

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología



*EFFECTO DE ACEITES ESENCIALES SOBRE
LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE CEPAS
FITOPATÓGENAS DE SOJA*

Trabajo final para optar al título de Microbiología

Milena Vanesa Giuliano

Año 2013

Directora: Dra. María de las Mercedes Oliva

Co-directora: Dra. Mirta Demo



El siguiente trabajo final fue realizado en la orientación de Microbiología perteneciente al Departamento de Microbiología e Inmunología, escrito y presentado como requisito para optar al título de Microbiología, en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Seminarista

Milena Vanesa Giuliano

Firma

Jurados

Dra. María de las Mercedes Oliva

Firma

Dr. Germán Barros

Firma

Dra. Elina Reynoso

Firma

ÍNDICE

I – INTRODUCCIÓN

1. Soja: Generalidades y cultivo	1
2. Enfermedades del cultivo de soja	4
2.a. Enfermedades bacterianas	5
2.a.1. Tizón bacteriano	5
2.a.2. Pústula bacteriana	8
3. Biofilms bacterianos	11
4. Control de enfermedades bacterianas	13
5. Plantas medicinales y aromáticas	14
6. Aceites esenciales	15

II – HIPÓTESIS DE TRABAJO

17

III – OBJETIVOS

1. Objetivo general	17
2. Objetivos específicos	17

IV - MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones	18
2. Medios de cultivo	18
3. Aceites esenciales	19
3.a. Obtención del material vegetal	19
3.b. Obtención de aceites esenciales	20
3.c. Identificación y cuantificación de los aceites esenciales	21
4. Cepas bacterianas	21
4.a. Aislamiento e identificación	21
4.b. Conservación y propagación de cepas	23
5. Actividad antimicrobiana de productos naturales	23

5.a. Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales	23
6. Producción de biofilm	24
6.a. Técnica del Rojo Congo	24
6.b. Técnica del Cristal Violeta	24
6.c. Producción de biofilm de cepas fitopatógenas a diferentes tiempos	25
6.d. Efecto de dosis inhibitorias y sub-inhibitorias de aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Thymus vulgaris</i> sobre la formación de biofilm	25
7. Análisis estadístico	26

IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de aceites esenciales	27
2. Identificación y cuantificación de componentes de aceites esenciales	29
3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Thymus vulgaris</i> sobre cepas de <i>P. syringae</i> y <i>X. axonopodis</i>	31
3.a. Identificación de cepas fitopatógenas de soja	32
3.b. Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales	32
4. Determinación de la formación de biofilm en cepas aisladas de hojas de soja	36
4.a. Producción de biofilm por técnica de Rojo Congo	37
4.b. Producción de biofilm por técnica del Cristal Violeta	38
4.c. Producción de biofilm de cepas fitopatógenas a diferentes tiempos	42
5. Efecto de dosis inhibitorias y sub-inhibitorias de aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Thymus vulgaris</i> sobre la formación de biofilm	47

V – CONCLUSIONES	55
-------------------------	----

VI – BIBLIOGRAFIA	57
--------------------------	----

VII - ANEXO	68
--------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Disposición trifoliada de las hojas de plantas de soja (zona rural Alcira Gigena)	2
Figura 2: Flores características de la planta de soja (zona rural Paso del Durazno)	2
Figura 3: Frutos y semillas característicos de soja (zona rural Alcira Gigena)	3
Figura 4: Manchas foliares características de tizón bacteriano (zona rural Alcira Gigena)	7
Figura 5: Signos característicos de pústula bacteriana	10
Figura 6: Etapas en la formación de un biofilm bacteriano de la clase de las proteobacterias	12
Figura 7: Equipo de hidrodestilación para obtención de aceites esenciales	20
Figura 8: Cultivo de <i>Origanum vulgare</i>	27
Figura 9: Cultivo de <i>Thymus vulgaris</i>	28
Figura 10: Producción de biofilm por la Técnica del Rojo Congo	38
Figura 11: Producción de biofilm por la Técnica del Cristal Violeta (observación cualitativa)	40
Figura 12: Producción de biofilm por la Técnica del Cristal Violeta (observación de capas superficiales)	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos microbianos	22
Tabla 2: Rendimiento y densidad de los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	29
Tabla 3: Componentes identificados en los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Origanum vulgare</i> (%) por GC-MS	30
Tabla 4: Actividad antimicrobiana de los AE de <i>Origanum vulgare</i> y <i>Thymus vulgaris</i> sobre cepas de <i>P. syringae</i> y <i>X. axonopodis</i>	33
Tabla 5: Producción de biofilm en cepas aisladas de soja mediante la Técnica del Rojo Congo	37
Tabla 6: Producción de biofilm en cepas aisladas de soja mediante la Técnica del Cristal Violeta	39
Tabla 7: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a diferentes tiempos (Lectura de DO _{570nm})	43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Producción de biofilm en cepas aisladas de soja mediante la Técnica del Cristal Violeta	41
Gráfico 2: Producción de biofilm a diferentes tiempos en cepas fitopatógenas	44
Gráfico 3: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 8 hs.	45
Gráfico 4: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 24 hs.	46
Gráfico 5: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 36 hs.	46
Gráfico 6: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 48 hs.	47
Gráfico 7: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Thymus vulgaris</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (8 hs.)	48
Gráfico 8: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Thymus vulgaris</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (24 hs.)	49
Gráfico 9: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Thymus vulgaris</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (36 hs.)	49
Gráfico 10: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Thymus vulgaris</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 hs.)	50
Gráfico 11: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Origanum vulgare</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (8 hs.)	51
Gráfico 12: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Origanum vulgare</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (24 hs.)	51
Gráfico 13: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Origanum vulgare</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (36 hs.)	52
Gráfico 14: Efecto de CIM y $\frac{1}{2}$ CIM de AE de <i>Origanum vulgare</i> sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 hs.)	52

Existen pocas medidas efectivas de control de microorganismos fitopatógenos. Los tratamientos con antibióticos o sales de cobre no poseen demasiada eficacia y son tóxicos ambientales. Una alternativa son las sustancias naturales tales como aceites esenciales (AE). Las bacterias fitopatógenas producen biofilm como estrategia de colonización para comenzar el ciclo de enfermedad. Está formado por comunidades bacterianas adheridas a una superficie y embebidas en una matriz de exopolisacáridos. Es el primer paso en la patogénesis y la agregación celular promueve la virulencia y la protección contra las respuestas de defensa de la planta. En el presente estudio se evaluó la capacidad de AE de orégano y tomillo de inhibir el biofilm producido por cepas de *P. syringae* aisladas de soja (6) y de referencia (P61 y DC3000). Se evaluó la formación e inhibición de biofilm por la técnica de cristal violeta. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por técnica de microdilución en caldo y la concentración bactericida mínima (CBM). Todas las cepas fueron productoras de biofilm, la formación fue detectada a las 8 hs de incubación, observándose concentraciones variables dependiendo de las cepas. Los AE presentaron actividad inhibitoria sobre las cepas analizadas. Los valores de CIM para tomillo estuvieron entre 1,4 y 11,5 mg/mL. y para orégano entre 5,8 y 46,3 mg/mL. Dosis sub-inhedoras de AE redujeron significativamente la producción de biofilm a las 8, 24, 36 y 48 hs. No se observó producción de biofilm cuando fueron expuestas a la CIM de ambos AE. La efectiva actividad antibacteriana que poseen estos AE, y la importancia de la inhibición total de la formación de biofilm a dosis subletales constituyen una alternativa promisorias para el tratamiento de enfermedades bacterianas de cultivos de soja, hortalizas, frutales, legumbres, cereales, ornamentales y además de que estos productos naturales no generan resistencia bacteriana, ni eliminan residuos tóxicos al ambiente

I – INTRODUCCIÓN

1. Soja: Generalidades y cultivo

En Argentina el cultivo de soja (*Glycine max* L Merr) ocupa el primer lugar en superficie sembrada. El 90% de la producción se obtiene en la provincia de Córdoba, zona sur y centro de Santa Fe, norte de Buenos Aires y noreste de La Pampa, el 5% en la región noroeste (Tucumán, Salta, Jujuy, noroeste de Santiago del Estero, y zona centro-este de Catamarca) y aproximadamente el 4% es obtenido en las provincias del este (Entre Ríos, Chaco, Corrientes y Misiones) (Wrather y col. 2001). Se cultiva en nuestro país desde 1960 y ha sido la siembra de rápida adopción y expansión en la historia de la agricultura argentina. En la actualidad, es el principal producto agrícola nacional por su participación en el valor total de la producción y de las exportaciones (Cabrera y col. 2004).

Glycine max, comúnmente conocida como soja, pertenece a la familia de las leguminosas. Su origen se sitúa en el Extremo Oriente y procede de la especie silvestre denominada *Glycineus suriensis*. Se cultiva en verano y su ciclo completo necesita entre 75 a 200 días para madurar, dependiendo de la especie, el clima y el suelo en el cual se siembra. Esta herbácea posee una altura que va desde 0,4 hasta 1,5 mts., según variedades y condiciones de cultivo. Los tallos son rígidos y en algunas condiciones muy ramificados. Su sistema radicular es potente, la raíz principal puede alcanzar hasta un metro de profundidad. Desarrollan raíces secundarias y poseen nódulos donde viven las bacterias fijadoras del nitrógeno que les aportan dicho nutriente necesario para el desarrollo de la planta. Las hojas son alternas, compuestas y trifoliadas con folíolos ovalanceolados (Figura 1) y presentan un color verde que se torna amarillo en la madurez, quedando las plantas sin hojas. Desarrollan un número variable de flores que se encuentran en inflorescencias racemosas axilares. Son pequeñas y se ubican en grupos de 5-10 flores blancas o violáceas-púrpuras. (Figura 2) En las flores tempranas se forman pocas vainas que comienzan a aparecer entre los 10 días y las dos semanas después de haber nacido las primeras flores (Scott y Aldrich. 1975).



Figura 1: Disposición trifoliada de las hojas de plantas de soja (zona rural Alcira Gigena)

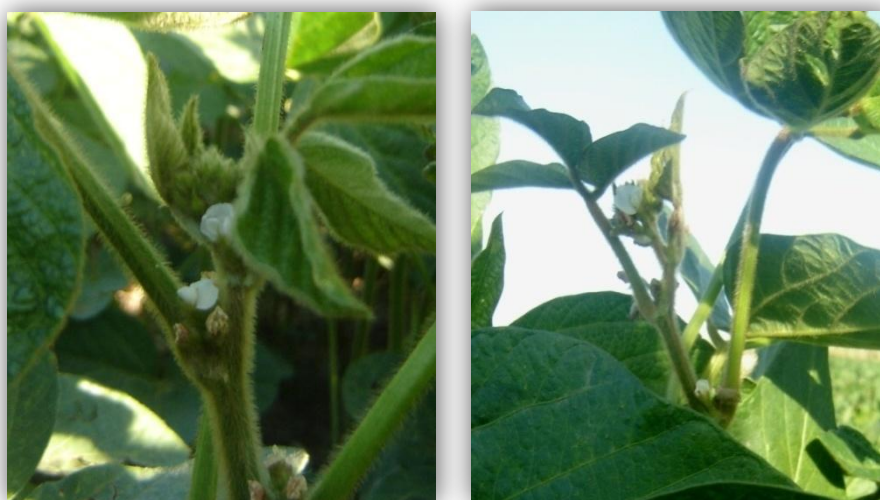


Figura 2: Flores características de la planta de soja (zona rural Paso del Durazno)

Los frutos tienen forma de chauchas que contienen de una a cuatro semillas cada una. Éstos se encuentran en grupos de dos o tres y son pubescentes cuando jóvenes y parduzcos al madurar. Las semillas son esféricas, amarillentas aunque pueden tomar otro color: marrón, negro o verde según los colores del hollejo y miden aproximadamente entre 3-6 mm. (Figura 3) (Scott y Aldrich. 1975).



Figura 3: Frutos y semillas característicos de soja (zona rural Alcira Gigena)

Esta leguminosa contiene alrededor de 36% de proteínas, 18% de grasas y reúne todos los aminoácidos necesarios para la vida humana, por lo que tiene gran importancia como alimento de primera categoría debido a su alto valor nutritivo (Mizrahi y Pinto. 1988).

Las temperaturas óptimas para la soja oscilan entre los 15°C y 18°C para la siembra y 25°C para la floración; sin embargo, ésta puede comenzar con temperaturas próximas a los 13°C, para ello, es indispensable determinadas horas de luz dependiendo de la variedad. Crece en terrenos pocos fertilizados, sobre todo en los áridos, aunque presenta poca resistencia a la salinidad. Se desarrolla en suelos neutros o ligeramente ácidos. Durante su cultivo necesita al menos 300 mm de agua (Scott y Aldrich. 1975).

2. Enfermedades del cultivo de soja

El monocultivo de soja junto a la siembra directa genera excelentes condiciones para la multiplicación y supervivencia de los patógenos causantes de las enfermedades de fin de ciclo (EFC), que son actualmente las más graves para el cultivo. Se entiende por EFC a un grupo de enfermedades cuyos síntomas se manifiestan en estados reproductivos intermedios y avanzados. La mayoría de los patógenos causantes de estas enfermedades son necrotróficos (extraen nutrientes de tejidos muertos) por lo que además, tienen la capacidad de sobrevivir en semillas y rastrojo (Formento y col. 2007).

Dicho complejo de EFC puede llegar a causar hasta un 30% de reducción en la producción de soja (Díaz y col. 2005). Estas enfermedades presentan diferentes niveles de incidencia y severidad que varían en función del estado fenológico, la región, las condiciones climáticas de cada campaña y las estrategias de manejo utilizadas. A nivel mundial han causado pérdidas en el rendimiento que oscilan entre un 10 y un 15%. Para la Argentina, dichas pérdidas son de aproximadamente del 8 al 10% de la producción (INTA, 2012). Estas enfermedades pueden afectar la producción del cultivo al reducir el área fotosintética, provocar senescencia foliar prematura, pérdida de fotoasimilados, destrucción de tejidos, reducción de turgencia y pérdida de calidad de semillas que limitan y disminuyen la producción y calidad del cultivo (Formento y col. 2007; Quintana y Sasovsky. 2006). La mayoría de los patógenos afectan las partes aéreas de las plantas de soja y las semillas, siendo estas últimas vehículos de transporte de dichos agentes. Muchos de ellos causan síntomas visibles, en cambio otros son portados sin causar daño directo, pero con importantes implicancias epidemiológicas. El control de la sanidad vegetal es importante para asegurar uniformidad del cultivo, evitar la dispersión de inóculos en el suelo e impedir el desarrollo de enfermedades (Díaz y col. 2005).

Las enfermedades que pueden afectar la soja desde el estado de inicio de formación de vainas hasta madurez fisiológica según la escala de Fehr y Cavannes (1977) son aproximadamente 50. Producen entre otros síntomas podredumbre de raíces y tallos y manchado de hojas, tallos, vainas y semillas. Pueden ser causadas por hongos o bacterias, como por ejemplo la mancha marrón (causada por *Septoria glycines*), el tizón de la hoja (*Cercospora kikuchii*), mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*), sclerotinia (*Sclerotinia sclerotium*), síndrome de la muerte repentina (*Fusarium*

spp.), tizón bacteriano (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*), pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), entre otras (Diaz y col. 2005; Formento. 2002; Formento y col. 2007).

2.a. Enfermedades bacterianas

La soja puede ser afectada por al menos seis bacterias fitopatógenas, las cuales pueden causar manchas foliares y marchitamiento. Entre ellas se encuentran *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (causante del quemado bacteriano), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (arrugado foliar bacteriano), *Ralstonia solanacearum* (marchitez bacteriana), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Mancha canela y marchitamiento bacteriano) y las dos restantes mencionadas anteriormente resultando ser las bacteriosis principales en el cultivo de soja (Formento y col. 2007; Scandiani y Luque. 2009).

2.a.1. Tizón bacteriano

El agente causal del tizón bacteriano es *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper. 1919), actualmente conocida como *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Formento y col. 2007). Es un bacilo Gram negativo, aerobio estricto, perteneciente a la subclase gamma de Proteobacterias, es oxidasa y arginina dehidrolasa negativos, posee flagelo polar y en la mayoría de los casos produce pigmentos fluorescentes. Es una bacteria epífita, es decir que coloniza la superficie de la epidermis y los espacios intercelulares del mesófilo sin ingresar al interior de las células de la hoja. Es capaz de crecer rápidamente en la plántula pre-emergente y luego coloniza las hojas cuando la planta crece (Ruffinatto. 2007).

Se sabe que esta bacteria puede causar enfermedades de manchas, puntos y tizón en plantas tales como porotos, remolachas, manzanas, pepino, lechuga, avena, tomate, ornamentales, entre otros. Por esto, los aislamientos de *P. syringae* son subdivididos taxonómicamente en patovares, los cuales son variedades patogénicas basadas principalmente en el huésped de aislamiento (Hwang y col. 2005).

Actualmente, en la provincia de Córdoba se registra la presencia de tizón bacteriano desde los primeros estadios vegetativos y durante casi todo el ciclo del cultivo, con niveles de incidencia del 100% y de severidades de hasta un 20% (INTA, 2012).

- Patogenicidad y virulencia

Para iniciar la patogénesis las bacterias deben ingresar a la hoja. Beattie y Lindow (1999) proponen un modelo de ocho etapas para explicar el ingreso de las bacterias al tejido vegetal. Este modelo comprende la llegada de la bacteria a la hoja, la modificación del micro ambiente en las inmediaciones de la célula bacteriana, la división celular y la extensión del ambiente modificado, la formación de microcolonias bacterianas, confluencia de estas microcolonias, entrada al espacio intercelular, la multiplicación en los espacios intercelulares y la salida de la bacteria hacia la superficie de la hoja. La entrada al espacio intercelular se produce a través de estomas, hidátodos, nectarios y heridas presentes en la superficie de la hoja. La entrada de bacterias también puede producirse a través de las flores (Cracogna. 2007).

Para una exitosa colonización de las plantas, las bacterias fitopatógenas desarrollaron una variedad de factores de virulencia que les permite evadir las defensas de las plantas y así obtener nutrientes (Cracogna. 2007). Los miembros del género *Pseudomonas* patógenas de plantas producen diversas moléculas importantes asociadas a la virulencia, tales como alginato y levano, polisacáridos de alto peso molecular. La formación de levano sirve como una característica taxonómica de *P. syringae* y la producción de alginato contribuye a la vida epífita y se ha asociado con la resistencia a la desecación, a moléculas tóxicas y con la inducción de lesiones acuosas en hojas infectadas (Hettwer y col. 1998; Laue y col. 2006). Las exoenzimas cutinasas, pectinasas, glucosidasas y celulasas también son consideradas importantes factores de virulencia ya que degradan componentes de la pared celular de plantas vasculares permitiendo el avance a través de los tejidos (Montesinos y Beltrá. 2000).

Otro factor de virulencia muy común en las bacterias fitopatógenas es la producción de fitotoxinas las cuales desestabilizan el equilibrio fisiológico de la planta, por lo que poseen un papel importante en la patogénesis (Murillo y Rodríguez-Palenzuela. 2000, Ruffinatto. 2007). Estas toxinas se originan en el metabolismo

secundario y hasta el momento se han descrito cinco tipos: siringomicina, coronatina, faseolotoxina, tabtoxina y tagetoxina. Las mismas son producidas por diferentes patovares de *P. syringae* capaces de producir síntomas de clorosis o de necrosis en la planta (Bender y col. 1990; Hwang y col. 2005).

- Síntomas y signos

Las hojas son los órganos más atacados por las bacterias, aunque también se puede manifestar en pecíolos, tallos y vainas. Los síntomas son pequeñas manchas marrón oscuras a negras (carácter distintivo), angulosas, de superficie plana sin protuberancias, generalmente brillantes cuando ocurre el exudado bacteriano más común en el envés de la hoja. Las partes centrales de las manchas se secan, se vuelven oscuras y se rodean de un margen humedecido envuelto por un halo verde amarillento. Las lesiones se agrandan y confluyen en áreas muertas e irregulares (Figura 4). Las semillas se pueden infectar observándose un crecimiento bacteriano viscoso en la superficie (Coerper. 1919; Formento y col. 2007; Young. 2010).



