



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE BOTÁNICA**

**Actividad antimicrobiana del aceite esencial de  
tomillo (*Thymus vulgaris* L.)**

**ROSA MIREYA LÓPEZ AMBROCIO**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. MÉXICO**

2015

La presente tesis, titulada: **Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.)**, realizada por el alumno: **Rosa Mireya López Ambrocio**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de :

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**BOTÁNICA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



**DRA. LUCERO DEL MAR RUÍZ POSADAS**

ASESOR:



**DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ**

ASESOR:



**DR. JOSÉ RODOLFO GARCÍA NAVA**

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2015**

## **Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.)**

Rosa Mireya López Ambrocio, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Las plantas aromáticas medicinales se caracterizan por poseer propiedades medicinales, olores y sabores específicos, los cuales son el resultado de la presencia de aceites esenciales. La creciente demanda de ingredientes naturales ha impulsado la producción de aceite esencial de alta calidad. El tomillo se comercializa principalmente por sus hojas y por la extracción de su aceite esencial, el cual está compuesto principalmente por monoterpenos (timol, carvacrol y linalol,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno,  $\alpha$ -Pineno y  $\alpha$ -Tujueno). Se conocen diversas propiedades del AE de tomillo, como su actividad antitumoral, antibacteriana, antifúngicas y antioxidantes. En este trabajo se evaluó el efecto que tiene la aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares en el rendimiento, composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo.

El mayor rendimiento lo presentó el tratamiento P61 con 13.3 mg AE g<sup>-1</sup> MS. Se observó que el número de componentes y el porcentaje presente en el aceite esencial es diferente en cada tratamiento. El tratamiento que presentó mayor concentración de timol fue el Testigo (52.55%), seguido por el tratamiento inoculado con P61 (51.05%) y Zac19+Cedro (50.66%). Para O-Cimeno el tratamiento inoculado con Zac19 (21.79) presenta la mayor concentración, seguido de Zac19+Cedro y Bioforte con 20.38% y 19.37% respectivamente. Respecto a la concentración de J-terpineno Cedro y P61 mostraron mejor respuesta, con 17.91 y 17.84% respectivamente. En la concentración al 50% los tratamientos tuvieron diferencias significativas (Figura 20); el tratamiento con mayor diámetro de inhibición correspondió a las plantas inoculadas con P61.

Palabras clave: tomillo, aceite esencial, micorriza arbuscular, rizobacterias.

## **Antimicrobial activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil**

Rosa Mireya López Ambrocio, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

### **ABSTRACT**

Medicinal herbs are characterized by having medicinal properties, odors, and specific flavors, which they result from the presence of essential oils. The growing demand for natural ingredients has boosted the production of high quality essential oil. Thyme is marketed mainly by its leaves and the extraction of their essential oil, which is composed mainly of monoterpenes (thymol, carvacrol, and linalool,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene,  $\alpha$ -pinene and  $\alpha$ -Tujuen). From the essential oil of thyme, various properties are known, as their antitumor, antibacterial, antifungal and antioxidant activity. In this work we evaluated the effect of the enforcement of a commercial plant-growth-regulator, the inoculation with plant growth promoting rhizobacterias and arbuscular mycorrhizal fungi in amount, composition and antibacterial activity of essential oil of thyme.

The best performance was achieved by the treatment P61 with 13.3 mg AE g<sup>-1</sup> MS. It was observed that the number of components and the percentage present in the essential oil was different for each treatment. The treatment with the highest concentration of thymol was the control (52.55%), followed by the treatment inoculated with P61 (51.05%) and Zac19+Cedar (50.66%). For O-Cymene the treatment inoculated with Zac19 (21.79) had the highest concentration, followed by Zac19+Cedar and Bioforte with 20.38% and 19.37% respectively. Over the concentration of J-Terpinene, Cedar and P61 showed better response, with 17.91 and 17.84% respectively. In the concentration to 50% the treatments had significant differences (figure 20); the treatment with the highest inhibition diameter corresponded to the plants inoculated with P61.

Key words: Thyme, essential oil, arbuscular mycorrhizal, rhizobacterias.

## DEDICATORIAS

Especialmente a mi mami, **Micaela Soledad Ambrosio Pérez**, quien siempre ha estado con migo y ha sido la inspiración de mi esfuerzo. Jamás existirá una forma de agradecerte una vida de lucha, sacrificio y de tanto amor.

A Martín Torres De La Cruz, quien ya no está físicamente a mi lado, pero con su cariño y enseñanzas todos los días está presente.

Vivian, Santiago, Ángela y Fati por el amor que me brindan, por darme tanta felicidad y por ser esos niños hermosos que me iluminan cada día.

A mi hermana Rosa Bibiana López Ambrocio, mi compañera inseparable, gracias por el apoyo que me brindas.

A mi tía Griselda Martínez Pérez, mi mejor amiga, siempre tan incondicional y entusiasta.

A Gabriel Abarca Joaquín, porque desde que te conozco siempre has estado a mi lado, apoyándome en los malos y mejores momentos, gracias por todos los años compartidos y ser un excelente compañero.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por regalarme cada día de vida

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero.

A la Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas por su amistad, por sus consejos y por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez por su dedicación, paciencia y apoyo incondicional en la realización de este trabajo

Al Dr. Marcos Soto Hernández por su paciencia y su valioso apoyo en el procesamiento y análisis fitoquímico.

Al Dr. Rodolfo García Nava por la revisión y sugerencias en la realización de esta tesis.

A la Dra. Luz Adela Guerrero Lagunes por su apoyo y asesoramiento en el manejo del cultivo.

Al M.C. Ricardo Vega Muñoz por su apoyo en herbario para el procesamiento e identificación taxonómica de mi material.

Al M.C. Rubén San Miguel Chávez por su apoyo en el laboratorio de fitoquímica y por su asesoramiento en el análisis de datos en los bioensayos.

Al M.C. Jorge Manuel Valdez Carrasco por su apoyo y el espacio brindado para la toma de fotografías en microscopia de Luz.

Al Sr. Edmundo Martínez Galán por su amistad y apoyo en el laboratorio de microbiología.

Al Sr. Domingo por su apoyo en el laboratorio de fitoquímica.

A la Biol. Vivian Quiroz por su amistad, dedicación e instrucción en el manejo de microorganismos y por su apoyo incondicional.

A la M. C. Claudia de La Rosa Mera por su amistad y asesoramiento en el manejo de microorganismos.

A Sandra y a Simón, por su valiosa amistad, por los gratos momentos compartidos y por esas platicas tan emotivas.

# CONTENIDO

Página

<b>INDÍCE DE CUADROS.....</b>	<b>xi</b>
<b>INDÍCE DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISION DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Plantas aromáticas medicinales.....	4
2.2. Aceite esencial.....	9
2.2.1. Biosíntesis de aceites esenciales.....	10
2.2.2. Composición de aceites esenciales.....	15
2.2.3. Métodos de extracción y análisis de aceites esenciales.....	18
2.2.4. Importancia de los aceites esenciales.....	19
2.3. Nutrición de plantas aromáticas medicinales.....	20
2.4. Los microorganismos y su influencia en la nutrición de las plantas....	22
2.4.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	24
2.4.2. Hongos micorrizicos arbusculares.....	25
2.5. Fitorreguladores de crecimiento industriales.....	29
2.6. Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> L.).....	31
2.6.1. Descripción taxonómica.....	32
2.6.2. Producción Nacional.....	33
2.6.3. Usos del aceite esencial de tomillo.....	35
2.7. <i>Escherichia Coli</i> .....	38
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>42</b>
4.1. Objetivo general.....	42
4.2. Objetivos particulares.....	42
4.3. Hipótesis general.....	42
4.4. Hipótesis específicas.....	43
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
5.1. Crecimiento y obtención del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrizicos arbusculares.....	44
5.1.1. Obtención del germoplasma.....	44
5.1.2. Identificación taxonómica.....	44
5.1.3. Propagación.....	45

