

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES  
ESENCIALES Y DE BACTERIAS ENDÓFITAS EXTRAIDAS DE *Lippia alba* y *Lippia  
origanoides* CONTRA *Bulkholderia glumae***

**ANDRÉS FELIPE CANABAL GONZÁLEZ**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN BIOPROSPECCIÓN AGROPECUARIA**

**SINCELEJO 2017**

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES  
ESENCIALES Y DE BACTERIAS ENDÓFITAS EXTRAIDAS DE *Lippia alba* y *Lippia  
origanoides* CONTRA *Bulkholderia glumae***

**ANDRÉS FELIPE CANABAL GONZÁLEZ**

**Trabajo presentado como requisito para optar al título de Biólogo.**

**DIRECTOR:**

**ALEXANDER PÉREZ CORDERO**

**I.A., M.Sc, Ph.D EN MICROBIOLOGÍA**

**CODIRECTOR:**

**DEIMER C. VITOLA ROMERO**

**BIÓLOGO**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN BIOPROSPECCIÓN AGROPECUARIA**

**SINCELEJO 2017**

**NOTA DE ACEPTACIÓN:**

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Sincelejo, Noviembre del 2017

“PERTENECE AL ESTUDIANTE EL DERECHO MORAL SOBRE LA PRODUCCIÓN  
INTELECTUAL QUE REALICE PERSONAL Y/O CON LA ORIENTACIÓN DE UN  
ASESOR O TUTOR, EN DESARROLLO DE LAS ACTIVIDADES ACADÉMICAS” Art. 29  
Res. 1675 del 2012

## **Agradecimientos**

Primeramente toda la gloria y honra a nuestro Dios, en quien deposite toda confianza y esperanza durante esta hermosa carrera, por sus bendiciones en momentos difíciles, siendo mi guía tras los años de estudio.

Un logro muy importante en esta vida y todo gracias a mi madre Clarisa González a quien le debo todos los años de trabajo y esfuerzo para mantenerme y formarme como siempre ha querido, ser un profesional, a toda mi familia quienes creyeron en mis capacidades y apoyo constante, a mi novia Ana María Aguilar quien me apoyo no solo académicamente sino que estuvo allí en los momentos donde más necesitaba, su ayuda, paciencia y comprensión fueron sus mejores armas, a mis amigos quienes de una u otra forma fueron parte influyente en este logro.

Con alegría doy un especial agradecimiento al cotutor de este importante proyecto, el Biólogo Deimer Vitola Romero quien con sus consejos, tiempo y grandes esfuerzos me enseñó el arte de la investigación, siempre apoyándome y sintiéndose más que un compañero, un amigo en quien puedo contar. Gracias al director del proyecto el doctor Alexander Pérez Cordero por la oportunidad, credibilidad y buenos consejos que siempre muestra a sus alumnos y por tener Fe en nuestras capacidades, a todo el grupo de investigación en Bioprospección agropecuaria por su ayuda y asesorías en muchos momentos de duda, amistad y sobre todo una gran familia.

Gracias a la Universidad de sucre por servir como casa del Saber y aprendizaje, donde se forman personas con anhelos y sueños de la vida.

## Tabla de contenido

| <b>Contenido</b>   | <b>Pag.</b> |
|--|-------------|
| Lista de tablas .....  | 9           |
| Lista de figuras.....  | 10          |
| Lista de graficas .....  | 11          |
| Abreviaturas .....   | 12          |
| Resumen.....   | 1           |
| Abstract .....   | 15          |
| <b>1. Introducción</b> .....   | 16          |
| <b>2. Planteamiento problema</b> .....   | 18          |
| <b>3. Justificación</b> .....  | 20          |
| <b>4. Marco Referencial</b> .....  | 21          |
| 4.1 Aceites esenciales.....  | 21          |
| 4.2 Plantas medicinales aromáticas en el departamento de sucre: características y propiedades de sus aceites esenciales..... | 211         |
| 4.2.1 <i>Lippia alba</i> .....   | 211         |
| 4.2.2 <i>Lippia origanoides</i> .....  | 222         |
| 4.3 Bacterias endófitas .....  | 233         |
| 4.3.1 Proceso de colonización endofítica y rizoférica .....  | 233         |
| 4.3.2 Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.....  | 255         |
| 4.4 <i>Burkholderia glumae</i> : causante del añublo bacterial de la panícula del arroz .....                                | 277         |
| 4.4.1 Generalidades de <i>Burkholderia glumae</i> . .....  | 277         |
| 4.4.2 Añublo bacterial de la panícula de arroz. ....   | 27          |
| 4.4.3 Incidencia de la enfermedad en Colombia. ....  | 277         |
| 4.4.4 Sintomatología de la enfermedad. ....  | 288         |
| 4.4.5 Síntomas en la vaina por infección en cultivos establecidos.....   | 288         |
| 4.4.6 Síntomas en la panícula por infección en cultivos establecidos. ....   | 299         |
| <b>5. Objetivos</b> .....  | 30          |
| 5.1 General .....  | 30          |
| 5.2 Específicos .....  | 30          |
| <b>6. Metodología</b> .....  | 31          |
| 6.1 Área de estudio y época .....  | 311         |
| 6.2 Obtención del material vegetal.....  | 311         |
| 6.3 Extracción de los aceites esenciales .....   | 311         |

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| 6.4 Fitopatógono.....   | 321                                   |
| 6.5 Actividad antibacteriana de aceites esenciales contra <i>Burkholderia glumae</i> .....  | 322                                   |
| 6.5.1 Actividad antibacteriana usando el ensayo de MTT. ....  | 322                                   |
| 6.5.2 Actividad antibacteriana mediante unidades formadoras de colonias (UFC). ....   | 332                                   |
| 6.5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>B. glumae</i> .....  | 333                                   |
| 6.6 Comparación en la eficiencia de inhibición <i>in vitro</i> entre los aceites esenciales y el control positivo con ácido oxolínico .....                             | 343                                   |
| 6.7 Aislamiento de bacterias endófitas.....   | 344                                   |
| 6.8 Actividad antimicrobiana de bacterias endófitas contra <i>B. glumae</i> .....   | 354                                   |
| 6.9 Actividad promotora de crecimiento.....   | 355                                   |
| 6.9.1 Fijación biológica de nitrógeno. ....   | 355                                   |
| 6.9.2 Solubilización de fosfato. ....   | 366                                   |
| 6.9.3 Producción de sideróforos. ....   | 366                                   |
| 6.10 Análisis químico.....  | 377                                   |
| 6.11 Análisis estadístico.....  | 377                                   |
| <b>7. Resultados.....</b>   | <b>¡Error! Marcador no definido.8</b> |
| 7.1 Clasificación científica de los ejemplares vegetales .....  | 388                                   |
| 7.2 Actividad antibacteriana de aceites esenciales contra <i>Burkholderia glumae</i> .....  | 388                                   |
| 7.2.1 Actividad antibacteriana usando el ensayo de MTT. ....  | 388                                   |
| 7.2.2 Actividad antibacteriana empleando el ensayo de unidades formadoras de colonias (UFC).....  | 40                                    |
| 7.2.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Lippia alba</i> . ....   | 455                                   |
| 7.2.4 Concentración bacteriana de <i>B. glumae</i> expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC) de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .....                | 466                                   |
| 7.2.5 Concentración mínima inhibitoria de <i>Lippia organoides</i> .....  | 466                                   |
| 7.2.6 Concentración mínima inhibitoria de <i>B. glumae</i> expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC) de aceites esenciales de <i>Lippia organoides</i> . .... | 477                                   |
| 7.3 Comparación de la eficiencia de inhibición <i>in vitro</i> entre los aceites esenciales y el control positivo con ácido oxolínico .....                             | 488                                   |
| 7.4 Actividad antimicrobiana de bacterias endófitas contra <i>B. glumae</i> .....   | 51                                    |
| 7.5 Actividad promotora de crecimiento de las bacterias endófitas.....  | 533                                   |
| 7.6 Quimiotipos encontrados en los aceites esenciales de <i>L. alba</i> y <i>L. organoides</i> por la metodología (GC-MS).....  | 544                                   |
| <b>8. Análisis de resultados .....</b>  | <b>575</b>                            |
| <b>9. Conclusiones .....</b>  | <b>642</b>                            |
| <b>10. Recomendaciones .....</b>  | <b>643</b>                            |

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| <b>11. Referencias</b> ..... | 664 |
| <b>12. Anexos</b> .....      | 818 |



## Lista de tablas

|   | <b>Pág</b> |
|---|------------|
| Tabla 1 Analisis de varianza para actividad inhibitoria.....                                    | 41         |
| Tabla 2 Pruebas de múltiple rangos para actividad inhibitoria por tipo de ensayo .....          | 42         |
| Tabla 3 Pruebas de múltiple rangos para actividad inhibitoria por tipo de planta.....           | 42         |
| Tabla 4 Prueba de múltiple rangos para actividad inhibitoria por concentración.....             | 43         |
| Tabla 5 Análisis de varianza para cinética de inhibición.....                                   | 49         |
| Tabla 6 Pruebas de múltiple rangos para cinética de inhibición por tratamiento antibacteriano . | 50         |
| Tabla 7 Pruebas de múltiple rangos para cinética de inhibición por horas.....                   | 50         |
| Tabla 8 Resultados finales del ensayo promotor de crecimiento, tabla consenso .....             | 54         |

## Lista de figuras

|   | <b>Pág</b> |
|---|------------|
| figura 1 Proceso de colonización endofítica y rizoférica.....   | 24         |
| figura 2 Clasificación científica de los ejemplares vegetales .....   | 38         |
| figura.3 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra <i>B. glumae</i> ensayo de MTT.....  | 39         |
| figura 4 actividad antibacteriana de <i>B. glumae</i> expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC).....  | 40         |
| figura 5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Lippia alba</i> .....   | 45         |
| figura 6 UFC de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .....  | 46         |
| figura 7 Concentración mínima inhibitoria de <i>Lippia organoides</i> .....   | 46         |
| figura 8 UFC de aceites esenciales de <i>Lippia organoides</i> .....  | 47         |
| figura 9 Cinética de inhibición de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , <i>Lippia organodes</i> y ácido oxolínico contra <i>B. glumae</i> ..... | 48         |
| figura 10 Atividade antimicrobiana de bacterias endófitas contra <i>B. glumae</i> .....   | 52         |
| figura 11 Actividad promotora de crecimiento, sideroforo, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno. ....   | 53         |
| figura 12 Espectro experimental del timol, quimiotipo identificado en el aceite esencial de <i>L. organoides</i> .....                                    | 56         |
| figura 13 . Espectro suministrado por la base de datos NIST2011 del timol, quimiotipo identificado en el aceite esencial de <i>L. organoides</i> .....    | 57         |
| figura 14 Estructuras fragmentadas a partir del timol.....  | 57         |

## **Lista de graficas**

|  | <b>Pág</b> |
|--|------------|
| Grafica 1 Actividad inhibitoria por tipo de ensayo.....                        | 43         |
| Grafica 2 Actividad inhibitoria de aceites esenciales por tipo de planta ..... | 44         |
| Grafica 3 Cinetica de inhibicion por tratamiento antibacteriano .....          | 51         |

## **Abreviaturas**

**MMt:** millones de toneladas

**MWHD:** Hidrodestilación asistida por radiación de microondas.

**ppm:** Partes por Millón.

**GC-MS:** Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masa.

**RT:** Tiempo de retención

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**CMI:** concentración mínima inhibitoria

**Msnm:** metros sobre el nivel del mar

## Resumen

La agricultura ha sido la principal fuerza impulsadora del desarrollo de los territorios rurales colombianos, encabezada por los cultivos de maíz y café, el arroz ocupa el tercer puesto en extensión con un 30% de los cultivos transitorios. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento en las enfermedades sobre estos cultivos. Tal es el caso del añublo bacterial de la panícula del arroz, causada por *Burkholderia glumae* que produce pudrición del grano generando pérdidas entre el 15 al 80% de la producción. Aunque se han implementado metodologías de manejo integrado y uso de agroquímicos como el ácido oxolínico para mitigar el desarrollo de la bacteria, el cual no ha mostrado resultados satisfactorios, debido a que este producto después de las 48 horas pierde su efecto bactericida, y el uso excesivo genera resistencia bacteriana y contaminación ambiental. Por lo tanto, con esta investigación se buscó implementar nuevas estrategias de biocontrol mas afines con el ambiente, a través del uso de bacterias endófitas y aceites esenciales extraídos de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* para disminuir las pérdidas en los cultivos de arroz causado por *B. glumae*, obteniéndose resultados promisorios que ambos aceites esenciales inhiben al patógeno en un 100%. Además, *L. origanoides* mostro un 100% de inhibición a su concentración más baja que fue de 90 ppm, ejerciendo su efecto desde la primera hora de aplicación. En adición, *L. alba* mostró inhibición a 1550 ppm con un 80% de efectividad en la primera hora de aplicación, superando al ácido oxolínico. Por otra parte, la confrontación de bacterias endófitas contra *B. glumae* también mostro resultados satisfactorio contra la bacteria patógena y además estas bacterias *in vitro*

presentaron capacidad de promoción de crecimiento. Los perfiles químicos de los aceites esenciales mostraron como metabolito secundario mayoritario al timol con un porcentaje de área de 68% para el aceite esencial de *L. origanoides*, mientras que *L. alba* contiene geranial y neral en 35% y 29% respectivamente.

**Palabras claves:** *B. glumae*, aceite esencial, quimiotípos, metabolitos, fitopatógenos

## Abstract

Agriculture has been the main driving force for the development of Colombian rural territories, led by maize and coffee crops. Rice ranks third with 30% of transitional crops. However, in recent years there has been an increase in diseases on these crops. Such is the case of the bacterial blight of the rice panicle, caused by *Burkholderia glumae* that produces grain rotting, generating losses between 15 and 80% of the production. Although methodologies of integrated management and use of agrochemicals such as oxolinic acid have been implemented to mitigate the development of the bacterium, which has not shown satisfactory results, since this product after 48 hours loses its bactericidal effect and the use excessive bacteria generates bacterial resistance and environmental pollution. Therefore, this research sought to implement new biocontrol strategies that are friendly to the environment through the use of endophytic bacteria and essential oils extracted from *Lippia alba* and *Lippia origanoides* to reduce losses in rice crops caused by *B. glumae*, promising results that both essential oils inhibit the pathogen by 100%. In addition, *L. origanoides* showed 100% inhibition at its lowest concentration which was 90 ppm, exerting its effect from the first hour of application. In addition, *L. alba* showed inhibition at 1550 ppm with 80% effectiveness in the first hour of application, surpassing oxolinic acid. On the other hand, the confrontation of endophytic bacteria against *B. glumae* also showed satisfactory results against the pathogenic bacterium and in addition these bacteria in vitro presented capacity of promotion of growth. The chemical profiles of the essential oils showed a major secondary metabolite to thymol with a percentage area of 68% for the essential oil of *L. origanoides*, whereas *L. alba* contains geranium and neral in 35% and 29%, respectively.

**Key words:** *B. glumae*, essential oil, chemotacts, metabolites, phytopathogens

## 1. Introducción

Históricamente, la agricultura ha sido la principal fuerza que impulsa el desarrollo y la transformación de los territorios rurales (Perfetti, Hernández, Leibovich y Balcázar, 2013). En el contexto mundial, Colombia está clasificado en el puesto número 23 en términos de producción de arroz, ocupando en América el cuarto lugar precedido por Brasil, Estados Unidos y Perú (Méndez del Villar, 2011).

Según la organización para las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO, 2017) la producción mundial de arroz en el año 2016 fue de 751.9 millones de toneladas (MMt), siendo 499.2 MMt del arroz elaborado, la cual aumento el 1.6% sobre el bajo nivel del 2015, es sabido que la alta producción o pérdida del cultivo se ve afectada por las condiciones climáticas, las cuales en algunos casos favorecen la proliferación de enfermedades, así mismo la FAO estima una producción de 758.9 MMt para el 2017, contando con condiciones climáticas y de crecimiento normal, con 503.8 MMt arroz elaborado, aumentando un 0.9% anual.

En Colombia el arroz es el tercero en extensión, después del café y el maíz en los cuales se ve representado en un 13% del área cosechada y estimado en un 30% de los cultivos transitorios del país (DANE-Fedearroz, 2010), siendo un cereal de alta importancia para el sistema agropecuario nacional, pero es de resaltar que en los últimos años se ha observado un incremento en enfermedades presentadas en los cultivos (Pérez, 2010).

La enfermedad que causa más daños en estos cultivos es el añublo bacterial de la panícula del arroz, una enfermedad que produce pudrición de las plántulas y del grano, causado por la bacteria *B. glumae* (Devescovi *et al.*, 2007), transmitida por la semilla (Sayler, Cartwright &



Yang, 2006; Nandakumar *et al.*, 2009) causando disminución desde el 15% hasta un 80% de la producción total (Ham, Melanson & Rush, 2011).

Se ha implementado metodologías de manejo integrado del cultivo, buscando minimizar la incidencia de enfermedades estableciendo época de menor riesgo, (Pérez y Saavedra, 2011). Usar semilla certificada, variedades de arroz resistentes (Shahjahan, Rush, Groth & Clark, 2000; Saichuk *et al.*, 2011) y sustancias químicas. Sin embargo, aún no se han conseguido resultados satisfactorios, además que estos compuestos químicos son perjudiciales para el ambiente, por lo tanto, con esta investigación tuvo como propósito implementar nuevas alternativas amigables con el medio mediante el uso de aceites esenciales vegetales y bacterias endófitas extraídas de plantas medicinales para contrarrestar los efectos patogénicos de *B. glumae*.

## 2. Planteamiento problema

Los cultivos de arroz producidos en gran cantidad son frecuentemente asechados por una gran variedad de microorganismos patógenos principalmente *B. glumae*, *B. gladiolii*, *Acidovorax avenae* y *Pseudomonas fuscovaginae* causante de muchas enfermedades, los cuales invaden órganos importantes en las plantas que van desde la semilla, tallos, hojas e inflorescencias, reduciendo la calidad y cantidad del cultivo (Caro, 2012).

*B. glumae*, es una bacteria Gram-negativa, principalmente comprometida en afectar la panícula del arroz provocando la enfermedad conocida como el añublo bacterial causante de grandes pérdidas económicas, por tanto es de suma importancia implementar un buen manejo integral para evitar grandes impactos en la productividad nacional (Quesada & García, 2014). Además de usar pesticidas y otros agentes químicos para controlar estos entes fitopatógenos (Hernández, Heydrich, Velázquez y Hernández, 2006).