Figura 4: Manchas foliares características de tizón bacteriano
(zona rural Alcira Gigena)

- Dispersión y persistencia

Kendrick y Gardner (1920) demostraron que el patógeno es llevado por las semillas y Kauffman y Leben (1974) concluyeron que, en condiciones controladas, la entrada de las bacterias a las mismas se produce a través de las flores. La dispersión del inóculo dentro de un lote se realiza por salpicado de la lluvia y por la formación de aerosoles que contienen células bacterianas. *P. syringae* tiene la capacidad de persistir en el suelo durante el invierno y en rastros de soja infectados (Cracogna. 2007). Las condiciones ambientales predisponentes para el establecimiento y dispersión de la enfermedad son elevada humedad relativa, temperaturas templadas a frescas y vientos fuertes con lluvias (Formento y col. 2007).

2.a.2. Pústula bacteriana

El agente causal de la pústula bacteriana es *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Macano Dye), también conocida como *X. axonopodis* pv. *glycines* (Formento y col. 2007; Kaewnum y col. 2006). Pertenece a la subdivisión gamma de las Proteobacterias, es una bacteria Gram negativa, aerobia estricta, con forma de bastón que puede encontrarse sola, de a pares o constituyendo cadenas. Las colonias son circulares, de borde entero, lisas y de color brillante. Produce xanthomonadina, un pigmento amarillo insoluble en agua y que no difunde al medio (Malamud. 2011; Scandiani y Luque. 2009). Es oxidasa negativo, posee la enzima catalasa, produce precipitados a partir del sulfuro de hidrógeno y posee un solo flagelo polar (He y Zhang. 2008).

El género *Xanthomonas* es uno de los grupos más ubicuos de las asociaciones planta-patógeno, se ha demostrado que los miembros de este género pueden infectar al menos 124 monocotiledóneas y 268 especies de dicotiledóneas. *X. campestris* es la especie más dominante con al menos 141 patovares que infectan una amplia gama de plantas, incluyendo muchas de interés agrícola, como por ejemplo, coliflor, brócoli, tomate, pimiento, algodón, soja, nogal, entre otros (He y Zhang. 2008). Es un patógeno vascular y normalmente se limita al xilema de las hojas de las plantas infectadas en la etapa temprana de la enfermedad (Ryan y col. 2006).

En Argentina, la pústula bacteriana ha sido mencionada para todas las áreas sojeras (SINAVIMO). Ya en la década de 1960, Atlas (1965) mencionaba su presencia en las provincias de Misiones, Chaco, Santa Fe, Entre Ríos, Salta, Tucumán y Río Negro (Cracogna. 2007). En regiones asiáticas se han reportado pérdidas de rendimiento de hasta un 40% (Kaewnum y col. 2006).

- Patogenicidad y virulencia

La bacteria llega a los espacios intercelulares penetrando a través de aberturas naturales (estomas) y por heridas. Coloniza las paredes del parénquima esponjoso, en donde se produce una pérdida progresiva y posterior dispersión de las microfibrillas y la ruptura de algunas células del mesófilo; por último las células se agrandan, presionan la epidermis hacia afuera y constituyen la pústula que caracteriza la enfermedad. La bacteria es capaz de penetrar a los tejidos interiores de la semilla, sobreviviendo allí hasta por 16 meses; también es capaz de permanecer en residuos de cosecha por 9 meses (Gotuzzo. 1975; Polanco. 1974).

Xanthomonas sp. posee al menos seis sistemas de secreción que cumplen una importante función en la patogenicidad. Estos sistemas liberan enzimas al medio que degradan la pared celular vegetal, lo que permite que el patógeno modifique el entorno a su favor (Büttner y Bonas 2010). Además, tiene la capacidad de producir un exopolisacárido llamado xantano que consiste en secuencias repetidas de un pentasacárido formado por manosa-(β -1,4)-ácido glucurónico-(β -1,2)-manosa-(β -1,3)-celobiosa. Los polisacáridos son constituyentes importantes de la superficie bacteriana que pueden ser secretados al medio o quedarse unidos a la superficie celular cumpliendo funciones destacadas como impedir la desecación, contribuir a la aparición de síntomas y suprimir la defensa basal de las plantas (Dharmapuri y Sonti 1999; Vojnov y col. 2001; Yun y col. 2006). Además está altamente relacionado con la capacidad de desarrollar biofilms (Torres y col. 2007). Este compuesto es el responsable del aspecto mucoide característico de las colonias bacterianas de este género (Malamud. 2011).

Estas bacterias también poseen la capacidad de deslizarse debido a la presencia de flagelos. Uno de los movimientos que son capaces de realizar es llamado *swimming* que les permite trasladarse a través de un ambiente acuoso (Jarrell y McBride. 2008; Staskawicz y col. 1987); y otro movimiento donde la presencia del

flagelo es fundamental es el de *swarming* donde las bacterias se encuentran creciendo y esparciéndose dentro de una colonia donde es necesario algún tipo de comunicación entre ellas. Muchos estudios relacionan al flagelo con las etapas tempranas del proceso de formación de biofilm (Malamud. 2011).

- Síntomas y signos

La enfermedad afecta principalmente al follaje y se ha citado su presencia en vainas (Cracogna. 2007). Los primeros síntomas son lesiones pequeñas, marrones a verde pálidas, con los centros elevados en una o en las dos caras de las hojas. Las lesiones varían de tamaño y pueden coalescer ocasionando desprendimiento de tejido foliar. Las hojas se ven rasgadas cuando se caen las partes muertas, sobre todo en período ventoso. La pústula se forma por hipertrofia o hipertrofia e hiperplasia de las células del parénquima (Figura 5). Pueden causar defoliación prematura. Se diferencia del tizón bacteriano en que durante los primeros estados de sintomatología no se manifiesta como lesiones acuosas y sus manchas son de centros sobreelevados (Cracogna. 2007; Formento y col. 2007).



Figura 5: Signos característicos de pústula bacteriana

(<http://www.soydiseases.illinois.edu/index.cfm?category=diseases&disease=92>;
http://wiki.bugwood.org/NPIP:M:Bacterial_pustule_on_soybean)

- Dispersión y persistencia

La bacteria sobrevive en las semillas de soja, en la superficie de rastrojos y en la rizósfera de las raíces de trigo. Fue aislada de semillas almacenadas durante 7 meses y se observaron síntomas de pústula en plántulas provenientes de semillas almacenadas 30 meses. Temperaturas moderadas a elevadas, con un óptimo de alrededor de 28°C, alta humedad, lluvia y viento (dispersión) son condiciones ambientales predisponentes para el establecimiento de la enfermedad. Está más difundida hacia el norte del país, al igual que el tizón. Atlas (1965) mencionó que las mayores pérdidas se producen cuando la bacteria llega a infectar las vainas (Cracogna. 2007; Formento y col. 2007).

3. Biofilms bacterianos

Los organismos procariontes que interactúan con las plantas lo pueden hacer de diversas maneras, por ejemplo como agentes patógenos, comensales o simbióticos, para lo cual la capacidad de formar biofilm es primordial, siendo ésta una importante estrategia de colonización en bacterias fitopatógenas (Danhorn y Fuqua, 2007; Ude y col. 2006).

A partir de la década de los 80 se comenzó a observar que la mayoría de los microorganismos estudiados se encontraban formando parte de comunidades metabólicamente integradas denominadas biopelículas o biofilms (Malamud. 2011). Dichas comunidades están compuestas por microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos en la cual también se encuentran proteínas, ADN y donde están adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. En general, el biofilm es la suma de las células bacterianas, los espacios intercelulares y la matriz extracelular que los rodea formada, entre otras cosas, por exopolisacáridos que es lo que se denomina "*slime*" (Costerton. 1999).

Las bacterias que conforman la biopelícula tienen una fisiología diferente de las células de vida libre. Por lo general, viven bajo limitación de nutrientes, pueden promover el intercambio de material genético y generar una mayor diversidad de poblaciones. Las biopelículas protegen a las bacterias de las tensiones ambientales, los mecanismos de defensa del huésped y de los compuestos antimicrobianos (Rigano

y col. 2007). La alta densidad poblacional proporciona la oportunidad de llevar a cabo ciertos procesos que las células individuales no pueden lograr de manera eficiente, tales como la producción de metabolitos excretados o exoenzimas que sólo son eficaces por encima de un umbral de concentración. La formación de una biopelícula es una forma de mantener una masa crítica de células en un lugar específico por períodos suficientes para iniciar interacciones beneficiosas o antagónicas con sus huéspedes. Debido a todas las propiedades que la formación de biofilm puede proporcionarle a los microorganismos, es considerado un importante factor de virulencia en cepas patógenas (Danhorn y Fuqua. 2007).

Hay un modelo generalizado para la formación de biopelículas. En primer lugar, los microorganismos colonizan y se adhieren a una superficie abiótica o biótica, en segundo lugar, las bacterias transforman su estado planctónico a un estado inmovilizado y, por último, se forma la microcolonia y continúa la proliferación de microorganismos hasta construir una arquitectura tridimensional que se considera como biopelícula madura (Chen Niu. 2006). En la figura 6 se muestra un esquema con las distintas etapas de este proceso.

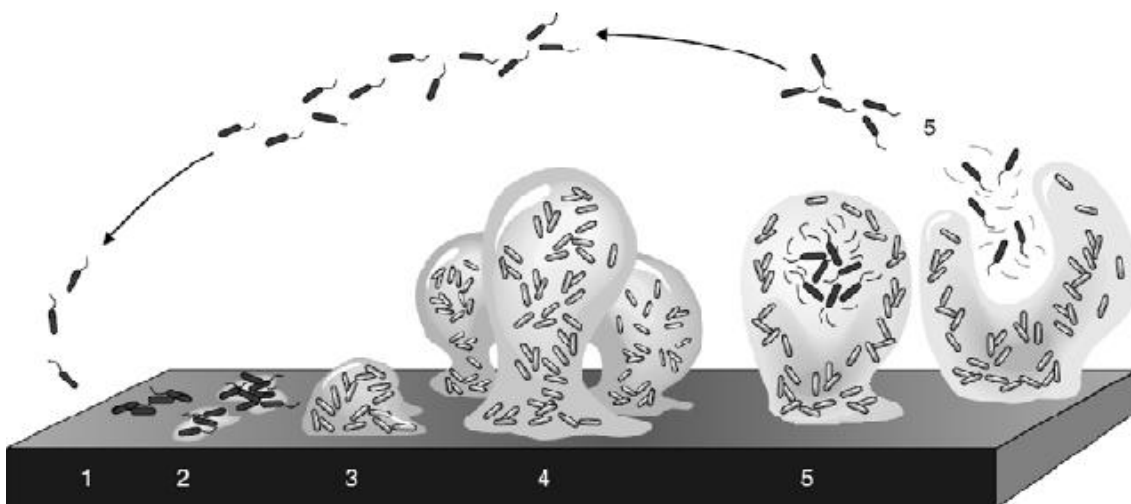


Figura 6: Etapas en la formación de un biofilm bacteriano de la clase de las proteobacterias. Inicio (1) unión débil, unión irreversible (2), formación de microcolonias (3), desarrollo de las macrocolonias (4), biofilm maduro (5). Imagen tomada de Sauer 2003, genome biology.

Existe una diversidad de arquitecturas de biofilm que refleja la adaptación a microambientes específicos, lo que sugiere que el estado nutricional es un factor crítico en el desarrollo del mismo. Muchos de los componentes polisacáridos de la

matriz de las biopelículas de bacterias Gram negativo se ha informado que desempeñan papeles importantes en la fisiología del biofilm tales como el alginato y levano en *P. syringae* y xantano en *Xanthomonas* (Rigano y col. 2007). La matriz conecta a las células e imparte características claves incluyendo la capacidad de proteger a las células de la desecación y otras tensiones. Las bacterias pueden variar su composición de la matriz y el uso de diferentes adhesinas para adaptarse a los cambios ambientales (Danhorn y Fuqua. 2007). Otros componentes estructurales, tales como los flagelos, desempeñan un papel importante ya que facilitan la iniciación de la formación de biopelículas debido a que ayudan a la unión a las superficies y son necesarios para que las bacterias puedan moverse en el biofilm facilitando el crecimiento y la propagación del mismo (Pratt y Kolter. 1998).

Se ha demostrado que el proceso de formación de biofilm se encuentra regulado y dirigido por un sistema de sensores propio de las bacterias conocido como *quórum sensing* (QS) donde se percibe que al aumentar la cantidad de bacterias también aumentan moléculas denominadas homoserin lactonas (HSL) (Malamud. 2011). Este mecanismo permite a las bacterias actuar de manera coordinada y refuerza la idea de que las células individuales se benefician del comportamiento grupal cooperativo para sobrevivir, competir y persistir en la naturaleza o colonizar un huésped en particular (Bodman y col. 2003).

4. Control de enfermedades bacterianas

Se requiere de una combinación de varios métodos de control para combatir una enfermedad bacteriana. Son muy importantes las medidas sanitarias que permitan disminuir la cantidad de inóculo en un área de cultivo al trasladar y quemar las plantas infestadas y al limitar la propagación de las bacterias mediante la desinfección de las herramientas y manos después de haber manipulado plantas enfermas. El ajuste de ciertos métodos de cultivo como la fertilización e irrigación, de tal forma que las plantas no sean extremadamente suculentas durante el período en que se produce la infección, puede también reducir la incidencia de la enfermedad. El uso de variedades resistentes a ciertas enfermedades bacterianas complementadas con prácticas de cultivo adecuadas es una de las mejores formas de evitar grandes pérdidas. Los antibióticos como estreptomycin y compuestos derivados del cobre se han utilizado para combatir algunas enfermedades pero no son recomendables ya que generan

resistencia bacteriana y resultan tóxicos para el ambiente y el humano (Agrios. 2002). Como medida preventiva se recomienda el uso de semillas producidas en lotes sanos y/o certificadas mediante análisis sanitario, una correcta rotación de cultivos y la eliminación del rastrojo enfermo (Fernandez Valiela. 1975; Formento y col. 2007).

Como estrategia alternativa para evitar la dispersión de enfermedades como pústula y tizón bacterianos se está probando la aplicación de compuestos naturales derivados de plantas (Formento y col. 2007; Vasinauskiene y col. 2006). Las investigaciones se centran principalmente en las especies aromáticas las cuales se seleccionan sobre la base de su uso popular. Los productos derivados de estas plantas se pueden dividir en varias categorías fitoquímicas: fenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, aceites esenciales (AE), alcaloides, lectinas y polipéptidos. Varios estudios confirman la actividad antimicrobiana de los mismos; en consecuencia, la preservación de especies vegetales nativas resulta crucial para mantener la biodiversidad y la principal fuente de estos compuestos (Demo y Oliva. 2008; Díaz. 2008; Henao y col. 2009; Tereschuk y col 2007).

5. Plantas medicinales y aromáticas

La denominación de plantas medicinales hace referencia a aquellos vegetales con principios activos que ejercen una acción farmacológica y beneficiosa para el organismo vivo. Un principio activo se define como aquella sustancia cuya principal función es aliviar la enfermedad o restablecer la salud, otorgando las propiedades terapéuticas a estas plantas y en base a ellos se clasifica y selecciona. Tanto semillas como frutos, hojas, tallos y raíces pueden contener principios activos. Con el transcurso del tiempo se han aislado estos principios y se han realizado estudios químicos, fisiológicos y médicos. Muchos de estos productos naturales se fueron incorporando a las farmacopeas, continuando en la actualidad con el uso de ellos en la medicina humana y animal (Davies. 2004; Núñez y Cantero. 2000).

Algunas especies de plantas medicinales son aromáticas; éstas generan por algún proceso fisicoquímico un producto aromático, caracterizado por poseer olor o sabor determinado (Bamba y col. 1993). Dentro de este grupo hay una gran diversidad de especies cuya característica en común es la producción de AE y/o resinas, las cuales son una mezcla fragante de líquidos (Gunther. 1948).

6. Aceites esenciales

Químicamente consisten en mezclas de lípidos sencillos llamados terpenos. Estructuralmente están constituidos por la unión de dos o más unidades de isopreno y se clasifican según el número de éstas que poseen. Los compuestos oxigenados derivados de estos hidrocarburos incluyen alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos (Croteau y col. 2000; Primo-Yúfera. 1995; Sikkema y col. 1995; Svoboda y Hampson. 1999).

Tradicionalmente se refiere a estas sustancias como metabolitos secundarios, los cuales están distribuidos entre grupos taxonómicos limitados dentro del reino vegetal (Cowan. 1999). Los AE o esencias, se elaboran en el citoplasma de ciertas células vegetales y se acumulan en diferentes partes de la planta, pudiendo localizarse en un determinado órgano vegetal: flores, hojas, frutos y hasta raíces o en toda la planta (Burt. 2004; Ojeda y col. 2001).

Desde la antigüedad, los AE de plantas han sido utilizados como medicamentos, especias y perfumes (Bagci y Digra. 1996; De Pooter y col. 1995; Zygadlo y Juliani. 2000). Los AE y sus componentes están generando cada vez mayor interés debido a su inocuidad y seguridad, a su amplia aceptación por parte de los consumidores y a sus potenciales y múltiples usos (Ben El Hadj Ali y col. 2013). Han demostrado tener destacadas propiedades funcionales en beneficio de la salud del hombre pudiendo jugar un rol muy importante en el agregado a productos alimenticios y como quimioterápicos en enfermedades de origen humano y animal. Entre las propiedades descritas se encuentran: actividad antitumorogénica (Crowell. 1999), actividad antioxidante (Tiziana Baratta y col. 1998; Zygadlo y Juliani. 2000) y actividad antimicrobiana entre otras (El-Sakhawy y col. 1997; Tiziana Baratta y col. 1998; Demo y col. 2005; Oliva y col. 2011; Zygadlo y Juliani. 2000).

Se está investigando el uso de AE y extractos naturales provenientes de vegetales frente a bacterias fitopatógenas aisladas de soja, encontrándose resultados promisorios (Oliva y col. 2013). Investigaciones realizadas con AE de numerosas especies aromáticas de Argentina afirman que estos compuestos inhiben a bacterias Gram positivo, Gram negativo y hongos unicelulares (Demo y col. 2005; Oliva. 2005). Muestras oleosas obtenidas de miembros de la familia *Lamiaceae* fueron activas contra *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* agente causal del tizón en porotos (Soylu y col. 2003) y estudios realizados sobre *P. syringae* y otras bacterias

fitopatógenas demostraron que el AE de *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare* y *O. vulgare* presentaron buena actividad inhibitoria (Vasinauskiene y col. 2006).

Los AE ejercen su acción principalmente en la membrana plasmática de la célula produciendo daños en la estructura de la misma, modificando la hidrofobicidad de la superficie de la misma y se sabe que modulan el QS (Di Pascua y col. 2006; Sikkema y col. 1995; Turina y col. 2006). La producción de “biofilm” por *Pseudomonas sp* y *Escherichia coli*, fue significativamente inhibida por terpenos como eugenol y citronelol (Niu y Gilbert 2004). Algunos AE podrían estar incidiendo en la liberación y/o producción de biofilm, exopolisacáridos y exoproteínas generados por cepas microbianas, por lo que el estudio de la capacidad de evitar o inhibir la formación de biofilms ayudaría a controlar la capacidad patogénica de los microorganismos.

Aunque la producción agrícola ha crecido en los últimos años, en gran medida debido al uso generalizado de fertilizantes sintéticos, pesticidas, riego, etc., esta tasa de producción no es sostenible a causa de los impactos ambientales de las prácticas modernas agrícolas. Una correcta utilización de productos antimicrobianos de origen natural aplicados sobre el cultivo y/o sobre semillas infectadas evitaría la dispersión de la enfermedad y además contribuiría con la no eliminación al medio ambiente de productos contaminantes no deseados.

En este trabajo se obtuvieron por hidrodestilación AE de las plantas aromáticas: *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* y se ensayó la actividad antimicrobiana de estos sobre bacterias fitopatógenas aisladas de soja y sobre la producción de biofilm de estas bacterias. Los antecedentes de efectividad en la actividad inhibitoria de estos compuestos naturales sobre bacterias los convierte en potenciales sustancias efectivas, no contaminantes y de bajo costo que podrían ser utilizadas para el control de bacteriosis de soja.