5.1.4.	Manejo en invernadero.....	45
5.1.5.	Hongos micorrízicos arbusculares.....	46
5.1.6.	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	46
5.1.7.	Fitorregulador comercial.....	48
5.1.8.	Manejo en campo.....	48
5.1.9.	Diseño experimental.....	49
5.1.10.	Variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo.....	51
5.1.10.1.	Colonización micorrízica antes del trasplante.....	51
5.1.10.2.	Dinámica de la altura de la planta.....	52
5.1.10.3.	Dinámica de la cobertura de la planta.....	52
5.1.11.	Variables evaluadas a la cosecha.....	52
5.1.11.1.	Numero de inflorescencias.....	52
5.1.11.2.	Numero de ramas.....	52
5.1.11.3.	Peso fresco de la parte aérea.....	53
5.1.11.4.	Peso seco de la parte aérea.....	53
5.1.11.5.	Colonización micorrízica.....	53
5.1.12.	Aceite esencial.....	53
5.1.12.1.	Extracción por destilación por arrastre con vapor de agua.....	53
5.1.12.2.	Rendimiento.....	54
5.1.12.3.	Análisis del aceite esencial por cromatografía de capa fina.....	54
5.1.12.4.	Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases.....	55
5.1.13.	Análisis estadístico.....	56
5.2.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares.....	57
5.2.1.	Obtención de la cepa <i>Echeriquia coli</i> .....	57
5.2.2.	Diseño experimental.....	58
5.2.3.	Bioensayos.....	58

5.2.4.	Variables evaluadas.....	59
5.2.4.1.	Diámetro de inhibición.....	59
5.2.5.	Análisis estadístico.....	59
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
6.1.	Crecimiento y obtención del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares.....	60
6.1.1.	Identificación taxonómica.....	60
6.1.2.	Variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo.....	61
6.1.2.1.	Colonización micorrízica antes del trasplante.....	61
6.1.2.2.	Dinámica de la altura de la planta.....	62
6.1.2.3.	Dinámica de la cobertura de la planta.....	63
6.1.3.	Variables evaluadas a la cosecha.....	65
6.1.3.1.	Altura final.....	65
6.1.3.2.	Cobertura final.....	66
6.1.3.3.	Número de ramas.....	67
6.1.3.4.	Número de inflorescencias.....	68
6.1.3.5.	Peso seco de la parte aérea.....	70
6.1.3.6.	Colonización micorrízica.....	71
6.1.4.	Aceite esencial.....	75
6.1.4.1.	Rendimiento.....	75
6.1.4.2.	Análisis del aceite esencial por cromatografía de capa fina.....	78
6.1.4.3.	Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases.....	81
6.2.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares.....	85
6.2.1.	Diámetro de inhibición.....	85
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE CUADROS

		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Principales países importadores y exportadores de PAM entre el 2004 y 2008, se enumeran en orden descendente de acuerdo al promedio de volúmenes de comercio.....	7
<b>Cuadro 2.</b>	Producción de plantas aromáticas medicinales (PAM) cultivadas en México en 2011.....	9
<b>Cuadro 3.</b>	Precios y presentaciones del tomillo fresco y deshidratado en la localidad de la Paz, Baja California Sur.....	34
<b>Cuadro 4.</b>	Comercialización del aceite esencial de tomillo.....	34
<b>Cuadro 5.</b>	Especies y géneros de hongos micorrízicos arbusculares, porcentajes de colonización micorrízica arbuscular presente en <i>Thymus vulgaris</i> L. antes del trasplante (120 días después de la propagación por esqueje).....	61
<b>Cuadro 6.</b>	Colonización micorrízica, numero de inflorescencias y peso seco de parte aérea en <i>Thymus vulgaris</i> L. por efecto de inoculación de hongos micorrízicos arbusculares a 105 DDT.....	73
<b>Cuadro 7.</b>	Rendimiento de aceite esencial en plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	77
<b>Cuadro 8.</b>	$R_{fs}$ (tiempos de retención) de los componentes del aceite esencial de tomillo en los tratamientos.....	79
<b>Cuadro 9.</b>	Presentación comparativa de la composición química del AE de <i>Thymus vulgaris</i> L. 1. Zac19; 2.Cedro; 3.Zac19+Cedro; 4.P61; 5.Bioforte; 6.Testigo.....	84
<b>Cuadro 10.</b>	Actividad antibacteriana del AE de <i>Thymus vulgaris</i> L. en <i>Escherichia coli</i> DH5-Alpha en función de los diámetros de inhibición del crecimiento de la bacteria.....	86

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Rutas generales de la biosíntesis de metabolitos secundarios.....	11
<b>Figura 2.</b>	Rutas de biosíntesis de terpenos en la célula de la planta.....	12
<b>Figura 3.</b>	Rutas de biosíntesis de monoterpenos.....	14
<b>Figura 4.</b>	Estructuras del hongo micorrízico arbuscular en la raíz.....	27
<b>Figura 5.</b>	Micrografía de hojas de <i>Thymus vulgaris</i> L. obtenidas con MEB 20X. Se observan las glándulas que contiene el aceite esencial en la superficie a) adaxial y b) abaxial.....	33
<b>Figura 6.</b>	Estructura química de p-cimeno, timol y carvacrol.....	36
<b>Figura 7.</b>	Plano de distribución de los tratamientos en campo. <b>T1:</b> HMA Zac19, <b>T2:</b> HMA Cedro, <b>T3:</b> HMA Zac19 con HMA Cedro, <b>T4:</b> P61, <b>T5:</b> Bioforte, <b>T6:</b> Testigo, <b>R:</b> repetición.....	50
<b>Figura 8.</b>	Micrografía de hojas de <i>Thymus vulgaris</i> L. obtenidas con MEB. A) superficie adaxial y abaxial 23X. B) Glándula esférica que contiene el aceite esencial 200X. C) Glándulas 500X. D) Corte transversal de la hoja, se observa que la cutícula presenta una capa cerosa 5 000X.....	60
<b>Figura 9.</b>	Altura de las plantas de tomillo durante el periodo de cultivo con diferentes tratamientos de aplicación de un fitoregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	63
<b>Figura 10.</b>	Cobertura de las plantas de tomillo durante el periodo de cultivo con diferentes tratamientos de aplicación de un fitoregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	64
<b>Figura 11.</b>	Altura final de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitoregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	66
<b>Figura 12.</b>	Cobertura final de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitoregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	67

<b>Figura 13.</b>	Número de ramas de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	68
<b>Figura 14.</b>	Número de inflorescencias de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	69
<b>Figura 15.</b>	Peso seco de la parte aérea de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	71
<b>Figura 16.</b>	Estructura interna de la simbiosis entre HMA y la raíz de <i>Thymus vulgaris</i> L. en microscopio óptico. A y B arbúsculos en la célula hospedante (Zac19). C vesículas (Cedro). D espora e hifa del HMA (Zac19+Cedro).....	74
<b>Figura 17.</b>	Rendimiento de aceite esencial (mg) en 1g de muestra seca de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV.....	76
<b>Figura 18.</b>	Imagen de la placa cromatográfica de sílica gel observada en luz ultravioleta. 1.Estándar de timol; 2.Testigo; 3.P61; 4.Zac19; 5.Cedro; 6.Zac19+Cedro; 7.Bioforte; 8.Estándar linalol.....	79
<b>Figura 19.</b>	Imagen de la placa cromatográfica de sílica gel. 1.Estándar de timol; 2.Testigo; 3.P61; 4.Zac19; 5.Cedro; 6.Zac19+Cedro; 7.Bioforte; 8.Estándar linalol.....	80
<b>Figura 20.</b>	Actividad antibacteriana del AE al 50% de <i>Thymus vulgaris</i> L. en <i>Escherichia coli</i> DH5-Alpha en función de los diámetros de inhibición del crecimiento de la bacteria.....	88

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde su origen los humanos han dependido de las plantas para satisfacer sus necesidades básicas, como alimentos, ropa, vivienda y como un recurso para curar sus enfermedades. Las plantas han sido la base de los sistemas de medicina tradicional de todas las culturas y actualmente siguen prestando a la humanidad una amplia gama de remedios (Gurib-Fakim, 2006). El uso de plantas medicinales se basa en los hallazgos empíricos de miles de años, los primeros registros datan alrededor de 5,000 años en Mesopotamia. Los escritos en tablillas de arcilla describen el uso de aceites de especies de *Cedrus* (Cedar) y *Cupressus sempervirens* (ciprés), extractos de *Glycyrrhiza glabra* y *Papaver somniferum* (Gurib-Fafim, 2006).

Las plantas medicinales suelen contener diferentes mezclas de compuestos químicos que pueden actuar de forma individual o sinérgica; por ejemplo, una planta puede contener sustancias amargas que estimulan la digestión, compuestos que pueden actuar como un antioxidante y antimicrobianos (Gurib-Fakim, 2006). Otras plantas se caracterizan por poseer propiedades medicinales, olores y sabores específicos, los cuales son el resultado de la presencia de aceites esenciales, estos vegetales se conocen también como plantas aromáticas medicinales (PAM) (Lubbe *et al*, 2011).