En el mercado se encuentran un sinnúmero de productos químicos, de los cuales los productores de arroz hacen uso constante para contrarrestar cualquier plaga presentada en los cultivos, inicialmente pudieron ser efectivos pero el uso indiscriminado de estos ha llevado a crear cepas resistentes (Tikhonovich & Provorov, 2011). Teniendo en cuenta el problema ocasionado por el uso constante de sustancias de origen químicas, fedearroz ha evaluado el comportamiento de la bacteria *B. glumae* contra diferentes antibióticos, tales como por ejemplo Clorhidrato de biguanidina, , Aceites cresolados, Kasugamicina 1, Kasugamicina 2, Amonio Cuaternario, Validamicina A, Mancozeb, Carbendazim, Cloruro de benzalcaina, Complejo Yodopolietanol y Sulfato de gentamicina + Clorihidrato Oxitetraciclina, quien este último mencionado fue el que presento mayor inhibición contra *B. glumae* estando a un nivel parecido al ácido oxolínico, el

cual es la sustancia química mejor conocida hasta el momento y obteniendo como resultado la superioridad bacteriana frente a tales tratamientos (Ospina y Beltrán, 2010 tomado de Pedraza, 2012)

El ácido oxolínico ha demostrado ser efectivo contra *B. glumae* en condiciones *in vitro* (Correa, Pérez y Saavedra, 2007). Pero el uso indiscriminado de este agente químico ha pasado de ser la solución, a convertirse en problema, puesto que las bacterias tienden a resistir sustancias químicas a las cuales se adaptan debido al uso excesivo e indiscriminado frente a los cultivos. La resistencia bacteriana al ácido oxolínico proviene de unas mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* ya que presentan cambios en los aminoácidos de las sub unidades de DNA girasa, evitando que el ácido oxolínico detenga la replicación (Hassouan, 2006). Surgiendo cepas bacterianas ácido oxolínico-resistentes (Ham *et al.*, 2011). A raíz del problema, Pedraza (2012) sugiere que a medida de las cepas ácido oxolínico resistentes aumentan, se deberían utilizar mecanismos biológicos que contaminen menos al ambiente y que sean eficientemente iguales, el método químico es efectivo pero la cantidad de energía utilizada lo hace un mecanismo costoso.

Si se desea conservar un sistema de producción sustentable, se hace necesario minimizar el uso de agroquímicos en la actualidad, debido a que su uso ha carreado por un lado la resistencia bacteriana y por otro el deterioro del ambiente, ya sea por inhibición de la microbiota benéfica que interactúa con los cultivos, la contaminación del suelo, cuerpos de agua y el aire, además de ser perjudiciales para la salud humana y animal (Tikhonovich & Provorov, 2011).

El presente estudio tuvo como pregunta de investigación la siguiente ¿los aceites esenciales y las bacterias endófitas extraídas de plantas de *Lippia alba* y *Lippia organoides* tienen actividad inhibitoria contra *B glumae* causante del añublo bacterial de la panícula en cultivo de arroz?

### **3. Justificación**

Entendiendo la gravedad del problema se han creado estrategias que sustituyen parcial o en su totalidad la dependencia a agroquímicos y así poder acercarse a una agricultura sustentable, por lo cual los aceites esenciales, representan una gran alternativa, debido a que han tomado mucha fuerza por su efectividad contra diferentes patógenos, ya sean fúngico, bacterianos o virales, siendo eficaces en pequeñas concentraciones (Vásquez, 2012). Así mismo, el uso de bacterias endófitas han demostrado tener acción como control biológico contra algunos entes patógenos (Pérez y Pérez, 2013). Además que estimulan varias funciones promotoras de crecimiento como lo es la asimilación de nitrógeno y la captación de algunos compuestos esenciales para un óptimo crecimiento y desarrollo de los cultivos (Bhattacharyya & Jha, 2012).

## 4. Marco Referencial

### 4.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son catalogados como compuestos volátiles de olor característico, naturales y complejos, presentes en plantas aromáticas (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008). Entre las principales familias de plantas productoras de aceites esenciales tenemos a Myristicaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Apaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Verbenaceae, Rosaceae, Piperaceae y Rutaceae (Simões & Spitzer, 2000). Mayormente los aceites esenciales están compuestos químicamente por monoterpenos y sesquiterpenos, al igual encontramos fenoles aromáticos, esterés, alcoholes, óxidos, éteres, aldehídos y cetona. Tales compuestos se creé que están relacionados con sus propiedades herbicida, bactericida y fungicida (Bakkali *et al.*, 2008).

### 4.2 Plantas medicinales aromáticas en el departamento de sucre: características y propiedades de sus aceites esenciales

#### 4.2.1 *Lippia alba*.

Primeramente *L. alba* se encuentra comprendida dentro del género *Lippia*, la cual cuenta con unas 200 especies aproximadamente distribuidas por regiones tropicales, subtropicales y templadas de América, África y Asia. *L. alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton y P. Wilson, corroborando con los datos de la colección científica en la línea del herbario de la Universidad Nacional de Colombia (2014). Esta planta se encuentra incluida en el reino Plantae; filum Magnoliophyta; clase Magnoliopsida; orden Lamiales; familia Verbenaceae, Teniendo 139 registros en el país hasta el día de hoy, de los cuales 26 son para la región caribe y 30 corresponden a la especie *L. alba* (Vitola y Hernández, 2015)

La planta es un arbusto aromático cultivado comercialmente en América Latina de diversos países como por ejemplo México, Colombia, Paraguay, Brasil, Uruguay y Argentina (Mamun, Sem, Jamal & Nasrin, 2013). Es conocida también por su nombre vulgar, el cual cambia dependiendo del país, para Colombia es llamada “pronto alivio” taxonómicamente hablando encontramos que sus hojas son membranosas, pecioladas, pubescentes, lugar en donde se encuentra una alta cantidad de aceites esenciales, estos aceites se localizan en la epidermis, en las glándulas secretoras para ser más específicos, estructuras conocidas como tricomas glandulares, sus miembros difieren en diferentes formas, pueden presentar una base cuneiforme o decumbente, ápice agudo y bordes dentados o irregulares (Gruenwald & Galizia, 2005).

Sus aceites esenciales se caracterizan por presentar compuestos fenólicos naturales, los cuales presentan propiedades de gran importancia como antibacterianos y antifúngicos principalmente además de ser acaricidas, antiacné, antioxidante entre otras. (Vásquez, 2012).

#### ***4.2.2 Lippia origanoides.***

Planta aromática también comprendida dentro del género *Lippia*, es conocida por sus propiedades farmacológicas, perteneciente de la familia Verbenaceae. Es un arbusto que puede alcanzar los 3 metros de altura, posee hojas verdes ovaladas muy aromáticas e inflorescencias en racimo, axilares y blancas. Crece en forma silvestre en América central, el norte de América del sur y las Antillas. (Hennebelle, Sarpaz, Joseph & Bailleul, 2008; Pascual, Slowing, Carretero, Sánchez & Villar, 2001). En Colombia puede encontrarse en altitudes que oscilan de 500 a 800 msnm, en diferentes departamentos que van desde el norte de la península de la Guajira, hasta departamentos de la región andina. (Stashenko, Ruiz, Muñoz, Castañeda & Martínez, 2008). Se han identificado en Colombia la presencia de tres quimiotipos en el aceite esencial los cuales son

trans- $\beta$ cariofileno/r-cimeno, timol y carvacrol, proporcionándoles así las diferentes propiedades para el cual son utilizadas en aplicaciones etnofarmacológicas. (Oliveira *et al.*, 2007).

### **4.3 Bacterias endófitas**

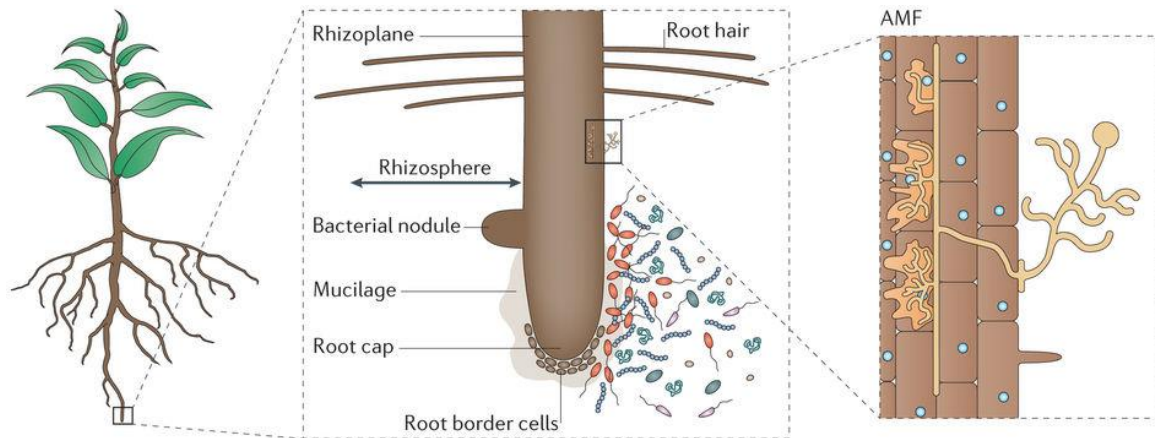
Son denominadas todas aquellas bacterias que son aisladas de la superficie o el interior de la planta, estas no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Pérez, Rojas y Fuentes, 2010). Diversos estudios hechos anteriormente infieren en que las bacterias endófitas ejercen control biológico sobre Fitopatógenos (Sessitch, Reiter, Pfeifer & Wilhelm, 2002). Promueven el crecimiento de las plantas hospederas (Tsavkelova, Cherdyntseva, Botina, & Netrusov, 2007). Ayudan a la planta a adquirir resistencia contra enfermedades (Chanway, 1998). Contribución a la fijación biológica del nitrógeno (Hurek & Reinhold, 2003). Solubilización de fosfato (Hameeda, Harini, Rupela, Wani & Reddy, 2008). Además de brindar protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Berg *et al.*, 2005).

Primeramente se había utilizado el término de “Rizobacteria” el cual fue introducido en el año 1978 para referirse a aquellas bacterias encontradas en el suelo que luego colonizarían las raíces de las plantas (Kloepper & Schroth, 1978). Luego en 1981 estos mismos autores dieron el nombre de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. En la actualidad los microorganismos promotores de crecimiento no se limitan solo a rizobacterias, ya se incluyen hongos como por ejemplo las micorrizas y otras bacterias de vida libre.

#### **4.3.1 Proceso de colonización endofítica y rizoférica.**

Primeramente se da un desplazamiento de las bacterias hacia las raíces de la planta, esta movilización se realiza mediante quimiotaxis, dando como resultado la interacción de los microorganismos con la raíz, se da liberación de ciertos compuestos orgánicos de la planta al

suelo, los cuales son llamados fotositatos o exudados, esos compuestos conllevan concentraciones importantes de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, orgánicos, fenólicos, azúcares y vitaminas, los cuales son una gran fuente de nutrientes para los microorganismos. (Uren, 2007; Prasha, Kapoor, & Sachdeva, 2014).



Nature Reviews | Microbiology

Fuente: (Philippot, Raaijmakers, Lemanceau & Van Der Putten, 2013).

*Figura 1.* Proceso de colonización endofítica y rizoférica. En la figura se observa a los microorganismos son “atraídos” hacia la rizósfera y la superficie de las raíces, aquí da lugar la colonización, más comúnmente este procedimiento se da en los extremos de las raíces ya que aquí es donde ellas se extienden en su máximo para la elongación radicular y en los puntos de emergencia de los pelos radiculares.

Ya en contacto los microorganismos con la raíz, estos forman micro-colonias, y es aquí donde inician la colonización endofítica (Hardoim, Overbeek, & van Elsas, 2008). Ya establecidos allí, estos entran por la corteza de las raíces en los puntos de emergencia de las raíces laterales, luego si bien estos microorganismos pueden establecerse allí o pueden avanzar por los sistemas internos de transporte hacia las diferentes partes la planta (Hardoim *et al.*, 2008).



### **4.3.2 Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.**

Las bacterias promotoras de crecimiento son aquellas que por métodos directos o indirectos estimulan el crecimiento de las plantas, el método directo es aquel donde las bacterias facilitan el acceso a los nutrientes poco disponibles a la planta, además que estas a su vez pueden modular hormonas que estén implicadas en el crecimiento vegetal (Glick, 2012). Algunos de estos mecanismos promotores de crecimiento encontramos a la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfato y sideróforo.

**4.3.2.1 Fijación biológica del nitrógeno.** Este proceso biológico es aquel donde se da una conversión del nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) en amonio. Solo en bacterias y arqueas ha sido identificado este proceso hasta el día de hoy. Este proceso permite que la biosfera se supla con nitrógeno, además de compensar pérdidas generadas por efectos de desnitrificación. (Rubio & Ludden, 2005).

**4.3.2.2 Solubilización de fosfatos.** En el suelo existen una gran cantidad de nutrientes pero no todos están en abundancia, algunos presentan cierto tipo de limitante, tal es el caso del fósforo, el cual se considera que es el segundo nutriente con mayor limitante para el crecimiento de la planta, su mayor concentración está en el suelo, pero la mayor parte de sales de fosforo son insolubles en agua (75-90% del total del fósforo presente en suelos) ya que estos forman complejos con metales como el hierro, aluminio y calcio, generan precipitación y adsorción en los suelos (Igual, Valverde, Cervantes, & Velázquez, 2001). Las plantas tienen la capacidad de captar el fosforo en formas de iones monobásicos (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) y di básico (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Sabiendo esto, la suministración de este elemento se da por fertilización tradicional o por la contribución de microorganismos solubilizadores (Igual *et al.*, 2001).

Son conocidas dos vías por las cuales los microorganismos asimilan el fosforo, una de las vías es que tienen la capacidad de secretar enzimas como fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas que solubilizan el fósforo a partir de fuentes orgánicas (mineralización de fosfato orgánico). Y la segunda vía se da por liberación de ácidos orgánicos (ácido glucurónico, por ejemplo) y cationes (generalmente hidrogeniones) que son capaces de solubilizar el fosfato de fuentes inorgánicas. (Rodríguez & Fraga, 1999; Hamdali, Hafidi, Virolle & Ouhdouch, 2008; Richardson Barea, McNeill & Prigent, 2009).

**4.3.2.3 Producción de sideróforo.** Las bacterias, hongos y algunas plantas monocotiledóneas producen compuestos denominados sideróforos de bajo peso molecular (400-1000Kda) en condiciones limitantes de hierro, es sabido ya que dichos compuestos tienen una alta afinidad por los iones férricos, por lo cual es el método más empleado para la adquisición del elemento (Andrews, Robinson, & Rodríguez, 2003; Katiyar & Goel, 2004; Saha, Saha, Donofrio & Bestervelt, 2013). Teniendo en cuenta que el hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante en la tierra, su disponibilidad para los organismos es bastante baja (Loper & Buyer, 1991). Por lo tanto el uso de bacterias endófitas se hace necesario.

Las bacterias que producen sideróforos en ambientes con limitantes de hierro actúan de dos formas, la primera es acaparando el hierro no dejándolo disponible a los microorganismos patógenos, dicho comportamiento puede ser tomado como biocontrol, y la segunda forma es aportando los complejos Fe-sideróforo los cuales son termodinámicamente estables a las plantas que son capaces de adquirirlo (Kloepper, Leong, Teintze & Schroth, 1980; Loper & Buyer, 1991; Katiyar & Goel, 2004). Este último mecanismo aún se encuentra en estudio.

#### **4.4 *Burkholderia glumae*: causante del añublo bacterial de la panícula del arroz**

##### **4.4.1 Generalidades de *Burkholderia glumae*.**

Descrita por primera vez como *Pseudomonas glumae*, haciendo su primera aparición registrada en Japón descrita como agente causal de la pudrición del grano de arroz, es conocida por otros nombres dependiendo de las etapas en el crecimiento de la planta en donde esta sea afectada, es conocida también como causante de la pudrición de la vaina y de la pudrición de la panícula, todos los síntomas anteriores en conjunto se conocen como la enfermedad del añublo bacteria de la panícula (Ham *et al.*, 2011). Y desde esa fecha se ha reportado en los grandes países y continentes productores de arroz, como por ejemplo en Asia Oriental y en América Latina (Correa *et al.*, 2007). En Estados Unidos *B. glumae* fue llamada el agente causal del tizón bacterial de la panícula (Nandakumar *et al.*, 2009)

##### **4.4.2 Añublo bacterial de la panícula de arroz.**

Ha provocado grandes pérdidas en el mundo a los grandes países productores de arroz, la enfermedad fue reportada por primera vez en Japón en 1967 (Kurita & Tabei, 1967). 2005 fue el año donde reportaron en cultivos estadounidenses esta enfermedad (Nandakumar *et al.*, 2009) posterior a eso en 2006 se reportó para Panamá y en 2007 por primera vez en Colombia, ocasionando pérdidas en el departamento de Córdoba (Pérez y Saavedra, 2011).

##### **4.4.3 Incidencia de la enfermedad en Colombia.**

*B. glumae* fue reportada por primera vez en 1987 pero solo hasta el año 2007 se presentaron grandes pérdidas en el departamento de Córdoba (Pérez y Saavedra, 2007), a partir de allí FEDEARROZ (fondo nacional de arroz) empezó un trabajo de monitoreo fitosanitario confirmando que el patógeno se encontraba en diferentes zonas arroceras de Colombia (Pérez y

Saavedra, 2011). El cuadro afectado en Colombia ha dejado varios departamentos infectados por la enfermedad tales como el ya mencionado departamento de Córdoba (la doctrina, montería) y Bolívar (María la baja) (Pérez, 2009; Pérez y Saavedra, 2011), Otros departamentos en la parte central como Tolima (Ambalema, Saldaña) y Huila (Campoalegre) (Pérez, 2009). Y por técnicas de PCR presentada en algunas muestras de varios departamentos como Cesar, Meta, Santander, Sucre y Valle del Cauca, dando a entender que la bacteria *B. glumae* está distribuida a lo largo del país, (Flórez & Vélez, 2011).

#### **4.4.4 Sintomatología de la enfermedad.**

Pedraza (2012) cita la sintomatología de la enfermedad tanto en la vaina como en la panícula y dice que la enfermedad varía mucho en sus síntomas, que van desde una decoloración y pudrición de varios órganos de la planta y se expresa también diferente dependiendo del sitio donde esta actúe, principalmente ataca a la plántula, la vaina, las hojas y la panícula, al igual que la semilla se ve afectada.

#### **4.4.5 Síntomas en la vaina por infección en cultivos establecidos.**

Los síntomas presentados por cultivos establecidos son diferente a uno inducido ya que, primeramente estos son crecidos en campos, en condiciones algo adversas y diferentes, entre los síntomas esta la decoloración de la vaina, especialmente en la hoja bandera, hojas marchitas donde se presenta la infección y exudados a nivel del tallo igual que el inoculado.

#### **4.4.6 Síntomas en la panícula por infección en cultivos establecidos.**

Los síntomas más evidentes se muestran en la panícula y la semilla de la planta, en la panícula esta revela una decoloración, manchado y vaneamiento; cuando es de notar un machado café en la panícula y la semilla son síntomas muy característicos de la enfermedad.