II – HIPÓTESIS DE TRABAJO

Bacterias fitopatógenas son productoras de biofilm y los aceites esenciales inhiben su producción.

III – OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar el efecto de aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm de cepas bacterianas fitopatógenas de soja.

2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Recolectar, preparar y obtener aceites esenciales a partir del material vegetal.

Objetivo 2: Identificar y cuantificar los componentes de los aceites esenciales.

Objetivo 3: Determinar la actividad antimicrobiana (CIM y CBM) de aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* sobre cepas fitopatógenas de soja.

Objetivo 4: Analizar a diferentes tiempos la capacidad de los fitopatógenos bacterianos *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas axonopodis* para formar biofilms.

Objetivo 5: Analizar el efecto de dosis subletales de aceites esenciales sobre la formación de biofilm de las cepas en cuestión.

IV - MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones

- **Solución de resazurina al 0,01%**

Sal de Resazurina Sódica _____ 0.01 gr.

Agua destilada c.s.p. _____ 100 ml

Se colocó 0,01 gr. de sal de resazurina sódica en 100 ml de agua destilada estéril en un frasco de vidrio color caramelo esterilizado. La solución se disolvió por agitación y se conservó a 4°C con tapón de goma y en oscuridad.

- **Cristal Violeta al 1%**

Cristal violeta _____ 1 gr.

Agua destilada c.s.p. _____ 100 ml

2. Medios de cultivo

- **Caldo Trypticasa – Soya (CTS)**

Tripteína _____ 17 gr.

Peptona de soya _____ 3 gr.

Cloruro de sodio _____ 5 gr.

Fosfato dipotásico _____ 2,5 gr.

Glucosa _____ 2,5 gr.

Agua destilada c.s.p. _____ 1000 ml

- **Agar Trypticasa - Soya (ATS)**

Caldo Trypticasa Soya _____ 1000 ml

Agar _____ 17 gr

- **Extracto de levadura, dextrosa, CO₃Ca (YDCA):** para *Xanthomonas sp.*

Extracto de levadura _____ 5 gr.
Dextrosa (glucosa) _____ 20 gr.
Carbonato de calcio _____ 40 gr.
Agua destilada c.s.p. _____ 1000 ml
Agar _____ 15 gr.

- **Caldo King B (CKB):** para *Pseudomonas sp.*

Tripteína soya _____ 10 gr.
Peptona de carne _____ 10 gr.
Fosfato dipotásico _____ 1,5 gr.
Sulfato de magnesio _____ 1,5 gr.
Agua destilada _____ 1000 ml
Glicerina _____ 10 ml

- **Agar King B (AKB):** para *Pseudomonas sp.*

Se preparó con los mismos componentes indicados anteriormente más el agregado de 15 gr de agar/litro.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C a 1 atm de presión durante 15 minutos. Se conservaron a 4°C hasta el momento de su uso.

3. Aceites esenciales

3.a. Obtención del material vegetal

Los especímenes vegetales aromáticos *Origanum vulgare* (L) cv “chileno” (orégano) y *Thymus vulgaris* (L) (tomillo) fueron obtenidos de cultivares provenientes de la provincia de San Luis. Se seleccionaron cuidadosamente aquellas partes vegetales que no mostraron ninguna alteración morfológica visible, como así tampoco

indicios de afecciones por patógenos, tanto hojas verdes, flores como de talluelos tiernos. El material vegetal se almacenó en un recipiente limpio y fresco hasta el momento de su uso.

3.b. Obtención de aceites esenciales (AE)

Para la extracción del AE de las plantas aromáticas se utilizó la técnica de hidrodestilación. Para ello se llenó una columna extractora con el material vegetal el cual fue depositado sobre una rejilla. En un balón de 1 litro de capacidad, conteniendo agua, se generó calor hasta ebullición; los vapores de agua arrastraron los componentes volátiles al atravesar el lecho vegetal de la columna, los cuales condensaron y por decantación se obtuvieron dos fases: AE-agua (Bamba y col. 1993; De Feo y col. 1998) (Figura 7). El AE obtenido fue desecado con sulfato de sodio anhidro y conservado a -20°C hasta el momento de su uso con el propósito de evaluar las actividades biológicas.



Figura 7: Equipo de hidrodestilación para obtención de aceites esenciales.

3.c. Identificación y cuantificación de los aceites esenciales

Se realizó la cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) de los AE de orégano y tomillo, en el Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Dr. Julio Zygadlo. Los AE fueron analizados en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-R1A equipado con una columna de sílica (30 m x 0,25 mm) cubierta con CBP-1. La temperatura de la columna fue programada desde los 60°C a los 240°C a 4°C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 270 °C. El gas carrier utilizado fue He, a una velocidad de 1ml/min. El área de los picos fue medida por integración electrónica. Las cantidades relativas de los componentes individuales están basadas en el área de los picos obtenida, sin factor de corrección de FID. Las temperaturas programadas de los índices de retención de los compuestos fueron determinadas relacionadas a los n-alcanos. El análisis de GC fue realizado utilizando una columna Supelcowax-10 bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente.

Cromatografía gaseosa y Espectrometría de masas (GC-MS): este análisis fue realizado en un aparato Perkin Elmer Q-910 usando una columna capilar cubierta con CBP-1, de 30m x 0.25 mm. La temperatura de la columna y del inyector fue la misma que la utilizada para la cromatografía gaseosa. El gas carrier fue He, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El espectro de masa fue registrado a 70 eV. Los componentes oleosos fueron identificados por comparaciones de sus índices de retención con aquellos de muestras auténticas, por el tamaño del pico de datos publicados, y la librería de espectros de masa del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 3.0) y librería propia de espectros de masa e índices de retención de los compuestos volátiles. Los análisis de GC-MS fueron realizados utilizando una columna Supelcowax 10 con las mismas condiciones descriptas anteriormente. (Adams.1989)

4. Cepas bacterianas

4.a. Aislamiento e identificación

Se utilizaron cepas de referencia y cepas aisladas de hojas de soja con sintomatología característica de tizón y/o pústula durante 2009/2010 y 2010/2011.

Fueron caracterizadas según propiedades fisiológicas y bioquímicas en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la U.N.R.C. y tipificadas mediante identificación genotípica por ARNr 16S (servicio de Macrogen, Korea) (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos microbianos

PROVINCIA	ORIGEN	CEPAS	IDENTIFICACIÓN (RNAr 16S)	MAX IDENTIDAD
Córdoba	Alicia Gigena	A5	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	99%
		A6	<i>Pseudomonas putida</i>	99%
		A7	<i>Pseudomonas putida</i>	99%
	Paso del Durazno	M2E7	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99%
	Los Cisnes	C11	<i>Pseudomonas putida</i>	99%
		C13	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	99%
		LS3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	99%
	Alejandro Roca	C47	<i>Acinetobacter schindleri</i>	99%
		EM1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	99%
		EM16	<i>Pseudomonas putida</i>	99%
		EM21	<i>Acinetobacter schindleri</i>	99%
Santa Fe	Venado Tuerto	VT2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	99%
San Luis	Quines	Q	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	99%
Cepas de referencia	INTA Bella Vista (Corrientes)	Xa	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> / pv. <i>citri</i>	99%
	UNRC (Depto. Biología Molecular)	DC 3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	
		P61	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	

4.b. Conservación y propagación de cepas

Las cepas utilizadas se conservaron en AKB y ATS inclinado, a 4 °C y se repicaron mensualmente. Para el almacenamiento de cepas a largo plazo se repicaron en CTS, CKB y/o caldo YDCA con el agregado de glicerol al 20 % y se conservaron a -80°C.

5. Actividad antimicrobiana de productos naturales

5.a. Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Concentración inhibitoria mínima (CIM): Se determinó mediante la Técnica de microdilución en caldo según Mann y Markham (1998).

Preparación de la dilución de trabajo: Se sembraron los microorganismos en CKB o CTS, según corresponda, y se incubaron a 28°C durante 24 hs. A partir de los caldos se realizaron diluciones factor 10 en CTS o CKB hasta la dilución 10⁻⁵. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 170 µL de cada dilución del microorganismo a probar, 20 µL de DMSO:agua (1:8) y 10 µL de resazurina. Se incubaron a 28°C durante 24 hs. y como dilución de trabajo se eligió la primera dilución incapaz de reducir la resazurina (azul). La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos, a determinada concentración, de reducir al indicador redox resazurina (0,01%); el color azul indicó que la concentración celular es insuficiente para reducir al compuesto (estado oxidado) y el rosado presencia de crecimiento (estado reducido).

Recuento microbiano: a las diluciones de trabajo elegidas de cada cepa se les realizó recuento microbiano. Para ello, se tomó 1 ml de la misma realizándose en agua peptonada diluciones seriadas en base 10. Se sembraron 100 µL de cada una de ellas en placas con AKB o ATS según corresponda y se incubaron a 28°C durante 24-48 hs. Se determinaron las UFC/ml de cada dilución de trabajo.

Determinación de la CIM: Se realizaron diluciones factor 2 del AE en DMSO:agua (1:8). En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 20 µL de cada

dilución del AE a probar y luego 170 μ L del cultivo microbiano (dilución de trabajo), desde el pocillo 1 al 10. Se incubó la microplaca a 28°C durante 24 hs. y luego se agregaron 10 μ L de resazurina al 0,01% en cada pocillo. La placa se incubó nuevamente a 28°C durante 3-4 hs. y se determinó la CIM visualmente al observar el cambio de color azul a rosa. Se tomó como CIM a la última dilución que presentó color azul, es decir, la concentración más baja del AE que inhibió el crecimiento visible del microorganismo.

El control positivo consistió en 170 μ L de cultivo de microorganismo a probar con 20 μ L del diluyente (DMSO:agua) sin el aceite (rosado) y el control negativo fue 170 μ L de CTS o CKB suplementado con 20 μ L del diluyente del AE (azul) (Carson y col. 1995; Mann y Markham. 1998).

Concentración bactericida mínima (CBM)

En placas de ATS o AKB se sembraron en superficie 100 μ l de la CIM y las 5 diluciones anteriores a la misma, obtenidas en la microtécnica. Se incubaron a 28°C durante 24-48 hs. y se observó la CBM. Se definió la CBM como la mínima concentración a la cual menos del 0,01% del inóculo sobrevivió. Cada ensayo se realizó por duplicado (Finelgold y col. 1992).

6. Producción de biofilm

6.a. Detección de cepas productoras de biofilm por la Técnica de Rojo Congo.

Se siguió la metodología propuesta por Mathur y col. (2006) con algunas modificaciones.

Se hicieron crecer cepas de *Pseudomonas* y *X. axonopodis* aisladas de soja en CKB y en CTS, respectivamente, a 28°C durante 48 hs. Luego se sembraron en placas de Agar Rojo Congo en estrías radiales y se incubaron a 28°C durante 72 hs. Las colonias color bordó se consideraron cepas productoras de biofilm.

6.b. Detección de biofilms por micrométodo espectrofotométrico cuali y cuantitativo.

Se siguió la metodología según O`Toole y col. (1998).

Microplacas de 48 pocillos se inocularon con 900 μ L de CKB y 100 μ L de cultivo bacteriano con una DO_{620nm} comprendida generalmente entre 1 y 2, y se incubaron a 28° C durante 48 hs. Las células libres fueron removidas y los pocillos fueron teñidos con cristal violeta (CV) al 1% durante 30 min. a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada, y posteriormente se efectuó una lectura visual usando un grado estimativo de producción de biofilm: fuerte (+++), moderado (++) , débil (+), ausente (-). El biofilm se cuantificó por solubilización con 1500 μ L de etanol al 95% y la absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro a 570 nm. (O'Toole y col. 1998).

6.c. Producción de biofilm de cepas fitopatógenas a diferentes tiempos.

Una vez detectada la producción de biofilm de las cepas fitopatógenas, se determinó la producción del mismo a distintos períodos de incubación: 8, 24, 36 y 48 hs. con el fin de evaluar a que tiempo comienza a formarse el biofilm en cada una de las cepas.

6.d. Efecto de dosis inhibitorias y sub-inhibitorias de aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm.

Se realizó la experiencia según Niu y Gilbert (2004) con algunas modificaciones.

Las cepas productoras de biofilm fueron sometidas a la acción de los AE a fin de evaluar la inhibición en la producción del mismo.

Inóculo microbiano: Las cepas fueron cultivadas a 28 °C durante 24 hs. en CKB y/o CTS a partir de las cuales se realizaron diluciones hasta obtener valores de DO_{620nm} similares a los obtenidos con cada cepa en la experiencia de actividad antimicrobiana (CIM).

Se probó el efecto de diferentes concentraciones de aceite (CIM y $\frac{1}{2}$ CIM) sobre la capacidad de formación de biofilm en placas de 48 pocillos. Se colocó en cada pocillo de la placa 900 μ l del inóculo microbiano y 100 μ l de AE a concentraciones finales sub-inhibitorias (1/2 CIM) o inhibitorias (CIM) según corresponda. Cada concentración de AE se realizó por triplicado. Se incubó a 28°C y se observó el efecto de los AE sobre la producción de biofilm a distintos tiempos de incubación: 8, 24, 36 y 48 hs. Al finalizar cada período, se descartó el medio de cada

pocillo, se lavó dos veces con agua destilada, se tiñó con CV (1%) durante 30 min., se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Se determinó visualmente el desarrollo de biofilm. Posteriormente se agregó 1500 μ l de etanol al 95% y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm (Niu y Gilbert. 2004).

Se realizaron controles negativos: control de medio de cultivo: CKB o CTS, control del diluyente: medio de cultivo + DMSO:agua (1:8) y controles positivos: control de producción de biofilm: 1000 μ l inóculo, control de viabilidad: inóculo + DMSO:agua (1:8).

7. Análisis estadístico

Los experimentos de producción de biofilm y efecto de AE sobre la producción de biofilm fueron ejecutados en tres a cinco repeticiones. Cada experiencia se realizó por duplicado. Sobre los resultados obtenidos, se realizaron los siguientes cálculos estadísticos utilizando el software InfoStat (Di Rienzo y col. 2012)

1. Determinación de medias y desvíos estándar.
2. Análisis de varianza y test de LSD Fisher, $\alpha = 0.05$.

IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 - Obtención de aceites esenciales (AE)

Los AE son metabolitos secundarios que normalmente sintetizan las plantas para la lucha contra agentes infecciosos o parasitarios o como consecuencia de situaciones de estrés. Son componentes aromáticos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas, tales como flores, brotes, semillas, hojas y frutos, y han sido utilizados durante mucho tiempo en diferentes industrias, principalmente en perfumes, en los alimentos y en la industria farmacéutica (Koroch et al. 2007).

En este trabajo se obtuvieron AE de dos especies aromáticas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*: *Origanum vulgare* (L) cv “chileno” y *Thymus vulgaris* (L).

Orégano: *Origanum vulgare*, es una especie de la familia *Lamiaceae* que crece en laderas soleadas. Es originaria de Europa y Asia, desde donde se ha extendido hacia todo el mundo (Figura 8). Es una planta muy rica en AE, aunque la cantidad varía dependiendo de las diferentes variedades. Es muy utilizado como saborizante en gastronomía y también posee amplias propiedades medicinales: tónica, digestiva, estimulante, expectorante, antiespasmódica y estomacal. Es efectivo contra el reumatismo, tortícolis, asma húmeda, debilidad estomacal, supresión de menstruación, falta de apetito, etc. (Enciclopedia de Plantas que curan. 1994).



Figura 8: *Origanum vulgare*

(<http://fichas.infojardin.com/condimentos/origanum-vulgare-oregano-meiorana-silvestre-orenga.htm>)

Tomillo: *Thymus vulgaris*, pertenece a la familia *Lamiaceae* (Figura 9). Se emplea desde la antigüedad como condimento y como planta medicinal. Los usos más populares del tomillo son aquellos relacionados con la digestión, el sistema respiratorio y propiedades antisépticas. En la actualidad se estudia su acción sobre el sistema inmunológico y el posible efecto sinérgico de su asociación con otros inmunoestimulantes. Todas las propiedades medicinales del tomillo, unidas a su baja toxicidad, permiten su aplicación en tratamientos prolongados (Enciclopedia de Plantas que curan. 1994).



Figura 9: *Thymus vulgaris*

(http://www.farmazia.ehu.es/p046-11213/eu/contenidos/informacion/jardin_virtual/eu_jardin/adjuntos/55.thvu.htm)

Luego de la extracción de los AE se procedió a realizar los cálculos correspondientes para determinar el rendimiento y la densidad de cada uno de ellos. El porcentaje de rendimiento fue calculado en base a los volúmenes de AE obtenidos según la cantidad de material vegetal hidrodestilado (Tabla 2).

Tabla 2: Rendimiento y densidad de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*

ACEITE ESENCIAL	RENDIMIENTO (%)	DENSIDAD (gr/mL)
<i>Origanum vulgare</i> (Orégano)	0,5	925,2
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	1,9	918,8

El rendimiento obtenido para el AE de orégano fue similar al descrito por Lombardo (2008) quien obtuvo un valor de 0,39%, mientras que el alcanzado para el AE de tomillo no se encuentra dentro de los promedios citados por los autores Roldan y colaboradores (2010) y Lombardo (2008), quienes obtuvieron valores de 0,48% y 0,27% respectivamente, alcanzando mayor rendimiento en nuestra experiencia.

2 - Identificación y cuantificación de componentes de aceites esenciales

Los principales componentes de los AEs fueron mono y sesquiterpenos. Ha sido demostrado que algunos de estos componentes, aislados o en conjuntos, presentan actividades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Roldan y col. 2010).

En el AE de orégano se identificaron 24 compuestos y en el AE de tomillo se identificaron 36 compuestos, que representan el 99,7% y 99,3%, respectivamente. Ambos aceites presentaron altos niveles de carvacrol (19,7 y 29,5%, respectivamente) y bajos porcentajes de timol (1,5 y 1% respectivamente). Estos monoterpenos fenólicos se describen como característicos de dichos aceites (Ultee y col. 1998; Viuda-Martos y col. 2011). Además, los AE de orégano y tomillo presentan p-cimeno y gamma terpineno como componentes principales y el AE de orégano presentó también cis-hidrato sabineno en alto porcentaje entre sus terpenos (Tabla 3).

Tabla 3: Componentes identificados en los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* (%) por GC-MS

COMPONENTES	% TOMILLO	% ORÉGANO
alfa tujona	1.7	0.6
alfa pineno	1.6	Tr
alfa fencheno	0.8	Tr
beta pineno	1.1	-
Sabineno	-	1.8
3 –octanona	-	Tr
trans-2-octen-1-ol	-	Tr
Mirceno	1.8	1.2
3-octanol	Tr	-
alfa felandreno	Tr	-
3 – careno	Tr	-
alfa terpineno	1.7	2.4
p –cimeno	31.5	11.5
1,8 –cineol	2.4	-
Limoneno	-	Tr
beta felandreno	-	Tr
Cisocimeno	-	3.9
transocimeno	-	0.6
gama terpineno	11.3	22.7
Terpineno	1.5	2.1
para-cimeno	Tr	-
Linalol	3.5	-
cis hidrato de sabineno	Tr	19.7
trans hidrato de sabineno	-	Tr
Alcanfor	Tr	-
Borneol	1	0.6
4-terpineol	1.2	5.1
p-cimeno-8-ol	Tr	-
alfaterpineol	Tr	1.8
Timol metil éter	1.7	1.5
Geraniol	Tr	-
Geranial	Tr	
Timol	1	1.5
Carvacrol	29.5	19.7
acetato de isobornilo	Tr	-
alfa copaeno	Tr	-
beta bourboneno	Tr	-
Longifoleno	3.6	-
alfa cadineno	1.1	-

gama muuroleno	Tr	-
gama cadineno	Tr	-
delta cadineno	Tr	-
1-S cis calameneno	Tr	-
oxido de cariofileno	1.3	-
beta cariofileno	-	2.7
	99.3	99.7

Ref.: tr: trazas

Se ha descrito para el AE de tomillo altos porcentaje de timol entre sus componentes (Roldan y col. 2010; Rota y col. 2008; Stahl-Biskup 1991; Viuda-Martos y col. 2011). Sin embargo, en este ensayo se presentó bajo contenido de dicho monoterpeno. Las variaciones en la composición de los AE de tomillo se deben a distintos factores, entre ellos se encuentran el quimiotipo, la edad y parte del vegetal de donde se extrajo el aceite, la etapa de desarrollo de la planta, el período de cosecha, entre otros (Viuda-Martos y col. 2011). Se han informado 7 quimiotipos diferentes dentro de *T. vulgaris* que estarían correlacionados con el polimorfismo sexual y el medio ambiente. La razón de estas variaciones dentro de una misma especie vegetal podría estar atribuida a la ruta biosintética de los fenoles terpénicos presentes en su composición, como resultado de represores o inhibidores de las enzimas (Stahl-Biskup. 1991).