Actualmente ha incrementado el interés en las PAM debido a la actividad biológica y a la capacidad antioxidante que poseen sus aceites esenciales, los cuales tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, agrícola, avícola y ganadera. También son ampliamente usados en aromaterapia y /o como productos alternativos de la salud (Amad *et al.*, 2011; Juárez-Rosete *et al.*, 2013). Con estas características, las plantas aromáticas crean una oportunidad de negocio para los productores de países en vías de desarrollo, que están en condiciones de producir con calidad y con capacidad de atender mercados exigentes.

La creciente demanda de ingredientes naturales han impulsado la producción de aceite esencial (AE), los aceites más demandados son aquellos que presentan compuestos fenólicos como constituyentes mayoritarios (CBI, 2013). La calidad de un AE está determinada por su composición química, existen normas internacionales (ISO) que prescriben los requisitos de aceites esenciales y de PAM secas. En el caso del tomillo la Norma ISO 6754:1996 prescribe ciertos requisitos del contenido en el producto, las hojas enteras de tomillo deben contener un mínimo de 0.5% de aceite esencial, lo que equivale a 5 mL kg<sup>-1</sup> de hierba seca, y tomillo molido debe contener al menos 0.2% de aceite; y el timol debe ser el componente mayoritario del AE para cumplir los requisitos.

El tomillo, *Thymus vulgaris* L. es una planta de la familia Lamiaceae, posee cualidades aromáticas medicinales y alimenticias, se comercializa

principalmente por sus hojas como condimento y herboristería y por la extracción de su aceite esencial, la cual está compuesta principalmente por timol y carvacrol, también puede contener p-cimeno, linalol, borneol y ésteres acéticos (Rota, 2008). La actividad antimicrobiana del AE de tomillo ha sido muy estudiada como una alternativa a los conservadores químicos de carnes, y a los antibióticos debido a la aparición de bacterias resistentes a estos.

La creciente demanda de aceite esencial de tomillo nos obliga a obtener rendimientos más altos, las prácticas agrícolas intensivas dirigidas a alto rendimiento de los cultivos demandan el uso intensivo de fertilizantes químicos y pesticidas, que son caros y tienen impactos ambientales negativos. Además la tendencia de una alimentación dirigida hacia lo sano ha incrementado la demanda de los alimentos orgánicos. El uso de fitorreguladores de crecimiento, así como de microorganismos del suelo es una alternativa económica y sustentable para incrementar el rendimiento de los cultivos. Los hongos micorrízicos arbusculares y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal juegan un papel importante en la mejora del crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, y en los últimos años han sido utilizados como inoculantes para mejorar crecimiento de las plantas en condiciones controladas, así como las condiciones naturales.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Plantas aromáticas medicinales**

Las plantas aromáticas medicinales (PAM) son vegetales que se caracterizan por poseer propiedades medicinales, olores y sabores específicos, los cuales son el resultado de la presencia de aceites esenciales (AE). Los órganos destinados para el almacenamiento de AE, así como la composición y cantidad de estos, son distintos en cada especie. Algunas plantas los acumulan en las hojas, tallos, flores o frutos (Regnault-Roger, 2012; Lubbe *et al.* 2013).

Se estima que la diversidad vegetal del planeta está representada por al menos 300,000 especies, alrededor del 10% de estas contienen AE. Las AE se encuentran concretamente en ciertas familias de Angiospermas, las principales son: Apiaceae (anís, hinojo), Asteraceae (manzanilla), Lauraceae (canela), Mirtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae y Violaceae; de las cuales destaca el grupo de las Lamiaceae (menta, orégano, tomillo, lavanda y albahaca), que incluye alrededor de 300 especies aromáticas (Muñoz, 2002; Kuklinski, 2003; Schmidt, 2010).

El uso de PAM se remota a tiempos prehistóricos; en lo que hoy es Irak se encontraron 600 tabletas de arcilla, las cuales parecen haberse escrito hace 5,000 años. Sin embargo, R. Campbell Thompson determinó que la mayoría eran copias de textos mucho más antiguos, en las tabletas se describen los

múltiples usos de tomillo, menta, romero, ruda, manzanilla, ajeno, mirto, mostaza, entre otras (Sneader, 2005).

El aprovechamiento de las PAM reside en los agradables aromas que emiten, en los sabores que proporcionan a los alimentos, en su capacidad de aliviar el dolor y curar enfermedades. Actualmente se observa un aumento en la demanda de PAM debido a la actividad biológica y a la capacidad antioxidante que poseen los aceites esenciales obtenidos de estas. Las principales industrias que demandan PAM son la farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, aromaterapia y herbolario, también tienen nuevas aplicaciones en la industria agrícola, avícola y ganadera (Amad *et al.*, 2011; Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

En la industria farmacéutica se utilizan para la elaboración de medicamentos por sus propiedades funcionales, como son antibacterial, antioxidante, antifúngica. En la industria cosmética para elaborar fragancias, jabones, detergentes, velas, lociones para el cuerpo, repelentes y cosméticos de todo tipo como suavizantes de piel. Los productos elaborados a base de PAM son más comunes y su venta en herbolarios es más frecuente; también cada vez son más utilizados en la aromaterapia y/o como productos alternativos de la salud (CBI, 2014).

La industria agroalimentaria utiliza los AE como saborizantes, aromatizantes, colorantes y conservadores, sobre todo en la elaboración de lácteos, dulces y

confitería. También son utilizadas en detergentes, ambientadores y desodorantes locales (CBI, 2014).

En la industria avícola y en la ganadería se usan como aditivos. En la última década el uso de PAM en la cocina ha sido cada vez más extendido, se utilizan para preservar o sazonar los alimentos (Mandiola *et al.*, 2009; Amad *et al.*, 2011; Guerrero, 2012; Sánchez *et al.*, 2012).

En la agricultura las PAM son importantes en el control de plagas, enfermedades, malezas y en cambio de nutrientes orgánicos y nutrientes disponibles, especialmente N. Además, los residuos de las plantas aromáticas, así como los AE, son una fuente de carbono y energía para promover incrementos en el número de microorganismos del suelo (Marcel *et al.* 2008; Juárez-Rosete *et al.*, 2013; Teles *et al.*, 2014).

A nivel mundial la comercialización y producción de PAM está dominada por la Unión Europea, Estados Unidos, Japón y China. Del 2004 al 2008 los principales países importadores fueron Estados Unidos, Hong Kong y Alemania; y exportadores China, Egipto y México (Cuadro 1). Otros países del continente americano que también producen aceites esenciales son Argentina, Paraguay, Uruguay, Guatemala y Haití. La mayoría del material vegetal (cultivado o silvestre recolectado) se utiliza para la producción de aceite esencial o se cotizan en forma seca (excepto cuando los compuestos deseados

son sensibles al proceso de secado), como polvos o harinas (Schmidt, 2010; Guerreo, 2012; Lubbe *et al.* 2013).

**Cuadro 1.** Principales países importadores y exportadores de PAM entre el 2004 y 2008, se enumeran en orden descendente de acuerdo al promedio de volúmenes de comercio.

Importadores			Exportadores		
País	Toneladas	Valor (\$)	País	Toneladas	Valor (\$)
Estados Unidos	62,038	220,638	China	204,082	348,821
Hong Kong	48,168	167,298	India	47,551	93,450
Alemania	47,814	139,684	México	38,262	38,081
Rep. Corea	34,732	47,563	Egipto	24,600	34,151
Japón	27,937	118,514	Alemania	18,076	99,349
China	27,754	34,808	Polonia	15,775	47,183
Francia	20,336	72,471	Hong Kong	15,011	81,698
Reino Unido	17,895	51,006	Estados Unidos	13,919	95,704
España	15,670	44,337	Chile	11,627	27,656
Italia	13,436	59,582	Marruecos	10,796	19,463
Malasia	11,348	44,058	Bulgaria	9,338	21,088
Pakistan	11,045	4,733	Albania	7,770	17,084

**Fuente:** Adaptado de Lubbe *et al.*, 2013.

Se estima que en México se han registrado alrededor de 4,000 especies vegetales con atributos medicinales. Más del 90% de los mexicanos utilizan plantas medicinales para el tratamiento empírico de varias enfermedades; algunas son nativas y muchas otras son introducidas de otras partes del mundo (Mendoza *et al.*, 2002; González-Stuart y Rivera, 2009; Alonso-Castro *et al.*, 2012).

