, fue inoculado con 50 μL de la solución de esporas del hongo fitopatógeno. El tiempo de incubación varió de 48 a 72 horas, a una temperatura de 27°C. Al verificar el crecimiento al interior de los pocillos, se reportaba como CIM la concentración más baja de la microdilución que inhibía el crecimiento fungal.

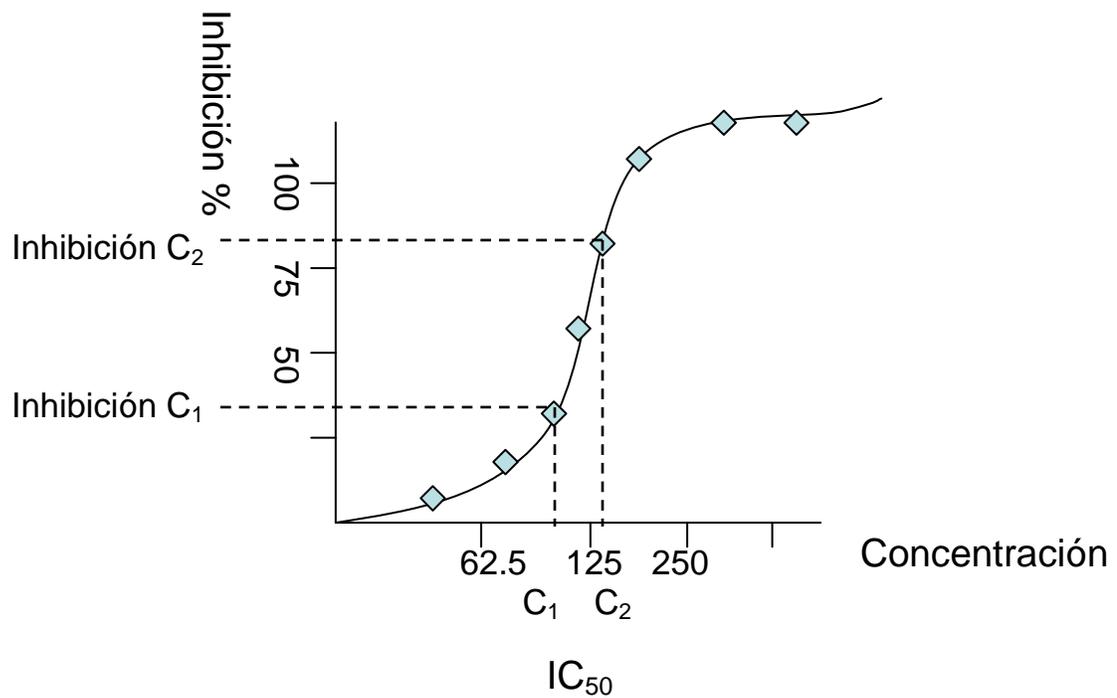
2.1.5 Tratamiento estadístico de datos

Los datos obtenidos en los bioensayos de actividad antibacteriana y antifúngica, fueron analizados obteniendo medias y desviación estándar de las repeticiones.

2.1.6 Determinación de la IC₅₀ para actividad antibacteriana

Los resultados de la dilución seriada fueron analizados para obtener la IC₅₀ de actividad antibacteriana. La IC₅₀ es la concentración de aceite esencial que inhibe el crecimiento bacteriano en un 50%. Para su determinación, se establecen las concentraciones bajo y sobre el 50% de actividad antimicrobiana, según la lectura de absorbancia obtenida.

Luego, se interpola al 50 % de actividad antimicrobiana, según la siguiente fórmula:



$$\text{Inhibición} = a * (\text{concentración de muestra}) + b$$

$$a = \frac{\text{Inhibición}_{C_2} - \text{Inhibición}_{C_1}}{C_2 - C_1}$$

C_2 = La concentración mas baja que presenta más del 50% de actividad en relación al control

C_1 = La concentración mas alta que presenta menos del 50% de actividad en relación al control

$$b = \text{Inhibición } C_1 - (a * C_1)$$

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

CAPITULO III

RESULTADOS OBTENIDOS.