## 5. Objetivos

### 5.1 General

Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de aceites esenciales y de bacterias endófitas extraídas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* contra *Burkholderia glumae* causante de la enfermedad conocida como el añublo bacterial de la panícula en cultivo de arroz.

### 5.2 Específicos

- Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* contra *Burkholderia glumae* usando el método de UFC y MTT.
- Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de bacterias endófitas aisladas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* contra *Burkholderia glumae*.
- Comparar la eficiencia de inhibición *in vitro* entre los aceites esenciales y el control positivo con ácido oxolínico.
- Caracterizar químicamente los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS).

## **6. Metodología**

### **6.1 Área de estudio y época**

El material vegetal fue recolectado en el municipio de Sincelejo, departamento de Sucre, dentro del campus de la Universidad de Sucre en el mes de mayo del 2017 en época de lluvias.

### **6.2 Obtención del material vegetal**

El material vegetal usado fue *L. alba* y *L. origanoides*, las cuales fueron divididas en dos partes: una parte correspondió a hojas frescas que se usaron para la obtención de aceites esenciales y la planta completa para el aislamiento de bacterias endófitas de los tejidos raíz, tallo y hojas y la otra parte se envió al Herbario de la Universidad de Sucre para la confirmación taxonómica.

### **6.3 Extracción de los aceites esenciales**

Para la extracción de los aceites esenciales se utilizó hojas frescas de *L. alba* y *L. origanoides* empleando un equipo de hidrodestilación asistido por radiación de microondas, donde se sumerge el material vegetal en agua y se calienta hasta hervor, durante tres ciclos de 15 minutos cada uno y estos aceites esenciales extraídos se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en viales cromatográficos ámbar a baja temperatura hasta su posterior uso (Pérez, Chamorro y Vitola, 2017).

## 6.4 Fitopatígeno

Se utilizó un Fitopatígeno: la bacteria *B. glumae* causante de la enfermedad del añublo bacterial de la panícula del cultivo de arroz, cedida por el Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

## 6.5 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra *Burkholderia glumae*

### 6.5.1 Actividad antimicrobiana usando el ensayo de MTT.

Para esta prueba se utilizaron placas de Elisa de 96 pozos, en cada pozo se adiciono 100 µL de una suspensión de bacterias ajusta a una concentración de 0,1 a 0,08 DO equivalente

En la escala de McFarland a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (Alviz, Pérez y Pérez, 2017) y el mismo volumen de los tratamientos, se incubaron a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas a 160 rpm.

Pasado el tiempo de incubación, se adiciono 50 µL de una solución de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de 5mg/mL, basada en la metodología de Ruilova, (2007) con modificaciones; Ramírez y Castaño (2009). Los pozos que contengan los tratamientos y los controles, seguidamente las placas se dejan por 2 horas en las mismas condiciones. Para determinar la inhibición de *B. glumae* se midió la densidad óptica en un lector de microplacas de Elisa Chromate Awareness, modelo 4300 utilizando una longitud de onda de 490 nm. La absorbancia se tomó como una medida del porcentaje de inhibición del aceite esencial mediante la siguiente formula:

$$\%I.B = 100 - \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

En cada placa se incluyó controles. El ensayo se realizó por triplicado.



### **6.5.2 Actividad antimicrobiana mediante unidades formadoras de colonias (UFC).**

Del ensayo anterior se tomaron 5µL de las concentraciones y tratamientos de cada pozo de la microplaca de Elisa y se adiciono cada uno en un tubo de ensayo que contenía 15ml de agua destilada estéril para hacer una dilución, luego se tomaban 10µL de esa dilución y se depositaban en placas de Petri que contenían agar solido Kim B, preparado el día anterior. Se hizo el extendido correspondiente de la muestra por toda la placa de Petri con la ayuda de una espátula de Drigalsky, por último se hacia la respectiva rotulación y se sellaba cada placa de Petri con papel de cocina y se incubo a una temperatura en un intervalo de 30°C a 35°C durante 48 horas, pasado se tiempo se hizo el conteo de las colonias de *B. glumae* mediante un cuenta colonias (Doncel, Chamorro y Pérez, 2016).

### **6.5.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *B. glumae*.**

La CMI de los aceites esenciales se definió como la concentración más baja de los tratamientos que mostrara inhibición o poca proliferación bacteriana  $\geq 90\%$  (Consentino *et al.*, 1999; Ramírez y Castaño, 2009). Se utilizaron placas de Elisa de 96 pozos, en cada pozo se adiciono 100 µL de una suspensión de bacterias ajusta con concentración equivalente a una absorbancia de 0,1 a 0,08 a 625 nm y el mismo volumen de los tratamientos (figura 5 y 6, Anexo 3 y 4).

Se usaron diluciones seriadas de los tratamientos que mostraron inhibición cercanas al 100%, aplicando la metodología de unidades formadoras de colonias (UFC) anteriormente descrita.

## **6.6 Comparación en la eficiencia de inhibición *in vitro* entre los aceites esenciales y el control positivo con ácido oxalínico**

Para esta prueba se siguió la metodología propuesta por Rana, Singh & Taneja (1997) con modificaciones, en donde se usaron microplacas de elisa y en cada pozo se adicionó 100 µl de una suspensión de la bacteria *Burkholderia glumae* con una DO alrededor de 0.1 y el mismo volumen de las concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada aceite, después de lo cual se realizaron mediciones cada hora durante 19 horas. Las mediciones se realizaron con un lector de microplacas de elisa Chromate Awareness, modelo 4300, con adición previa de 50µl de una solución de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) 0,5 mg/ml.

Cada ensayo se hizo por triplicado.

## **6.7 Aislamiento de bacterias endófitas**

El aislamiento de las bacterias endófitas se hizo por la técnica de desinfección superficial propuesta por Pérez, Rojas y Fuentes (2010) con modificaciones. El proceso de desinfección consistió en tomar 1g de cada tejido vegetal y se depositan por separado en erlenmeyers para lavar por 2 veces con agua destilada estéril, se lava con una solución tampón de fosfato de potasio 0,05 mol/L, pH: 7,0 por 15 min con agitación, luego se lava en alcohol al 70% por 1 min, después en hipoclorito de sodio al 5% por 5 min, e inmersión en Tween 80%, de nuevo en alcohol y después en la solución de tampón, se lava por 4 veces en agua destilada estéril y se repite todo el proceso.

Los tejidos una vez estériles fueron macerados y depositados en agua peptonada en agitación por 24 horas a 35±2°C. Pasado este período se tomó 1mL de esta mezcla y se realizaron dilución hasta 10<sup>-8</sup>, luego tomar 0,1mL e inocularlo en medio R2A e incubar por 72 horas a 35±2°C.

Fueron observadas y seleccionadas las colonias que se distinguían en cuanto a forma, aspecto de la superficie, color y tamaño. Los morfotipos seleccionados fueron purificados y mantenidos en agar nutritivo para su posterior análisis e identificación.

### **6.8 Actividad antimicrobiana de bacterias endófitas contra *B. glumae***

Se siguió el protocolo de (Pérez y Pérez, 2013) con modificaciones. Los morfotipos aislados fueron depositados en caldo nutritivo y dejado en agitación a 160 rpm, y a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Pasado el tiempo se agregó 20 $\mu\text{l}$  de la suspensión de morfotipos a discos de papel filtro whatman grado 388 de aproximadamente 7 mm de diámetro, los cuales se colocaron en el medio de cultivo que contiene la bacteria fitopatógena y este montaje se incubó por 3 días a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la fórmula  $(\text{Da}/\text{C})\cdot 100$ . Donde Da corresponde a la inhibición de la bacteria en cada tratamiento y C corresponde a la inhibición del testigo. El ensayo se realizó por triplicado.

### **6.9 Actividad promotora de crecimiento**

Para desarrollar esta prueba se tomaron los morfotipos que presentaron actividad inhibitoria contra *B. glumae* y se sometieron a los siguientes medios de cultivos.

#### **6.9.1 Fijación biológica de nitrógeno.**

Para esto se realizó una siembra directa por superficie de las bacterias aisladas, en medio selectivo agar BURK: 5g  $\text{MgSO}_4$ , 20g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3,25g  $\text{CaSO}_4$ , 1,45g  $\text{FeCl}_3$ , 0,253g  $\text{NaMoO}_4$ , 1000mL de agua destilada estéril (Park *et al.*, 2005; Tejera, Lluch, Martínez & González, 2005) carente de fuente de nitrógeno como evaluador de la actividad fijadora de nitrógeno, el cual utiliza una fuente combinada de carbono que permite recuperar una mayor

cantidad de microorganismos con posible actividad fijadora, seleccionando solo aquellos que presenten el sistema enzimático que les permite reducir el nitrógeno atmosférico y utilizarlo en su metabolismo. Los resultados serán observados según el crecimiento de la bacteria en medio.

### **6.9.2 Solubilización de fosfato.**

La evaluación preliminar de la actividad solubilizadora de fosfato, se utilizó el medio de cultivo sólido según NBRID: 10g Glucosa, 5gr  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 5g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2g KCl,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  en 1000mL de agua destilada (Dawwam, Elbeltagy, Emara, Abbas & Hassan, 2013). Este medio de cultivo contiene sales de fosfato de calcio y púrpura de bromocresol como indicador de pH. Aproximadamente a los 6 días de siembra serán seleccionadas las colonias bacterianas que formarán un halo transparente, lo que indicará el proceso de acidificación del medio (viraje de color rojo a amarillo debido al cambio de pH) lo cual indica actividad solubilizadora de fosfato.

### **6.9.3 Producción de sideróforos.**

La producción de sideróforos fue evaluada mediante el medio cromo azurol-S (CAS) propuesto por Schwyn & Neilands (1987). Se disolverá 60,5 mg de CAS en 50 ml de agua destilada, lo anterior se mezcla con 10 de una solución de hierro (III) (1 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 10 mM de HCl). Bajo agitación, esta solución de mezcla con 72,9 mg de HDTMA disuelto en 40mL de agua. El líquido azul resultante será autoclavado a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. En otro recipiente también fue autoclavado una mezcla de 750mL de agua, 15g de agar, 30,24g de pipes, y 12g de una solución 50% (w/w) de NaOH para alcanzar un pH de 6.8. Al medio se le agregará 4 gr de glucosa como fuente de carbono. Las cepas serán inoculadas en discos y colocadas en el medio mediante la ayuda de pinzas y se incubaran durante 7 días a  $30^\circ\text{C}$ . La habilidad de la bacteria

para producir sideróforos será evidenciada por la formación de un halo transparente alrededor de las colonias.

Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

### **6.10 Análisis químico**

La composición química de los aceites esenciales de hojas de *L. alba* y *L. origanoides* se realizó por técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) usando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A y un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5977E. Los índices de Kóvats fueron determinados empleando una columna capilar HP-5MS con una longitud de 30m, diámetro interno de 0.24 mm y un espesor de la fase estacionaria de 0.25mm. El volumen de inyección fue de 1 µL a una temperatura de 250°C. La temperatura inicial del horno fue 60°C y se mantuvo allí por 5 min, luego ascendió a 4°C/min hasta 160°C y luego a 15°C/min hasta 240°C. Se usó como gas de arrastre al helio a 1mL/min. La temperatura de la línea de transferencia del espectrómetro de masas fue de 250°C.

La identidad de los componentes se asignó por comparación del espectro de masas obtenido experimentalmente para cada componente, con los reportados en la base de dato NIST 2011.

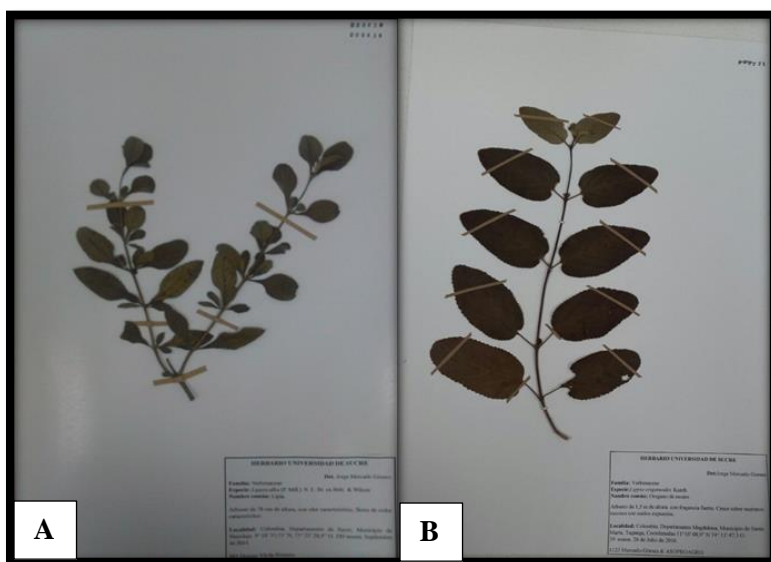
### **6.11 Análisis estadístico**

Cada prueba se evaluó por triplicado. Se realizó un análisis de varianza para establecer la correlación de la actividad inhibitoria en función de la concentración. El análisis estadístico se desarrolló utilizando el programa Statgraphics Centurión XVI y luego de encontrar diferencias significativas entre los tratamiento ensayados se aplicó la prueba múltiple de rango Tuckey.

## 7. Resultados

### 7.1 Clasificación científica de los ejemplares vegetales

La identidad taxonómica de los dos ejemplares vegetales colectados fue corroborada en el herbario de la Universidad de Sucre, e identificadas como *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson, montada bajo registro N° 000830 (A) y *Lippia origanoides* Kunth, bajo registro N° 000025.



Fuente: A: Vitola y Hernández, 2015. B: Canabal, 2017.

*Figura 2.* Clasificación científica de los ejemplares vegetales. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson, montada para la colección del Herbario de la Universidad de Sucre bajo registro N° 000830 (A) y *Lippia*. Esta planta fue identificada como *Lippia origanoides* Kunth, la cual hace parte de la familia Verbenaceae, montada para la colección del Herbario de la Universidad de Sucre bajo registro N° 000025 (B)

### 7.2 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra *Burkholderia glumae*

#### 7.2.1 Actividad antimicrobiana usando el ensayo de MTT.

Los resultados obtenidos de la prueba de la actividad antimicrobiana empleando el ensayo MTT, demostró la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales contra *B. glumae*. En la figura 3 se muestran los resultados de la prueba

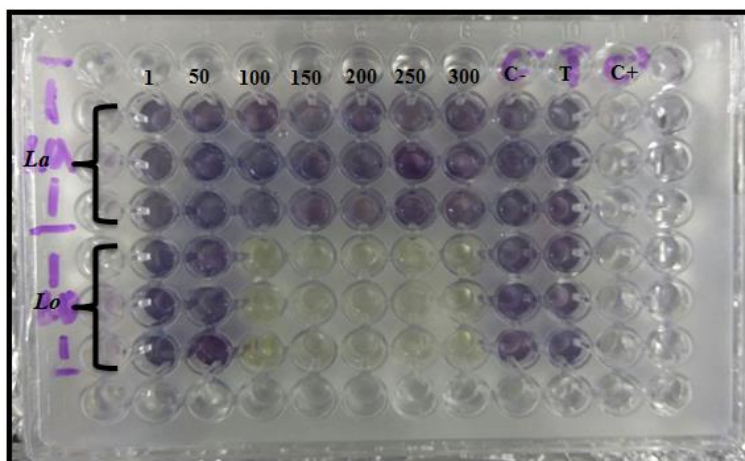


Figura. 3. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra *B. glumae* ensayo de MTT. Se observan los dos diferentes tratamiento (la suspensión bacteriana junto con la concentración de aceite esencial) de las dos plantas *L. alba* (La) y *L. origanoides* (Lo) evaluadas. Las concentraciones se evaluaron desde 1 ppm hasta 300 ppm cada una con 3 repeticiones como se observa en la figura, acompañada del control negativo (C-) usando dimetil sulfoxido al 0.2%, testigo (T) y el control positivo (C+) siendo el ácido oxolínico.

Los pozos coloreados con azul oscuro demuestran crecimiento de la bacteria en las diferentes concentraciones y controles, visto por un cambio de color del medio, debido a esto las concentraciones evaluadas de *L. alba* no mostraron efectividad para inhibir la bacteria dentro de las concentraciones evaluadas, al igual que el control negativo usado (dimetil sulfoxido 0.2%) y el crecimiento óptimo de la bacteria como testigo, pero *L. origanoides* mostro inhibición del 100% a partir de 100 ppm, logrando observar un color amarillo claro por lo que se infiere que no hay crecimiento de *B. glumae* ya que hay cambio de coloración a azul oscuro evidenciándose también en el ácido oxolínico usado como control positivo.

Las absorbancias expresadas en porcentajes de inhibición se detallan en el anexo 1. En este, se observa que la actividad inhibitoria del aceite esencia de *L. alba* contra *B. glumae*, evaluado a diferentes concentraciones no fue 100% efectivo, mostrando un porcentaje de inhibición de 63.9%, en cambio *L. origanoides* tiene actividad inhibitoria al 100% cuando se evalúa a una concentración de 100 ppm.

En la figura 4 se observa la actividad antimicrobiana empleando el ensayo de unidades formadoras de colonias, demostrando que efectivamente a 300ppm el aceite esencial de *L. alba* no inhibió a *B. glumae* dentro de las concentraciones evaluadas, diferente al aceite esencial de *L. origanoides* la cual presento efecto antimicrobiano a 100ppm.

### 7.2.2 Actividad antibacteriana empleando el ensayo de unidades formadoras de colonias (UFC).

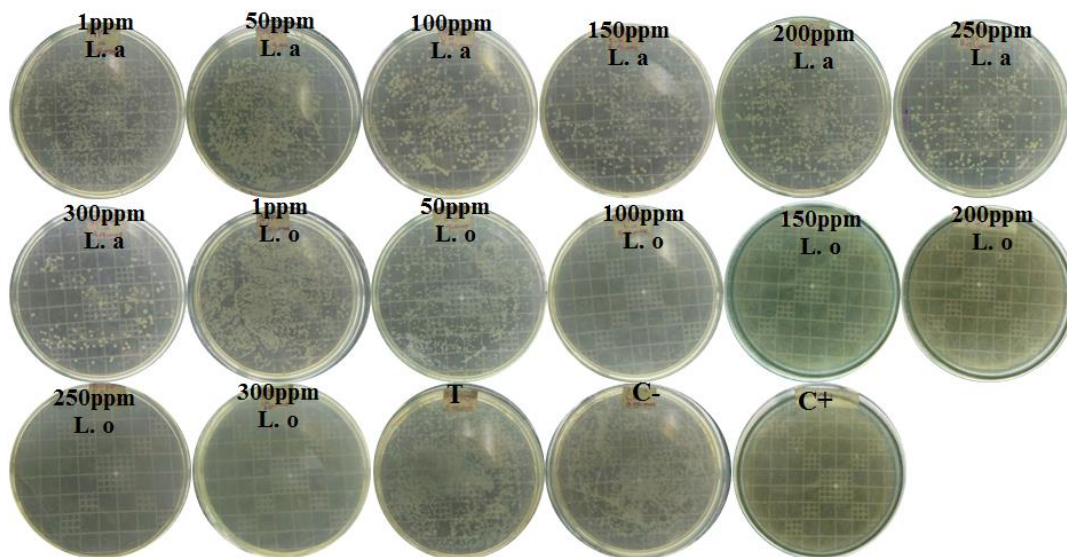


Figura 4. Actividad antimicrobiana de *B. glumae* en unidades formadoras de colonias. Concentración bacteriana de *B. glumae* expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC). Se destaca la presencia de bacteria en cada tratamiento, con disminución progresiva a medida que se aumenta la concentración para el aceite esencial de *L. alba*, al igual la incidencia bacteriana en el control negativo (C-) y testigo (T). *B. glumae* está presente en 1ppm y 50ppm, a partir de 100ppm en adelante no hay presencia de bacteria para *L. origanoides*, e igual en el control positivo (C+). Dato similar a los presentados en Anexo 1.