En México, los estados de Morelos, Baja California Sur, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala son los principales productores de PAM, cuya producción está destinada al mercado nacional y en mayor parte a Estados Unidos de América. Cabe destacar que la producción de PAM orgánicas presenta su producción más alta en el Estado de Baja California Sur. El cultivo de estas especies se encuentra en expansión debido a la investigación y los programas de vinculación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Así mismo, en Nayarit, se cultivan alrededor de 127 ha de diferentes PAM, entre ellas la albahaca, menta, salvia, zacate limón, orégano y tomillo (Sánchez-Verdugo *et al.*, 2012; Guerreo, 2012; Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

El SIAP (2012), reporta que en el 2011 de las 8,351 ha destinadas a la producción comercial de hierbas aromáticas, el cilantro ocupó 71%, la manzanilla 10% y la albahaca 5%. Respecto al rendimiento obtenido destaca el cultivo de perejil, te limón y epazote, con 14.65, 11.28 y 9.81 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Los cultivos mejor pagados fueron el comino, la menta y el cebollín (Cuadro 2) (Juárez-Rosete *et al.*, 2013).

Alrededor de algunos campos de PAM se ha implementado el agroturismo, dicha actividad provee beneficios económicos al productor y a los pobladores de la zona (Guerreo, 2012). La demanda de PAM y de aceites esenciales obtenidos de estas va en aumento, por lo tanto el cultivo de estas plantas ofrece una oportunidad de negocio para los productores de países en vías de desarrollo.

**Cuadro 2.** Producción de plantas aromáticas medicinales (PAM) cultivadas en México en 2011.

Cultivo	Superficie sembrada (ha)	Rendimiento (ton ha <sup>-1</sup> )	Valor de producción (Pesos ton <sup>-1</sup> )
Albahaca	441	8.2	13,769
Cebollín	24	2.2	17,367
Cilantro	5,931	9.21	3,659
Comino	42	1.16	32,685
Eneldo	156	1.24	16,300
Epazote	156	9.81	3,444
Hierbabuena	29	8.85	2,434
Manzanilla	869	1.62	10,465
Mejorana	38	2.17	6,795
Menta	10	3.39	22,099
Orégano	69	2.09	13,038
Perejil	279	14.65	6,786
Romero	52	7.15	4,546
Salvia	23	3.16	15,065
Estragón	8	2.28	16,645
Te limón	44	11.28	1,419
Tomillo	20	3.36	10,711

**Fuente:** Adaptado de Guerrero (2012).

## 2.2. Aceite esencial

El término aceite esencial (AE) es una contracción de “aceite de excelencia”; se encuentran en distintos órganos de la planta, como flores, tallos, semillas, frutos, raíces, corteza, hojas; y se pueden encontrar almacenados en células

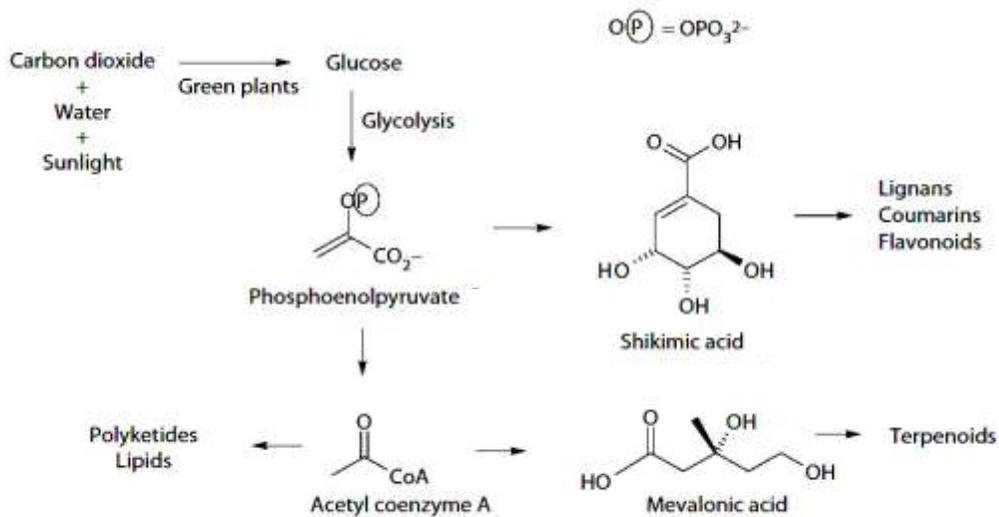
epidérmicas, cavidades, canales o en tricomas glandulares. Los AE son sustancias líquidas, volátiles, generalmente incoloras, son solubles en lípidos y en disolventes orgánicos con una densidad generalmente más baja que la del agua. No todos los extractos de plantas olorosas cumplen con las Normas Internacionales de Organización (ISO). Un aceite esencial definido por la ISO es un “producto obtenido a partir de material vegetal, ya sea con destilación por arrastre de vapor o desde el epicarpio de los frutos cítricos mediante un procedimiento mecánico” (Bakkali *et al.*, 2008; Sell, 2010; Lubbe *et al.*, 2013).

### **2.2.1. Biosíntesis de aceites esenciales**

El AE es una mezcla de diferentes sustancias orgánicas liposolubles de bajo peso molecular. Puede contener de 20 a 60 componentes en diferentes concentraciones. Dichos componentes incluyen dos grupos; el grupo principal se compone de terpenos y el otro de constituyentes aromáticos (aldehídos, alcoholes, cetonas y ésteres) y alifáticos. Los terpenos están formados por unidades de isopropeno (C5) y se dividen en dos grupos principales: monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15); cuando el número de subunidades isoprenoides es bajo (hasta 15 carbonos) suelen ser compuestos volátiles y pueden ser olorosos y servir de intermediarios para la comunicación entre organismos (Cheng *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

En el esquema general de las reacciones biosintéticas a través de la fotosíntesis las plantas convierten el dióxido de carbono y agua en glucosa; la escisión de la

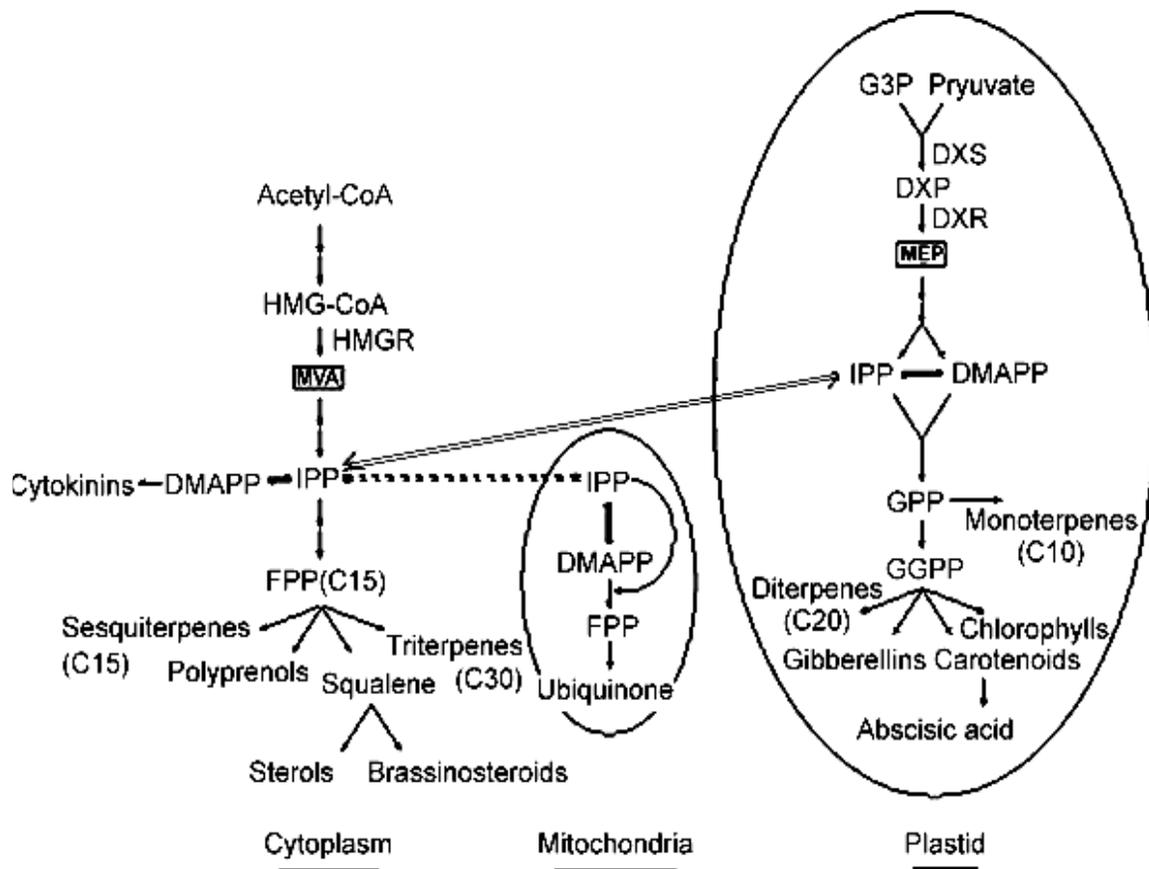
glucosa produce fosfoenolpiruvato, que es un elemento clave para el shikimato. La descarboxilación de fosfoenolpiruvato da a la unidad de dos carbonos de acetato y éste es esterificado con la Coenzima-A para dar Acetil CoA, la condensación de esta conduce a los policétidos y lípidos. La Acetil CoA también es un punto de partida para la síntesis de ácido mevalónico, que es el material de partida clave para los terpenoides (Figura 1) (Sell, 2010).