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Rendimiento de aceites esenciales

El rendimiento de los aceites esenciales se calculó mediante la relación de ml/Kg. de material. Se debe mencionar que los rendimientos son variables en función de la época de recolección de material, en nuestro caso las extracciones corresponden a los meses de Marzo y Abril del 2007.

Especie	ml /kg. de material vegetal
Romero (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	8.07
Hierba Luisa (<i>Lippia citriodora</i>)	3.95
Pamba poleo (<i>Mentha pulegium.</i>)	2.45
Hinojo (<i>Foeniculum vulgare Millar</i>)	1.19
Cedrón (<i>Cymbopogon citratus (DC) Staff.</i>)	2.60

Cuadro 1. Rendimiento en mL de los aceites esenciales

3.1.2 Puesta a punto de condiciones experimentales para los bioensayos

El establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de los bioensayos de actividad antimicrobiana y antifúngica permiten presentar un protocolo para el desarrollo de estas pruebas. Este trabajo implicó los siguientes pasos:

- Selección de la longitud de onda adecuada para el bioensayo de actividad antimicrobiana.
- Establecimiento de las condiciones de lectura en ELISA (uso de colorante MTT vs. densidad óptica)
- Establecimiento de medio de cultivo adecuado para el ensayo de actividad antifúngica.

Los resultados obtenidos nos permitieron establecer las siguientes condiciones óptimas para el ensayo de actividad antibacteriana:

- Longitud de onda: 492 nm

- Uso de colorante: MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium).

Además se recomienda una adecuada homogeneización del aceite esencial con el medio de cultivo, mediante el uso de vórtex, antes del desarrollo de la dilución seriada en los pocillos de la microplaca.

Para el ensayo de actividad antifúngica, se estableció como mejor medio de cultivo, el medio mínimo (ver anexo 3.3), el cual favorece el crecimiento de micelio en un tiempo adecuado y no interfiere en la lectura visual de las placas.

3.2.2 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales.

Los aceites esenciales fueron evaluados en su actividad antimicrobiana en un rango de concentraciones desde 50 hasta 0.1 $\mu\text{l}/\text{mL}$. Los bioensayos fueron desarrollados como se describe en la sección de Materiales y Métodos. A continuación se presentan los resultados de actividad antibacteriana y antifúngica.

3.2.2.1 Actividad antibacteriana.

En el siguiente cuadro se presentan las IC_{50} obtenidas para los aceites esenciales en estudio, ante las bacterias fitopatógenas *Erwinia sp* y *Pseudomonas syringae*

<i>Especies vegetales</i>	Bacterias fitopatógenas	
	IC_{50}	
	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Erwinia sp.</i>
CEDRON (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Staff.)	24,0 μL	49,0 μL
HINOJO (<i>Foeniculum vulgare</i> Millar)	49,0 μL	49,0 μL
ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	8,5 μL	49,0 μL
PAMBA POLEO (<i>Mentha pulegium.</i>)	49,0 μL	23,0 μL
H. LUISA (<i>Lippia citriodora</i>)	50,0 μL	49,0 μL

Cuadro 2. Actividad antibacteriana de aceites esenciales ante bacterias fitopatógenas, expresada como IC_{50}