3 - Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* sobre cepas de *P. syringae* y *X. axonopodis*.

Dentro de las plantas aromáticas se ha reportado a la familia *Lamiaceae* como un grupo destacado debido a su actividad antimicrobiana. En esta familia se encuentran *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (Pierozan y col. 2009). La actividad antimicrobiana de los AE de estas dos especies fueron analizados en el Laboratorio de Microbiología del Dpto. de Microbiología e Inmunología, observándose la efectividad de los mismos contra cepas Gram negativo aisladas de alimentos (Lombardo. 2008) y aisladas de soja (Córdoba. 2012).

3.a. Identificación de cepas fitopatógenas de soja

Se realizó la identificación bioquímica y por ARN 16s de 13 cepas aisladas a partir de plantas de soja con sintomatología característica de pústula y tizón. De las 13 cepas aisladas, 6 de ellas fueron identificadas por ARN 16s dentro de la especie *P. syringae* patovariedad *glycinea*. Fueron identificadas como *P. putida* 4 cepas, como *Acinetobacter schindleri* 2 cepas y como *Achromobacter xylosoxidans* 1 cepa. Estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología correspondiente al Dpto. de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la U.N.R.C.

3.b. Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Las enfermedades bacterianas en cultivos adquieren importancia debido a que provocan disminución o pérdida en la producción agrícola, lo cual implica fuertes impactos económicos (Formento y col. 2007). El control de estas plagas se realiza principalmente con pesticidas que resultan tóxicos para el ambiente y el hombre. La limitada disponibilidad de bactericidas, la capacidad de las bacterias fitopatógenas de difundir a través de semillas y la rápida resistencia a los pesticidas que estos microorganismos adquieren, ocasionan un problema considerable en el control de estas plagas (Lo Cantore y col. 2004).

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos orgánicos biológicamente activos obtenidos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar microorganismos patógenos. La utilización de AE obtenidos de plantas con propiedades antimicrobianas representa una nueva alternativa para el control de bacterias fitopatógenas (Borboa-Flores y col. 2010).

Se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los AE de orégano y tomillo sobre las cepas fitopatógenas de *P. syringae* y cepas de referencia: *X. axonopodis*, *P. syringae* pv. *syringae* (P61) y *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000), utilizando la técnica de microdilución en caldo. El rango de concentración de inóculo utilizada en este ensayo fue de 10^4 a 10^7 UFC/mL dependiendo de la cepa bacteriana (los resultados se detallan en la Tabla 1 del Anexo). La mayoría de los microorganismos probados fueron

inhibidos por ambos AE, con excepción de la cepa *P. syringae* pv. *glycinea* (VT2) la cual sólo fue inhibida por el AE de orégano. La cepa más sensible a la acción de ambos AE fue *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*/pv.*citri*, la cuál fue la única que presentó CBM. El resto de las cepas fueron inhibidas por ambos AE, siendo *P. syringae* pv. *glycinea* (LS3) la más sensible a la acción del AE de orégano (CIM: 5,8 mg/mL) y *P. syringae* pv. *syringae* (P61) al AE de tomillo (5,8 mg/mL). Los valores de CIM para el aceite de orégano presentaron variación entre 5,8 mg/mL y 46,3 mg/mL y para el de tomillo entre 1,4 mg/mL y 11,5 mg/mL, siendo esta última concentración la que registró el porcentaje más alto de inhibición en las cepas probadas (75%). (Tabla 4)

Tabla 4: Actividad antimicrobiana de los AE de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* mediante la técnica de microdilución en caldo sobre cepas de *P. syringae* y *X. axonopodis*

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	ORÉGANO (92,5-0,022 mg/mL)		TOMILLO (92-0,0022 mg/mL)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	46,3	-	11,5	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	11,6	-	11,5	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	46,3	-	11,5	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	5,8	-	11,5	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	23,1	-	NI	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Q)	23,1	-	11,5	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (P61)	11,6	-	5,8	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000)	23,1	-	11,5	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> /pv. <i>citri</i> (Xa)	5,8	11,6	1,4	23

Ref.: NI: no inhibe; (-): no posee

El método de microdilución en caldo posee la ventaja de utilizar pequeños volúmenes de las sustancias a ensayar y permite mayor número de repeticiones (Sokovic y col. 2007). A partir de este método se puede determinar también el efecto -cida de una sustancia.

Se pudo observar que tanto el AE de tomillo como el de orégano tuvieron capacidad de inhibir a la mayoría de las bacterias fitopatógenas ensayadas, destacándose el tomillo con bajos valores de CIM. La actividad antimicrobiana realizada con estreptomycin (control) no presentó efecto contra las bacterias analizadas. Por lo tanto ambos aceites poseen alta eficacia sobre cepas de *P. syringae*, las cuales se caracterizan por ser resistentes a estreptomycin. Los antimicrobianos tales como cobre y estreptomycin se han utilizado durante décadas para controlar las infecciones por *P. syringae* en plantas de cultivo (Hwang y col. 2005).

La capacidad inhibitoria de los compuestos naturales evaluados en el presente trabajo representan una alternativa de control interesante debido a que las bacterias fitopatógenas poseen reconocida resistencia a las sustancias antimicrobianas. Esta resistencia está dada por la composición química de la membrana externa ubicada por fuera de la pared de peptidoglicanos, que funciona como una barrera cuyas porinas no permiten el paso de grandes moléculas. Aunque algunos solutos hidrofílicos pequeños atraviesen la membrana externa; ésta muestra muy baja permeabilidad para compuestos hidrofóbicos, lo que ha sido adjudicado a la presencia de lipopolisacáridos lipofílicos. Este hecho es lo que otorga la resistencia de las bacterias Gram negativo hacia los antibióticos hidrofóbicos, drogas y probablemente a algunos AE. Además algunas bacterias Gram negativo, particularmente *Pseudomonas sp.*, pueden presentar una serie de adaptaciones que incluso les permite desarrollarse en presencia de compuestos hidrocarbonados tóxicos (Helander y col. 1998; Sikkema y col. 1995).

La capacidad antimicrobiana de los AE está dada por la presencia de componentes activos, principalmente atribuible a isoprenos tales como monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes relacionados, otros hidrocarburos y fenoles. El carácter lipófilo de su esqueleto hidrocarbonado y el carácter hidrófilo de sus grupos funcionales son de principal importancia en la acción antimicrobiana de los componentes de los AE (Koroch y col. 2007). Los terpenos (combinación de unidades de isopreno) perturban la integridad de la membrana y alteran la permeabilidad celular

por penetración entre las cadenas de ácidos grasos que componen las bicapas lipídicas de las membranas (El Abed y col. 2011). Como consecuencia se ve afectada la homeostasis de pH, el equilibrio de iones inorgánicos, inhibición de la actividad ATPasa, liberación de ATP intracelular, entre otros (Koroch y col. 2007; Viuda-Martos y col. 2011).

Muchos trabajos afirman que los AE de orégano y tomillo tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, relacionadas con el elevado porcentaje de los compuestos fenólicos carvacrol y timol. Por lo tanto estos AE así como los terpenos mencionados por sí solos podrían ser utilizados como fungicidas y bactericidas (Bagamboula y col. 2004; Borboa-Flores y col. 2010; Kotan y col. 2007; Sokovic y col. 2007). Cosentino y col. (1999), estudiaron el AE de tomillo demostrando elevada actividad antimicrobiana sobre una gran variedad de cepas Gram positivo y Gram negativo, atribuyendo esta capacidad a la concentración de los componentes fenólicos: timol y carvacrol, mientras que Vasinauskienė y col. (2006) demostraron que el AE de orégano presentó actividad contra algunas especies bacterianas tales como *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas marginalis*, *P. syringae* y *Bacillus sp.* asignando dicho efecto a los terpenos mencionados anteriormente.

Por GC-MS se observó que los AE de tomillo y orégano utilizados contienen elevados porcentajes de carvacrol (29,5 y 19,7%, respectivamente) y bajos de timol (< 1,5%), por lo que la capacidad inhibitoria podría ser atribuida principalmente a carvacrol, y/o a las mezclas terpénicas que se generan en el AE completo. Nostro y Papalia (2012) indicaron que el carvacrol, debido a su naturaleza hidrofóbica, interactúa con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática y se alinea entre las cadenas de ácidos grasos logrando una expansión y desestabilización de la estructura de la membrana y un aumento de su fluidez y permeabilidad. Produce agotamiento del ATP intracelular ya sea por reducción de su síntesis o aumento de la hidrólisis del mismo.

Además, el AE de tomillo presentó un porcentaje elevado de p-cimeno (31,5%) y el AE de orégano un porcentaje considerable de gamma-terpineno (22,7%). Estos compuestos son precursores de los isómeros timol y carvacrol por lo que se puede atribuir un posible efecto sinérgico entre ellos. Aunque el p-cimeno es un compuesto antibacterial débil, expande la membrana celular bacteriana lo que ayuda a que el carvacrol sea más fácilmente transportado dentro de la célula observándose un efecto sinérgico entre ellos (Roldan y col. 2010; Rota y col. 2008).

Estos resultados demuestran la elevada eficacia de los AE de orégano y tomillo frente a bacterias Gram negativo fitopatógenas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Por lo tanto, estos aceites constituyen una alternativa promisorio para el control de enfermedades causadas por bacterias sobre diferentes cultivos de interés agroalimentario. La ventaja de estos compuestos naturales es que no generan resistencia bacteriana, no dejan residuos tóxicos en el ambiente y pueden ser obtenidos en grandes cantidades y a bajo costo.

4 - Determinación de la formación de biofilms en cepas aisladas de hojas de soja.

En los ecosistemas naturales, los microorganismos crecen preferentemente unidos a las superficies formando biopelículas. Éstas generalmente se definen como conglomerados de células inmovilizadas en una matriz orgánica con polisacáridos extracelulares como componente principal (Rigano y col. 2007). Los biofilms son utilizados por las bacterias como una estrategia con el fin de colonizar superficies de diversos ambientes tales como tejidos animales, plantas, rizósfera y agua. La vida en los biofilms le confiere a las bacterias, tanto comensales como patógenas, ventajas para soportar las condiciones adversas del estrés ambiental (Danhorn y Fuqua. 2007; Ude y col. 2006). El género *Pseudomonas* ha sido un modelo para el estudio de biopelículas ya que se ha demostrado que tiene la capacidad de formar biofilm sobre un gran número de superficies, tanto bióticas como abióticas. Este hecho llevó a indagar sobre estas estructuras microbianas ya que proporcionan un ambiente modificado que permite el desarrollo del microorganismo en el huésped y se convierten en una barrera física para la penetración de sustancias antimicrobianas (Kumar y col. 2013; O'Toole y Kolter 1998).

Se analizó la capacidad de producción de biofilm de todas las cepas en estudio mediante dos métodos: Técnica de Rojo Congo (método cualitativo) y Técnica del Cristal Violeta (cualitativa y cuantitativa).

4. a. Producción de biofilm por Técnica de Rojo Congo (RC)

El método de RC se realizó mediante la técnica de estrías radiales y permitió determinar cualitativamente la capacidad de cepas bacterianas de producir biofilm. La intensidad del colorante Rojo Congo indica la mayor producción de éste; a mayor intensidad mayor producción de biofilm, lo cual se expresó con una escala arbitraria de + a ++++. Se analizaron doce cepas aisladas de soja. Ocho presentaron buena producción de biofilm (++++) dentro de las cuales se encuentran cuatro cepas fitopatógenas de *P. syringae* pv. *glycinea* (EM1, LS3, C13 y Q). Dos presentaron moderada producción de biofilm (++) : *P. syringae* pv. *glycinea* (A5) y *P. putida* (EM16). Una cepa presentó baja producción (+): *Acinetobacter schindleri* (EM21) y una no presentó producción de biofilm mediante este método: *Acinetobacter schindleri* (C47) (Tabla 5) (Figura 10).

Tabla 5: Producción de biofilm en cepas aisladas de soja mediante la Técnica del Rojo Congo

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	OBSERV. CUALITATIVA
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	++
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	+++
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	+++
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	+++
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Q)	+++
<i>P. putida</i> (C11)	+++
<i>P. putida</i> (A6)	+++
<i>P. putida</i> (A7)	+++
<i>P. putida</i> (EM16)	++
<i>Acinetobacter schindleri</i> (EM21)	+
<i>Acinetobacter schindleri</i> (C47)	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (M2E7)	+++

Ref.: (-): sin producción, (+): débil (rosa); (++) : moderado; (++++): fuerte (rojo)

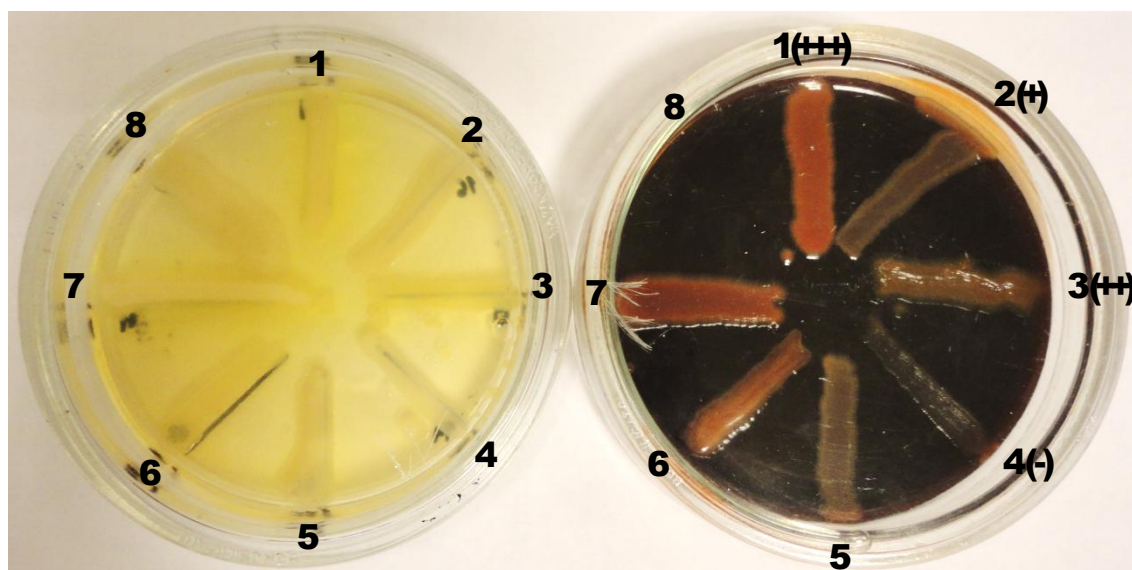


Figura 10: Producción de biofilm por la Técnica del Rojo Congo

Ref.: 1: *P. syringae* pv. *glycinea* EM1 (+++); 2: *Acinetobacter schindleri* EM21 (+); 3: *P. syringae* pv. *glycinea* A5 (++); 4: *Acinetobacter schindleri* C47 (-); 5: *P. putida* EM16 (++); 6: *P. syringae* pv. *syringae* Q (+++); 7: *Achromobacter xylosoxidans* M2E7 (+++); 8: No creció.

4. b. Producción de biofilm por Técnica del Cristal Violeta (CV)

Este método se realizó en policubetas de 48 pocillos utilizando rangos de concentraciones celulares de 10^9 a 10^{12} UFC/mL según la cepa a probar (los resultados se detallan en la Tabla 2 del Anexo). En el análisis cualitativo 6 cepas produjeron la mayor cantidad de biofilm (+++) con una mínima diferencia con respecto al resto. Analizando cuantitativamente se pudo comprobar que todas las cepas fueron capaces de producir biofilm, observándose valores de DO_{570nm} por encima de 1,4. Dentro de las especies fitopatógenas correspondientes a *P. syringae*, la mayor producción de biofilm se observó en la cepa *P. syringae* pv. *glycinea* (EM1) con un valor de DO_{570nm} de 1,8. Entre las demás especies la mayor producción de biofilm se observó en *P. putida* (C11 y A7), y *Acinetobacter schindleri* (C47) con valores de DO iguales o mayores a 2, lo que estaría indicando la buena capacidad de producir biofilm de estas cepas. El resto de las cepas analizadas fueron capaces de formar la biopelícula en menor cantidad que las mencionadas anteriormente. Los datos cualitativos y cuantitativos coinciden para la mayoría de las cepas indicando la eficacia

de ambas técnicas para determinar la producción de biofilm (Tabla 6). Los Resultados se detallan en la Tabla 3 del Anexo.

Tabla 6: Producción de biofilm en cepas aisladas de soja mediante la Técnica del Cristal Violeta (CV)

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	OBSERV. CUALITATIVA	OBSERV. CUANTITATIVA DO _{570nm}
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	++	1,6
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	+++	1,8
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	++	1,4
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	+++	1,6
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	+++	1,5
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Q)	++	1,6
<i>P. putida</i> (C11)	+++	2,2
<i>P. putida</i> (EM16)	++	1,5
<i>P. putida</i> (A6)	++	1,6
<i>P. putida</i> (A7)	+++	2,1
<i>Acinetobacter schindleri</i> (EM21)	++	1,6
<i>Acinetobacter schindleri</i> (C47)	+++	2,0
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> / pv. <i>citri</i> (Xa)	++	1,5

Ref.: (-): negativo; (+): producción débil; (++) : producción moderada; (+++): producción fuerte;

NR: No Realizado

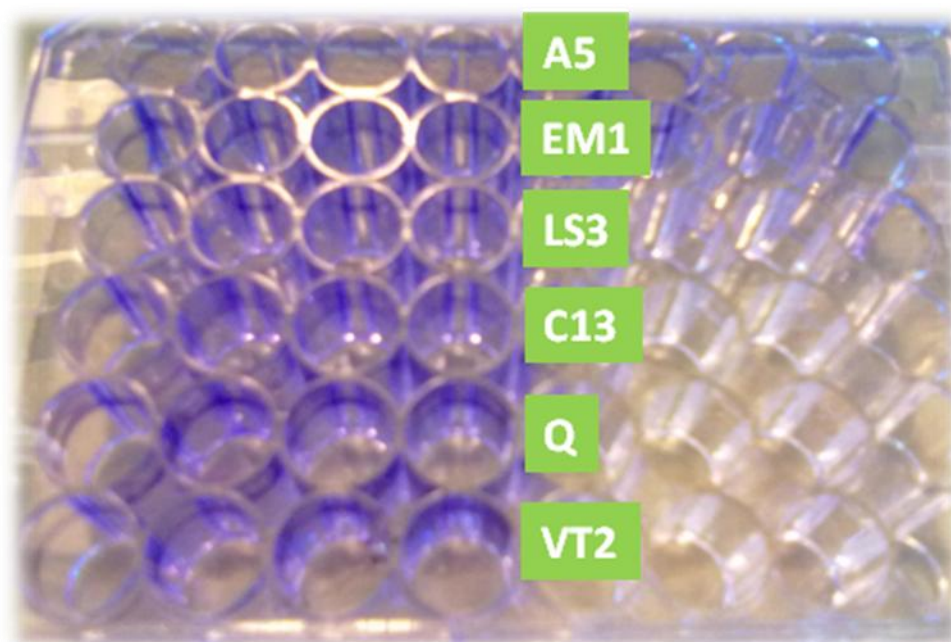


Figura 11: Producción de biofilm por la Técnica del Cristal Violeta (observación cualitativa)

Ref.: *P. syringae* pv. *glycinea*: A5, EM1, LS3, C13, Q, VT2.