**Figura 1.** Rutas generales de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Sell, 2010).

El citoplasma, la mitocondria y los plastidios son los organelos de secreción de terpenos en las plantas superiores (Figura 2). En el citoplasma y la mitocondria la biosíntesis se sintetiza por la ruta del mevalonato, en la cual tres moléculas de Acetil CoA se convierten en 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) que se reduce a mevalonato, posteriormente el mevalonato a través de dos

fosforilaciones y una descarboxilación da lugar al isoprenildifosfato (IPP) y el dimetilalildifosfato (DMAPP), en donde se forman las unidades de isopreno (C5), los cuales por reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas llegan a convertirse en farnesilpirofosfato (FPP) para formar sesquiterpenos (C15). De esta forma continuando la ruta de biosíntesis la condensación IPP y GPP forma escualeno, que es el precursor de triterpenos, lípidos y esteroides (Cheng *et al.*, 2007; Avalos *et al.*, 2009; Brahmksatriya *et al.*, 2013).



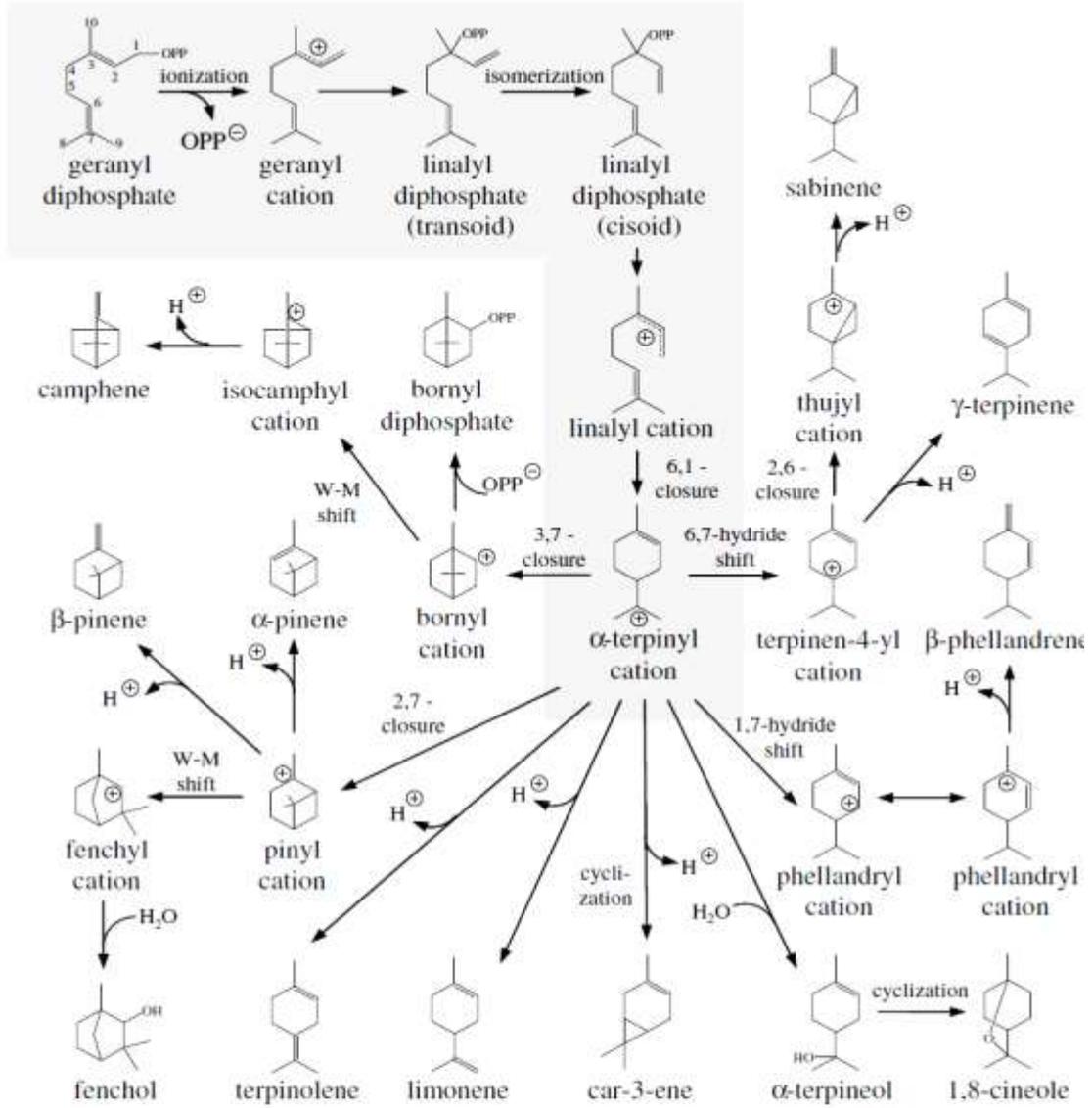
**Figura 2.** Rutas de biosíntesis de terpenos en la célula de la planta (Cheng *et al.*, 2007).

En los plástidios la biosíntesis ocurre por la ruta del metileritritol fosfato (MEP), aquí el IPP y el DMAPP se forma a partir de hidroxietilamina (producto de la desacrboxilación del piruvato) y gliceraldehído-3-fosfato. Posteriormente se forma la 1-desoxi-D-xilulosa-5 fosfato (DXP), la cual da origen a las unidades de isopropeno (C5) que son los precursores del geranilpicrofosfato (GPP). El GPP es ionizado para dar un carbocación que está implicado en diversas reacciones, el catión de geranilo se convierte primero en un catión de linalilo y posteriormente da origen a los monoterpenos (C10) (Cheng *et al.*, 2007; Avalos *et al.*, 2009; Brahmksatriya *et al.*, 2013; Chizzola, 2013).

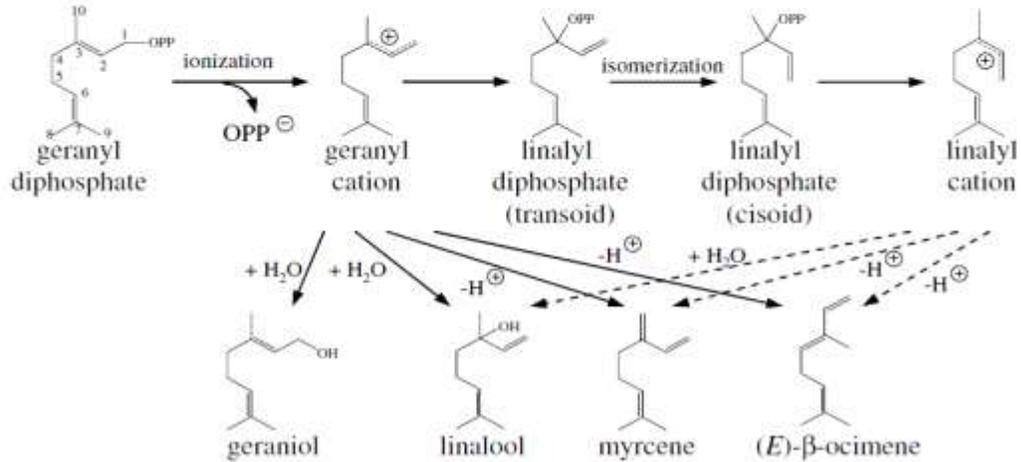
Para la formación de monoterpenos los mecanismos de reacción de todas las monoterpenos-sintasas comienzan con la ionización del GPP. El carbocación resultante puede someterse a una gama de ciclaciones, los cambios de hidruro y reordenamientos antes de la reacción se termina por desprotonación o captura de agua. Los mecanismos de monoterpeno-sintasas cíclico (A) y acíclico (B) se representan por separado (Figura 3). La formación de monoterpenos cíclicos requiere la isomerización preliminar del catión de geranilo a un linalilo intermedio capaz de ciclación. La formación monoterpenos acíclicos (linalool, mirceno y o-cimeno) pueden proceder ya sea a través del catión de geranilo o mediante el catión de linalilo. Para la formación de **timol** y **carvacrol** la ruta general de biosíntesis es a partir de terpineol, el

cual da origen a  $\gamma$ -terpineno y/o *J*-terpineno, que posteriormente forma p-cimeno, precursor de timol y carvacrol (Degenhardt *et al.*, 2009).