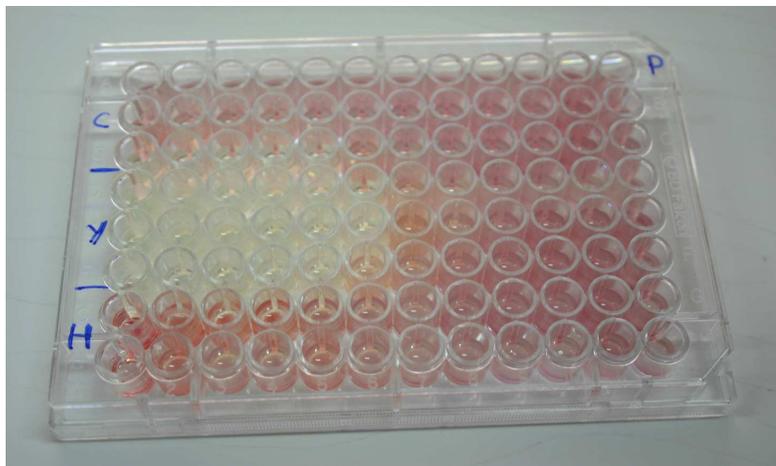


Figura. 4 Placa de ensayo antibacteriano, revelada con MTT.

3.2.2.2 Actividad antifúngica de aceites esenciales

En los bioensayos para valorar la actividad biocontroladora frente a las cepas de hongos *Botrytis* y *Alternaria*, la evaluación de la actividad se realizó de forma visual, estableciendo la inhibición del crecimiento de las cepas en los micropocillos inoculados.

<i>Especies vegetales</i>	Hongos fitopatógenos CIM	
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria sp</i>
CEDRON (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Staff.)	3.12 μ l	12.5 μ l
HINOJO (<i>Foeniculum vulgare</i> Millar	12.5 μ l	6.25 μ l
ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	3.12 μ l	6.25 μ l
PAMBA POLEO (<i>Mentha pulegium.</i>)	0.78 μ l	12.5 μ l
H. LUISA (<i>Lippia citriodora</i>)	0.78 μ l	-----

Cuadro 3. Actividad antifúngica de los aceites esenciales ante los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp*

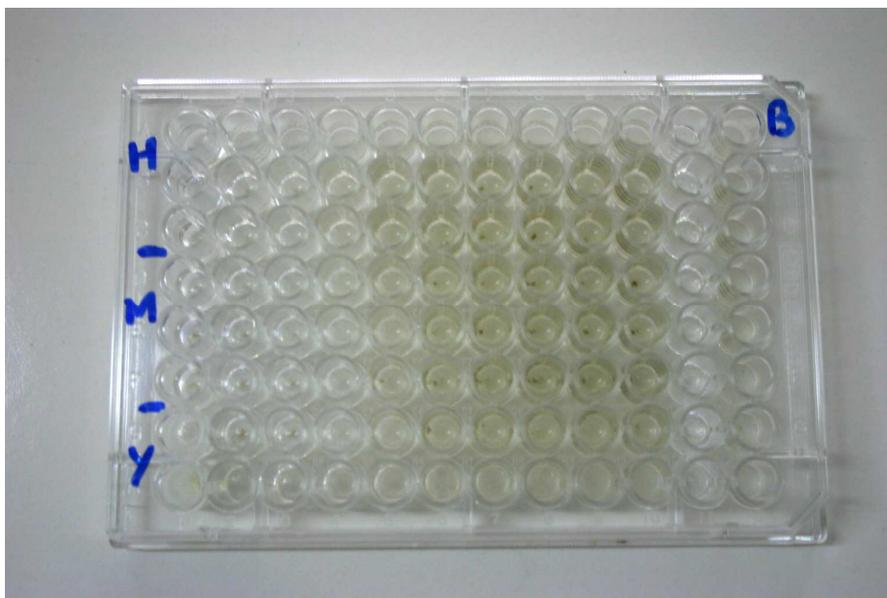


Figura 5. Placa de bioensayo de actividad antifúngica, luego del período de incubación.