Los resultados demuestran que todas las cepas fueron capaces de producir biofilm y que no existen grandes variaciones en la producción individual de este polisacárido. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en la producción de biofilm para las cepas de *P. syringae* (LS3, C13, VT2, Q) y *P. putida* (EM16), mientras que para el resto de las cepas se observaron algunas diferencias significativas entre ellas y con las cepas mencionadas anteriormente ($p > 0,05$) (Gráfico 1).

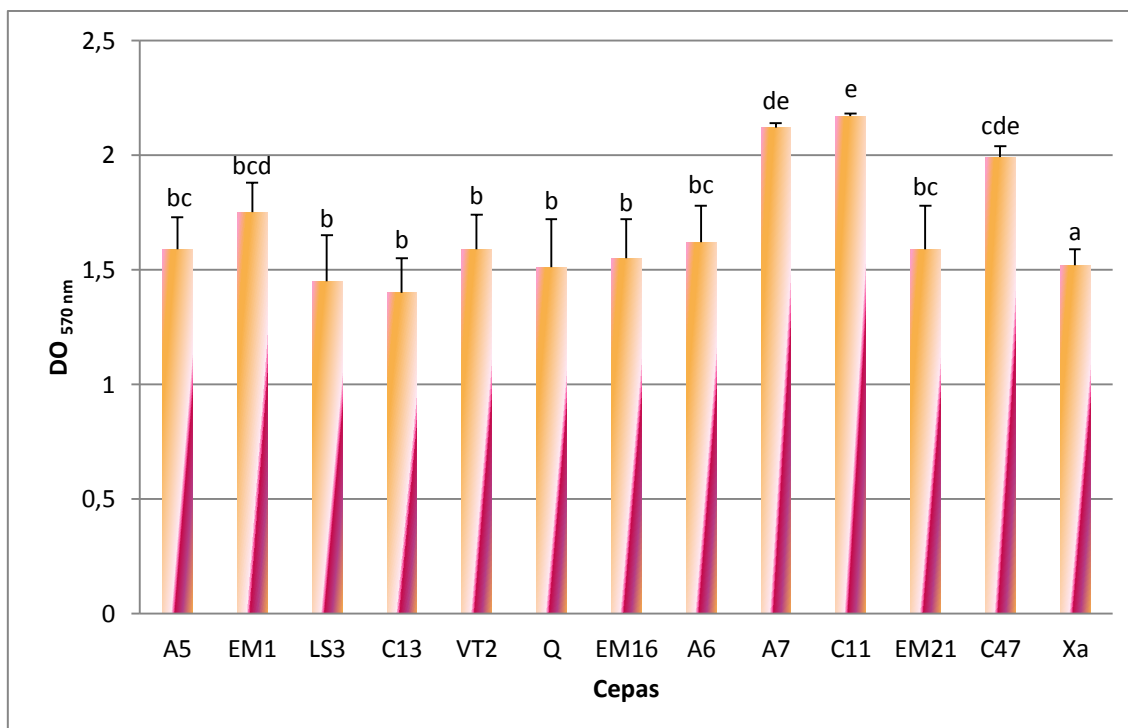


Gráfico 1: Producción de biofilm en cepas aisladas de soja mediante la Técnica del Cristal Violeta (CV)

* Letras distintas para cada cepa indican diferencias significativas en cuanto a la producción de biofilm. ($p > 0,05$, LSD Fisher)

Cabe destacar que la producción de biofilm en algunas cepas de *Pseudomonas* se observaba formando una capa en la superficie del medio líquido, variando de muy cuantioso a muy delgado en otros dependiendo de la cepa en cuestión (Figura 11). Al realizar la técnica del CV, dicha capa era eliminada de los pocillos de la policubeta ya que no se encontraba adherida a las paredes de los mismos, por lo tanto, la intensidad del color no siempre reflejó la producción real de biofilm de cada cepa. La lectura de DO_{570nm} en el espectrofotómetro correspondió al colorante adherido a las paredes de los pocillos, sin reflejar la producción total de biofilm. Este evento fue descrito por Ude y colaboradores (2006) para una mutante rugosa de *Pseudomonas fluorescens*, la cual ubica esta capa en la interfase aire-líquido (A-L) en un cultivo líquido, donde se mantiene unida a las paredes de los viales por la región del menisco y gracias a su naturaleza hidrofóbica. La formación de la interfase A-L le permite a las cepas una mejor disponibilidad de oxígeno, permitiendo una velocidad de crecimiento mayor que las cepas no formadoras de biofilm (Ude y col. 2006).

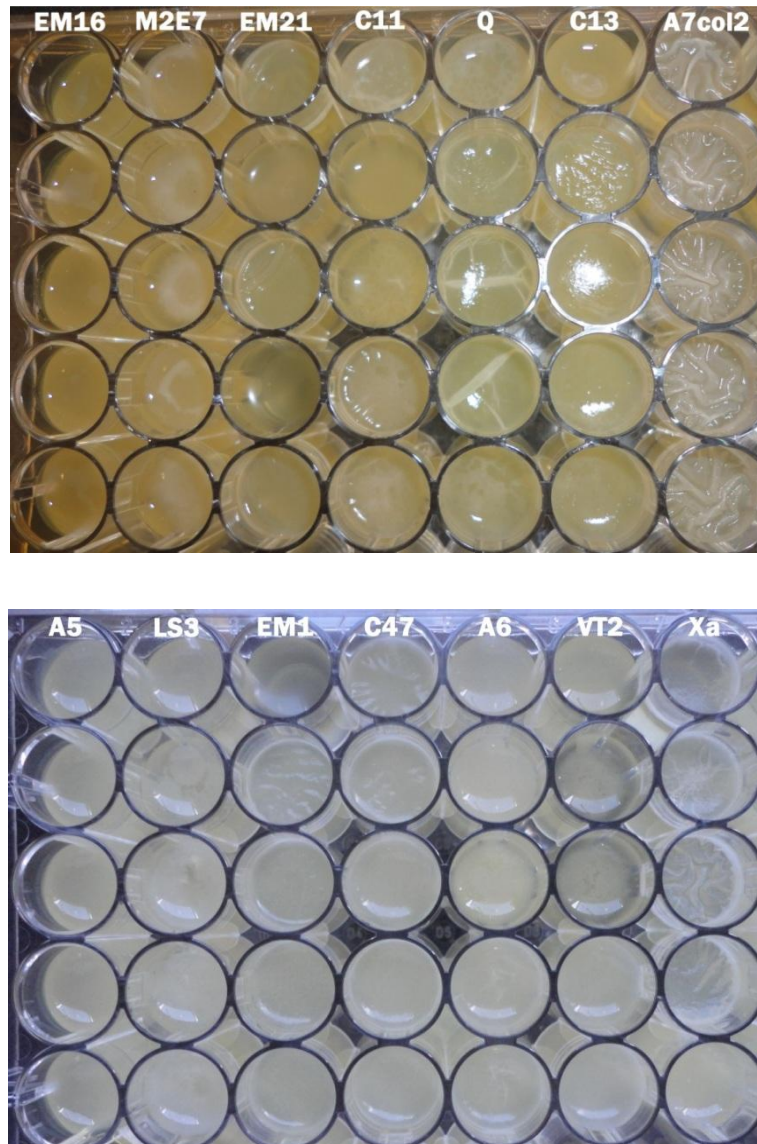


Figura 12: Producción de biofilm. Observación de la interfase A-L.

4. c. Producción de biofilm de cepas fitopatógenas a diferentes tiempos

Con el objetivo de investigar las diferentes etapas en la formación de biofilm y determinar a qué tiempo las cepas fitopatógenas comenzaban a producir esta biopelícula se analizó la producción a distintos tiempos de iniciado el cultivo (8, 24, 36 y 48 hs.). En esta experiencia se utilizaron las cepas fitopatógenas identificadas como *P. syringae* y cepas de referencia: *X. axonopodis*, *P. syringae* pv. *syringae* (P61) y *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000). En la Tabla 7 se muestran los promedios correspondientes a las experiencias realizadas (Tabla 4 del Anexo). De las 8 cepas

analizadas se pudo observar que 3 cepas de *P. syringae* pv. *glycinea* (A5, EM1 y LS3) presentaron la mayor producción de biofilm a las 8 hs. con valores de $DO \geq 1,5$ notándose luego, una disminución del mismo (24 hs.) y aumentando nuevamente a las 36 hs. El resto de las cepas presentaron un pico máximo de producción de biofilm a las 36 hs. con valores de $DO \geq 0,5$. La cepa de referencia *P. syringae* pv. *syringae* (P61) produjo su máximo a las 48 hs. con $DO = 0,7$ (Tabla 7) (Gráfico 2).

Tabla 7: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a diferentes tiempos.

(DO_{570nm})

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	8 hs	24 hs	36 hs	48 hs
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	1,5	0,4	1,0	0,5
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	1,6	0,3	0,5	0,8
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	1,5	0,2	1,0	0,7
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	0,4	0,4	1,1	0,9
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	0,8	1,0	1,5	1,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Q)	0,4	0,5	1,4	1,1
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (P61)	0,01	0,3	0,3	0,7
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000)	0,3	0,8	1,0	0,4
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> / pv. <i>citri</i> (Xa)	0,01	0,4	0,5	0,4

La formación de biofilm comienza debido a una serie de señales medioambientales y al crecimiento bajo una limitación de nutrientes. Proteínas de membrana externa tales como proteínas de unión a calcio y adhesinas junto con los flagelos median los pasos iniciales de unión a las superficies. Después de la formación de microcolonias se requiere la producción de moléculas señales tales como N-acil homoserina lactonas para el establecimiento de la biopelícula madura. Los exopolisacáridos producidos en este proceso proporcionan la forma arquitectónica y estabilizan la estructura tridimensional de las biopelículas. Ocasionalmente estos agregados bacterianos liberan células individualizadas que se dispersan y multiplican

rápida mente colonizando otras superficies u otros sustratos (Costerton y col. 1999; Rinaudi y Giordano 2009).

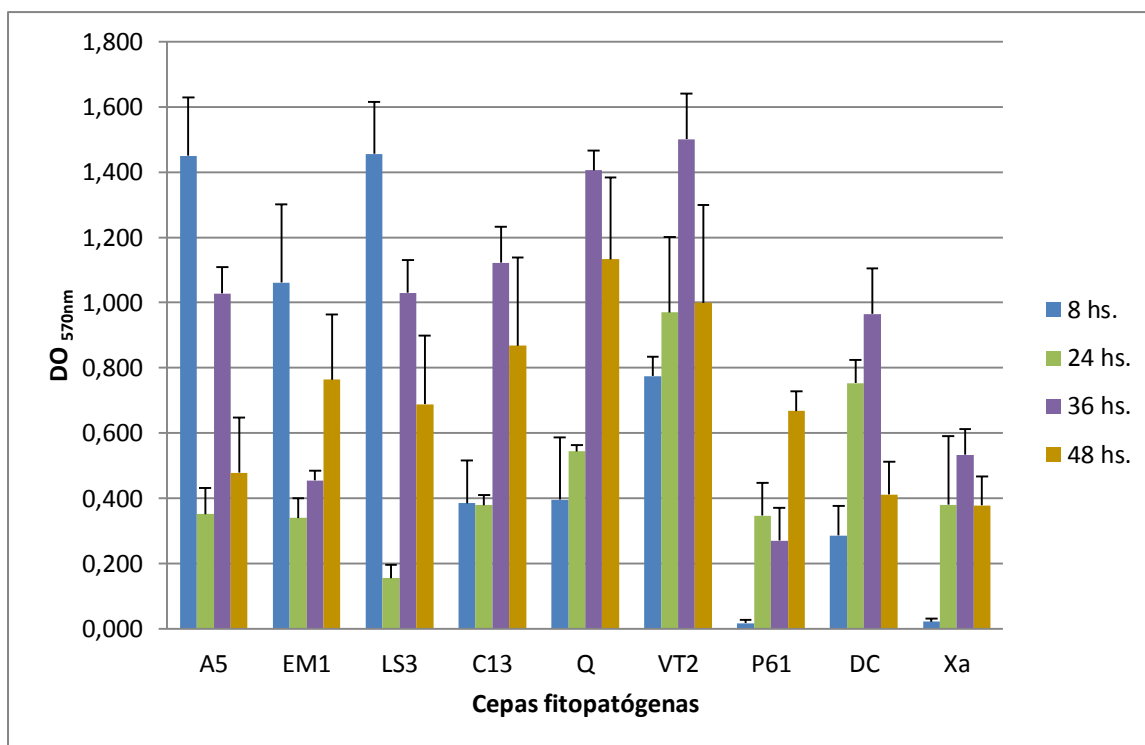


Gráfico 2: Producción de biofilm a diferentes tiempos en cepas fitopatógenas

Se pudo observar que a las 8 hs. las cepas con mayor producción de biofilm fueron tres *P. syringae* pv. *glycinea* (A5, EM1 y LS3), lo que indica que estas produjeron la biopelícula en un corto período después de iniciado el cultivo. A las 24 hs. redujeron la cantidad de biofilm detectado debido al desprendimiento del mismo, aumentando la producción a las 36 hs. lo que indica claramente la dinámica de la formación de estas biopelículas. A las 24 hs. las cepas que obtuvieron su mayor producción fueron *P. syringae* pv. *glycinea* (VT2) y *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000) notándose un aumento con respecto al tiempo anterior. A las 36 hs., en general, la producción de biofilm por parte de las cepas se registró con valores de DO cercanos a 1, observándose muy poca diferencias significativas entre las mismas, con excepción de las cepas *P. syringae* pv. *glycinea* (EM1), *P. syringae* pv. *syringae* (P61) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*/ pv. *citri* las cuales presentaron valores de DO similares a los registrados en el tiempo anterior (cerca de 0,4). Por último, a las 48 hs. de iniciado el cultivo bacteriano se pudo observar que las cepas mostraron valores de DO entre 0,4 y 1,1 con algunas diferencias significativas entre ellas. La mayoría

redujo la producción con respecto al tiempo anterior, con excepción de *P. syringae* pv. *glycinea* (EM1) y *P. syringae* pv. *syringae* (P61) quienes mostraron valores mayores. Comparando las diferentes lecturas a los distintos tiempos se detecta el comportamiento individual de cada cepa: producción de la biopelícula, desprendimiento y nuevamente producción, independientemente del tiempo máximo en donde se detecta la mayor lectura. Se observan diferencias significativas entre ellas, aún para aquellas que produjeron el máximo en el mismo tiempo. Los datos se muestran en los siguientes gráficos (Gráficos 3, 4, 5 y 6) (Gráficos 1-8 del Anexo).

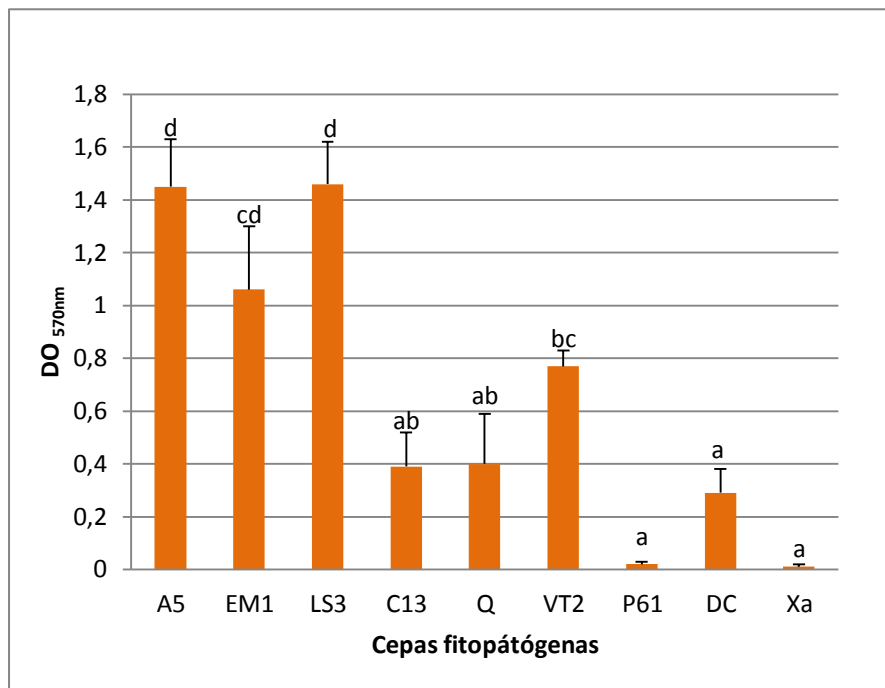


Gráfico 3: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 8 hs

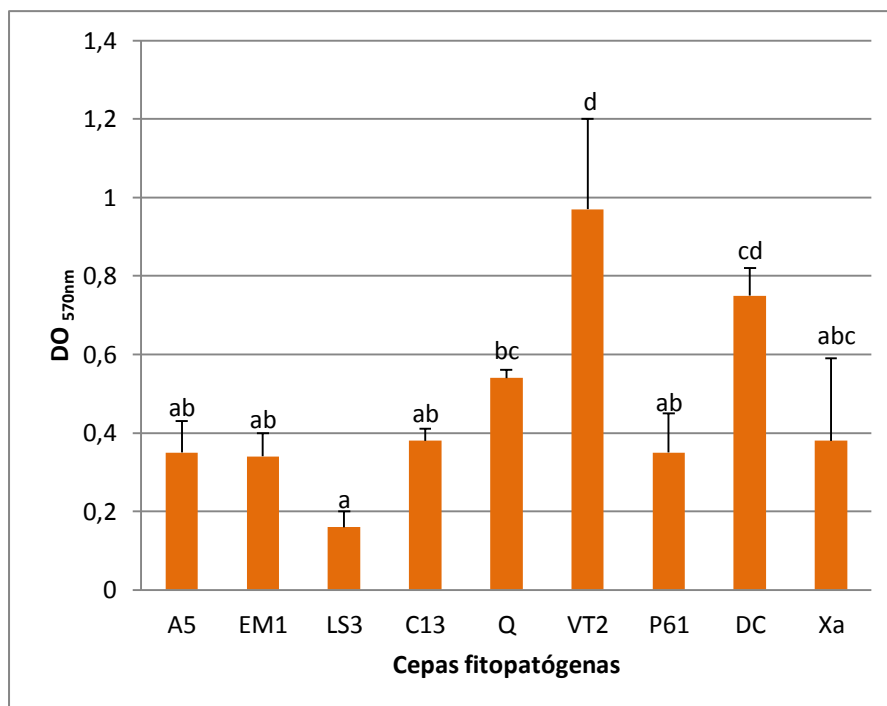


Gráfico 4: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 24 hs

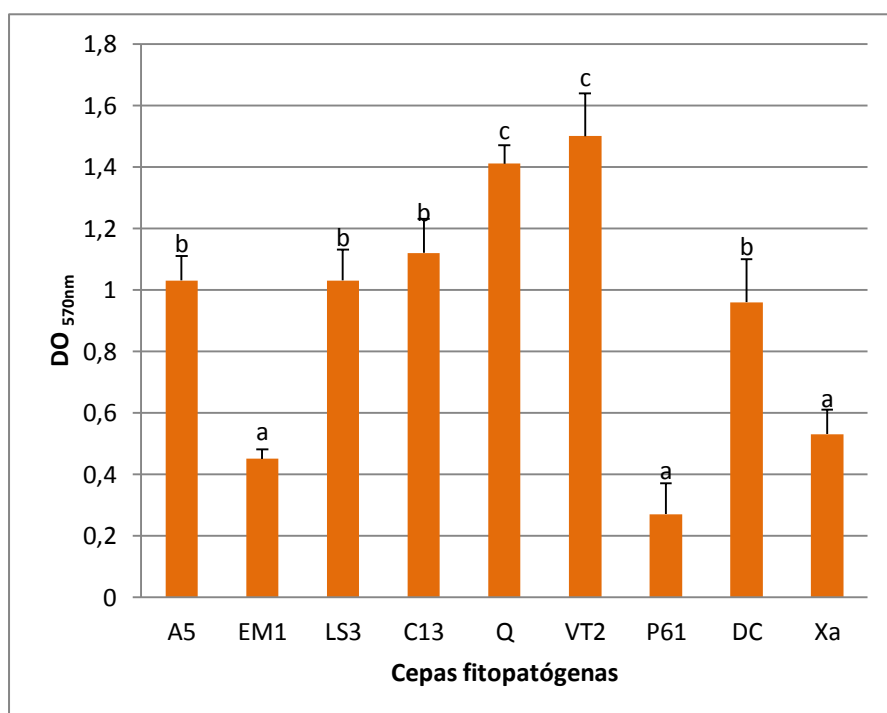


Gráfico 5: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 36 hs

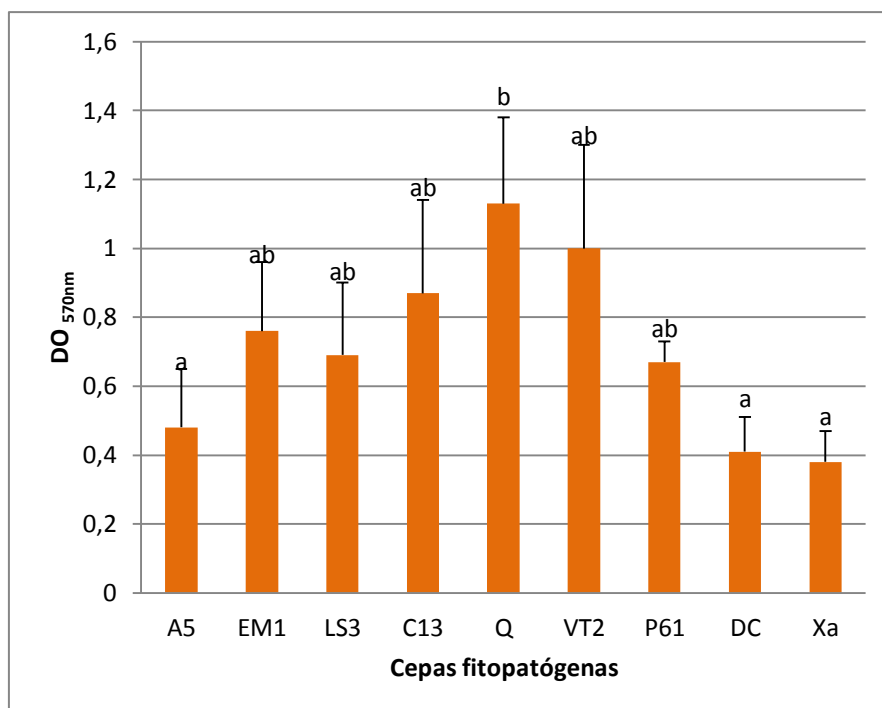


Gráfico 6: Producción de biofilm en cepas fitopatógenas a las 48 hs

5 - Efecto de dosis inhibitorias y sub-inhedorias de aceites esenciales de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm

Las cepas de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* productoras de biofilm fueron sometidas a la acción de los AE de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* a concentraciones sub-inhedorias (1/2 CIM) e inhedorias (CIM). Este efecto fue analizado a diferentes tiempos de exposición al aceite esencial (8, 24, 36 y 48 hs.). La producción de biofilm frente a las distintas concentraciones de los AE se cuantificó mediante la técnica del CV.