A



B



**Figura 3.** Rutas de biosíntesis de monoterpenos (Degenhardt *et al.*, 2009).

### **2.2.2. Composición de aceites esenciales**

La composición y producción del AE depende de factores fenológicos, genéticos y ambientales, así como la hora de cosecha, los métodos de extracción y almacenamiento.

Un factor muy importante que influye en la acumulación de aceite es la etapa fenológica de la planta, así como el órgano, el tejido y el tipo de célula destinada para su almacenamiento. Se ha demostrado que en muchas PAM existe una coordinación entre el periodo de crecimiento y la acumulación de AE. Por ejemplo, en albahaca el contenido de aceite incrementa durante la floración, pero la composición de aceite exhibe fluctuaciones menores: en la primera etapa de floración se observa que el linalol y los sesquiterpenos constituyen 40-60% y 5-20% respectivamente, y en la etapa final la concentración de linalol disminuye a 25-30% mientras que los sesquiterpenos aumentan a 60-70%. Así, en general, la ontogenia influye fuertemente en la expresión del metabolismo del aceite esencial (Sangwan, 2001).

La variación genética de las especies regula la composición y acumulación de los aceites esenciales (cada especie presenta diferentes patrones), por ejemplo en *Cymbopogon jwarancusa* el porcentaje más bajo de aceite (0.5%) se presenta en la etapa vegetativa y el mayor (1.64%) durante la floración; por otra parte en *C. martinii* el geraniol aumenta de 65% a 81% hasta la etapa de floración y en

*C. flexuosus* el citral (principal componente) alcanza su valor mayor en el día 20 de crecimiento (Sangwan, 2001).

Otros factores que tienen un efecto significativo en la producción de biomasa e influyen en la biosíntesis de AE son la temperatura, la humedad del aire, la velocidad del viento, la intensidad de la luz y la disponibilidad de agua. En *Thymus vulgaris* el déficit hídrico maximiza la concentración de timol y carvacrol, mientras que en *Thymus zygis* incrementa la concentración de aceite esencial y la riqueza en timol; contrariamente a esto en *Tanacetum parthenium* la producción de AE incrementa cuando se somete a un riego frecuente. También se ha observado que las condiciones climáticas limitan el rendimiento de AE. Al respecto Riahia *et al.* (2015) reportan que en *Artemisia absinthium* el rendimiento de AE aumenta cuando se cultiva en un clima árido en comparación con un clima húmedo, mientras que las capacidades antioxidantes de los aceites estudiados aumentan de clima húmedo a zonas áridas (Usano 2012; Alpaslan *et al.*, 2013, Riahia *et al.*, 2015).

La fertilización juega un papel muy importante, ya que puede tener un efecto positivo o negativo en la producción de biomasa y AE. Cuando los recursos están disponibles, la planta distribuye el carbono principalmente para crecer, pero cuando un recurso específico como por ejemplo, el nitrógeno, limita el crecimiento, la planta tiende a acumular otros recursos, como el carbono, y los puede derivar para incrementar la síntesis de metabolitos secundarios. Por otro lado, también se ha observado que el manejo de cultivo de las PAM, y su estado

nutrimental, influyen en el rendimiento del AE. Naghdi *et al.* (2004) reportaron que el espacio de plantación (relacionado con el volumen de suelo disponible para cada planta para desarrollar su sistema radical en busca de nutrientes y agua) y el tiempo de cosecha afectan la calidad y cantidad de producción de AE de tomillo. Observaron que el rendimiento más alto de biomasa (6-4 t ha<sup>-1</sup>), de AE (1.2 % de la biomasa seca) y de concentración de timol (50%) se obtiene dejando un espaciado de 15 cm entre cada planta y realizando la cosecha a principios de floración.

El método de secado del material vegetal, así como el de extracción y almacenamiento tienen un fuerte impacto en la composición y en rendimiento del AE. En el proceso de secado se recomienda no exponer el material vegetal a temperaturas superiores a 35°C ya que se pueden evaporar algunos componentes del AE (Guerreo, 2012). Al respecto Sárosi *et al.* (2013) reportan un bajo rendimiento de AE de tomillo cuando el material vegetal es secado a temperaturas mayores de 40 °C o cuando se seca por liofilización. Otros experimentos han demostrado que la extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> y destilación por arrastre de vapor, los AE contienen más monoterpenos y sesquiterpenos que los obtenidos bajo destilación simple (Juarez-Rossete, 2010; Guerrero, 2012). Para la preservación del AE se deben almacenar en frascos de vidrio oscuros de tapa roscada a temperaturas menores de 30°C.

### **2.2.3. Métodos de extracción y análisis de aceites esenciales**

Industrialmente se utilizan varios métodos para obtener aceites esenciales. Los más comunes son la hidrodestilación y el arrastre con vapor de agua, el segundo es uno de los más importantes, en este proceso el material vegetal (intacto o picado) se coloca en un recipiente con agua y se hierve, los vapores heterogéneos se condensan en la superficie fría y por diferencias de densidad y miscibilidad el AE se separa del agua. La Termo-micro destilación (TAS) es otro método utilizado, el cual permite la extracción directa de los compuestos vegetales sin descomposición. Todos los componentes de los aceites esenciales y algunos otros compuestos volátiles, por ejemplo, cumarinas; se obtienen por este método (Wagner, 2001; Chlodwig *et al.*, 2010).

En la extracción con diclorometano el material vegetal se extrae por agitación durante 15 min con diclorometano, la suspensión se filtra y se deja evaporar. Este método es útil para extraer otro tipo de compuestos, frecuentemente incluye sustancias lipofílicas. La centrifugación es otro método que permite la separación del AE, por ejemplo, la esencia de naranja se obtiene tallando la corteza y se somete a centrifugación para separar el aceite esencial de la fase acuosa. Otras técnicas que permiten la extracción de AE son: presión en frío, extracción con CO<sub>2</sub> (subcrítico), extracción con microondas y con grasas (Wagner, 2001; Asbahani *et al.*, 2015).

Los métodos aplicados en el análisis de los aceites esenciales permiten conocer los componentes que lo constituyen y el porcentaje de cada uno de ellos. El principal método es el cromatográfico acoplado a un espectrómetro de masas (CG-SM). En esta técnica se identifican y cuantifican los componentes. Otra técnica que nos permite la caracterización preliminar de los aceites esenciales es la cromatografía en capa fina (CCF), la cual es muy rápida y económica (Zellner *et al.*, 2010).

#### **2.2.4. Importancia de los aceites esenciales**

Los AE desempeñan un papel ecológico, son efectivos atrayentes de polinizadores e intervienen como moléculas de defensa frente a la pérdida de agua, patógenos (antibacterianos, antivirales y antifúngicos) y como disuadores alimentarios (Cheng *et al.*, 2007).

El AE son efectivos antibacterianos, antivirales y antifúngicos debido al gran número de componentes que los constituyen. Una característica importante de los AE es su hidrofobicidad, ya que les permite introducirse a través de los lípidos de la membrana celular de las bacterias y causar daño a las proteínas, así mismo puede coagular el citoplasma y permeabilizar la membrana provocando la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, lo cual induce la fuga de macromoléculas y consecuentemente su lisis (Bakkali *et al.*, 2008).

En los virus el AE puede disolver o penetrar en las cápsulas virales y desnaturalizar sus proteínas o los ácidos nucleicos (ADN o ARN). También pueden prevenir la muerte de las células infectadas de la planta e inducir la transcripción de genes que codifican las enzimas de la síntesis de fitoalexina interior en las plantas infectadas (Mona *et al.*, 2013).