Como es de observar en los resultados del lector de microplacas de Elisa, la presencia de la bacteria *B. glumae* en todas las concentraciones evaluadas del aceite esencial de *L. alba* y solo se encontró inhibición de 70.3% en 300ppm (figura 4 y anexo 2), con un decrecimiento en la presencia de unidades formadoras de colonias bacterianas en cada concentración. Por otro lado, para el aceite esencial de *L. origanoides* se obtuvo actividad inhibitoria a concentración de 100ppm en adelante, no se observó presencia de colonas de *B. glumae*, lo que indica que a partir



de estas concentraciones se presentó inhibición del 100% (anexo 2), similar al efecto observado con el control positivo (C+) el cual es el ácido oxolínico. Los resultados obtenidos fueron comparados con los observados con el testigo (T) y control negativo (C-), como se muestra en la figura 4.

En la tabla 1 se observa el análisis de varianza para la actividad inhibitoria por metodología empleada y el tipo de aceite esencial de cada planta además de una interacción entre estos dos factores mencionados, demostrando el valor-p es menor a 0.05%, cada factor muestra diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 1

*Análisis de varianza para actividad inhibitoria*

| <b>Fuente</b>               | <b>Suma de Cuadrados</b> | <b>Gl</b> | <b>Cuadrado Medio</b> | <b>Razón-F</b> | <b>Valor-P</b> |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| <b>EFFECTOS PRINCIPALES</b> |                          |           |                       |                |                |
| <b>A:Tipo de Ensayo</b>     | 1614,82                  | 1         | 1614,82               | 194,15         | <b>0,0000</b>  |
| <b>B:Tipo de planta</b>     | 24259,0                  | 1         | 24259,0               | 2916,70        | <b>0,0000</b>  |
| <b>C:Concentración</b>      | 31314,7                  | 6         | 5219,12               | 627,50         | <b>0,0000</b>  |
| <b>INTERACCIONES</b>        |                          |           |                       |                |                |
| <b>AB</b>                   | 967,643                  | 1         | 967,643               | 116,34         | <b>0,0000</b>  |
| <b>AC</b>                   | 286,084                  | 6         | 47,6807               | 5,73           | <b>0,0001</b>  |
| <b>BC</b>                   | 4327,93                  | 6         | 721,322               | 86,73          | <b>0,0000</b>  |
| <b>RESIDUOS</b>             | 515,671                  | 62        | 8,31728               |                |                |
| <b>TOTAL (CORREGIDO)</b>    | 63285,9                  | 83        |                       |                |                |

Nota: se evalúan 3 factores, el tipo de ensayo, el tipo de planta y la concentración además de la interacción entre cada factor

\* Puesto que el valor de p es menor a 0.05, existen diferencias estadísticas significativas entre todos los factores evaluados y su interacción influye sobre la variable respuesta.

Los resultados obtenidos del ANOVA en el cual se muestra diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, se procedió a realizar la prueba de tukey para comparar cada factor por separado.

En la tabla 2 se denota la prueba múltiple de rango para la actividad inhibitoria por tipo de ensayo los cuales consistieron corroborar si había diferencia significativa entre el ensayo de

MTT y el ensayo UFC, y efectivamente puesto que los grupos homogéneos no se encuentran en la misma columna, si hay diferencia entre metodologías.

Tabla 2

*Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad Inhibitoria por Tipo de Ensayo*

| <i>Tipo de Ensayo</i>  | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|------------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| <b>UFC</b>             | 42           | 62,7405         | 0,445006        | <b>X</b>                 |
| <b>MTT<sup>a</sup></b> | 42           | 71,5095         | 0,445006        | <b>X</b>                 |

Nota: Existen diferencia estadísticas significativas entre los ensayos de evaluación de la actividad inhibitoria de los aceites esencial.

a: el ensayo MTT fue la que presentó los mayores promedios de inhibición.

En la tabla 3 se detalla la prueba de múltiple de rango por tipo de aceite esencial de cada planta, demostrando que efectivamente el aceite esencial de *L. origanoides* es mucho más efectivo que el aceite esencial de *L. alba*, puesto que los grupos homogéneos no comparten la misma fila.

Tabla 3

*Pruebas de Múltiple Rangos para Actividad Inhibitoria por Tipo de planta*

| <i>Tipo de planta</i>                 | <i>Casos</i> | <i>Media LS</i> | <i>Sigma LS</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| <i>Lippia alba</i>                    | 42           | 50,131          | 0,445006        | <b>X</b>                 |
| <i>Lippia origanoides<sup>a</sup></i> | 42           | 84,119          | 0,445006        | <b>X</b>                 |

Nota: La tabla nos muestra que si existen diferencias estadísticas significativas entre el aceite esencial de ambas plantas puesto que los grupos homogéneos no comparten una misma fila

a: *L. origanoides* es mucho más efectiva que *L. alba*.

En la tabla 4 se observa la prueba múltiple de rango para la actividad inhibitoria por la concentración, entendiendo las filas de los grupos homogéneos nos indica que de 1ppm hasta 150ppm hay diferencia estadísticamente significativa para el efecto de inhibición, pero que a 200ppm en adelante no se aprecia diferencia en la actividad inhibitoria.

Tabla 4

*Prueba de Múltiple Rangos para Actividad Inhibitoria por Concentración*

| Concentración        | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|----------------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 1 ppm <sup>a</sup>   | 12    | 30,4917  | 0,83253  | X                 |
| 50 ppm <sup>a</sup>  | 12    | 44,7333  | 0,83253  | X                 |
| 100 ppm <sup>a</sup> | 12    | 72,7833  | 0,83253  | X                 |
| 150 ppm <sup>a</sup> | 12    | 77,05    | 0,83253  | X                 |
| 200 ppm <sup>b</sup> | 12    | 79,9833  | 0,83253  | XX                |
| 250 ppm <sup>b</sup> | 12    | 81,2667  | 0,83253  | X                 |
| 300 ppm <sup>b</sup> | 12    | 83,5667  | 0,83253  | X                 |

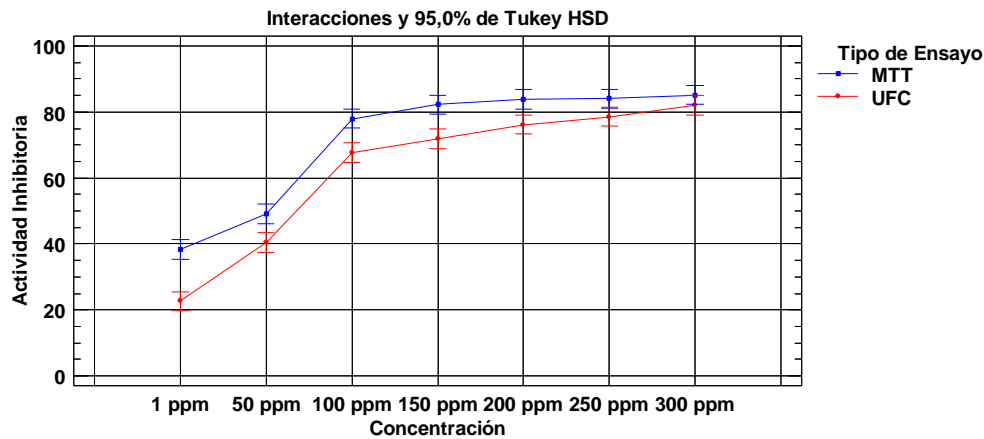
Nota: La inhibición aumenta en función de la concentración.

a: hay diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones

b: no hay diferencia significativa

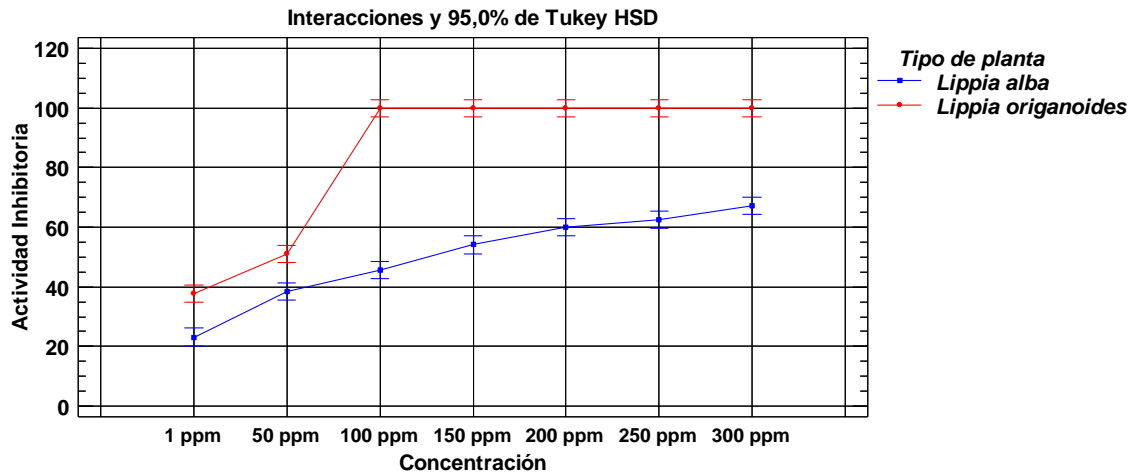
Con los resultados obtenidos en la prueba de tukey, se procedió a realizar 2 graficas, una que muestre en una línea de tiempo las diferencias entre metodología y otra grafica que señale el tipo de planta donde se extrajo cada aceite esencial.

En la gráfica 1 se evalúa una línea de tiempo, la actividad inhibitoria por tipo de ensayo, acertando en que la metodología por UFC estuvo siempre por debajo del ensayo MTT la cual mostro mejores resultados con respecto a la claridad de los datos en manera de inhibición.



*Grafica 1.* Actividad inhibitoria por tipo de ensayo. El ensayo MTT presentó ser más efectivo al momento de la lectura de los resultados, puesto que presentó los valores más altos de actividad inhibitoria, indicando además que es una metodología muy útil para determinar la efectividad de este tipo de principio activo.

En la gráfica 2 se describe la efectividad de cada aceite esencial de cada planta con respecto a su actividad inhibitoria, mostrando una vez más que el aceite esencial de *L. origanoides* a 100ppm en adelante es 100% efectivo, la cual tiene a solo 1ppm una inhibición acerca del 40%, contrario a el aceite esencial de *L. alba* quien aun en 300ppm mostro apenas inhibición del 65%.



Grafica 2. Actividad inhibitoria de acetites esenciales por tipo de planta. Así mismo como se muestra en la Tabla 5 la prueba de tukey, en esta grafica se denota la diferencia entre *L. alba* y *L. origanoides* en cuanto a su actividad inhibitoria de los aceites esenciales, presentando esta última la mayor efectividad en menor concentración de aceite a solo 100ppm.

Debido a que *Lippia alba* no inhibió dentro de las concentraciones evaluadas, se procedió a buscar una concentración donde sea efectiva, evaluamos 9 concentraciones empezando con 1000ppm,1500ppm, 2000ppm, 2500ppm, 3000ppm, 3500ppm, 4000ppm, 4500ppm y 5000ppm. Encontrando que la concentración que inhibió a *B. glumae* fue de 2000ppm en adelante, mostrando crecimiento en 1000ppm y 1500ppm, por ende se puede inferir que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *L. alba* se encuentra en el rango de 1500ppm a 2000ppm

### 7.2.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Lippia alba*.

Teniendo en cuenta que *L. alba* fue efectiva contra *B. glumae* en un rango de 1500ppm a 2000ppm, se procedió a buscar la concentración mínima inhibitoria entre ese intervalo. Se evaluaron concentraciones de 50 en 50 empezando por 1500ppm hasta llegar a los 2000ppm, arrojándonos unos resultados bastante satisfactorios ya que desde la concentración de 1550ppm en adelante el aceite esencial de *L. alba* inhibe en un 100% a *B. glumae* puesto que no hay cambios de color en el medio, se acompaña de los respectivos controles que aseguran el crecimiento natural y funcional de la bacteria, caso del control negativo y testigo. Figura 5

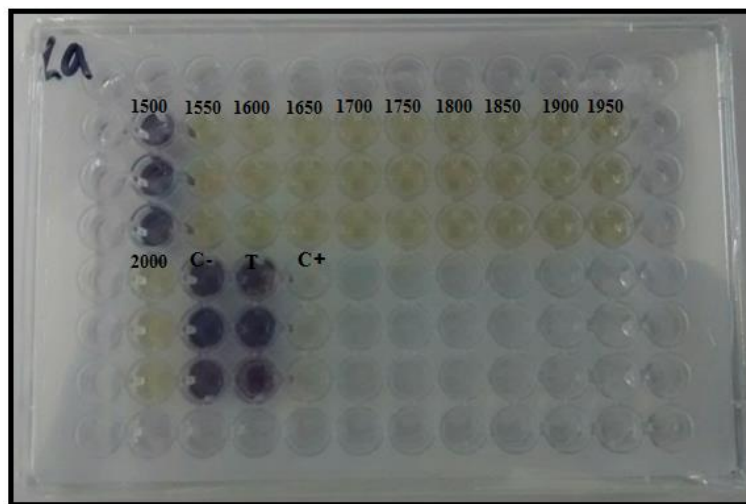


Figura 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Lippia alba*. CMI *Lippia alba*. Concentraciones expresadas en partes por millón (ppm).

En la figura 6 se muestra la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *L. alba* con respecto a *B. glumae*, dando a conocer la poca cantidad bacteriana en 1500ppm, siendo 100% efectiva a partir de 1550ppm en adelante y mostrando el crecimiento óptimo en el testigo (T) corroborando la actividad de *B. glumae*.

**7.2.4 Concentración mínima inhibitoria bacteriana de *B. glumae* expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC) de aceites esenciales de *Lippia alba*.**

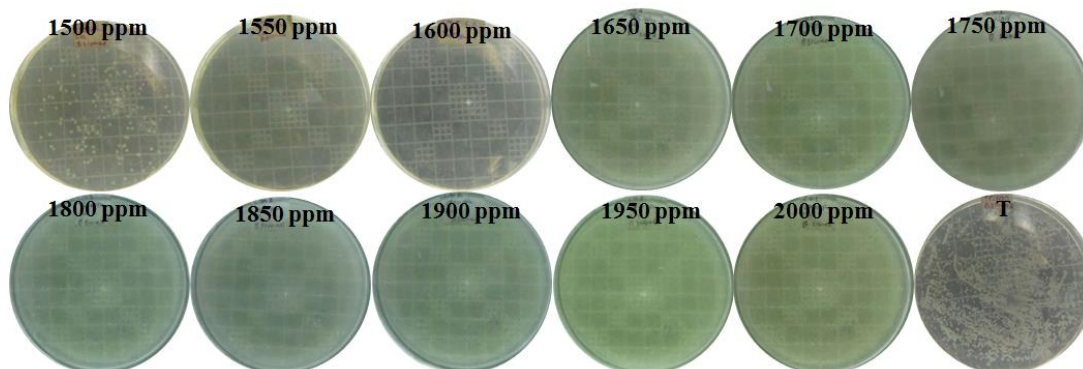


Figura 6. Resultados de CMI por UFC del aceites esenciales de *Lippia alba*.

Ambas metodologías a 1500ppm presentaron gran inhibición, el ensayo MTT mostro un 84% se muestra en el anexo 3 y la metodología por UFC tuvo una inhibición del 92% anexo 4, y por ultimo para ratificar la inhibición completa a partir de 1550ppm para ambas metodologías.

**7.2.5 Concentración mínima inhibitoria de *Lippia organoides*.**

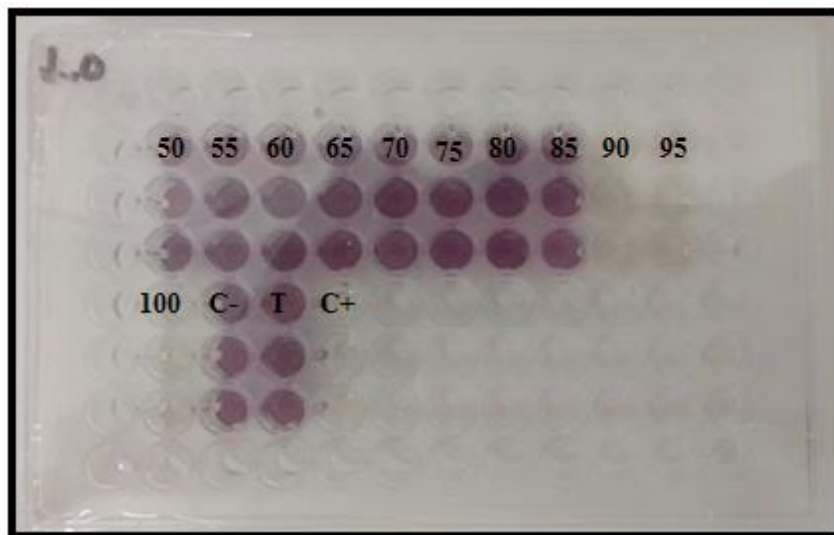


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria de *Lippia organoides*. Concentraciones en partes por millón.

Ya establecido en el ensayo general donde se observó que el aceite esencial de *L. origanoides* fue ineficiente en 50ppm pero eficaz en 100ppm, inferimos que la concentración mínima inhibitoria se encontraba entre ese rango.

Los resultados anteriores permitieron utilizar y evaluar las 11 concentraciones de 50ppm, 55ppm, 60ppm, 65ppm, 70ppm, 75ppm, 80ppm, 85ppm, 90ppm, 95ppm, y 100ppm. Los ensayos fueron evaluados con sus respectivos controles y testigo. Encontrado que en 85ppm había un 90% de inhibición y a partir de 90ppm en adelante la bacteria *B. glumae* fue inhibida por el aceite esencial, siendo esta la concentración mínima inhibitoria. Figura 7 y anexo 5.