Cuando las cepas fueron expuestas a concentraciones inhedorias y sub-inhedorias de los AE de orégano y tomillo y se compararon con los controles positivos de cada cepa se pudo observar que ambos AE tuvieron efecto sobre la formación de biofilm.

Para el AE de tomillo, las concentraciones sub-inhedorias (1/2 CIM) probadas fueron capaces de disminuir considerablemente la producción del polisacárido, mientras que las concentraciones inhedorias (CIM) mostraron total inhibición en la mayoría de las cepas analizadas. En los gráficos se exponen los resultados obtenidos

en las cepas tratadas comparadas con sus respectivos controles positivos (Gráficos 7, 8, 9 y 10). Se observó que tanto a las 8 hs. como a las 36 y 48 hs. la dosis correspondiente a la CIM tuvo efecto de inhibición total en la formación de biofilm durante el tiempo en el que transcurrió la experiencia. A las 24 hs., la CIM tuvo un efecto inhibitorio total frente a la cepa de *P. syringae* pv. *glycinea* (LS3) y la cepa de referencia *P. syringae* pv. *syringae* (DC3000), mientras que para el resto de las cepas se observó una marcada disminución en la producción del biofilm. Las concentraciones sub-inhedoras (1/2 CIM) mostraron una disminución en la formación de las biopelículas en la mayoría de las cepas aunque no lograron igualar el efecto ocasionado por la CIM.

El control del diluyente (DMSO:agua) mostró que no afecta a la producción de biofilm como así también a la viabilidad celular.

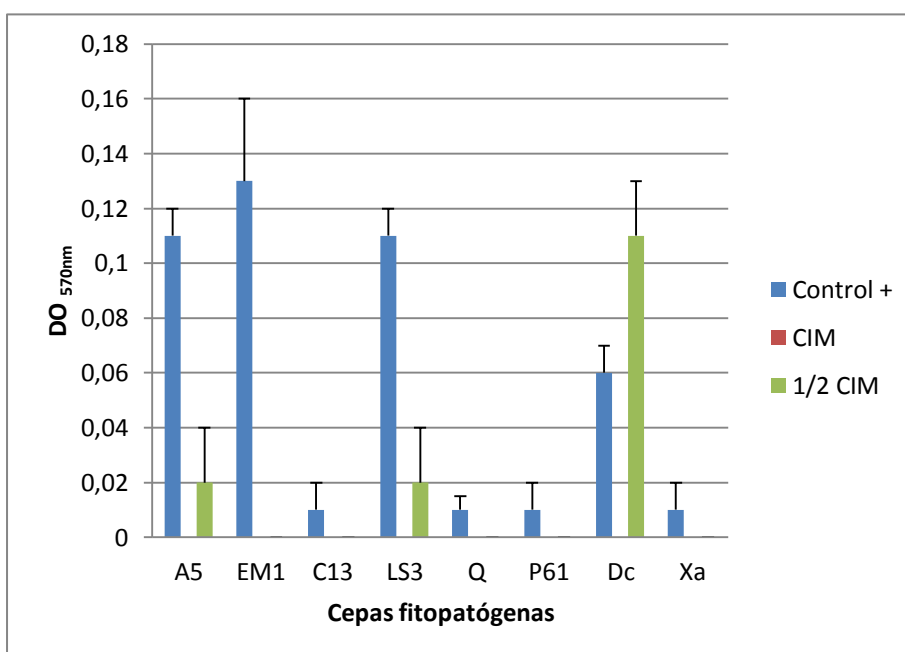


Gráfico 7: Efecto de CIM y 1/2 CIM de AE de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (8 hs.)

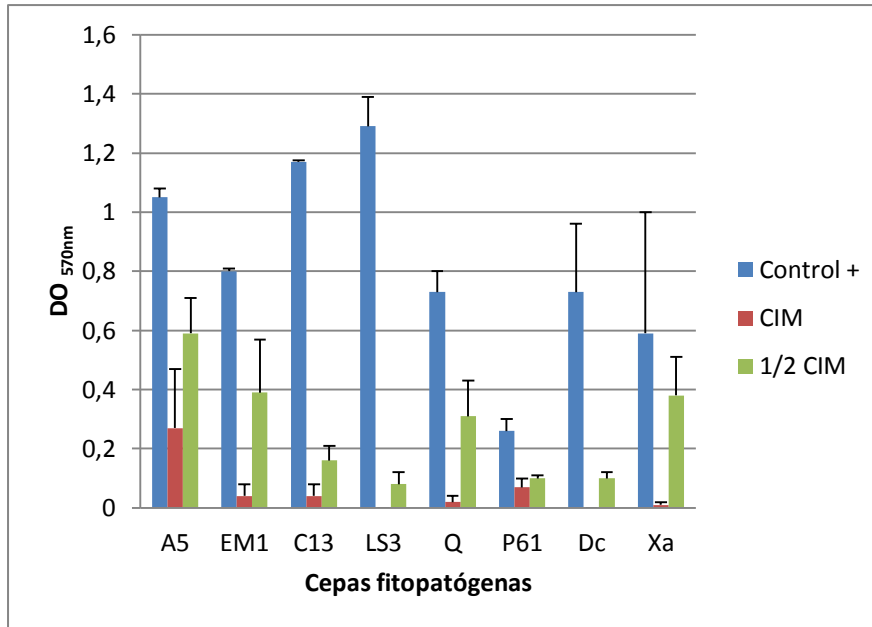


Gráfico 8: Efecto de CIM y ½ CIM de AE de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (24 hs.)

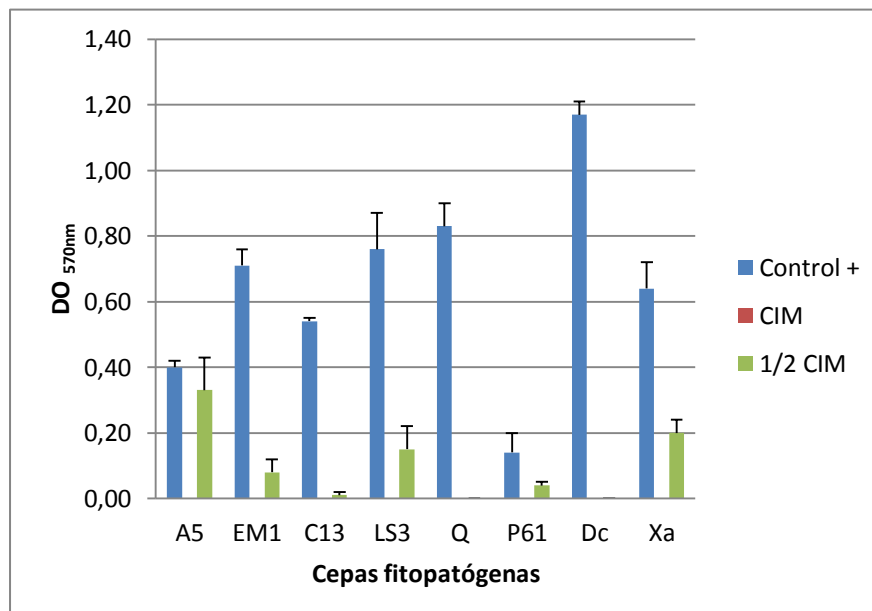


Gráfico 9: Efecto de CIM y ½ CIM de AE de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (36 hs.)

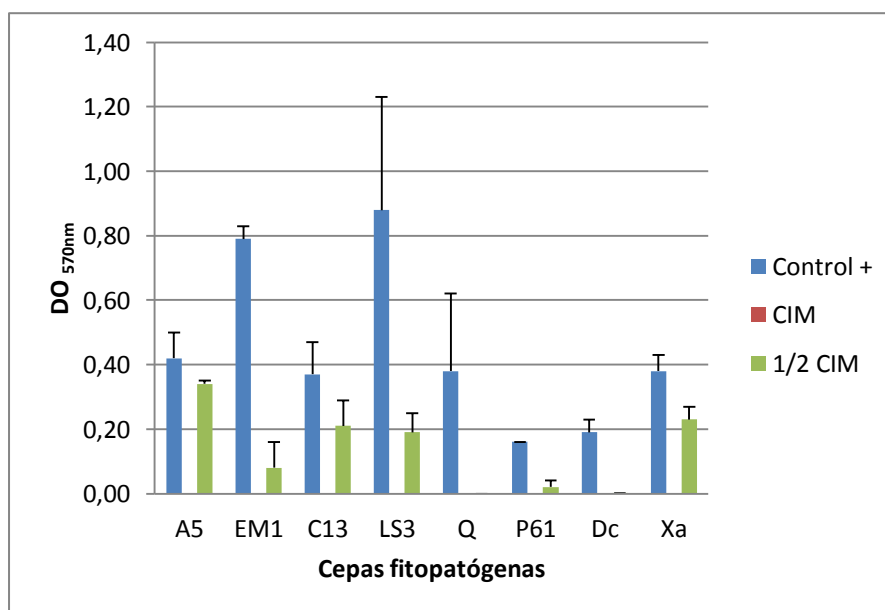


Gráfico 10: Efecto de CIM y 1/2 CIM de AE de *Thymus vulgaris* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 hs.)

Cuando las cepas fueron expuestas a dosis inhibitorias y sub-inhibitorias del AE de orégano y se compararon con los controles positivos se observó que a las 24, 36 y 48 hs., se produjo una reducción en la producción de biofilm en la mayoría de las cepas, aunque los valores fueron variados, detectándose una clara inhibición de la producción de biofilm de todas las cepas a las 48 hs.

A las 8 hs se observó producción de biofilm en las cepas de *P. syringae* pv. *glycinea* (Q) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*/ pv. *citri* enfrentadas al aceite esencial con respecto al control, esto indicaría probablemente una reacción a la presencia de la sustancia oleosa induciendo la producción del polisacárido. Este comportamiento se observó también en *P. syringae* pv. *glycinea* (C13) a las 24 hs. y en *P. syringae* pv. *glycinea* (EM1), *P. syringae* pv. *syringae* (P61) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*/ pv. *citri* a las 36 hs. de iniciado el cultivo. Este efecto de aumento en la producción de biofilm por algunas cepas expuestas a concentraciones de aceites esenciales, ha sido explicado por algunos autores los cuales demostraron que el efecto de concentraciones sub-inhibitorias de tetraciclinas potenciaba de 9 a 11 veces la expresión del operón *ica* implicado en la formación de biocapas en *S. epidermidis* (Rachid et al. 2000). Un efecto similar fue descrito para algunos

aminoglucósidos e imipenem en *P. aeruginosa* (Bagge et al. 2004; Hoffman et al. 2005).

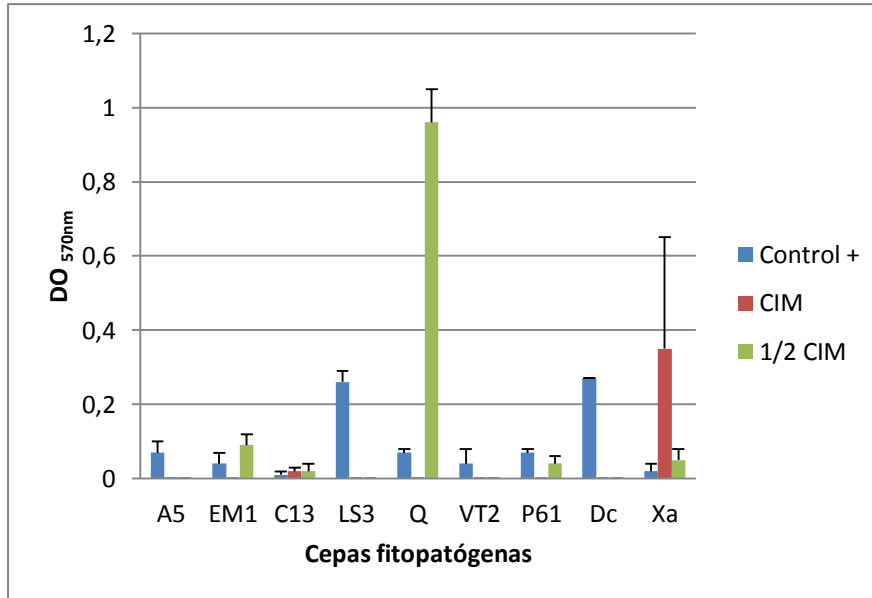


Gráfico 11: Efecto de CIM y 1/2 CIM de AE de *Origanum vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (8 hs.)

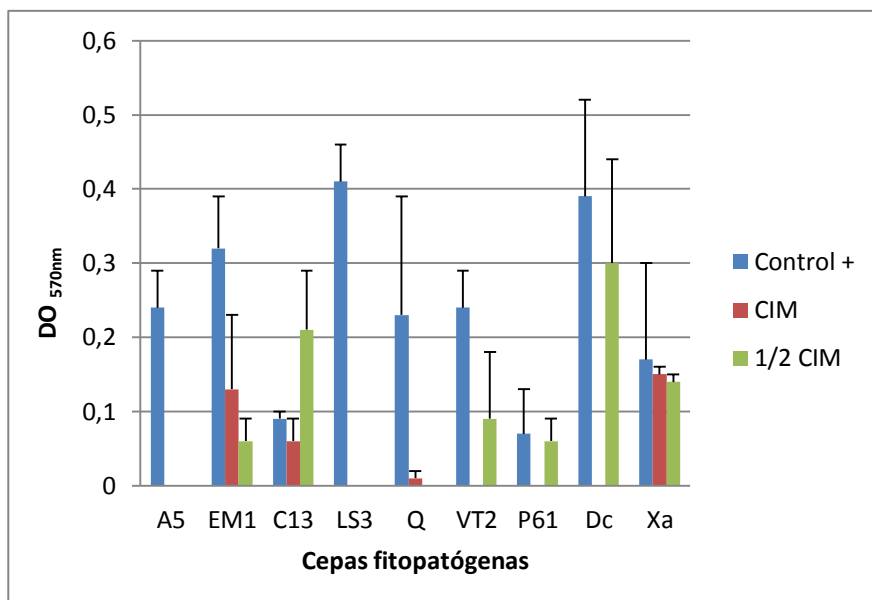


Gráfico 12: Efecto de CIM y 1/2 CIM de AE de *Origanum vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (24 hs.)

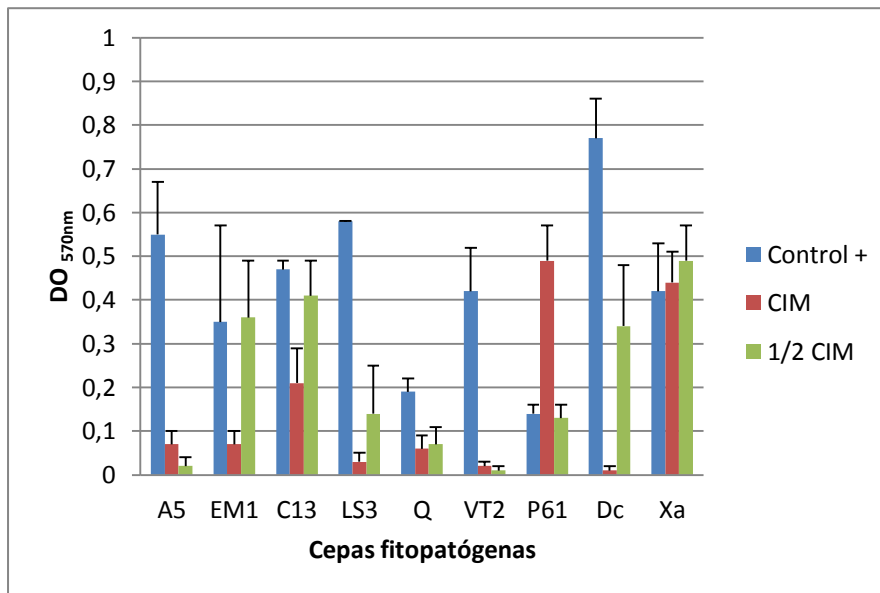


Gráfico 13: Efecto de CIM y 1/2 CIM de AE de *Origanum vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (36 hs.)

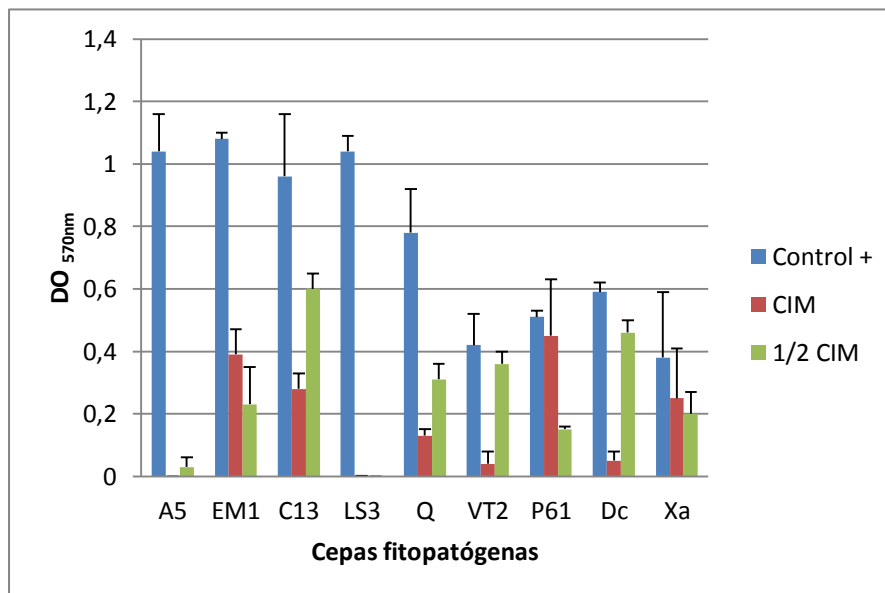


Gráfico 14: Efecto de CIM y 1/2 CIM de AE de *Origanum vulgare* sobre la formación de biofilm en cepas fitopatógenas (48 hs.)