3.2.2.3 IC_{50} y MIC de los aceites esenciales estudiados, expresada como concentración volumen / volumen

Los valores de IC_{50} y MIC obtenidos para los aceites esenciales en estudio, son expresados como porcentajes en volumen, con el fin de aproximarnos a la dosis de aplicación que sería efectiva para inhibir el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos usados como objetivos. Para esto se toma en cuenta que el aceite esencial fue diluido en un volumen fijo de medio de cultivo antes de desarrollar el ensayo antimicrobiano en la microplaca. Los resultados presentados nos permiten aproximarnos a la recomendación de preparación para un biocontrolador formulado con aceites esenciales. No obstante, se deben desarrollar pruebas en campo que permitan verificar la actividad y persistencia del aceite esencial en condiciones ambientales.

Aceite esencial	Concentración antimicrobiana (% volumen)			
	<i>P. syringae</i>	<i>Erwinia sp</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria sp</i>
CEDRON	4.90	4.90	0.31	1.25
HINOJO	4.90	4.90	1.25	0.63
ROMERO	0.85	4.90	0.31	0.63
PAMBA POLEO	4.90	2.30	0.08	1.25
H. LUISA	5.00	4.90	0.08	--

Cuadro 4. Concentración antimicrobiana de aceites esenciales estimada a partir de los bioensayos de microdilución en placa

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

La presente investigación fue orientada para establecer las condiciones experimentales que permitan probar la efectividad de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de microorganismos fitopatógenos. Para el efecto se desarrolló un ensayo en el cual se logró establecer la concentración inhibitoria mínima antifúngica (CIM) y la actividad inhibitoria media del crecimiento bacteriano (IC_{50}).

Los aceites esenciales en estudio fueron evaluados en su rendimiento de extracción. En esta investigación, hemos podido determinar que existe diferencia en el rendimiento de los aceites de Romero (*Rosmarinus officinalis L.*), tiene el mejor rendimiento, seguido por la Hierba Luisa (*Lippia citriodor*), Pamba poleo (*Mentha pulegium.*). Las dos especies de menor rendimiento fueron Cedrón (*Cymbopogon citratus (DC) Staff.*) y el Hinojo (*Foeniculum vulgare Millar*). La proporción de eficiencia de extracción es aproximadamente de 1:7, si se compara el aceite de mayor rendimiento con el de menor extracción.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición del crecimiento de bacterias fitopatógenas permiten seleccionar ciertos aceites como biocontroladores promisorios.

El aceite de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), es el más eficiente como inhibidor de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas syringae*. El aceite obtenido de pamba poleo (*Mentha pulegium.*) tiene mayor actividad antibacteriana ante *Erwinia sp.* Cabe destacar que esta especie tiene buenas características de inhibición ante los cuatro agentes fitopatógenos utilizados como microorganismos objetivo.

En cuanto al control de los hongos fitopatógenos podemos destacar que el aceite esencial de pamba poleo (*Mentha pulegium.*) y hierba luisa (*Lippia citriodor*) son los que presentaron mejor resultado de actividad antifúngica de *Botrytis cinerea*, y los aceites de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), e hinojo (*Foeniculum vulgare Millar*) presentan mayor eficacia para controlar *Alternaria sp.*

Los aceites esenciales en estudio demostraron su efectividad como inhibidores del crecimiento de hongos fitopatógenos. Las CIM más baja ante *Botrytis cinérea* corresponden a los aceites de hierba luisa (*Lippia citriodor*) y pamba poleo (*Mentha pulegium.*) (0.78 μ L), como se muestra en el Cuadro 3.

Los aceites de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), e hinojo (*Foeniculum vulgare Millar*) presentan una moderada actividad biocontroladora ante *Alternaria sp* (CIM = 6.25 μ L). El aceite de hierba luisa (*Lippia citriodor*) no presenta actividad antimicrobiana en las condiciones de nuestro bioensayo.