#### **7.2.6 Concentración mínima inhibitoria de *B. glumae* expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC) de aceites esenciales de *Lippia origanoides*.**

A partir de los datos obtenidos mediante el lector de microplacas de Elisa, se corrobora la inhibición 100% de *B. glumae* a partir de 90ppm en adelante y se observó actividad inhibitoria en un 96% a concentraciones de 80ppm, 85ppm, obsérvese en la (figura 8 y anexo 6)

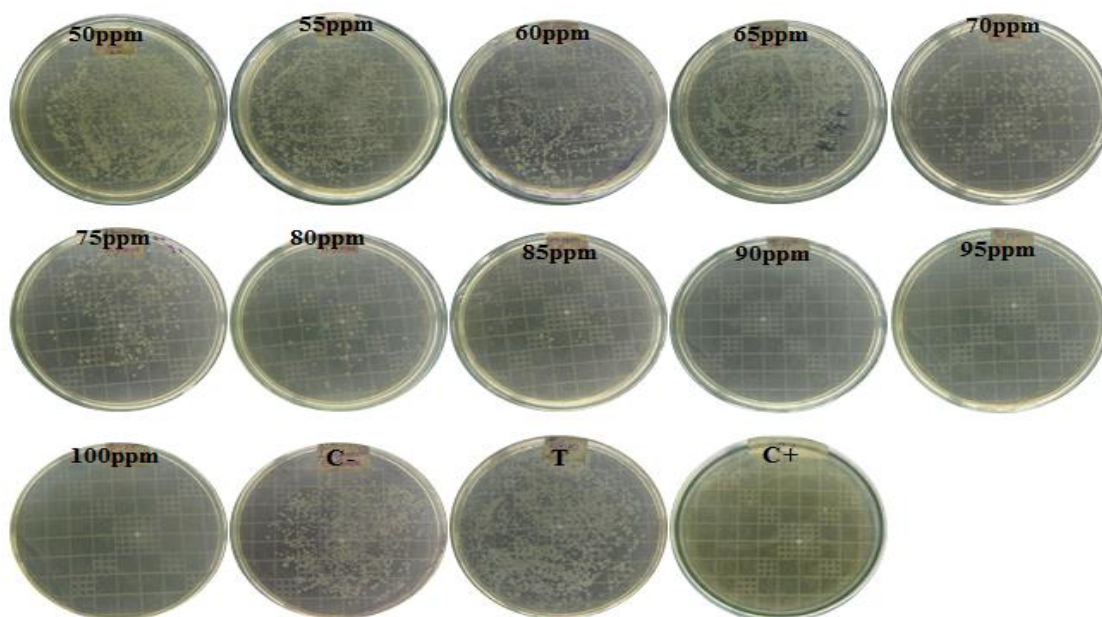


Figura 8. Resultado de CMI por UFC de aceites esenciales de *Lippia origanoides*.

### 7.3 Comparación de la eficiencia de inhibición *in vitro* entre los aceites esenciales y el control positivo con ácido oxolínico

La concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales y el control positivo (ácido oxolínico) fue evaluado hora por hora contra *B. glumae*, para determinar el tiempo exacto que tarda el tratamiento en hacer efecto, haciendo uso de la sal MTT para observar una reacción colorimétrica y la medición de la absorbancia a cada hora luego de la adición del bromuro MTT. Se obtuvieron los siguientes resultados.

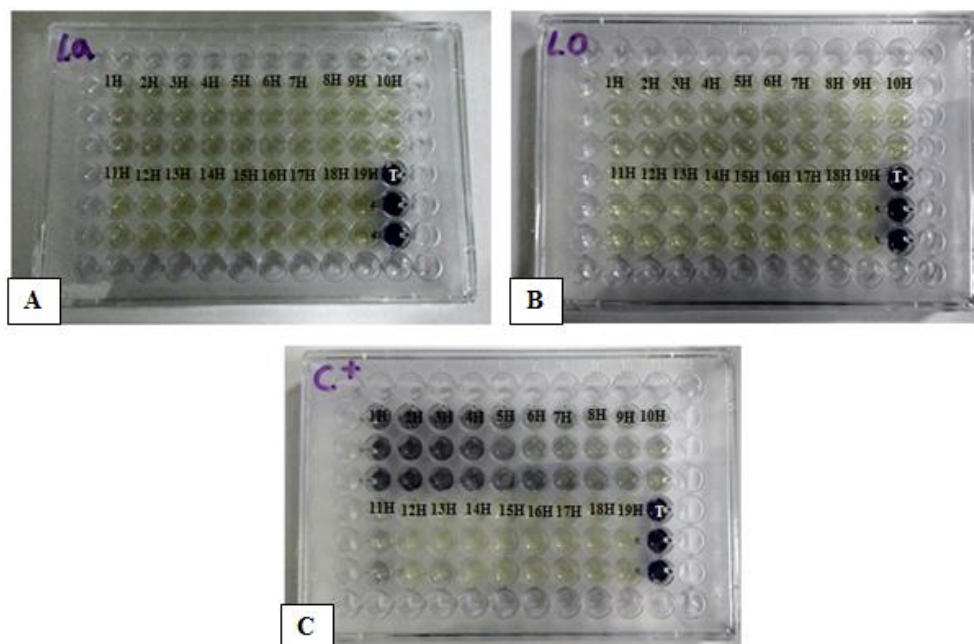


Figura 9. Cinética de inhibición de los aceites esenciales de *L. alba*, *L. origanoides* y ácido oxolínico contra *B. glumae*. Se describe la cinética de inhibición durante cada hora evaluada, el índice (A) muestra el ensayo de *L. alba*, (B) la prueba de *L. origanoides* y (C) para control positivo ácido oxolínico.

La evaluación de la cinética de inhibición, ambos aceites, *L. alba* y *L. origanoides* como se muestra en la figura 9 (A) y (B) muestra que a partir de la primera hora de iniciado el experimento tuvieron actividad inhibitoria superior con respecto al control positivo (ácido oxolínico) figura 9 (C), evidenciando el aceite esencial de *L. origanoides* es 100% eficiente tras su primera hora en confrontación con la bacteria, el aceite esencial de *L. alba* obtuvo un 80% de



inhibición durante su primera hora de exposición a *B. glumae* y alcanzando un 100% de inhibición a la novena hora, dejando claro la superioridad de ambos tratamientos frente al ácido oxolínico quien solo tuvo inhibición de solo un 55% en su primera hora de contacto y pasada las 12 horas es que este viene siendo 100% efectivo lo cual puede verse en el anexo 7.

En la tabla 5 se observa el análisis de varianza para la cinética de inhibición, donde se evaluaron 2 factores y su interacción, puesto que el tratamiento antibacteriano (aceite esencial de *L. alba* y *L. origanoides* y el ácido oxolínico), las horas a exposición con *B. glumae* y la interacción entre ambos presentan un valor-p menor a 0,05% lo cual son diferentes estadísticamente.

#### *Análisis de Varianza para Cinética de Inhibición*

| <b>Fuente</b>                       | <b>Suma de Cuadrados</b> | <b>Gl</b> | <b>Cuadrado Medio</b> | <b>Razón-F</b> | <b>Valor-P</b> |
|-------------------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| <b>EFECTOS PRINCIPALES</b>          |                          |           |                       |                |                |
| <b>A:Tratamiento antibacteriano</b> | 2552.13                  | 2         | 1276.07               | 754.12         | 0.0000         |
| <b>B:Horas</b>                      | 5606.0                   | 12        | 467.167               | 276.08         | 0.0000         |
| <b>INTERACCIONES</b>                |                          |           |                       |                |                |
| <b>AB</b>                           | 3548.18                  | 24        | 147.841               | 87.37          | 0.0000         |
| <b>RESIDUOS</b>                     | 131.987                  | 78        | 1.69214               |                |                |
| <b>TOTAL (CORREGIDO)</b>            | 11838.3                  | 116       |                       |                |                |

Nota: se compararon 2 factores, el primer factor fue el tratamiento bacteriano, segundo fueron las horas evaluadas y por último la interacción entre los dos factores anteriores

\* Puesto que el valor de P es menor a 0.05, los factores presentan diferencia significativa

Luego de la ANOVA se realiza la prueba de tukey para comparar los 2 primeros factores anteriores.

La tabla 6 se muestra la prueba de múltiple de rango para Cinética de Inhibición por Tratamiento antibacteriano, donde se comparan los dos aceites esenciales y su control positivo, basándonos en los grupos homogéneos, puesto que cada uno comparte filas distintas, nos indica que el aceite esencial de *L. origanoides* es más efectivo que el aceite esencial de *L. alba* y este a su vez es mejor, que su control positivo el ácido oxolínico.

Tabla 6

*Pruebas de Múltiple Rangos para Cinética de Inhibición por Tratamiento antibacteriano*

| Tratamiento antibacteriano | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|----------------------------|-------|----------|----------|-------------------|
| Ácido oxolínico            | 39    | 88.6744  | 0.208298 | <b>X</b>          |
| <i>Lippia alba</i>         | 39    | 92.9385  | 0.208298 | <b>X</b>          |
| <i>Lippia origanoides</i>  | 39    | 100.0    | 0.208298 | <b>X</b>          |

Nota: puesto que los grupos homogéneos no comparten la misma casilla, se infiere que los 3 tratamientos presentan diferencia estadística significativa

a: *L. origanoides* fue el mejor tratamiento en todo el ensayo desde el inicio

en la tabla 7 se muestra la prueba de Múltiple Rangos para Cinética de Inhibición por Horas evaluadas frente a la confrontación con *B. glumae* indicando que hay diferencia estadísticamente significativa dentro de las primeras 7 horas, a partir de esa hora no hay evidencia estadísticamente significativa en consecuencia a la inhibición basándonos en las diferentes filas de los grupos homogéneos presentados en la tabla.

Tabla 7

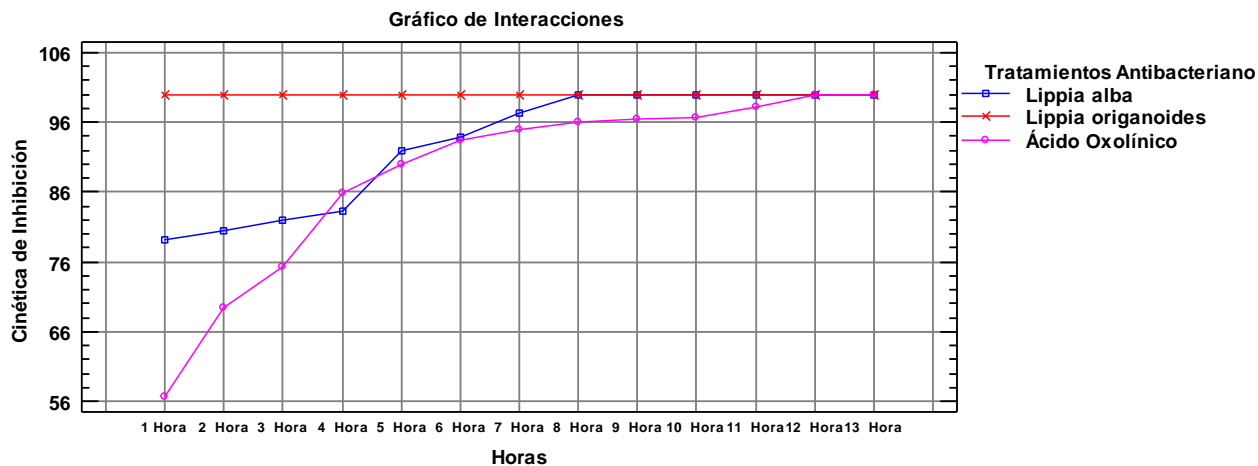
*Pruebas de Múltiple Rangos para Cinética de Inhibición por Horas*

| Horas          | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|----------------|-------|----------|----------|-------------------|
| <b>1 Hora</b>  | 9     | 78.6222  | 0.433607 | <b>X</b>          |
| <b>2 Hora</b>  | 9     | 83.3111  | 0.433607 | <b>X</b>          |
| <b>3 Hora</b>  | 9     | 85.7333  | 0.433607 | <b>X</b>          |
| <b>4 Hora</b>  | 9     | 89.7     | 0.433607 | <b>X</b>          |
| <b>5 Hora</b>  | 9     | 93.9111  | 0.433607 | <b>X</b>          |
| <b>6 Hora</b>  | 9     | 95.7778  | 0.433607 | <b>XX</b>         |
| <b>7 Hora</b>  | 9     | 97.4444  | 0.433607 | <b>XX</b>         |
| <b>8 Hora</b>  | 9     | 98.6667  | 0.433607 | <b>XX</b>         |
| <b>9 Hora</b>  | 9     | 98.8333  | 0.433607 | <b>XX</b>         |
| <b>10 Hora</b> | 9     | 98.9333  | 0.433607 | <b>XX</b>         |
| <b>11 Hora</b> | 9     | 99.3889  | 0.433607 | <b>XX</b>         |
| <b>13 Hora</b> | 9     | 100.0    | 0.433607 | <b>X</b>          |
| <b>12 Hora</b> | 9     | 100.0    | 0.433607 | <b>X</b>          |

Nota: El ensayo de tukey por concentración demuestra que hay diferencias significativas entre las primeras 8 horas, a partir de allí desde la novena hora no hay diferencia estadística significativa.

En la gráfica 3 de interacciones de la cinética de inhibición en función de los tratamientos se hace clara la efectividad del aceite esencial de *L. origanoides* en un 100% a partir de la primera hora de confrontación con *B. glumae*, por su parte el aceite esencial de *L. alba* no tan efectivo en

su inicio pero comenzando a ser 100% eficiente a partir de la séptima hora y por último el ácido oxolínico el cual tarda varias horas para mostrar su efecto, tras doce horas de exposición a *B. glumae* para ser exactos.



*Grafica 3.* Cinética de inhibición por tratamiento antibacteriano. El grafico de la interacción de los tratamientos demuestra que desde la primera hora el aceite esencial de *L. organoides* fue efectivo, inhibiendo en un 100%, por su lado, El aceite esencial de *L. alba* presento una inhibición media de 80% en su lectura inicial y progresivamente fue ganando más inhibición mientras pasaban las horas y por último el ácido oxolínico quien al inicio solo mostro una inhibición del 55% promedio, dando a conocer que fue el peor tratamiento por Hora.

#### 7.4 Actividad antimicrobiana de bacterias endófitas contra *B. glumae*

De los 26 morfotipos en total obtenidos de las dos plantas tratadas en los diferentes tejidos, solo 5 mostraron resultados favorables para inhibir a *B. glumae*, el cual se le comparo su eficiencia con su control, ácido oxolínico.

Los resultados obtenidos en porcentajes, de la confrontación de bacteria endófitas contra *B. glumae* (véase en el anexo 8), se observa un promedio de inhibición del 84.71% para el morfotipo T1LaM1, por otro lado encontramos que dos bacterias lograron superar la inhibición del testigo, el morfotipo R2LaM4 con un 138%, 104%, todas encontradas en la figura 10.

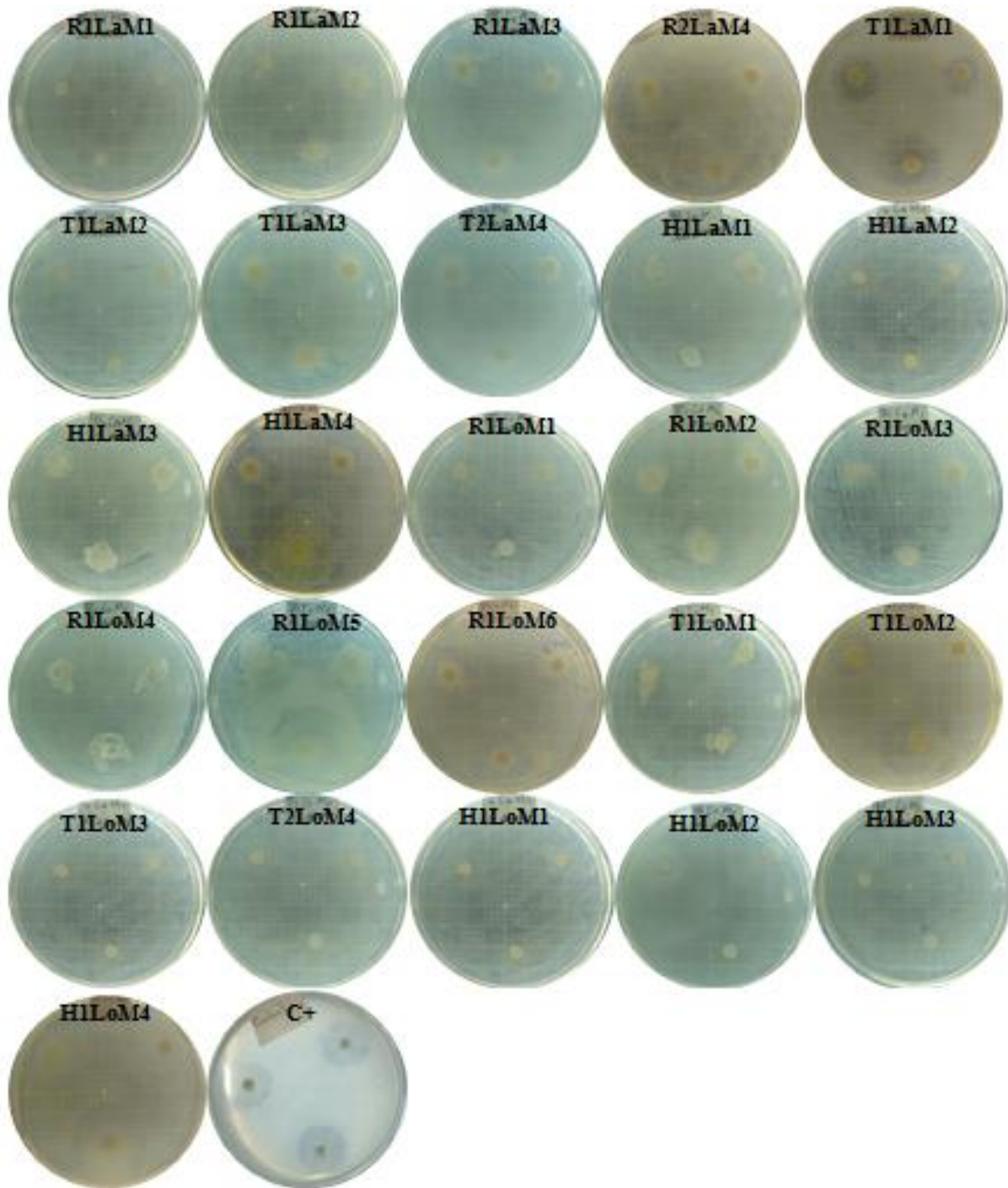
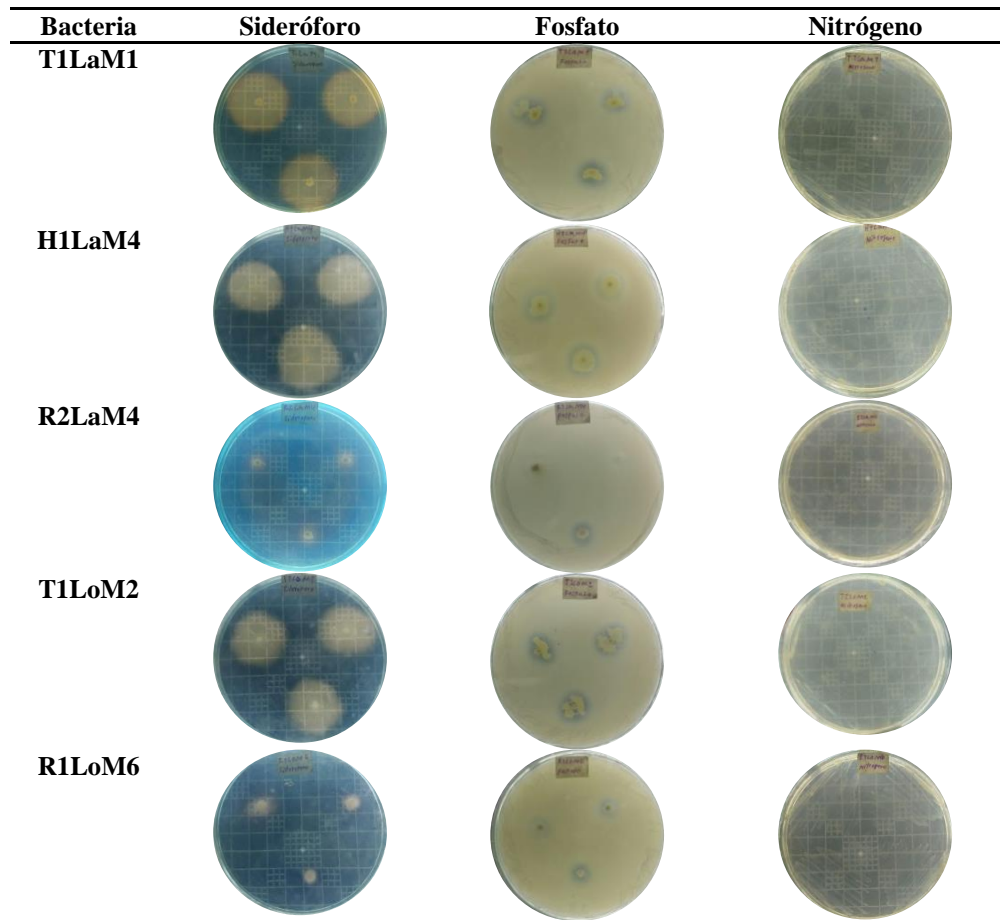