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana de los AE en levaduras se debe a que sus componentes fenólicos cruzan la membrana citoplasmática e interactúan con proteínas y enzimas de la membrana, dañando principalmente sistemas enzimáticos involucrados con la producción de energía y síntesis de componentes estructurales (García *et al.*, 2008).

### **2.3. Nutrición de plantas aromáticas medicinales**

La actividad biológica de los AE de las PAM depende de su composición química, la cual está determinada por el genotipo e influenciado por condiciones ambientales y agronómicas. En la producción de PAM la densidad del cultivo y la fertilización (orgánica y/o mineral) son factores que influyen en el rendimiento de biomasa y en la composición de AE (Juarez-Rossete, 2010; Karamanos *et al.*, 2013; Teles *et al.*, 2014).

El abastecimiento óptimo de fertilizantes y agua favorece la actividad metabólica de la planta. El metabolismo de la planta varía con la etapa de crecimiento y consecuentemente la demanda nutrimental (Karamanos *et al.*,

2013). Se ha reportado que la aplicación de nitrógeno, fósforo y potasio en los cultivos de PAM promueven el crecimiento y la formación de AE. Franz (1972) investigó la influencia de nitrógeno y potasio en la formación de aceite esencial de menta. Pudo demostrar que la oferta más alta de nitrógeno aumenta la biomasa pero retarda el desarrollo de la planta, mientras que la oferta más alta de potasio obligó a la madurez. Con el aumento de nitrógeno, se observó un mayor rendimiento del AE, el cual estaba compuesto en su mayoría por mentona y muy poco mentol; el suministro de potasio dio como resultado un bajo rendimiento de AE con más mentol y acetato de metilo (Sangwan *et al.*, 2001). También *Origanum vulgare* respondió a la disponibilidad de nitrógeno con mayor rendimiento de AE; en cuanto a la composición del AE la aplicación de nitrógeno favoreció la concentración de linalol en las inflorescencias y el carvacrol en las hojas (Karamanos *et al.*, 2013).

Experimentos con manzanilla también han demostrado que la nutrición con nitrógeno y fósforo da lugar a un ligero aumento del contenido de aceite esencial; sin embargo, las dosis altas de potasio tiene un efecto negativo en la floración, ya que la etapa de floración se reduce, lo que, obviamente, repercute en el período disponible para la producción de aceite esencial (Schmidt; 2010).

Las características físicas y químicas del suelo también influyen en la producción de biomasa y el AE. La salinidad es un problema creciente en la agricultura; algunas PAM son relativamente tolerantes a la sal. *Thymus vulgaris* L. mostró una buena tolerancia a la salinidad del agua de riego hasta

2,000 ppm, pero concentraciones superiores causó daños graves (Massoud *et al.*, 2002). A mayor salinidad se reduce el contenido de aceite esencial con un incremento en el porcentaje de p-cimeno.

La fertilización del tomillo generalmente se realiza después de cada cosecha para promover el crecimiento, la fertilización debe contener nitrógeno, fósforo, potasio y azufre, también pueden aplicarse dosis adicionales de nitrógeno de acuerdo análisis de suelo. Sin embargo, se tiene que evitar el exceso de nitrógeno debido a que la calidad del aceite puede verse afectada (Muñoz, 2002). En una fertilización orgánica Hendawy *et al.* (2010) recomiendan la fertilización de tomillo con diferentes abonos orgánicos en forma de composta para obtener mejor crecimiento, producción de biomasa y rendimiento de AE en las plantas de *Thymus vulgaris* L.

#### **2.4. Los microorganismos y su influencia en la nutrición de plantas**

Los consumidores demandan materias primas procedentes de plantas cultivadas utilizando buenas prácticas agrícolas, lo que ha incrementado el interés por cultivos orgánicos y el uso de productos naturales. En la agricultura se han usado por muchos años biofertilizantes a base de microorganismos, como las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, fijadoras de N<sub>2</sub> y hongos micorrízicos (Almaraz y Ferrera-Cerrato, 2010).

La biomasa microbiana del suelo es fundamental para mantener las funciones del mismo, ya que representa la principal fuente de enzimas que regulan la intemperización de los minerales del suelo; además la presencia de microorganismos benéficos alrededor de la raíz establece y acelera procesos bioquímicos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que está asociado con un incremento de elementos químicos disponibles y la producción de sustancias de crecimiento (Böhme *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2007).

La simbiosis con otros organismos es otro factor que influye en la fisiología de la planta, muchas de las interacciones planta-microorganismo presentan un beneficio bilateral; varios trabajos han reportado respuestas positivas a la inoculación con microorganismos benéficos, lo cual se atribuye a que estos microorganismos pueden promover el crecimiento de plantas, regulando el equilibrio nutricional y hormonal, e inducir resistencia contra patógenos. Además de sus interacciones con las plantas, también muestran interacciones sinérgicas y antagónicas con otros microorganismos del suelo. Estas interacciones pueden ser vitales para la agricultura sostenible, ya que para mantener el crecimiento de la planta y el desarrollo dependerá principalmente de los procesos biológicos en lugar de los agroquímicos.

Las prácticas agrícolas intensivas dirigidas a alto rendimiento de los cultivos demandan el uso intensivo de fertilizantes químicos, que son caros y tienen impactos ambientales negativos. El uso de microorganismos del suelo es una

alternativa económica y sustentable para incrementar el rendimiento de los cultivos. Los hongos micorrízicos arbusculares y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal juegan un papel importante en la mejora crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, y en los últimos años han sido utilizados como inoculantes para mejorar crecimiento de las plantas en condiciones controladas, así como las condiciones naturales de campo (Cappellari *et al.*, 2013; Mahmood *et al.*, 2014; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2015).

#### **2.4.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

De las diferentes poblaciones microbianas presentes en la rizosfera, las bacterias son los microorganismos más abundantes, algunos géneros representativos de estas son, *Paenobacillus*, *Pseudomonas*, *Azobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Azospirillum*; estas bacterias se caracterizan por que causan un pronunciado efecto sobre el crecimiento de la planta, y se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Las RPCV mejoran el desarrollo y crecimiento de la planta, por un gran número de mecanismos directos e indirectos, como son: la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización del fósforo, la producción de reguladores del crecimiento vegetal, ácidos orgánicos y metabolitos que reducen al población de patógenos, así como la protección por enzimas como la

ACC-deaminasa, quitinasa y glucanasa (Tarkka *et al.*, 2008; Mahmood *et al.*, 2014).

La efectividad de las RPCV depende de la interacción planta-huésped y las características del suelo, en algunos casos ciertas especies bacterianas tienen un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de la planta; este efecto podría ser debido a la producción de ciertos metabolitos (auxinas, giberelinas, etileno) y/o a la capacidad de colonización de la raíz (Mahmood *et al.*, 2014; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2015).

Las cepas de RPCV son eficaces no sólo para mejorar el crecimiento de las plantas, sino también para promover su metabolismo secundario. Se ha reportado que la inoculación de ciertas cepas de RPCV causa la inducción sistémica de terpenos y compuestos aromáticos (Santoro *et al.*, 2011; Cappellari *et al.*, 2013). Colombo *et al.* (2013) investigó como se ve afectada la composición y el rendimiento del AE de *Calamintha nepeta* cuando es inoculada con cepas *Rhizophagus intraradices*; reportó que en comparación con las plantas control la cepa M3 aumentó el rendimiento y la GA5 lo disminuyó; en la composición del AE la mentona y la isomentona alcanzaron sus valores más altos en las plantas de control, mientras que la GA5 y M3 elevaron la concentración de neomentol y pulegona respectivamente. Banchio *et al.* (2008) demostraron para *Origanum majorana* L. que la inoculación con RPCV tienen un efecto significativo en la producción de biomasa y en el rendimiento del AE, pero no altera la composición de este.