De los resultados obtenidos se puede demostrar la eficiencia de los aceites esenciales como biocontroladores. Los resultados obtenidos con el aceite de pamba poleo (*Mentha pulegium.*), nos permiten señalarlo como biocontrolador promisorio, ya que presenta actividad ante todos los microorganismos usados en este estudio. El aceite de hierba luisa (*Lippia citriodor*) tiene un interesante espectro de acción antimicrobiana, exceptuando *Alternaria sp.*

Además, relacionando el rendimiento de extracción con la actividad biocontroladora demostrada, podemos señalar que el aceite de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), tiene mayor potencial para ser utilizado en la formulación de biocontroladores.

Es necesario recalcar que en todos los cultivos extensivos o intensivos existen grandes riesgos de enfermedades fitopatógenos, estas pueden ser causadas por condiciones de mal manejo o por factores ambientales. Por esto consideramos una alternativa válida el uso de estos aceites esenciales para el control de enfermedades causadas por *Erwinia sp*, *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp.*, con la ventaja de ser una medida de control de enfermedades de plantas complementaria al manejo integrado de plagas.

Recomendaciones:

En base a los resultados del presente trabajo se pueden establecer las siguientes recomendaciones:

- 1) La utilización del aceite de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), puede significar una alternativa para el control de *Pseudomona syringae* en cultivos de solanáceas, hortaliza y flores.
- 2) El aceite de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), e hinojo (*Foeniculum vulgare Millar*) al controlar de manera eficiente a *Alternaria sp.* pueden ser considerados para el control de este patógeno en cultivos susceptibles. Además estos dos aceites, presentan las CIM más bajas en relación al resto de aceites probados, lo que garantiza que podría ser un producto de bajo costo y al alcance de mediano y pequeño agricultor.
- 3) Se recomienda también el uso de los aceites esenciales de pamba poleo (*Mentha pulegium.*), hierba luisa (*Lippia citriodora*), romero (*Rosmarinus officinalis L.*), y cedrón (*Cymbopogon citratus (DC) Staff.*) que actúan eficientemente teniendo las CIM más bajas, para el control de *Botrytis cinerea*. que es un agente fitopatógeno que frecuentemente se presenta en nuestros cultivos.
- 4) Es importante que en base a estos resultados se diseñe el protocolo adecuado para desarrollar pruebas a nivel de laboratorio, invernadero y campo, para demostrar la eficacia de los aceites esenciales como biocontroladores.

BILIOGRAFIA

AGAPITO T., Sung I., (2005). Fito-Medicina 1100 Plantas medicinales Tomo I y Tomo II Pág. 160, 252, 254, 325, 407.

ANUARIO Agrícola (2005). Sistema Integral de información agroalimentaria y pesquera. Disponible en la Web: D:\Documents and Settings\USER\Escritorio\Pseudomonas.htm. Visitado el 08/10/2007

BANDONI, A. (2000) Los recursos vegetales aromáticos en latino América, CYTED Editorial de la Universidad Nacional de La Plata – Argentina.

BENITO, E., Arranz, M., Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología; **17**, pp. S43 – S46

BUCHANAN, B., Grisse, W., Jones, R., Eds. (2000). Natural Products, Biochemistry & Molecular Biology of Plants Physiologists,

CAZAR, M. (2006). Fungicidas y Bactericidas de microorganismos de suelo. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención Investigación y Desarrollo de Productos Naturales. Universidad de Talca, Chile

CRINNION, W. (2000). Pesticides. Biologically persistent and ubiquitous toxins. *Alternative Medicine Review*, **5**, 432 - 447

DEACON, J. W. introduction to Modern Mycology. Traducido por IMENEZ Javier. 2da Ed. Editorial Limusa. Mexico 1998. Pag. 270 – 285. ISBN: 0-632-01156-4

DORMAN, H., Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308 - 316

ELOFF, J. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, **64**, 711 - 713

GARCIA, R (2000). Especies y subespecies de *Erwinia* en Actividad Biocontroladora de hongos de suelo sobre microorganismos fitopatógenos. Tesis para optar al grado de Biólogo. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador.