Figura 10. Actividad antimicrobiana de bacterias endófitas contra *B. glumae*. Montaje de la actividad antimicrobiana de las bacterias endófitas, las que obtuvieron mejores resultados fueron T1LaM1, H1LaM4, R2LaM4 morfotipos aislados de *L. alba*. Y T1LoM2, R1LoM6 morfotipos aislados de *L. origanoides*. Control positivo (C+) ácido oxalínico.

## 7.5 Actividad promotora de crecimiento de las bacterias endófitas

Las bacterias endófitas que mostraron inhibición fueron sometidas a 3 pruebas promotoras de crecimiento las cuales consistían en fijación de nitrógeno, producción de sideróforo y solubilización de fosfato.



*Figura 11.* Actividad promotora de crecimiento, sideroforo, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno. Por parte de la solubilización de fosfato solo 4 lograron presentar asimilación como es el caso de H1LaM4, T1LoM2, T1LaM1 y R1LoM6 y por parte de la producción de sideróforos también solo 4 bacterias dieron positivo tales como T1LaM1, R1LoM4, H1LaM4 y T1LoM2, para el nitrógeno, todas fijaron en poca o gran manera pero lo hicieron.

Todas las bacterias endófitas asimilaron el ensayo de fijación de nitrógeno, pero solo 3 lograron cumplir las 3 pruebas promotoras de crecimiento, y las 2 restantes coincidieron solo con 2.

Tabla 8

*Resultados finales del ensayo promotor de crecimiento, tabla consenso*

| <b>Bacteria</b> | <b>Sideróforo</b> | <b>Fosfato</b> | <b>Nitrógeno</b> |
|-----------------|-------------------|----------------|------------------|
| <b>R2LaM4</b>   | Si                | No             | Si               |
| <b>H1LaM4</b>   | Si                | Si             | Si               |
| <b>T1LaM1</b>   | Si                | Si             | Si               |
| <b>T1LoM2</b>   | Si                | Si             | Si               |
| <b>R1LoM6</b>   | No                | Si             | Si               |

Nota: asimilo el compuesto (si), no asimilo el compuesto (no)

Observando la tabla 8, es de notar que 3 de las 5 bacterias cumplieron con las pruebas promotoras de crecimiento en su totalidad y teniendo en cuenta que estas mismas lograron contrarrestar a *B. glumae* en gran porcentaje, H1LaM4 inhibiendo en un 104% más efectiva que el control positivo usado, T1LaM1 inhibiendo en 84.71% y T1LoM2 en 92.76%, siendo los 2 morfotipos aislados de la planta *L. alba* (H1LaM4, T1LaM1) y uno de *L. origanoides* (T1LoM2) se convierten en grandes alternativas como uso de biocontrol y agente antimicrobiano efectivo para la inhibición de *B. glumae*, además de proveerle a la planta ciertos elementos que se pueden encontrar en poca cantidad o poco accesible en el suelo.

### **7.6 Quimiotipos encontrados en los aceites esenciales de *L. alba* y *L. origanoides* por la metodología (GC-MS)**

El análisis cromatográfico del aceite esencial de *L. alba* presentó dos compuestos mayoritarios como lo es el geranial con 35% y el neral con 29% (véase en el anexo 9), posiblemente trabajen en conjunto para hacer su efecto inhibitorio, por su parte, *L. origanoides* presentó el timol con un 68% a cual se le puede atribuir su efectividad como antimicrobiano (véase en el anexo 10).

Para corroborar la verdadera identificación de los compuestos mayoritarios de cada aceite esencial se utilizó la técnica de fragmentación, el cual consiste en analizar los patrones de fragmentación o las reacciones monomoleculares de disociación de moléculas ionizadas por el

impacto electrónico y sus iones-fragmento, con el propósito de elucidar la estructura molecular original. Tanto los iones-fragmento típicos, como los patrones de fragmentación característicos, son la base experimental para la elucidación de estructuras moleculares. (Stashenko & Martínez, 2010, p.26). A manera de ejemplo se realizó la confirmación de la estructura correspondiente al timol (figura 14, A) comparando el espectro experimental (figura 12) con el suministrado por la base de dato NIST2011 (figura13). La fragmentación inicio por el radical metilo dando como resultado un  $M^+=135$  (figura 14, B), presentando una abundancia relativa de 100; luego se fragmenta el grupo hidroxilo resultando un  $M^+=115$  (figura 14, C) y una abundancia relativa de aproximadamente 20. Por medio de la regla retro-Diels Alder se logró fragmentar el anillo bencénico para determinar dos picos uno de  $M^+=91$  (figura 14, D) dando como resultado el ion tropilio, y el otro  $M^+=65$  (figura 14, E), con una abundancia relativa de aproximadamente 25 y 5 respectivamente.

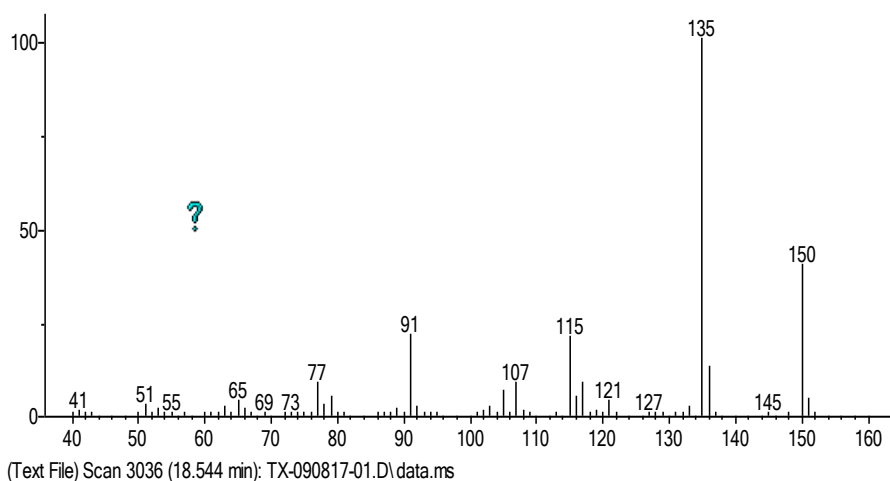


Figura 12. Espectro experimental del timol, quimiotipo identificado en el aceite esencial de *L. organoides*

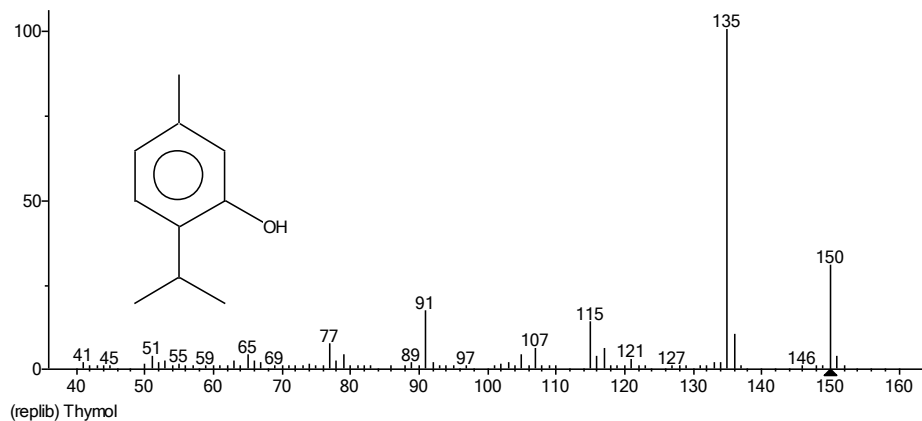


Figura 13. Espectro suministrado por la base de datos NIST2011 del timol, quimiotipo identificado en el aceite esencial de *L. origanoides*

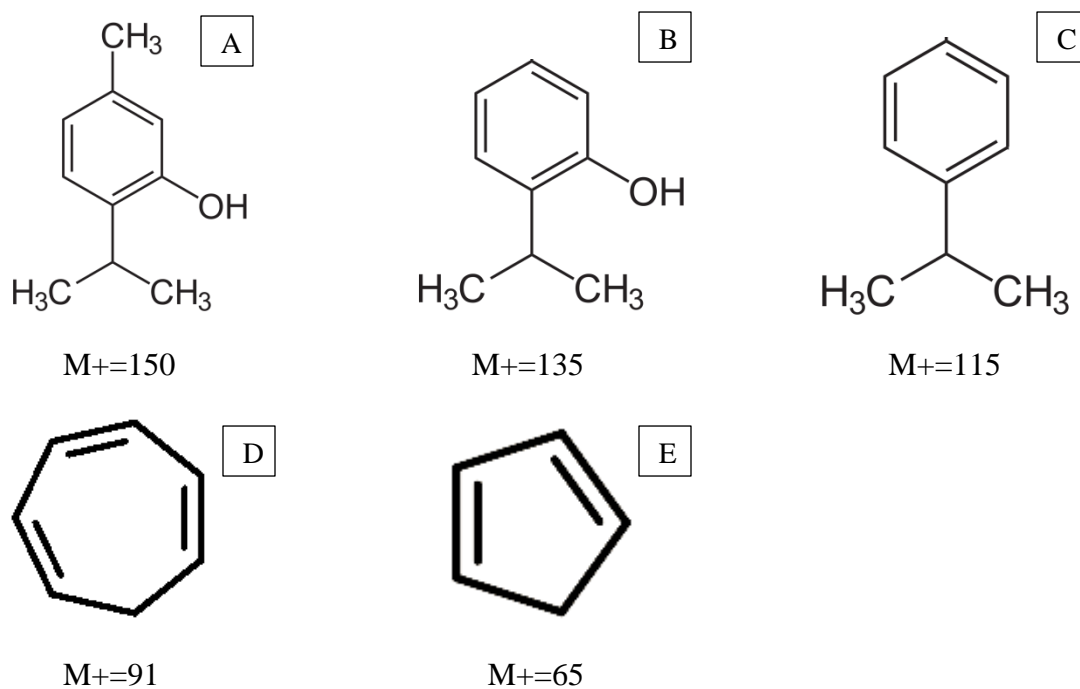


Figura 14. Estructuras fragmentadas a partir del timol

La misma tecnica de fragmentacion fue elaborada para los quimiotipos mayoritarios del aceite esencial de *L. alba*, el cual fue neral, vease en el anexo 12 - 13 y para geranial anexo 14 - 15



## 8. Análisis de resultados

*B. glumae* como ya sea mencionado anteriormente es uno de los patógenos con más incidencia en enfermedades, pues esto lo hace por diversos mecanismos que esta misma ha adquirido, entre tantos el más importante es la segregación de una toxina llamada toxoflavina, se distingue en medio agar Kim B cuando las colonias bacterianas se tornan amarillentas mostrando mayor patogenidad como se observa en todas las figuras de este estudio, esta toxina está implicada en procesos metabólicos y celulares de la planta así como también en la síntesis y degradación de proteínas (Wan y Liu, 2008), haciendo el trabajo de transportador de electrones NADH y oxígeno, dando como resultado un producto tóxico para las células manifestando daño tisular (Latuasan & Berends, 1961). La toxoflavina es sintetizada por dos grupos de genes, el primer grupo encargado de la biosíntesis de la toxoflavina a cargo de los genes (toxABCDE), el segundo grupo encargado de transportar la toxoflavina al espacio extracelular por los genes (toxFGHI), en conjunto a ellos operan dos genes más los cuales son toxJ y toxR muy importantes puesto que ellos codifican la proteína que regula la expresión de los dos grupos de genes citados (Shingu & Yoneyama, 2004) además de los genes la producción de la toxoflavina es favorecida por temperaturas entre 30 °C y 37 °C donde es el crecimiento óptimo de *B. glumae* (Pérez & Saavedra, 2011).

Teniendo en cuenta lo citado por varios estudios ya antes mencionados se buscan alternativas para contrarrestar esta bacteria y los aceites esenciales de *L. alba* y *L. origanoides* han sido muy eficientes a la hora de contrarrestar este patógeno, gracias a la presencia de sustancias o quimiotipos presentes en los metabolitos secundarios generados por cada planta. (Friedman, Henika & Mandrell, 2002) postulan que el atributo antimicrobiano de los aceites esenciales es gracias a su carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos los

cuales son los principales quimiotípos presentes en las plantas de *L. alba* y *L. origanoides* cómo se logra observar en el anexo 9 Estos compuestos no solo tienen un solo sitio activo donde atacar, la literatura cita que estos pueden provocar la degradación de la pared celular de las bacterias, dañar proteínas, coagulación y daño citoplasmático, filtración del contenido celular y la disminución en la fuerza motriz del patógeno. Para Burt (2004) las bacterias Gram negativas mueren por la desintegración de la membrana externa, cuando se liberan los lipopolisacáridos incrementando la permeabilidad en la membrana plasmática al ATP.

El aceite esencial de *L. alba* es abundante en compuestos terpenos y terpenoides (Cowann, 1999), entre los más comunes encontrados están citral, linalol, carvona y limoneno pero se han encontrado una gran variedad de compuestos a lo largo de las investigaciones en diferentes zonas incluso de un mismo país, tal es el caso en Brasil donde se detectaron 3 quimiotipos diferentes para 3 zonas estudiadas (Tavares *et al.*, 2005), a su vez en ese mismo país se detectaron 6 quimiotipos más en la investigación de López Stashenko & Fuentes (2011), en ese mismo orden Mesa–Arango *et al.* (2009) Abordaron diversos compuestos en varias regiones de Colombia, los mismos estudios se han encontrado en Francia (Hennebelle, Sahpaz, Dermont Joseph & Bailleul, 2006). las variaciones en compuestos químicos presentados por el aceite esencial de *L. alba* se deben a diversos factores entre los cuales está la geografía, características fisicoquímicas del suelo, en qué etapa del desarrollo se encuentre la planta, el clima y la parte donde se hace la extracción (Stashenko, Jaramillo y Martinez. 2004). Independientemente de esta variación, la acción conjunta de los quimiotípos encontrados en el aceite esencial de *L. alba* la ha catalogado como un poderoso antimicrobiano, citado por diferentes autores contra *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* entre

otros (Hennebelle *et al.*, 2008b). Al igual que en presente estudio donde se comprobó la acción bactericida contra *B. glumae* en una concentración de 1550ppm, véase en la figura 5 y 6.

Por otro lado los compuestos fenólicos como timol y carvacrol son la más común y en mayor cantidad para los aceites esenciales de *L. origanoides* (Celis, Rivero, Isaza, Stashenko y Martínez, 2007) también encontrados en la lista de compuestos químicos de nuestra planta de estudio anexo 10 siendo un potencial antimicrobiano contra microorganismos de alimentos (Lambert, Skandamis, Coote y Nychas, 2001). El carvacrol el cual presenta un grupo fenólico ha sido utilizado mayormente por su habilidad de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, con esto se da la liberación de lipopolisacaridos y el incremento de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001), lo cual hace que el ATP salga e inhibiendo la actividad ATPasa y la disminución de la movilidad del protón (Burt *et al.*, 2007). Se ha comprobado su efectividad con otros patógenos como es el caso de *B. cereus* en la cual carvacrol interacciona con la membrana celular bacteriana pasando a través de la bicapa de fosfolípidos y alineación entre cadenas de ácidos grasos, aquí se da una desestabilización estructural y de membrana provocando que la permeabilidad aumente, al momento de la adición de carvacrol en la fase exponencial de *B. cereus* se observa una disminución por el cual se infiere que la fuerza motriz del protón de debita, por eso se piensa que este compuesto genera algún tipo de canal entre la membrana, debido a la separación de los ácidos grasos en los fosfolípidos haciendo que los iones abandonen el citoplasma (Ultee, Bennik & Moezelaar, 2002). Así mismo (Lambert *et al.*, 2001) señala que carvacrol tiene el mismo mecanismo frente a *S. aureus* y *P. aeuroginosa*. Además, (Burt *et al.*, 2007) en *E. coli* y (Conner, Beuchat, Worthington & Hitchcock, 1984) asegura que se le afecta la actividad respiratoria a *S. cerevisiae*.