Los datos expuestos en esta experiencia muestran que el aceite de tomillo fue más efectivo con respecto al de orégano ya que se observó inhibición de biofilm tanto para la CIM como para la ½ CIM en todos los tiempos evaluados. A concentraciones inhibitorias (CIM) ambos aceites afectaron la producción de biofilm en mayor medida que a concentraciones sub-inhedorias.

La búsqueda de sustancias naturales capaces de inhibir la formación de estructuras que contribuyen con la patogenicidad, como el biofilm, está siendo cada día más estudiada. Schillaci y col. (2013) demostraron que concentraciones sub-inhedorias del AE de orégano inhibieron la formación de biofilm de patógenos de alimentos tales como *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*. Busso Aberastain (2010) demostró que concentraciones inhibitorias y sub-inhedorias del AE de *Aloysia triphylla* afectan la formación de biofilm disminuyendo su producción en cepas del género *Staphylococcus*. Carvalho y Fonseca (2007) observaron que terpenos (salviposone, carveol y carvona) aislados del AE de *Salvia sclarea* fueron capaces de evitar la agregación celular y la formación de biopelículas en *S.aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Rhodococcus erythropolis* ya que provocaron un cambio en la composición de los ácidos grasos y en la hidrofobicidad de las membranas celulares, afectando además los sistemas de comunicación entre las bacterias. El Abed y col. (2011) demostraron que cuatro terpenos (eugenol, carveol, carvona y β -ionona) que forman parte de AE de varias especies vegetales son capaces de inducir una inhibición tanto en la adherencia celular como en la formación de las biopelículas en cepas de *P. aeruginosa*.

Los AE de orégano y tomillo tienen la capacidad de inhibir la formación de biofilm en cepas de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* fitopatógenas de soja, siendo el aceite de tomillo el más efectivo contra la mayoría de las cepas analizadas. Estos compuestos naturales, al no generar resistencia bacteriana, no dejar residuos tóxicos en el ambiente y obtenerse en grandes cantidades a un bajo costo, permitirían desarrollar en un futuro estrategias de control de tizón y pústula bacterianas. así como de otras enfermedades vegetales. Este control puede estar dirigido al control del microorganismo directamente o a evitar la producción de factores de virulencia que colaboren con la patogenicidad. Disminuir o impedir que el biofilm se forme estaría ayudando a que las bacterias fitopatógenas no puedan establecer un hábitat adecuado para poder colonizar un ambiente y de ese modo producir la enfermedad.

Teniendo en cuenta la eficacia de los AE de orégano y de tomillo, principalmente este último, se deberían seguir realizando experiencias in-vivo a escala de invernáculo para ensayar la capacidad antimicrobiana de estos compuestos y además la habilidad de disminuir la producción de biofilm, evaluando como influyen estos resultados en la patogenicidad del microorganismo en el sistema vegetal.

V – CONCLUSIONES

✓ Los AE de *Thymus vulgaris* (Tomillo) y *Origanum vulgare* (Orégano) presentaron altos niveles de carvacrol y bajos porcentajes de timol entre sus componentes.

✓ El AE de tomillo presentó un porcentaje elevado de p-cimeno y el AE de orégano un porcentaje considerable de gamma-terpineno. Estos compuestos son precursores de los isómeros timol y carvacrol, que poseen conocida actividad antimicrobiana.

✓ Los AE de orégano y tomillo mostraron capacidad inhibitoria frente a la mayoría de las cepas fitopatógenas analizadas. El AE de tomillo fue efectivo para ejercer su efecto inhibitorio a concentraciones menores que el de orégano.

✓ *X. axonopodis* fue la cepa más sensible a ambos aceites. Estos compuestos naturales presentaron un efecto bactericida contra la misma.

✓ Todas las cepas de *P. syringae* fitopatógenas aisladas y las de referencia fueron capaces de desarrollar biofilm en distinto grado de producción.

✓ La mayoría de las cepas comienzan a producir biofilm a distintos tiempos; algunas lo hacen muy tempranamente y otras en etapas más avanzadas del cultivo.

✓ Todas las cepas poseen el mismo comportamiento para producir biofilm, independientemente del tiempo que tarden en formarlo. Esto implica producción de la biopelícula, desprendimiento y nueva formación.

✓ A concentraciones inhibitorias (CIM) ambos aceites afectan la producción de biofilm en mayor medida que a concentraciones sub-inhedorias (1/2 CIM).

- ✓ El AE de tomillo resultó más efectivo para inhibir la formación de biofilm, tanto a concentraciones inhibitorias como subinhibitorias.

Conclusión general

➤ Existe una elevada eficacia de los AE de orégano y tomillo frente a bacterias fitopatógenas pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, las cuales poseen resistencia natural contra compuestos antimicrobianos. Estos compuestos oleosos tienen la capacidad de inhibir la formación de biofilm, siendo el aceite esencial de tomillo el más efectivo. Por lo tanto, estos productos naturales constituyen una alternativa promisorio para el control de bacterias causantes de enfermedades en diferentes cultivos de interés agroalimentario, ya que no generan resistencia, no dejan residuos tóxicos en el ambiente y pueden obtenerse en grandes cantidades a un bajo costo.

VI – BIBLIOGRAFIA

Adams, R.P. 1989. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy. Ac. Press. NY.

Agrios, G. N. 2002. Fitopatología. 2th Edición. Ed. Limusa S.a De C.v. 12: 532-609.

Bagamboula, C.; Uyttendaele, M.; Debevere, J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21: 33–42.

Bagci, E.; Digrak, M. 1996. Antimicrobial Activity of Essential oils of some Abies (Fir) species from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 11: 251-256.

Bagge, N.; Schuster, M.; Hentzer, M.; Ciofu, O.; Givskov, M.; Greenberg, EP. 2004. Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 1175-1187

Bamba, D.; Bessiere, J. M.; Pélissier, Y.; Fourasté, I. 1993. Essential oil of *Eupatorium odoratum*. *Planta Médica*. 59:184.

Beattie, G.; Lindow, S. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89(5):353-359.

Ben El Hadj Ali, I.; Guetat, A.; Boussaid, M. 2013. A combined approach using allozymes and volatiles for the characterization of Tunisian *Thymbra capitata* (L.) Cav. (*Lamiaceae*) *Industrial Crops and Products* 43: 477– 483

Bender, C.; Malvick, D.; Conway, K.; George, S.; Pratt, P. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and environmental microbiology*. 56 (1): 170-175.

Bodman, S.; Bauer, D.; Coplin, D. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*. 41: 455–482

Borboa-Flores, J.; Rueda-Puente, O.; Acedo-Félix, E.; Ponce, J.; Cruz-Villegas, M.; García-Hernández, J.; Ortega-Nieblas, M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales

contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12(3): 539-547.

Burt, S. 2004. Essential oils: antibacterial properties and potential applications in food: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.

Busso Aberastain, Rita Soledad. 2012. Aplicación de aceites esenciales de *Aloysia Triphylla* como herramienta de biocontrol en cepas de *Staphylococcus* productoras de biofilm. Tesis de grado. UNRC.

Büttner, D.; Bonas, U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 34(2): 107–133

Cabrera, M.; Alvarez, R.; Raimondo, M.; Cúndom M.; Gutiérrez, S. 2004. Importancia de las enfermedades de fin de ciclo de la soja (*Glycine max*), en el NEA. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A-027.

Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Microbios*. 82: 181-185.

Carvalho, C.; Fonseca, M. 2007. Preventing biofilm formation: promoting cell separation with terpenes. *FEMS Microbiol Ecol* 61(3): 406–413

Chen Niu. 2006. The role of autoinducer-2 in *Escherichia coli* biofilm formation and the discovery of a plant-derived quorum sensing inhibitor. Tesis doctoral para Filosofía. Universidad de Georgia.

Córdoba, V. 2012. Aceites esenciales como herramienta de biocontrol sobre fitopatógenos bacterianos de soja. Tesis de grado. UNRC

Cosentino, S.; Tuberso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; 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.

Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11: 217–221

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-565.

Cracogna, M. F. 2007. Identificación de las bacteriosis de la soja en dos zonas agrícolas y cálculo de la función de daño para el tizón bacteriano. Tesis magíster scientiae. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). Chap 24: 1250-1319. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. American Society of Plant Physiologists.

Crowell, P.L. 1999. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. *Journal nutrition*. 129(3): 775-778.

Danhorn, T.; Fuqua, C. 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 401-422

Davies, P.; Villamil, J.J.; Ashfield, R. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto nacional de investigación agropecuaria. Uruguay. Capítulo 6: Fichas técnicas de cultivo: 63-66.

De Feo, V.; Ricciardi, A.; Biscardi, D.; Senatore, F. 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb). Epl. (*Lamiaceae*). *J Essential oil Res.* 10: 61-65.

De Pooter, H. L.; Aboutabl, E. A.; El-Shabrawy, O. A. 1995. Chemical composition and Antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa* (J.C. Wendl) K. Schum. Grown in Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*. 10: 63-67.

Demo, M.; Oliva, M.; Lopez, M.; Zunino, P.; Zygodlo, J. 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology*. 43:129-134. ISSN: 1388-0209.

Demo, M.; Oliva, M. 2008. Antimicrobial Activity of Medicinal Plants from South America. *Botanical Medicine in Clinical Practice*. Edited by Professors Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy. ISBN. 978 1 84593 413 2. Reino Unido.

Dharmapuri, S.; Sonti, R. 1999. A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 179: 53-59

Di Pascua, R.; Hoskins, N.; Betts, G.; Mauriello, G. 2006. Changes in Membrane fatty acids compositions of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2745-2749.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. InfoStat versión 2012., in Grupo InfoStat, F., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Díaz, C.; Ploper, L.; Galvez, M.; Gonzalez, V.; Zamorano, M.; Jaldo, H.; Lopez, C.; Ramallo, C. 2005. Efecto de las enfermedades de fin de ciclo en el crecimiento de distintos genotipos de soja relacionado a la fecha de siembra. *Agriscientia* 21 (1): 1-7.

Díaz, J. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. Revista científica de la Universidad Científica de Lima, Perú.

El Abed, S.; Houari, A.; Latrache, H.; Remmal, A.; Ibensouda Koraichi, S. 2011. In vitro activity of four common essential oil components against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Microbiology*. 6(4): 394-401

El-Sakhawy, F.; Tantawy, M.; Ross, A.; El-Sohly, A. 1997. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Murraya exótica* L. *Flavour and Fragrance Journal*.13: 59-62.

Enciclopedia de Plantas que curan. 1994. Ed. Mariscal

Fernandez Valiela, M.V. Introducción a la fitopatología. Vol. III. Colección científica del I.N.T.A. Bs. As. 1975, 62.

Finelgold, S.; Baron, E.; Braily, S. 1992. Diagnóstico microbiológico, aislamiento e identificación de microorganismos patógenos. Ed Médica Panamericana Bs. As., 36: 514-533.

Formento, N. 2002. Enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. Campaña agrícola 2000/01. Área de investigación en producción vegetal. INTA. EEA. Paraná.

Formento, N.; Scandiani, M.; Ivancovich, A.; Sillón, M. 2007. Enfermedades de fin de ciclo y roya de la soja: descripción y reconocimiento. INTA.

Gotuzzo, E.A. 1975. Introducción a la fitopatología. Vol. 3. Colección científica del INTA. 64, 66, 211, 213-214.

Gunther, E. 1948. The Essential Oils. 1:1-342. D. Van Nostrand Co. London.

He, Y.; Zhang, L. 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* 32(5): 842–857

Helander, I.; Alakomi, H.; Kala, K.; Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.; Gorris, L.; vonWright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal Agriculture Chemistry*. 46(9): 3590-3595.

Henao, J.; Muñoz, L.; Rios, E.; Padilla, L.; Giraldo, G. 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* h.b.k. Cultivada en el departamento del Quindío. *Rev. Invest. Univ. Quindio* 19: 159-164.

Hettwer, U.; Jaeckel, F.; Boch, J.; Meyer, M.; Rudolph, K.; Ullrich, M. 1998. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant Pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Applied and environmental microbiology*. 64 (9): 3180–3187.

Hoffman, LR.; D'Argenio, DA.; Machos, MJ.; Zhang, Z.; Jones, RA.; Millar, SI. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*. 436: 1171-1175

<http://www.farmazia.ehu.es/p046->

[11213/eu/contenidos/informacion/jardin_virtual/eu_jardin/adjuntos/55.thvu.htm](http://www.farmazia.ehu.es/p046-11213/eu/contenidos/informacion/jardin_virtual/eu_jardin/adjuntos/55.thvu.htm)

<http://fichas.infojardin.com/condimentos/organum-vulgare-oregano-mejorana-silvestre-orenga.htm>

<http://infoagro.com/herbaceos/industriales/soja.htm>

<http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13/>

Hwang, M.; Morgan, R.; Sarkar, S.; Wang, P.; Guttman, D. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology*. 71 (9): 5182–5191.

Jarrell, K.; McBride, M. 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol*. 6(6): 466-476.

Kaewnum, S.; Prathuangwong, S.; Burr, T. 2006. Aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolates to soybean and hypersensitivity responses by other plants. *Plant Pathology*. 54: 409–415.

Koroch, A. R.; Juliani, H.R.; Zygadlo, J.A. 2007. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. *Flavours and Fragrances*. 5: 87-115.

Kotan, R.; Dadasoglu, F.; Kordali, S.; Cakır, A.; Dikbas, N.; Cakmakci, R. 2007. Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. *Journal of Agricultural Technology*. 3(2): 299-306.

Kumar, L.; Chhibber, S.; Harjai, K. 2013. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia*. 90: 73–78.

Laue, H.; Schenk, A.; Li, H.; Lambertsen, L.; Neu, T.; Molin, S.; Ullrich, M. 2006. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152: 2909–2918.

Lo Cantore, P.; Iacobellis, N.; De Marco, N.; Capasso, F.; Senatore, F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 52(26): 7862–7866.

Lombardo, D.M. 2008. Conservación de productos alimenticios a través del uso de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas. Tesis de Maestría en Biotecnología. U.N.R.C.

Malamud, F. 2011. Bases moleculares del desarrollo de “biofilms” en *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y su rol en el proceso infectivo. Tesis doctoral en Química biológica. Universidad de Buenos Aires.

Mann, C. M.; Markham, J. L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journey Applied Microbiology*. 84(4): 538-544

Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T.; Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiolog.* 24 (1): 25-9.

Mizrahi Vieira, A.; Trujillo Pinto, G. 1988. Identificación de bacterias fitopatógenas en lotes de semillas de soja (*Glycine max* L. Merr.). *Agronomía Tropical* 38 (4-6): 5-16

Montesinos, E.; Beltrá, R. 2000. Las bacterias fitopatógenas. *Patología vegetal*. Ed. Phytoma, Mundi-Prensa. 14: 491-513

Murillo, J.; Rodriguez-Palenzuela, P. 2000. Biología molecular de las interacciones entre plantas y bacterias fitopatógenas. *Patología vegetal*. 565-566, 577-579.

Niu, C.; Gilbert, E. S. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol.* 70: 6951–6956.

Nostro, A.; Papalia, T. 2012. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 7(1): 28-35.

Núñez, C.; Cantero, J.J. 2000. "Las Plantas medicinales del sur de la Provincia de Córdoba". Ed. Fund. U.N.R.C.

Ojeda, M.; Corini, R.; Cosiansi, J.; Zapata, R.; Zygadlo J. 2001. Evaluation of variability in natural populations of peperina (*Minthostachys mollis* (kunth) griseb.), an aromatic species from Argentina. *Plant Genetic Resources Newsletter.* 126: 27-30.

Oliva, M. M. 2005. Análisis de actividad antimicrobiana de aceites esenciales y sus componentes puros obtenidos de plantas medicinales. Tesis de Maestría en Biotecnología. U.N.R.C.

Oliva, M. M.; Carezzano, E.; Gallucci, N.; Casero, C.; Demo, M. 2011. Antimicrobial effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Natural Products Communications*. 6 (7): 1039-1043.

Oliva, M. M.; Carezzano, E.; Giuliano, M.; Gallucci, N.; Daghero, J.; Giordano, W.; Demo, M. 2013. Actividad antimicrobiana de productos naturales obtenidos de plantas aromáticas sobre *Pseudomonas* fitopatógenas. XIII Congreso Argentino de Microbiología.

O'Toole, G.A.; Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 28: 449-461.

Pierozan, M.; Pauletti, G.; Rota, L.; Santos, A.; Lerin, L.; Di Luccio, M.; Mossi, A.; Atti-Serafini, L.; Cansian, R.; Oliveira, J. 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 29 (4): 764-770.

Polanco, C. 1974. La pústula bacteriana de la soja en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 24(4): 279-287.

Pratt, L.; Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30(2): 285-293.

Primo-Yúfera, E. 1995. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Ed. Reverté. Cap 32: 851-872.

Quintana, G.; Sasovsky, C. 2006. Control químico de roya asiática de la soja y enfermedades de fin de ciclo en la región sudoeste de la provincia de Chaco. EEA. INTA.

Rachid, S.; Ohlsen, K.; Witte, W.; Hacker, J.; Ziebuhr, W. 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 3357-3363

Rigano, L. A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendín, L.; Filippone, P.; Torres, P. S.; Qüesta, J.; Maxwell Dow, J.; Castagnaro, A. P.; Vojnov, A. A.; Marano, M. R. 2007.

Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(10): 1222–1230.

Rinaudi, L. V.; Giordano, W. 2009. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett.* 304: 1–11

Roldan, L.P.; Díaz, G.J.; Düringer, J.M. 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 23(4): 451-461.

Rota, M.C.; Herrera, A.; Martínez, R.; Sotomayor, J.; Jordán, M. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 19: 681–687.

Ruffinatto, A. 2007. Importancia del metabolismo de colina en la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* S5. Tesis de grado. U.N.R.C.

Ryan, R.; Fouhy, Y.; Lucey, J.; Jiang, B.; He, Y.; Feng, J.; Tang, J.; Dow, J. 2006. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*. 63(2): 429–442.

Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*. 4 (6): 219

Scandiani, M.M.; Luque, A.G. 2009. Identificación de patógenos en semillas de soja. *Análisis de semillas Suplemento Especial N°2*: 1-148.

Schillaci, D.; Napoli, E.M.; Cusimano, M.G.; Vitale, M.; Ruberto, G. 2013. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of Food Protection*. 76(10): 1747-1752.

Scott, W.; Aldrich, S. 1975. Producción moderna de la soja. *Hemisferio Sur*. 13-14, 18-20.

Sikkema, J.; De Bont, J.A.M.; Poolman, Bert. 1995. Mechanism of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Review*. 59(2): 201-221.

Soković, M.; Marin, P.; Brkić, D. L. D.; Van Griensven, L. 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food* ©2007. Global Science Books.

Soylu, S.; Soylu, E. M.; Bozkurt, A.; Kaya, A. D. 2003. Antibacterial activities of essential oils from oregano, thyme, rosemary and lavender plants against *pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola*, the causal agent of halo blight of bean. *Ovidius University Annals of Medical Science – Pharmacy*. 1: 40-44.

Stahl-Biskup, E. 1991. The Chemical Composition of *Thymus* Oils: A Review of the Literature 1960-1989. *Journal of Essential Oil Research*. 3: 61-82.

Staskawicz, B.; Dahlbeck, D.; Keen, N.; Napoli, C. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* 169(12): 5789-5794.

Svoboda, K.P.; Hampson, J.B. 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

Tereschuk, M.; Quarenghi, M.; González, M.; Baigorí, M. 2007. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes* del NOA. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 364-366.

Tiziana Baratta, M.; Damien Dorman, H.; Stanley G. Deans.; Figueredo, C.; Barroso, J. & Ruberto, J. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 13: 235-244.