HAMMER, K., Carson, C., Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. **86**, 985 – 990

LIGON, J. (2001). Enhancing biocontrol agents. *Pesticide Outlook*, DOI 10.1039/b108607n

MANN, C., Markham, J. (1998). A new method for determining the minimal inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, pp. 538-544

PONTI Ivan, Laffi F (1990). *Malattie Crittogamiche Delle Piante Ortive*, Edizioni L'informatore agrario. Segunda Edición. Verona-Italia.

Implementación de la técnica de ELISA para la detección de virus y otros patógenos en plantas en Venezuela. *Revista Digital CENIAP HOY* Número 10, 2006. Maracay, Aragua, Venezuela. ISSN 1690-4117.

RUEDA, Alfredo. SHELTON, Anthony. Tizón Temprano [en línea]. Cornell International Institute for food, Agricultura and Development. Abril 1995 [ref. de 5 de septiembre del 2007] disponible en la Web. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/spanish/eblight.html>.

SCHAAD, N., Jones, J., Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society. ISBN 0 89054 263 5

SUHR, K., Nielsen, P. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, pp. 665 - 674

TRIPATHI, P., Dubey, N. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to posrharvest fungal rotting of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. **32**, pp. 235 -245

URQUIJO, P y otros (1971) Patología vegetal Agrícola. Segunda edición .editorial
Mundi-Prensa, Madrid –España. Pp. 366-367

ANEXOS

Anexo 1

Medios de cultivo

- Agar EMB (Merck)
- Agar Mac Maconkey (Merck)
- Agar Muller-Hinton (Acumedia)
- Agar Nutritivo (DIFCO)
- Agar DEV (Merck)
- Agar citrato según Simmons (Merck)

Reactivos para preparación de medios de cultivo

- Almidón Hidrosoluble (J. T. Baker)
- Azúcares: Glucosa (grado técnico nacional) Maltosa (Merck)
- Lactosa (Mallincrodt) y Sacarosa (Mallincrodt)
- Colorante indicador Rojo de Fenol (Laboratorio Paracelso)
- Colorante Verde de Malaquita (Merck)
- Colorante indicador Azul de Bromotimol (Mallincrodt)
- Eritromicina (MK)
- Extracto de levadura (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Extracto de Malta (Fabricación nacional)
- Glicerol (Merk)
- Parafina líquida (Fabricación nacional)
- Peptona de caseína (Merk, Darmstadt, Alemania)

- Puré de papas deshidratadas, gelatina sin sabor, leche deshidratada, zanahorias, uvas, papas. (adquiridas en comercios locales).

Anexo 2

Medios de cultivo para conservación de bacterias fitopatógenas

Las formulaciones que se presentan a continuación son para preparar un litro de medio de cultivo.

2.1) Caldo Mossel (caldo para enriquecimiento de Enterobacterias)

Peptona	10g
Glucosa	5 g
Bilis de buey	10 g
Verde brillante	0.015 g
Na ₂ HPO ₄	8 g
K ₂ H PO ₄	2 g
Agua	1000 ml.

Disolver la mezcla y ajustar el pH a 7.3. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

2.2) Medio B de king.

Peptona	20 ml.
Sulfato de magnesio	1.5 ml.
K ₂ PO ₄ H	1.18 ml.
Agar-Agar	10 ml.
Glicerina	10 ml.

Agua	1000 ml.
------	----------

2.3) Medio CPG

Acido casamino (se sustituye por Urea)	1 g
Peptona	10 g
Glucosa	10 g
Agar-Agar	18 g
Agua	1000 ml.