El timol es catalogado como el quimiotipo más activo en los aceites esenciales (Falcone, Speranza, Del Nobile, Corbo, & Sinigaglia 2005; 2007; Lambert *et al.*, 2001), este compuesto trabaja similar al carvacrol puesto que su estructura química es similar, destruyendo la membrana externa de las bacterias Gram negativas, dando salida a lipopolisacaridos e incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander *et al.*, 1998). (Juven, Kanner, Schved & Weisslowicz, 1994) concluye en su trabajo diciendo que timol cambia la permeabilidad de la membrana de células bacterianas en *S. thiphymurium* y *S. aureus*. Pudiendo así filtrar sus componentes químicos para el metabolismo como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos resultando en la muerte de la célula (Lambert y Pearson, 2000). Se le atribuye el efecto inhibitorio muy eficaz contra *B. glumae* ya que es capaz de inhibirla *in vitro* a una concentración mínima inhibitoria de 90 ppm, siendo el timol el quimiotipo en mayor proporción del aceite esencial de *L. origanoides* anexo 10, un estudio realizado por Ramírez, Isaza, Veloza, Stashenko y Marín (2009) analizaron la composición química de 9 aceites de *L. origanoides* teniendo como resultado 6 de los 9 presentaban al timol como compuesto mayoritario igual al encontrado entre los quimiotopos del presente estudio y 2 de los 9 tenían al carvacrol como dominante, Por tanto es válido afirmar que la composición química del aceite esencial de *L. origanoides* también experimenta cambios en sus quimiotipos al igual que el aceite de *L. alba*, derivado de diversos factores como variaciones genéticas interespecificas, clima y suelo entre otros (Matos, Machado, Craveiro y Alencar, 1996; Zoghbi, Andrade, Santos, Silva y Maia, 1998).

Entre ambos aceites hay una diferencia entre su rango de inhibición, siendo *L. origanoides* superior a *L. alba*, podemos decir que se le atribuye esta superioridad debido a la composición química que difieren en ambos aceites, puesto que los compuestos fenólicos que constituyen el

aceite esencial de *L. origanoides* representan un poder antimicrobiano de mayor potencial que los terpenos y terpenoides en su mayoría compuestos del aceite de *L. alba*.

Por otra parte las bacterias endófitas quienes viven dentro de las plantas sin presentar síntoma alguno, tienen la capacidad para proveer múltiples beneficios en cuanto a su crecimiento y supervivencia a la planta (Kim *et al.*, 2011). Estas proceden a accionar mediante dos mecanismos, un mecanismo directo es la producción de algunas fitohormonas necesarias para la planta como lo son las auxinas, giberelinas, etileno y citoquininas, producción de ácidos orgánicos y como promotores de crecimiento (Wall, 2001), el cual también se evaluó en esta investigación, la fijación biológica del nitrógeno, producción de sideróforos para la asimilación de hierro y la solubilización de fosfato figura 11, mostrando buenos resultados las bacterias endófitas aisladas de *L. alba* y *L. origanoides*. Las bacterias endófitas al colonizar diferentes tejidos estas aumentan la disponibilidad de nutrientes, haciendo un trabajo de biofertilización, e incrementar la tolerancia de la planta al estrés abiótico como un factor bioestimulante y su acción biorremediadora ya que son capaces de degradar, asimilar o inactivar sustancias tóxicas que precede el suelo a causa de contaminación (Vacheron *et al.*, 2013), tales como algunos metales como es el mercurio, Pérez, Martínez, Barraza, y Marrugo (2016) evaluaron la tolerancia de 2 plantas y sus bacterias endófitas en suelos contaminados con mercurio, obteniendo buenos resultados por la asimilación de mercurio. Igual a otro registro de bacterias endófitas aisladas de plantas de arroz las cuales son resistentes al plomo (Pérez, Barraza y Martínez, 2015).

Se ha demostrado la capacidad promotora de crecimiento por parte de bacterias endófitas en cultivos de suma importancia económica como lo es el tomate, la papa y el arroz, aislamientos de plantas son capaces de inducir resistencia biótica como abiótica en plantas inoculadas y disminuyendo el desarrollo de enfermedades (Surette, Sturtz, Lada & Nowak 2003), produciendo

antibióticos, liberando ciertas enzimas como quitinasas y glucanasas, inducen a la resistencia contra bacterias, virus y hongos (Pal, Dey, Bhatt & Chauhan, 2000). Uno de los atributos más relevantes de las bacterias endófitas es su índice de biocontrol, son capaces de competir, eliminar o disminuir efectos de fitopatógenos (Vacheron *et al.*, 2013), en la literatura se describen algunos mecanismos de control biológico, uno de ellos es la competencia por espacio y nutrientes (Waisen, Eshel, Beeckman & Kafkafi, 2002), donde la bacteria endófitas suprime o desplaza al patógeno por colonización, estableciendo una disminución en las poblaciones de hongos y bacterias rizoféricas, al tener alto potencial de crecimiento, movilidad y la habilidad de liberar exudados radicales (quimiotaxis), (Kapulnik & Okon, 2002).

Otra estrategia citada es la inducción de resistencia sistémica y síntesis de metabolitos, producidos por las bacterias endófitas, los cuales son los más importantes (Waisen, *et al.*, 2002), el concepto fue optado por primera vez en los años 80's donde se postula que las bacterias promotoras de crecimiento tienen la capacidad de inducir a la resistencia sistémica a causa de la síntesis de metabolitos antipatógenicos producidos por la interacción de la bacteria endófitas con el patógeno (Kapulnik & Okon, 2002), como se observa en la figura 10, morfotipos T1LaM1, H1LaM4, R2LaM4, T1LoM2, R1LoM6 donde se denotan halos de inhibición entre las bacterias endófitas aisladas y *B. glumae*, encontrándose incluso algunas con mejor poder de inhibición que el mismo control empleado (ácido oxolínico), demostrando que si inhiben este fitopatógeno causante del añublo bacteria de la panícula del arroz. Zhou y Paulitz (citados por Kapulnik & Okon, 2002) describen en su investigación que al adicionar *Pseudomonas fluorescens* a los sistemas radicales del pepino, este resguardaba del ataque de *Phytium apanidermatum*, pero no solo encontraron que la aplicación de esta bacteria promotora de crecimiento en semillas y raíces inducía resistencia en el sistema radicular, sino que también inhibía el efecto de la enfermedad

contra el patógeno en hojas y brotes, muy importante esta característica ya que en este caso *B. glumae* no solo se trasmite por semilla sino también entra por los estomas de las hojas, con esto se indica que la adición de bacterias promotoras de crecimiento pueden inhibir a *B. glumae* desde diferentes partes de la planta.

Se ha descrito esta acción bioprotectante de las bacterias endófitas promotoras de crecimiento contra organismos causantes de enfermedades en géneros bacterianos tales como *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Ping & Boland, 2004).

## 9. Conclusiones

- Los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* son una fuente potencial de principios activos con actividad antimicrobianas amigable con el ambiente para contrarrestar los efectos de fitopatógenos como *B. glumae*.
- El ensayo MTT en comparación con otras técnicas permite determinar la acción de los aceites esenciales de forma rápida, así como una buena relación costo beneficio.
- Las bacterias endófitas se proponen como una gran alternativa fitosanitaria, debido a que ejercen control biológico contra *B. glumae*, además se constituyen como un potencial para la promoción del crecimiento vegetal.
- Los productos de origen vegetal se establecen como una excelente alternativa fitosanitaria para el control biológico de patógenos en cultivos de importancia comercial.



## 10. Recomendaciones

- Se recomienda hacer análisis molecular de las bacterias endófitas aisladas de las plantas tratadas para su posterior identificación, además de evaluar sus posibles interacciones frente a otros entes biológicos benéficos que cohabitan en la rizósfera de la planta.
- Hacer la separación de los compuestos químicos más representativos de cada aceite esencial y montar ensayos de inhibición contra *B. glumae* para determinar su inhibición.
- Antes de determinar la efectividad de los aceites esenciales y bacterias endófitas con acción antibacteriana en campo o modo invernadero se recomienda hacer pruebas de fitotoxicidad.

## 11. Referencias

- Alviz, L., Pérez, A., & Pérez-Cordero, A. (2017). Efecto inhibitorio de compuestos tipo metabolitos de bacterias endófitas contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Burkholderia glumae*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 9(S), 18-25.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., & Hallmann, J. (2005). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 215-229.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., ... & Veldhuizen, E. J. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4484-4490.

- Celis, C. N., Rivero, P. E., Isaza, J. H., Stashenko, E. E., y Martínez, J. R. (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia et Technica*, 1(33).
- Chanway, C. P. (1998). Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *SYDOWIA-HORN*-, 50, 149-170.
- Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E., & Hitchcock, H. L. (1984). Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 1(2), 63-74.
- Cordero, A. F. P., SIERRA, J. N. R., y CUELLO, J. R. F. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.
- Correa, F., Pérez, C. R., & Saavedra, E. (2007). Añublo bacterial de la panícula del arroz. *Revista Arroz*, 57(468), 26-32.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
- Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:564-582.

- Cristo Perez, C., y Saavedra, E. (2011). Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 3(1), 111-124.
- DANE - Fedearroz. (2010). *Área, Producción y Rendimientos*. Recuperado de [http://www.fedearroz.com.co/apr\\_public.php](http://www.fedearroz.com.co/apr_public.php)
- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H. M., Abbas, I. H., & Hassan, M. M. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 195-201.
- De Abreu Matos, F. J., Machado, M. I. L., Craveiro, A. A., & Alencar, J. W. (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 8(6), 695-698.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J. J., Kim, J., ... & Venturi, V. (2007). Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and environmental microbiology*, 73(15), 4950-4958.
- Doncel, A, Chamorro, L., y Perez, A. (2016). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosoana en el municipio de Corozal, Sucre. *Revista Colombiana de ciencia Animal-RECIA*, 8, 351-360.
- Falcone, P. M., Mastromatteo, M., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2007). Evaluating *in vitro* antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indicating and pathogenic bacteria. *Journal of food protection*, 70(2), 425-431.

- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of food protection*, 68(8), 1664-1670.
- Flórez Zapata, N. M. V., & Vélez, D. (2011). Determination of the Infection of *Burkholderia glumae* in Comercial Colombian Rice Varieties. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64(2), 6093-6104.
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of food protection*, 65(10), 1545-1560.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Gruenwald, J., & Galizia, M. (2005). Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species. *Adansonia digitata*.
- Ham, J. H., Melanson, R. A., & Rush, M. C. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. *Molecular plant pathology*, 12(4), 329-339.
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., & Ouhdouch, Y. (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2565-2575.

- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., & Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*, *163*(2), 234-242.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, *16*(10), 463-471.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, *46*(9), 3590-3595.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Dermont, C., Joseph, H., & Bailleul, F. (2006). The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. *Chemistry & biodiversity*, *3*(10), 1116-1125.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., & Bailleul, F. (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of ethnopharmacology*, *116*(2), 211-222.
- Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, *106*(2), 169-178.
- Igual, J., Valverde, A., Cervantes, E., & Velázquez, E. (2001). Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, *21*(6-7), 561-568.

- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, 76(6), 626-631.
- Kapulnik, Y., & Okon, Y. (2002). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *Plant Roots The Hidden Half*, 769-781.
- Katiyar, V., & Goel, R. (2004). Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad\*. *Plant growth regulation*, 42(3), 239-244.
- Kim, Y. C., Leveau, J., Gardener, B. B. M., Pierson, E. A., Pierson, L. S., & Ryu, C. M. (2011). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1548-1555.
- Kloepper, J. W., & Schroth, M. N. (1978, August). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria* (Vol. 2, pp. 879-882).
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Kurita, T., & Tabei, H. (1967). On the pathogenic bacterium of bacterial grain rot of rice. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 33, 111.
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 784-790.

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, *91*(3), 453-462.
- Latuasan, H. E., & Berends, W. (1961). On the origin of the toxicity of toxoflavin. *Biochimica et biophysica acta*, *52*(3), 502-508.
- Loper, J. E., & Buyer, J. S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact*, *4*(1), 5-13.
- López, M. A., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2011). Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and molecular biology*, *34*(3), 479-488.
- Mamun-Or-Rashid, A. N. M., Sem, M. K., Jamal, M. A. H. M., & Nasrin, S. (2013). A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. *International Journal of Biomedical Materials Research*, *1*(1), 14-20.
- Méndez del Villar P (2011) Una visión del mercado mundial del arroz. Situación y perspectivas. . ed.^eds.), p.^pp. San Carlos, Chile.
- Mesa-Arango, A. C., Montiel-Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-Galvis, L., & Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(6), 878-884.



- Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., ... & Rush, M. C. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Disease*, 93(9), 896-905..
- Oliveira, D. R., Leitao, G. G., Bizzo, H. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. *Food Chemistry*, 101(1), 236-240.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). *seguimiento del mercado del arroz de la FAO*. Recuperado de <http://www.fap.org7economic/est/publications/...el-aroz.../es>
- Pal, K. K., Dey, R., Bhatt, D. M., & Chauhan, S. M. (2000). Plant growth promoting fluorescent pseudomonads enhanced peanut growth, yield and nutrient uptake. *National Research Centre for Groundnut*.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., & Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127-133
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., & Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Pedraza Pineda, D. F. (2012). *Estado del arte de burkholderia glumae como patogeno de cultivos de arroz (Oryza sativa l.)*(Bachelor's thesis).
- Perez Cordero, A. F., Rojas Sierra, J. N., & Fuentes Cuello, J. R. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*bothriochloa pertusa*) en tres

localidades del departamento de sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*; Vol. 15, núm. 2 (2010); 219-228 *Acta Biológica Colombiana*; Vol. 15, núm. 2 (2010); 219-228 1900-1649 0120-548X.

Pérez Cordero, A. F., y Pérez Cordero, C. R. (2013). Bacterias endófitas asociadas a cultivo de arroz con actividad antimicrobiana sobre *Burkholderia glumae*. *Magazine of the Colombian Association of Biological Sciences (ACCB)*, (25).

Pérez, A., Martínez, D., Barraza, Z., & Marrugo, J. (2016). Endophytic bacteria associated to genus cyperus and paspalum in soils with mercury contamination. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 67-76.

Perez, A., Perez, C., y Chamorro, L. (2013). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a cultivo de arroz en el departamento de Cordoba-Colombia. Eestudio preliminar. *Revista Colombiana de ciencia Animal-RECIA*, 5(1), 83-92

Pérez, C. (2009). Un buen manejo del cultivo, verdadera barrera contra el añublo bacterial. *Revista Arroz*, 57(482), 30-38.

Pérez, C. R. (2010). Avances en el manejo integrado de *Burkholderia glumae*. *Revista Arroz*, 58(488), 4-8.

Pérez, C., y Saavedra, E. (2011). Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 3(1), 111-124.

- Pérez-Cordero, A., Barraza-Roman, Z., y Martínez-Pacheco, D. (2015). Identificación de bacterias endófitas resistentes a plomo, aisladas de plantas de arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2).
- Pérez-Cordero, A., Chamorro-Anaya, L., y Vitola-Romero, D. (2017). Actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2).
- Perfetti, J. J., Hernández, A., Leibovich, J., y Balcázar, Á. (2013). Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature reviews. Microbiology*, 11(11), 789.
- Ping, L., & Boland, W. (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 9(6), 263-266.
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63-77.
- Ramírez, L. S., Isaza, J. H., Veloza, L. Á., Stashenko, E., y Marín, D. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. *Ciencia*, 17(4).
- Ramírez, L. S., y Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, *Scientia et Technica*, 2(42).

- Rana, B. K., Singh, U. P., & Taneja, V. (1997). Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *Journal of ethnopharmacology*, 57(1), 29-34.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.
- Rubio, L. M., & Ludden, P. W. (2005). Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 405-414.
- Ruilova Reyes, A. G. (2007). *Determinación de la concentración inhibitoria mínima de aceites esenciales ante bacterias y hongos fitopatógenos* (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 303-317.
- Saichuk, J., Blanche, B., Eskew, E., Harrell, D., Groth, D., Hollier, C & Webster, E. (2011). Rice varieties and management tips. Louisiana State University Agricultural Center, Publication, (2270).
- Sayler, R. J., Cartwright, R. D., & Yang, Y. (2006). Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant disease*, 90(5), 603-610.

- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., & Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS microbiology ecology*, 39(1), 23-32.
- Shahjahan, A. K. M., Rush, M. C., Groth, D., & Clark, C. A. (2000). Panicle blight. *Rice J*, 15, 26-29.
- Shingu, Y., & Yoneyama, K. (2004). Essential regulator gene *toxR* for toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology*, 70(2), 108-114.
- Simões, C. M. O., & Schenkel, E. P. Gosmann. G, Mello JCP, Mentz LAA, Petrovick PR 2000. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas. *Scientia Chromatographica*, 2(2), 23-46
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.

- Stashenko, E., Ruiz, C., Munoz, A., Castaneda, M., & Martinez, J. (2008). Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 3(4), 563-566.
- Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R., & Nowak, J. (2003). Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil*, 253(2), 381-390.
- Tavares, E. S., Julião, L. S., Lopes, D., Bizzo, H. R., Lage, C. L. S., & Leitão, S. G. (2005). Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(1), 1-5.
- Tejera, N. L. C. M. M. G. J., Lluch, C., Martinez-Toledo, M. V., & Gonzalez-Lopez, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270(1), 223-232.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162(1), 69-76.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.

- Uren, N. C. (2007). Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. The rhizosphere. *Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York, 1-21.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., ... & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, 4.
- Vásquez Carreño, D. R. (2012). *El orégano de monte (Lippia origanoides) del Alto Patía: efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos*(Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Vitola, D., & Hernandez, J. (2015). *Evaluación in vitro de la eficiencia de aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas contra Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. causante de la antracnosis en cultivos de ñame en el departamento de sucre* (tesis de pregrado). Universidad de Sucre, Sucre, Colombia.
- Waisel, Y., Eshel, A., Beeckman, T., & Kafkafi, U. (Eds.). (2002). *Plant roots: the hidden half*. CRC Press.
- Wall, L. (2001). Consequences of an overview on PGPR work in Argentina: the Field should be wider. *Programa de investigación en interacciones biológicas, Universidad Nacional de Quilmes. Argentina. WEBER, O., CRUZ, L. & DOBEREINER, J.*
- Wan, X. Y., & Liu, J. Y. (2008). Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(8), 1469-1488.

