

## Evaluación del efecto del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas

Cynthia Sánchez-García<sup>1</sup>, Mileidy Cruz-Martín<sup>1</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>, Misleidy Pérez<sup>2</sup>, Mildrey Medinilla<sup>2</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Berkys Roque<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: cynthia@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Kurhotel Escambray. Topes de Collantes, Sancti Spiritus. Cuba

### RESUMEN

La contaminación microbiana es uno de los problemas que más afecta en la micropropagación de especies vegetales en el mundo, es por eso que se buscan nuevas alternativas a partir de productos naturales, con el fin de sustituir o atenuar el uso de compuestos químicos, empleados frecuentemente para el control de microorganismos. Los aceites esenciales de plantas aromáticas han mostrado un amplio espectro de actividad contra microorganismos. Por ejemplo, el aceite esencial de Citronela que se extrae de las hojas y el tallo de la planta *Cymbopogon nardus*, posee propiedades antisépticas, desodorantes, insecticidas y estimulantes. En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. nardus* frente a cepas de hongos y de bacterias aisladas del cultivo *in vitro* de especies vegetales; mediante los métodos de Difusión en Agar y Dilución en Agar. Con este último se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI). El aceite esencial inhibió el crecimiento del 100% de las cepas de hongos y bacterias analizadas. El 75% de la cepas bacterianas fue controlada a una concentración de 0.03% del aceite. Estos resultados pueden constituir un punto de partida en el desarrollo de estrategias para el control de microorganismos contaminantes frecuentes del cultivo *in vitro* de plantas.

Palabras clave: actividad antibacteriana, actividad antifúngica, aceite de Citronela, productos naturales

### ABSTRACT

Microbial contamination is one of the main problems faced in the micropropagation of plant species in the world. New alternatives are being looked for the use of natural products to substitute or to attenuate the frequent use of chemical compounds. Essential oils from several aromatic plants have shown a wide spectrum activity to microorganisms. Essential oil from leaves and stem of *Cymbopogon nardus* is a volatile oil with antiseptics, deodorants, insecticidal, tonics and stimulants properties. *C. nardus* essential oil was tested for antimicrobial activity against fungi and bacteria isolated from *in vitro* plant culture by using disc-diffusion and agar dilution by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) assays. The essential oil inhibited 100% of microbial growth of fungi and bacteria strains tested. A 0.03% concentration of the essential oil controlled 75% of bacterial strains. These results could be a valuable alternative solution to control contaminant microorganism for *in vitro* plants culture.

Key words: antibacterial activity, antifungal activity, citronella oil, natural products

### INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la propagación *in vitro* de especies vegetales en el mundo, ya que produce cuantiosas pérdidas de material vegetal tanto en la micropropagación comercial como en los trabajos de investigación. Los contaminantes más frecuentes *in vitro* son los hongos, bacterias y levaduras, que en muchos casos no son patógenos en condiciones de campo (Herman, 1987).

Se han establecido numerosos procedimientos tecnológicos para controlar o disminuir la presencia de contaminantes y el empleo de productos químicos (fungicidas y antibióticos) ha constituido una vía rápida tanto para atenuar como

para eliminar estos microorganismos (Carrazana *et al.*, 1997). Con el fin de atenuar el uso de estos compuestos y sus consecuentes efectos negativos, se buscan nuevas alternativas sobre la base de productos naturales.

Se cree que la producción de aceites esenciales por las plantas está fundamentalmente justificada como un mecanismo de defensa contra los patógenos y plagas (Oxenham, 2003) y han mostrado un amplio espectro de actividad contra microorganismos patógenos de plantas y humanos (Qamar y Choudhary, 1991).

Por ejemplo, el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* que es extraído de las hojas y el tallo de la planta, es un aceite volátil con propiedades

antisépticas, desodorantes, insecticidas, tónicas y estimulantes (Shahi y Tava, 1993).

Se ha demostrado que aceites esenciales de plantas del género *Cymbopogon*, poseen propiedades antimicrobianas, incluyendo a *C. nardus* (Saikia *et al.*, 2001), es por eso que este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. nardus* para el control de microorganismos contaminantes, aislados del cultivo *in vitro* de especies vegetales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron microorganismos procedentes de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). **Hongos:** *Penicillium* sp. (CCIBP-Pen18), *Aspergillus niger* (CCIBP-Asp10), *Aspergillus* sp. (CCIBP-Asp11), *Helminthosporium* sp. (CCIBP-Hel1), *Rhizopus* sp. (CCIBP-Rhi 1) **Bacterias:** *Proteus vulgaris* (ATCC 25923), *Pseudomonas stutzeri* (CCIBP-CC2), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus pumilus* (CCIBP-Sp53), *Corynebacterium* sp. (CCIBP-Sp100) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Se empleó el aceite esencial de Citronela puro, suministrado por el Laboratorio de Plantas Medicinales, Kurhotel Escambray, Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Cuba, el cual se esterilizó el aceite por filtración con membranas de 0.45 µm.