Mezclar los componentes en agitación, y autoclavar por 20 minutos a 121°C. Después de la esterilización del medio, añadir en condiciones asépticas (bajo cámara de flujo laminar) una solución de 2.3.5-trifeniltetrazolio cloruro (0.005%)

2.4) Medio YDC

Extracto de Levadura	10 g
Glucosa	20 g
CaCO ₃ P.A	20 g
Agar-Agar	15 g
Agua	1000 ml.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Al preparar el medio, colocar un magneto dentro del recipiente para homogeneizar la mezcla después del autoclavado. Dispensar en placas evitando la sedimentación del CaCO₃.

2.5) Medio Caldo NB

Peptona	7 gr.
NaCl	1 gr.
Extracto Levadura	3 gr.
Agar-Agar	20 gr.
pH (NaOH 0.1 N)	7.5

Disolver y esterilizar en autoclave a 121°C x 15 minutos.

2.6) Medio Agar Nutriente

Peptona	5 gr.
Extracto de carne	3 gr.
Agar-Agar	15 gr.
pH	7 (+/-0.2)
Agua	1000 ml.

Disolver y esterilizar en autoclave a 121°C x 15 minutos.

2.7) Medio Agar Pseudomona F.

Peptona de caseína.	10 gr.
Peptona carne	1.5 gr.
Sulfato de magnesio	1.5 gr.
K ₂ PO ₄ H	1.5 gr.
Agar	12 gr.
Glicerina	10 ml.

pH	7 (+/-0.2)
Agua destilada	1000 ml.

2.8) Medio GSP.

Gluconato sódico	10 gr.
Almidón hidrosoluble	20 gr.
PO ₄ H ₂ K	2 gr.
Sulfato de magnesio	0.5 gr.
Rojo de fenol.	0.36 gr.
Agar-Agar	12 gr.
Penicilina sódica	0.001gr
Agua destilada	1000 ml.

Anexo 3

Medios de cultivo para mantenimiento de hongos fitopatógenos

Las formulaciones presentadas a continuación son para preparar un litro de medio de cultivo.

3.1) Medio (YMG.) Levadura-Malta-Glucosa

Extracto de levadura	4 gr.
Extracto de malta	4gr.
Glucosa	4gr
Agua destilada	1000 ml.

Disolver y esterilizar en autoclave a 121°C x 15 minutos.

3.2) Medio Agar Doble malta.

Extracto de malta	40gr.
Agar-Agar	20 gr.
Agua	1000 ml.

Disolver en 1 litro de agua destilada y autoclavar a 121 °C x 15 minutos.

3.3) Medio Mínimo.

Glucosa	10 gr.
NH ₄ SO ₄	2 gr.
Kh ₂ PO ₄	500 mg.

MgSO ₄	100 mg.
CaCl ₂	10 mg.
Agua destilada	1000 ml.

Disolver en 1 litro de agua destilada.

3.4) Medio Agar Papa-Dextrosa (PDA)

Agar-Agar	20 gr.
Puré de papa	15 gr.
Glucosa	15 gr.
Agua destilada	1000 ml.

3.5) Medio Agar Levadura - Malta

Extracto de levadura	5 gr.
Extracto de malta	40 gr.
Agar-Agar	40 gr.
Agua destilada	1000 ml.

3.6 Medio Papa - zanahoria

Colado de papa	150 gr.
Colado de zanahoria	150 gr.
Agar-Agar	40 gr.
pH.	5.5
Agua destilada	1000 ml.

3.7) Medio Agar uva.

Colado de uva	300 gr.
Agar-Agar	40 gr.
pH.	5.5
Agua destilada	1000 ml.

Anexo 4

Lector Elisa

➤ Stat Fax 3200

Lector de ELISA para Pocillos



Este es un implemento moderno que se encuentra en el laboratorio de investigaciones de la Universidad del Azuay, sirve para utilizarse en placas de 96 micropocillos. Es completamente automático y lee e imprime absorbancias de 96 pocillos en solo 2 minutos. El modelo estándar cuenta con cuatro filtros (405, 450, 492 y 630 nm). Para la presente investigación se estandarizó en filtro de 492 nanómetros, usado para los bioensayos.