Torres, P.; Malamud, F.; Rigano, L.; Russo, D.; Marano, M.; Castagnaro, A.; Zorreguieta, A.; Bouarab, K.; Dow, J.; Vojnov, A. 2007. Controlled synthesis of the DSF cell–cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environmental Microbiology* 9(8): 2101–2109.

Turina, A.; Nolan, M.; Zygadlo, J.; Perillo, M. 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. 122: 101–113.

Ude, S.; Arnold, D.L.; Moon, C.D.; Timms-Wilson, T.; Spiers, A.J. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environmental Microbiology*. 8 (11): 1997-2011.

Ultee, A.; Gorris, L.; Smid, E. 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*. 85(2): 211-218.

Vasinauskiene, M.; Radusiene, J.; Zitikaite, I.; Surviliene, E. 2006. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. *Agronomy Research*. 4: 437-440.

Viuda-Martos, M.; Mohamady, M.A.; Fernández-López, J.; Abd ElRazik, K.A.; Omer, E.A.; Pérez-Alvarez, J.A.; Sendra, E. 2011. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*. 22: 1715-1722.

Vojnov, A.; Slater, H.; Daniels, M.; Dow, J. 2001. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol Plant Microbe Interact*. 14(6): 768–774.

Wrather, J.; Anderson, T.; Arsyad, D.; Tan, Y.; Ploper, L.; Porta-Puglia, A.; Ram, H.; Yorinori, J. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. *Can J. Plant Pathol*. 23(2): 115–121.

Young, J. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas pathogens of stone fruits and nuts: classical and molecular phyto bacteriology*. Training course handbook.

Yun, M.H.; Torres, P.S.; El Oirdi, M.; Rigano, L.A.; Gonzalez-Lamothe, R.; Marano, M.R.; Castagnaro, A.P.; Danker, M.A.; Bouarab, K.; Vojnov, A.A. 2006. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology*. 141(1): 178-187.

Zygodlo, J. A.; Juliani, H. R. 2000. Bioactivity of essential oil components. *Current topics in Phytochemistry*. 3: 203-214.

VII – ANEXO

Tabla 1. Recuentos microbianos de cepas fitopatógenas de *P. syringae*, *X. axonopodis* y cepas de referencia

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	RECUESTO MICROBIANO (UFC/ml)
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	4,3x10 ⁷
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	9,65x10 ⁶
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	4,5x10 ⁵
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	7,9x10 ⁷
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	5,3x10 ⁴
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Q)	1,2x10 ⁶
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (P61)	1,37x10 ⁶
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000)	6,4x10 ⁵
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> / pv. <i>citri</i> (Xa)	1,08x10 ⁶

Tabla 2. Recuentos microbianos de las cepas aisladas de soja

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	RECUESTO MICROBIANO (UFC/ml)
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	2,65x10 ¹¹
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	1,68x10 ¹²
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	1,05x10 ⁹
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	2,58x10 ¹²
<i>P. putida</i> (C11)	1,53x10 ¹²
<i>P. putida</i> (EM16)	4,2x10 ⁹
<i>P. putida</i> (A6)	1,28x10 ¹¹
<i>P. putida</i> (A7)	2,26x10 ¹²
<i>Acinetobacter schindleri</i> (EM21)	1,62x10 ¹¹
<i>Acinetobacter schindleri</i> (C47)	4,7x10 ¹⁰
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> / pv. <i>citri</i> (Xa)	1,32x10 ¹⁰

Tabla 3. Producción de biofilm de cepas aisladas de soja por la Técnica del Cristal Violeta (CV)

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	EXPERIENCIA 1	EXPERIENCIA 2	PROMEDIO
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	2,126	1,174	1,650
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	2,083	1,418	1,750
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	1,718	1,080	1,399
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	2,008	1,164	1,586
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	1,552	1,350	1,451
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Q1)	2,145	1,002	1,573
<i>P. putida</i> (C11)	2,187	2,147	2,167
<i>P. putida</i> (EM16)	2,057	1,037	1,547
<i>P. putida</i> (A6)	2,075	1,158	1,616
<i>P. putida</i> (A7)	2,109	2,139	2,124
<i>Acinetobacter schindleri</i> (EM21)	2,121	1,064	1,593
<i>Acinetobacter schindleri</i> (C47)	2,054	1,924	1,989
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> / pv. <i>citri</i> (Xa)	1,846	1,200	1,523

Tabla 4. Producción de biofilm de cepas fitopatógenas de soja a diferentes tiempos

ESPECIE BACTERIANA (CEPA)	EXPERIENCIA 1				EXPERIENCIA 2			
	8 hs	24 hs	36 hs	48 hs	8 hs	24 hs	36 hs	48 hs
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (A5)	1,924	0,550	1,126	0,935	0,975	0,155	0,931	0,022
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (EM1)	1,592	0,488	0,401	1,173	0,531	0,192	0,509	0,356
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (C13)	0,704	0,444	1,398	1,583	0,067	0,315	0,847	0,154
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (VT2)	0,781	1,571	1,805	1,786	0,769	0,369	1,197	0,213
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (LS3)	1,858	0,256	1,271	1,231	1,054	0,055	0,790	0,146
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Q1)	0,778	0,519	1,541	1,794	0,014	0,570	1,271	0,473
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (P61)	0,034	0,171	0,413	0,734	0,000	0,523	0,127	0,602
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000)	0,494	0,848	0,828	0,586	0,078	0,659	1,101	0,238

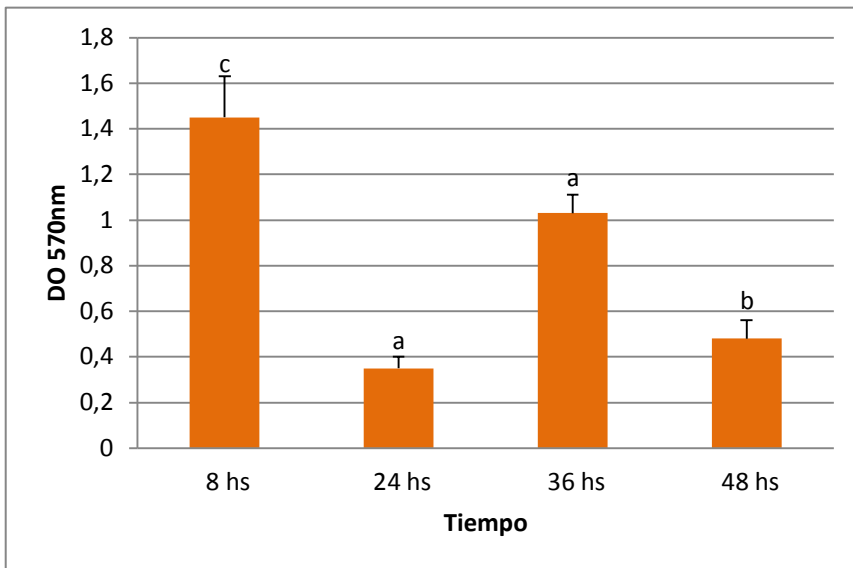


Gráfico 1: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *glycinea* (A5)

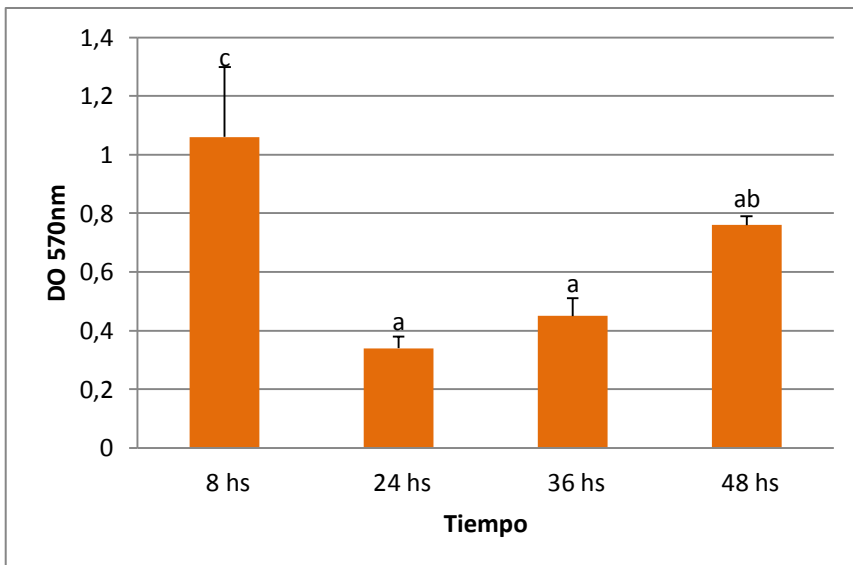


Gráfico 2: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *glycinea* (EM1)

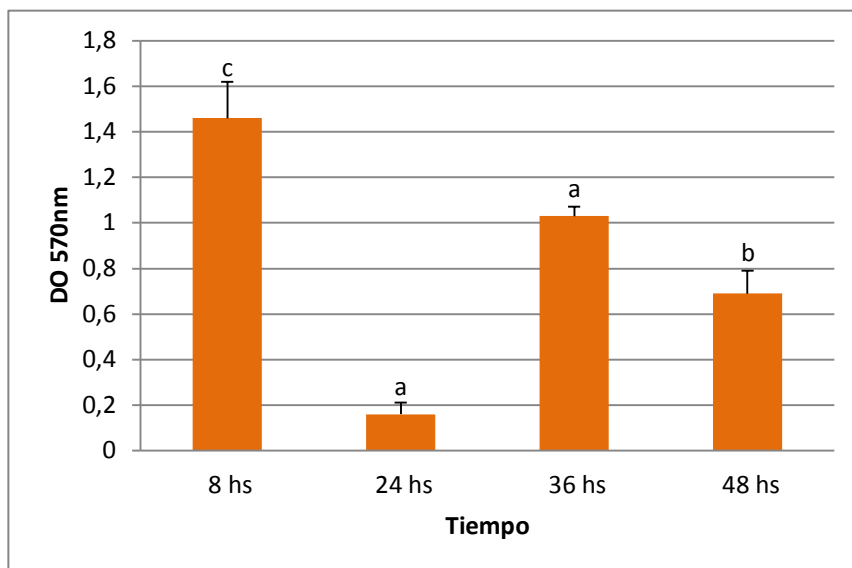


Gráfico 3: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *glycinea* (LS3)

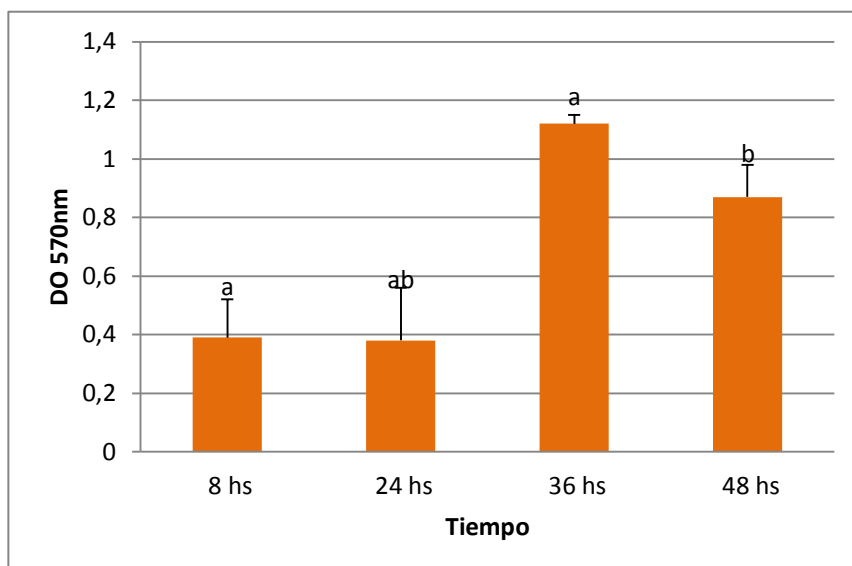


Gráfico 4: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *glycinea* (C13)

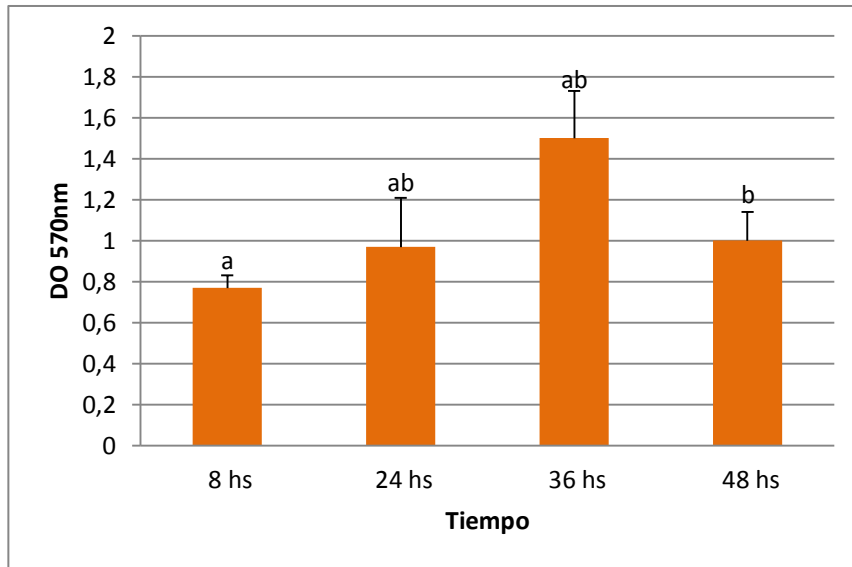


Gráfico 5: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *glycinea* (VT2)

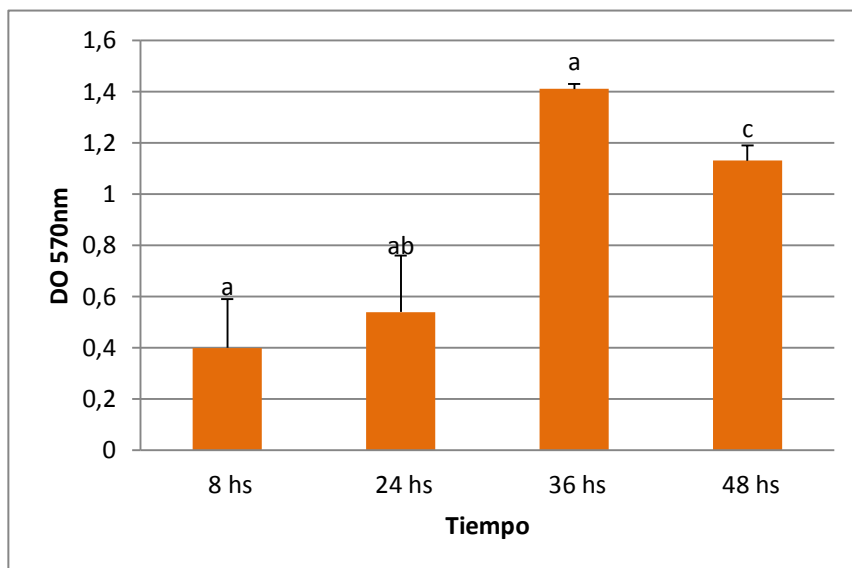


Gráfico 6: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *syringae* (Q)

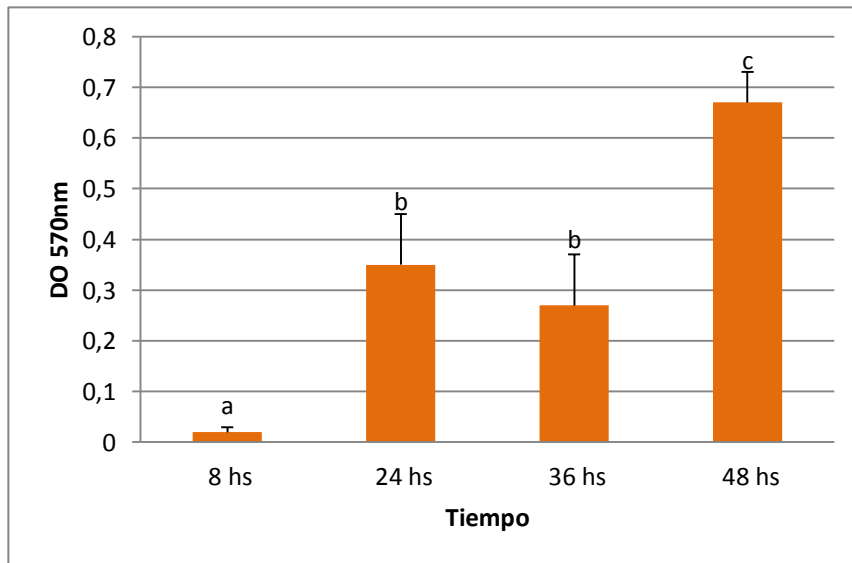


Gráfico 7: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *syringae* (P61)

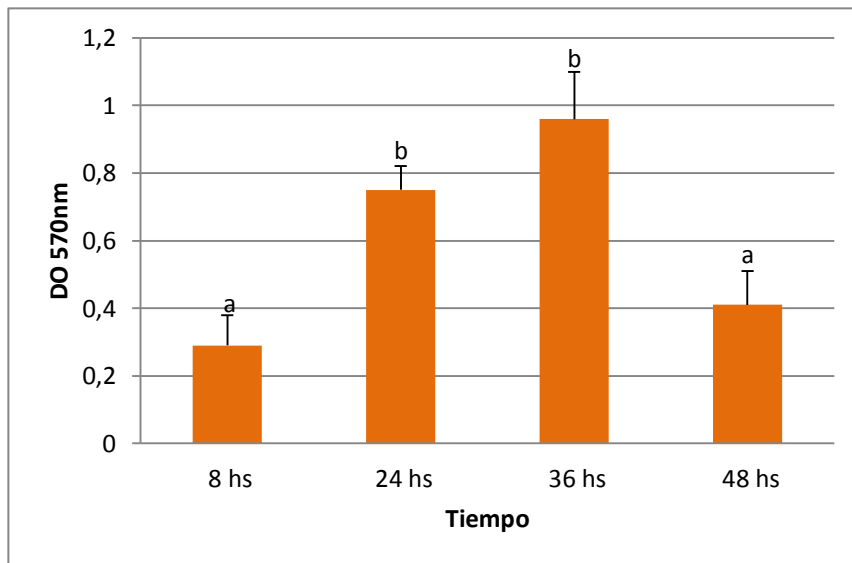


Gráfico 8: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *P. syringae* pv. *tomato* (DC3000)

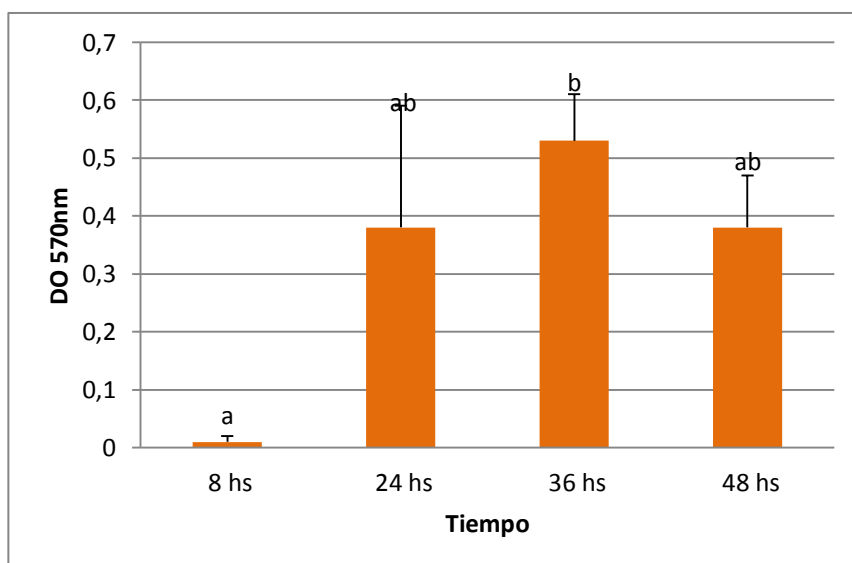


Gráfico 8: Producción de biofilm por la cepa fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*/ pv. *citri* (Xa)