Las diluciones del aceite esencial en alcohol al 75% se prepararon a partir de una concentración del 100%.

Para ambos ensayos de actividad antimicrobiana se utilizó medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para hongos y Agar de Muller- Milton (AMH) para las bacterias.

Se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite de Citronela mediante el método de Difusión en Agar (Bauer *et al.*, 1966). Para ello se empleó una suspensión conidial a una concentración aproximada de  $10^6$  ufc x  $ml^{-1}$  para el caso de los hongos y  $2 \times 10^8$  ufc x  $ml^{-1}$  para las bacterias. Se sembraron placas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían 20 ml de medio de cultivo. Se agregaron 5 µl de cada solución (aceite puro, aceite diluido, alcohol al 75% y agua estéril) a discos de papel de filtro Whatman 1 de 5 mm y se colocaron en la superficie de la placa de Petri, con ayuda de una pinza y se incubaron a 28 °C durante 7-14 días en el caso de los hongos y a 30 °C durante 7 días en el caso de las bacterias. Se realizaron tres réplicas de cada cepa. Además se incluyeron placas con medio de cultivo, libres del aceite de Citronella y con alcohol al 75% como controles de crecimiento. Se utilizaron como controles

positivos Higromicina B (Sigma) (50 µg/ml) frente a los hongos y Ampicilina (Sigma) (50 µg.ml<sup>-1</sup>) frente a las bacterias.

La evaluación se realizó a partir de los 7 hasta los 14 días en el caso de los hongos y a partir de las 24h hasta los 7 días para las bacterias. Se midió el valor del diámetro del halo o zona de inhibición en milímetros, restándole el diámetro del disco de papel de filtro (5mm.)

Para el ensayo de Dilución en Agar, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MCI), empleando el método de las diluciones dobles seriadas (Jorgensen *et al.*, 1993). Se ensayaron concentraciones decrecientes del aceite de Citronela en diluciones dobles seriadas en alcohol al 75% partiendo de una concentración del 100%, siguiendo el esquema que incluye una dilución final del aceite en el medio de cultivo de 1:10. Además, se incluyeron placas de Petri con medio de cultivo, libres del aceite de Citronela y con alcohol al 75%, como controles de crecimiento.

Para el caso de los hongos se colocó en el centro de cada placa de Petri de 50 mm de diámetro, un disco de micelio de 7 mm de diámetro proveniente de colonias crecidas durante 7-14 días. Se realizaron tres réplicas de cada concentración. Las mismas se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante 14 días. Las evaluaciones se realizaron a partir de las 72 horas.

En el caso de las bacterias se seleccionaron de 2 a 3 colonias aisladas de un cultivo, crecido en placa a 30°C por 18-24 h. La turbidez de la suspensión bacteriana se ajustó por comparación óptica con el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland (aprox.  $1-2 \times 10^8$  ufc  $ml^{-1}$ ). De los inóculos preparados se tomaron 3.5 µl y se depositaron en pocillos sobre la superficie del agar con una pipeta (Gilson). Se incubaron a 30°C en la oscuridad durante 48 h. Las evaluaciones se realizaron a las 24 y 48h. En ellas se comprobó el crecimiento bacteriano en los controles.

En ambos casos las placas se colocaron sobre una superficie que no reflejara la luz y se determinó la menor concentración del aceite esencial que inhibió completamente el crecimiento microbiano en cada caso, la cual fue tomada como la MCI.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aceite esencial de Citronela mostró actividad antimicrobiana frente a los hongos y bacterias seleccionadas, expresada en la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas a las concentraciones probadas. Esta sustancia inhibió el crecimiento de todas las cepas de hongos filamentosos utilizadas. El valor del halo de inhibición y MCI para cada cepa se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Valores del diámetro de la zona de inhibición y de MCI del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* frente a microorganismos contaminantes

Microorganismos	MCI <sup>1</sup> (%)	Zona de inhibición (mm)		
		Aceite de Citronella 100%	Ampicilina (50 µg.ml <sup>-1</sup> )	Higromicina B (50 µg.ml <sup>-1</sup> )
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2.5	9	19	--
<i>Proteus vulgaris</i> CCIBP- Cr1	0.03	15	22	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.03	8	17	--
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.03	16	21	--
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.08	20	22	--
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCIBP-CC2	0.03	17	18	--
<i>Bacillus pumilus</i> CCIBP-Sp 53	0.03	25	23	--
<i>Corynebacterium</i> sp. CCIBP-Sp 100	2.5	15	23	--
<i>Rhizopus</i> sp. CCIBP-Rh1	2.5	9	--	5
<i>Penicillium</i> sp. CCIBP-Pen18	2.5	8	--	6
<i>Aspergillus niger</i> CCIBP-Asp 10	2.5	9	--	9
<i>Aspergillus</i> sp. CCIBP-Asp11	2.5	9	--	5
<i>Helminthosporium</i> sp. CCIBP-Hel1	2.5	15	--	12

<sup>1</sup> Mínima Concentración Inhibitoria

Según Osorio y Suárez (1999) los hongos filamentosos constituyen un problema serio en cuanto a las pérdidas que ocasionan en el cultivo *in vitro* de plantas. Los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Chaetomium* han sido descritos por George (1993) y por Leifert *et al.* (1994) como los contaminantes fúngicos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos.