Zoghbi, M. D. G., Andrade, E. H., Santos, A. S., Silva, M. H. L., & Maia, J. G. S. (1998).  
Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) NE Br growing wild in the Brazilian  
Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1), 47-48



## 12. Anexos

### Anexo 1

*Porcentajes de inhibición bacteriana de las diferentes plantas y sus aceites esenciales*

| <i>Lippia alba</i>       |       |                   |                   |                   |                   |                   |
|--------------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1ppm                     | 50ppm | 100ppm            | 150ppm            | 200ppm            | 250ppm            | 300ppm            |
| 13.5%                    | 30.6% | 35.2%             | 43.7%             | 52.3%             | 57.0%             | 63.9%             |
| <i>Lippia organoides</i> |       |                   |                   |                   |                   |                   |
| 31.8%                    | 50.1% | 100% <sup>a</sup> | 100% <sup>a</sup> | 100% <sup>a</sup> | 100% <sup>a</sup> | 100% <sup>a</sup> |

Nota: concentraciones en partes por millón (ppm)

a: presento mejor tratamiento

### Anexo 2

*Resultados del conteo unidades formadora de colonias presentados por Lippia alba, Lippia organoides expresados en porcentajes de inhibición*

| Plantas tratadas                     | 1ppm  | 50ppm | 100ppm | 150ppm | 200ppm | 250ppm | 300ppm | C- | T  | C+   |
|--------------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----|----|------|
| <i>Lippia alba</i>                   | 32.8% | 46.2% | 55.9%  | 64.5%  | 67.6%  | 68.0%  | 70.3%  | 0% | 0% | 100% |
| <i>Lippia<sup>a</sup> organoides</i> | 43.8% | 51.9% | 100%   | 100%   | 100%   | 100%   | 100%   | 0% | 0% | 100% |

Nota: hay mayor inhibición al paso de la diferencia de concentraciones

a: tratamientos con resultados efectivos

### Anexo 3

*Porcentajes de inhibición bacteriana de la CMI Lippia alba*

|                    | 1500 <sup>a</sup> | 1550 <sup>b</sup> | 1600 <sup>b</sup> | 1650 <sup>b</sup> | 1700 <sup>b</sup> | 1800 <sup>b</sup> | 1850 <sup>b</sup> | 1900 <sup>b</sup> | 1950 <sup>b</sup> |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                    | 84.1%             | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              |
| <i>Lippia alba</i> | 2000b             | C-                | testigo           | C+                |                   |                   |                   |                   |                   |
|                    | 100%              | 0%                | 0%                | 100%              |                   |                   |                   |                   |                   |

Nota: Concentraciones evaluadas en partes por millón (ppm)

a: en la concentración de 1500ppm ya ha inhibido en gran manera, exactamente un 84.14% en promedio

b: a partir de 1550ppm hay un efecto inhibitorio total

## Anexo 4

### *Inhibición de la CMI del plaqueo de L. alba*

| Resultados de las UFC expresados en porcentajes |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1500 <sup>a</sup>                               | 1550 <sup>b</sup> | 1600 <sup>b</sup> | 1650 <sup>b</sup> | 1700 <sup>b</sup> | 1750 <sup>b</sup> | 1800 <sup>b</sup> | 1850 <sup>b</sup> | 1900 <sup>b</sup> | 1950 <sup>b</sup> | 2000 <sup>b</sup> |
| 91.8%   | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              | 100%              |

Nota: concentraciones evaluadas en partes por millón

a: Era de esperarse el crecimiento de *Burkholderia glumae* en la concentración de 1500ppm mostrando poca incidencia bacteriana pero con un valor casi llegando a las 100 colonias con efecto inhibitorio del 92% en promedio, figura 6

b: una inhibición absoluta del Fitopatógeno

## Anexo 5

### Porcentajes de inhibición bacteriana de la CMI *Lippia origanoides*

|                           | 50ppm               | 55ppm | 60ppm   | 65ppm | 70ppm | 75ppm | 80ppm | 85ppm | 90ppm <sub>a</sub> | 95ppm <sub>a</sub> |
|---------------------------|---------------------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|--------------------|
|                           | 51.1%               | 56.4% | 62.6%   | 63.7% | 74.2% | 77.6% | 87.2% | 90.0% | 100%               | 100%               |
| <i>Lippia origanoides</i> | 100ppm <sub>a</sub> | C-    | testigo | C+    |       |       |       |       |                    |                    |
|                           | 100%                | 0%    | 0%      | 100%  |       |       |       |       |                    |                    |

Nota: concentraciones evaluadas en partes por millón, El porcentaje incidente de bacteria va disminuyendo progresivamente a lo que la concentración va en aumento

a: 90ppm es la concentración mínima inhibitoria, teniendo un 100% de inhibición de allí en adelante contra *Burkholderia glumae*

## Anexo 6

### *Resultados del conteo unidades formadora de colonias presentados por Lippia orignoides expresados en porcentaje de inhibición*

| <i>Lippia origanoides</i> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 50ppm                     | 55ppm | 60ppm | 65ppm | 70ppm | 75ppm | 80ppm | 85ppm | 90ppm | 95ppm | 100ppm |
| 49.1%                     | 53.5% | 59.0% | 63.9% | 84.0% | 88.7% | 96.4% | 96.5% | 100%  | 100%  | 100%   |

Nota: a partir de 90ppm hay total inhibición de *B. glumae*

## Anexo 7

Porcentajes de inhibición de los 3 tratamientos durante cada hora

| Hora | <i>Lippia alba</i> | <i>Lippia organoides</i> | ácido oxolínico |
|------|--------------------|--------------------------|-----------------|
| 1    | 79.1%              | 100%                     | 56.7%           |
| 2    | 80.5%              | 100%                     | 69.3%           |
| 3    | 81.9%              | 100%                     | 75.2%           |
| 4    | 83.3%              | 100%                     | 85.7%           |
| 5    | 91.8%              | 100%                     | 89.9%           |
| 6    | 93.9%              | 100%                     | 93.3%           |
| 7    | 97.3%              | 100%                     | 94.9%           |
| 8    | 100%               | 100%                     | 96.0%           |
| 9    | 100%               | 100%                     | 96.5%           |
| 10   | 100%               | 100%                     | 96.8%           |
| 11   | 100%               | 100%                     | 98.1%           |
| 12   | 100%               | 100%                     | 100%            |
| 13   | 100%               | 100%                     | 100%            |

Nota: el ácido oxolínico resulto ser el tratamiento menos efectivo por hora, superado por los dos aceites esenciales, pero *L. organoides* resulto ser efectiva desde el inicio, siendo mejor que *L. alba*

## Anexo 8

Resultados bacteria-bacteria, *B. glumae* vs *Bacteria endófito*

| Bacteria            | Promedio de inhibición |
|---------------------|------------------------|
| R2LaM4 <sup>a</sup> | 138%                   |
| H1LaM4 <sup>a</sup> | 104%                   |
| T1LaM1              | 84.71%                 |
| T1LoM2              | 92.76%                 |
| R1LoM6              | 97.15%                 |
| H1LoM4 <sup>a</sup> | 114%                   |
| H1LoM4 <sup>a</sup> | 114%                   |
| Control             | 100%                   |

## Anexo 9

### Lista de compuestos químicos presentes en el aceite de *Lippia alba*

| Item | Tiempo De Retención (TR) | % Area | Compuesto Identificado   |
|------|--------------------------|--------|--|
| 1    | 6.684                    | 0.424  | 1-Octen-3-ol   |
| 2    | 6.969                    | 1.007  | 5-Hepten-2-one, 6-methyl-  |
| 3    | 8.464                    | 0.954  | D-Limonene   |
| 4    | 11.246                   | 1.113  | Linalool   |
| 5    | 12.955                   | 0.203  | 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-  |
| 6    | 13.262                   | 0.337  | Citronellal  |
| 7    | 13.703                   | 0.718  | trans-Verbenol   |
| 8    | 14.377                   | 1.280  | 3,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-  |
| 9    | 16.065                   | 5.128  | 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-   |
| 10   | 16.595                   | 29.461 | Neral  |
| 11   | 17.102                   | 11.873 | 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-   |
| 12   | 17.710                   | 35.750 | Geranial   |
| 13   | 19.798                   | 0.166  | D-Verbenone  |
| 14   | 20.997                   | 0.265  | (2,2,6-Trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-methanol   |
| 15   | 21.354                   | 1.578  | $\beta$ -Myrcene   |
| 16   | 21.533                   | 0.576  | Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,4 $\beta$ )]-                   |
| 17   | 22.364                   | 4.400  | Caryophyllene  |
| 18   | 22.993                   | 0.878  | $\alpha$ -Guaiene  |
| 19   | 23.418                   | 1.234  | Humulene   |
| 20   | 24.279                   | 0.796  | (1R,2S,6S,7S,8S)-8-Isopropyl-1-methyl-3-methylenetricyclo[4.4.0.0 <sup>2,7</sup> ]decane-rel-                          |
| 21   | 25.060                   | 0.470  | Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\alpha\beta$ )] |
| 22   | 25.334                   | 0.450  | alfa.-Copaene  |
| 23   | 26.195                   | 0.269  | Cyclohexene, 4-[(1E)-1,5-dimethyl-1,4-hexadien-1-yl]-1-methyl-   |
| 24   | 27.085                   | 0.180  | $\Upsilon$ -HIMACHALENE  |
| 25   | 28.036                   | 0.288  | Diepicedrene-1-oxide   |
| 26   | 41.645                   | 0.203  | Retinol  |

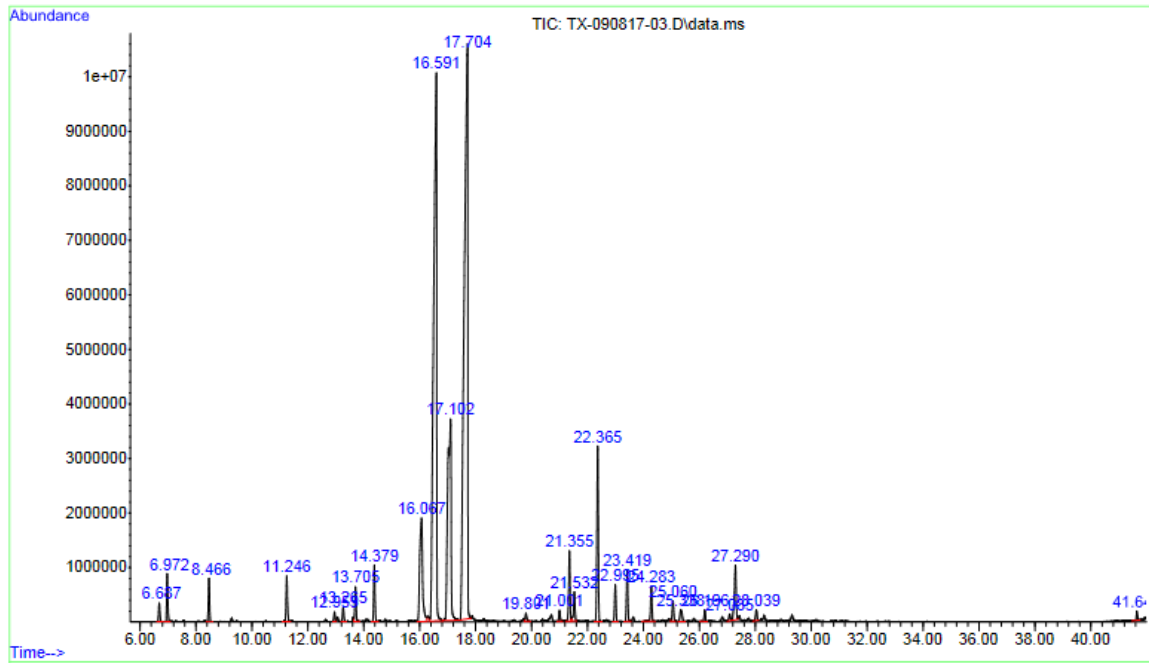
## Anexo 10

### Lista de compuestos químicos presentes en el aceite de *Lippia origanoides*

| Item | Tiempo De Retencion<br>(TR) | % Area | Compuesto Identificado  |
|------|-----------------------------|--------|---|
| 1    | 4.906                       | 0.459  | Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-  |
| 2    | 5.114                       | 0.438  | (1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene  |
| 3    | 5.589                       | 0.235  | Camphene  |
| 4    | 6.450                       | 0.123  | Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-  |
| 5    | 6.540                       | 0.111  | Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-   |
| 6    | 6.683                       | 0.031  | 1-Octen-3-ol  |
| 7    | 7.118                       | 2.342  | $\beta$ -Myrcene  |
| 8    | 7.551                       | 0.268  | Phellandrene  |
| 9    | 7.661                       | 0.104  | 3-Carene  |
| 10   | 8.012                       | 1.239  | 1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-   |
| 11   | 8.336                       | 9.435  | o-Cymene  |
| 12   | 8.463                       | 0.333  | D-Limonene  |
| 13   | 8.544                       | 2.486  | Eucalyptol  |
| 14   | 9.632                       | 3.447  | $\gamma$ -Terpinene   |
| 15   | 9.923                       | 0.197  | Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-,<br>(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,5 $\alpha$ )- |
| 16   | 10.744                      | 0.197  | Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-   |
| 17   | 11.236                      | 0.279  | Linalool  |
| 18   | 14.072                      | 0.535  | Terpinen-4-ol   |
| 19   | 14.206                      | 0.185  | Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-                                       |
| 20   | 14.678                      | 0.137  | $\alpha$ -Terpineol   |
| 21   | 16.232                      | 1.665  | Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-  |
| 22   | 18.542                      | 68.044 | Thymol  |
| 23   | 18.678                      | 0.193  | carvacrol   |
| 24   | 20.353                      | 2.473  | Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, acetate  |
| 25   | 22.356                      | 2.286  | Caryophyllene   |
| 26   | 23.417                      | 1.441  | Humulene  |
| 27   | 24.473                      | 0.252  | Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-  |
| 28   | 27.282                      | 0.779  | Caryophyllene oxide   |
| 29   | 28.039                      | 0.287  | Diepicedrene-1-oxide  |

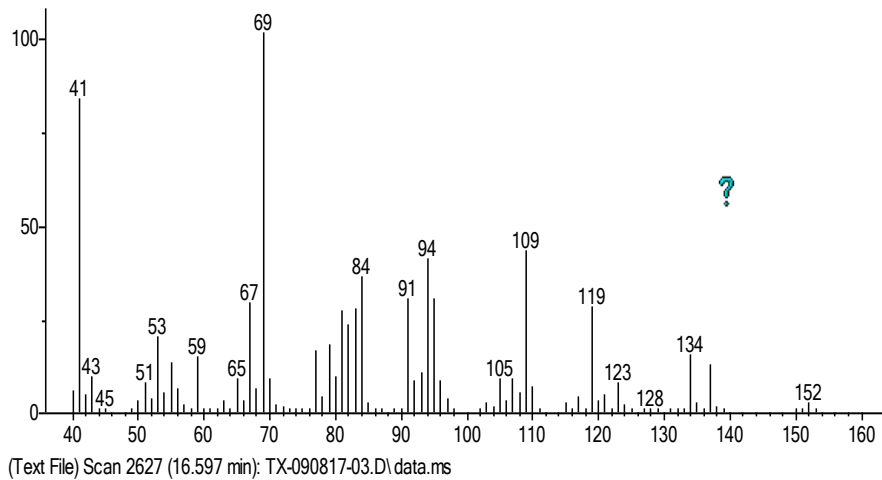
## Anexo 11

### *Cromatograma del aceite esencial de Lippia alba*



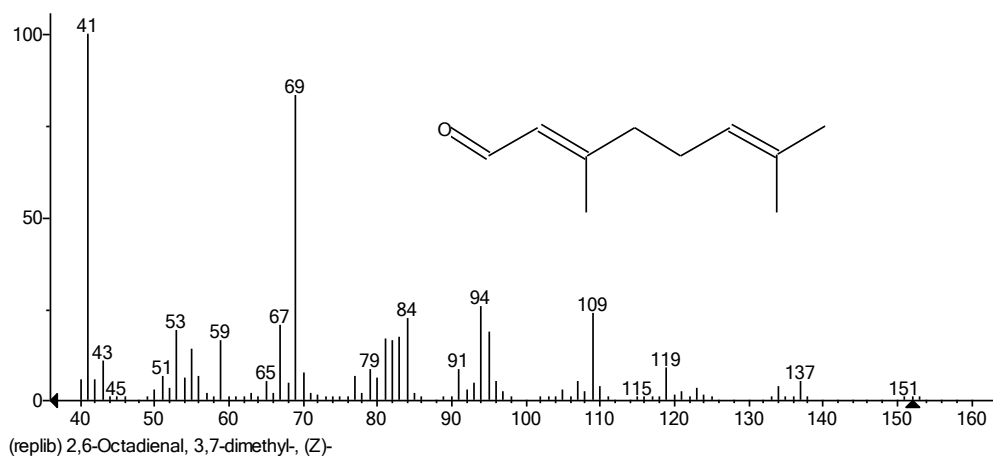
## Anexo 12

### *Espectro experimental de Neral*



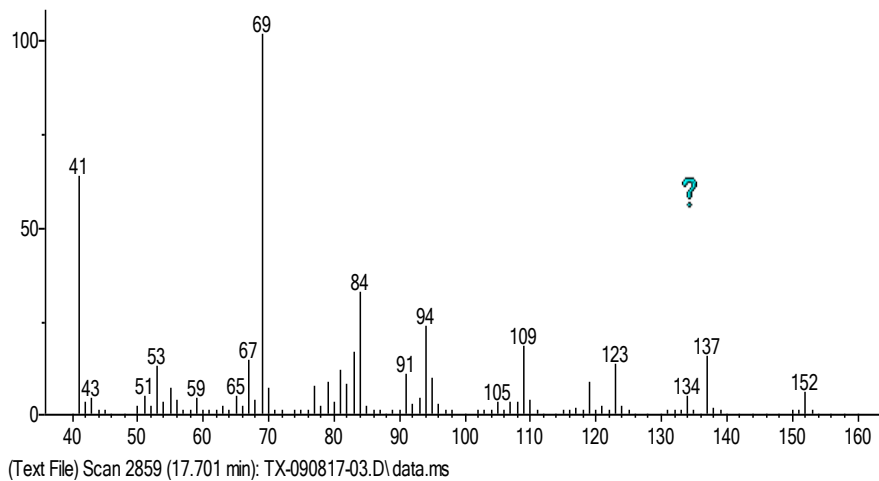
## Anexo 13

*Espectro arrojado por la base de datos NIST2011 sobre el neral*



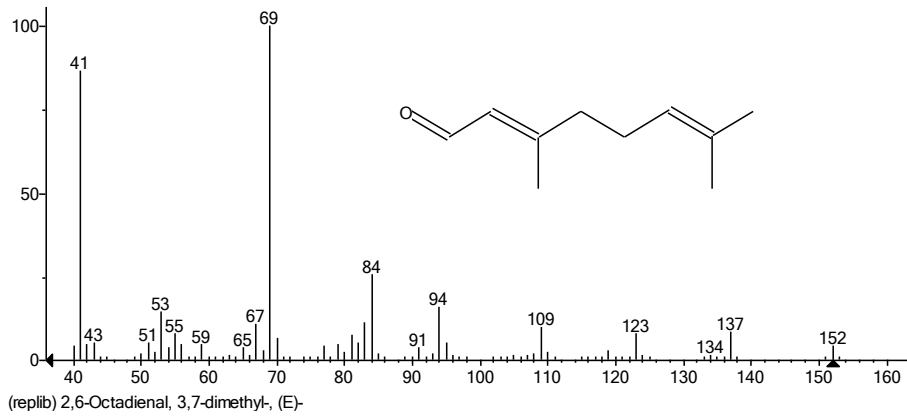
## Anexo 14

*Espectro experimental de Geranial*



## Anexo 15

*Espectro arrojado por la base de datos NIST2011 sobre el Geranial*



## Anexo 16

*Cromatograma del aceite esencial de Lippia organoides*