En este trabajo se obtuvo un valor del diámetro del halo de inhibición de *Aspergillus niger* frente al aceite puro de 9 mm, el cual fue semejante al obtenido por Saikia *et al.* (2001), que fue de 8 mm en condiciones similares.

Shimoni *et al.* (1993) encontraron que una gran cantidad de aceites esenciales de plantas tales como: *Syriaca Majorana*, *Satureja timbra*, *Micromeria fruticosa* y *Salvia triloba* exhibieron actividad antifúngica *in vitro* contra varios hongos patógenos.

Por su parte, Cruz-Martín *et al.* (2002) evaluaron concentraciones de 512 mg.l<sup>-1</sup> (p/v) del complejo Carbendazim -Ciclodextrina que fue eficaz para el control *in vitro* de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum*. Estos mismos autores demostraron que esta concentración del complejo no controló los géneros *Curvularia*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Oidiodendron*, *Rhizopus* y *Monilia*. Sin embargo, el aceite de Citronela inhibió el crecimiento de las cepas de *Helminthosporium* sp. y de *Rhizopus* sp. a una concentración del 2.5%.

Se comprobó que el aceite de Citronela inhibió el crecimiento de 100% de las cepas bacterianas. El valor de la zona de inhibición y MCI para cada cepa se muestra en la tabla 1.

Este aceite resultó más eficaz para el control de las bacterias que de los hongos. El crecimiento del 75% de las cepas bacterianas fue inhibido a una concentración del 0.03% de aceite esencial.

Otros autores han informado sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial de especies de *Cymbopogon*. Entre estos, Lemos *et al.* (1990) encontraron una actividad potente del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, mientras que frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* fue muy baja. Sin embargo, en este estudio el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* mostró actividad frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* a bajas concentraciones (2.5% y 0.03%, respectivamente).

El aceite de Citronella es un aceite esencial muy explotado comercialmente y su forma de obtención y composición química son bien conocidas, por lo que estos resultados pueden constituir una alternativa para el control de la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas.

## REFERENCIAS

- Bauer, AW, Kirby WMM, Sherris JC y Turckp M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496
- Carrazana, D, León A, Herrera L, Alvarado Y, Quiñónez R (1997) Efecto de diversos fungicidas comerciales sobre

- hongos contaminantes en biofábricas. Centro Agrícola 24(1): 61-66
- Cruz-Martín, M, Acosta Suárez M, Leiva-Mora M, Alvarado Capó Y, Lezcano M (2002) Evaluación del complejo Carbendazim- $\alpha$ -Ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. Biotecnología Vegetal 2 (2): 73-76
- George, E F (1993) Plant propagation by tissue culture. Exergetics Ltd
- Herman, E (1987) Toward control of micropropagation contamination. Agricell Report 9: 33-35
- Jorgensen, JHR, Cleeland WA, Craig G, Doern MJ, Ferraro SM, Finegold SL, Hansen SG, Jenkins WJ, Novick MA, Pfaller DA, Preston LB y Swenson JM (1993) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Third Edition. Approved Standard. NCCLS document M7-A3. Villanova
- Leifert, C, Morris C E, Waites W M (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Science 13:139-183
- Lemos, TLC, Matos TJA, Alenca JW, Craveiro AA, Clark AM y Chesney JD (1990) Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. Phytother Res.4: 82-84
- Osorio, CH, Suárez J M (1999) La regeneración aplicada a laboratorios comerciales de cultivo de tejidos. Libro de reportes cortos del 5<sup>o</sup> Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. UCLV
- Oxenham, SK (2003) Classification of an *Ocimum basilicum* germplasm collection and examination of the antifungal effects of the essential oil of basil. Glasgow, (University of Glasgow UK PhD thesis)
- Qamar, S y Choudhary F M (1991). Pak. J. Sct. Indl. Res. 34: 30-31
- Saikia, D, Khanuja SP S, Kahol A, Gupta S y Kumar S (2001) Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. Genetics Resources and Biotechnology Division, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, PO CIMAP, Lucknow 226 015, India
- Shahi, AK, Tava A (1993) Essential Oil Composition of three *Cymbopogon* species of Indian Thar Desert. J. Essent. Oil Res. 5: 639-643
- Shimoni, M, Putievsky E, Ravid U y Ruveni R (1993) Antifungal activity of volatile fractions of essential oils from four aromatic wild plants in Israel. J Chem Ecol 19:1129-1133