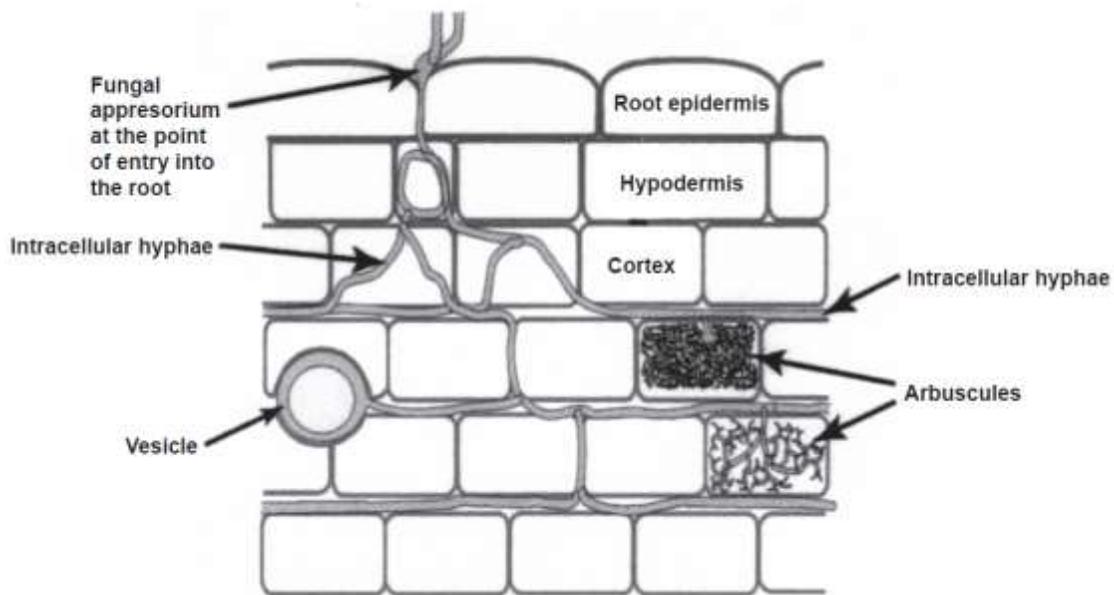
*Paenibacillus polymixa* es una RPCV que se asocia con muchas especies de plantas, esta especie ha sido muy utilizada en cultivos debido a que puede sintetizar auxinas y citoquininas, solubiliza el fósforo del suelo, mejora la porosidad del suelo y ha demostrado ser eficaz en el control de hongos y bacterias fitopatógenas.

#### **2.4.2. Hongos micorrizicos arbusculares**

La asociación que ocurre entre la raíz de una planta y un hongo micorrizico arbuscular (HMA) se conoce como micorriza arbuscular; y en ella existe un flujo bidireccional de nutrientes. EL HMA coloniza la raíz, estimulan el crecimiento de la planta, le provee nutrimentos poco disponibles, le proporciona protección contra enfermedades y resistencia al estrés ambiental, a cambio el hongo recibe compuestos de carbono. Los HMA pueden colonizar diferentes plantas; sin embargo, los efectos de micorrización pueden ser diferentes en el desarrollo de las plantas, ya que algunos hongos benefician en mayor grado a un determinado hospedante en comparación con otros (Parniske, 2008; De La Rosa, 2010; Barea, 2011; Rozpadek *et al.*, 2014).

La micorriza arbuscular (MA) se caracteriza porque las hifas además de formar micelio extracelular penetran la raíz inter e intracelularmente formando estructuras llamadas arbusculos (Figura 4), en los cuales se lleva a cabo el

intercambio de nutrientes. Los hongos micorrízicos arbusculares interactúan simbióticamente con el 80 % de las familias de plantas terrestres, algunas familias botánicas que no establecen asociación con HMA son: Pinaceae, Betulaceae, Fagaceae, Orchidaceae, Ericaceae, Chenopodiaceae, Fumaraceae, Cyperaceae, Commelinaceae, Urticaceae, Polygonaceae, Amaranthaceae, Capparidaceae, Caryophyllaceae, Cruciferaceae, Gentianaceae, Myrteaceae y Portulacaceae (Alarcon, 2007; Parniske, 2008).



**Figura 4.** Estructuras del hongo micorrízico arbuscular en la raíz (Habte *et al.* 2001).

La mayoría de los trabajos que estudian los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se han enfocado en el incremento de la biomasa y en el intercambio de nutrientes; sin embargo, pocos trabajos han estudiado el beneficio de HMA en el cultivo de las PAM, se ha reportado que la simbiosis de HMA favorece la producción y acumulación de importantes ingredientes activos de las plantas

como terpenos, fenoles, y alcaloides, optimizando la composición de los diferentes ingredientes y mejorando la calidad de los materiales a base de hierbas.

Los primeros trabajos que se estudian el efecto de los HMA en la producción de metabolitos secundarios se realizaron con *Datura stramonium* L. y *Schizonepeta tenuifolia* Briq. Existen 50 especies de 19 familias en las que se ha realizado este tipo de estudios, entre ellas se incluyen *Salvia miltiorrhiza*, *Atractylodes macrocephala*, *Glycyrrhiza inflata* y *Artemisia annua* (Zeng et al., 2013).

Khaosaad et al. (2006) mostraron el efecto de *Glomus mosseae* en la calidad de aceite esencial de orégano, los resultados mostraron un aumento en la concentración de aceite, pero no cambios significativos en su composición. Rapparini et al. (2008) analizaron el efecto de la micorrización en la emisión y contenido de terpenos en *Artemisia annua* L. Los resultados demuestran que en las plantas micorrizadas con *Glomus* spp. se incrementa la acumulación de sesquiterpenos y presentan un aumento en la producción de artemisia y limoneno en comparación con las no micorrizadas.

*Plantago lanceolata* L. es una planta medicinal que se utiliza para tratar enfermedades respiratorias, Fontana et al. (2009) evaluaron el efecto de los *Glomus intrarradices* en la producción de defensas directas (glicósidos iridoides) y defensas indirectas (compuestos orgánicos volátiles) de *Plantago lanceolata* L. establecida en condiciones de invernadero, cuando son afectadas por insectos herbívoros; ellos reportan que los HMA no tuvo alguna influencia en los niveles

de glicósidos iridoides, y que las plantas micorrizadas emiten cantidades menores de sesquiterpenos, pero no monoterpenos, además hubo un aumento en la emisión de (Z)-3-acetato hexenilo, en comparación con las plantas no micorrizadas.

Karagiannidisa *et al.* (2011) reportaron el efecto de *G. lamellosum* y *G. etunicatum* en la mejora del crecimiento, concentración de nutrientes, y la producción de aceites esenciales de orégano y plantas de menta en condiciones de invernadero. Los resultados demostraron que las plantas colonizadas con HMA tienen mayor peso seco en comparación con las no colonizadas, y el efecto de la *G. etunicatum* en la producción de aceite esencial fue estadísticamente similar, mientras que *G. lamellosum* induce a una concentración mayor.

*Thymus vulgaris* L. también respondió a la inoculación de HMA, Sasanelli *et al.* (2009) reportan que la presencia de los hongos HMA aumentó el crecimiento y la acumulación de aceite esencial en comparación con las plantas no micorrizadas.

## **2.5. Fitorreguladores de crecimiento industriales**

Las hormonas vegetales son sustancias orgánicas sintetizadas en un determinado lugar de la planta y son traslocadas a otra estructura, donde en concentraciones muy bajas promueve una respuesta fisiológica. En la agricultura los reguladores de crecimiento vegetal o fitorreguladores de

crecimiento son sustancias sintéticas y/o naturales que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta; tienen una inmensa importancia comercial en la agricultura, sobre todo en cultivos orgánicos y en los últimos años ha incrementado su demanda. Los fitorreguladores de crecimiento se dividen en cinco grupos, se clasifican de acuerdo a la función de sus estructuras químicas y efectos sobre las plantas; los grupos son auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, y un grupo llamado inhibidores (ácido abscísico, compuestos fenólicos, y alcaloides) (Sudriá *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2006; Bose *et al.*, 2013).

Las giberelinas y citoquininas han sido importantes en los cultivos de PAM, debido a que su aplicación favorece la productividad de biomasa y de AE. Las giberelinas promueven la germinación, el crecimiento y desarrollo de los órganos florales. La citoquininas estimulan la división celular, formación de yemas y expansión de las hojas (Mok *et al.*, 2000; Bose *et al.*, 2013).

En *Mentha arvensis* L. la aplicación de giberelinas (GA<sub>3</sub>) tiene un efecto positivo en la producción de biomasa, el diámetro y el número de tricomas glandulares en las hojas y el rendimiento del AE, así mismo aumentan la concentración de mentol y mentona en el AE. Se observa un efecto similar en *Lavandula dentata* L., la aplicación 6-benzyladenina (BA) y indol-3-ácido butírico (IBA) aumenta la producción de biomasa y promueve la densidad de tricomas glandulares (Sudriá *et al.*, 1999; Bose *et al.*, 2013).

Keltawi *et al.* (1987) demostraron que la aplicación foliar de citoquininas (kinetina, difenilurea, bencilaminopurina y zeatina) promueven el crecimiento general en *Mentha tuberia*, *M. spicata* y *Salvia officinalis*, pero no *M. suaueolens* y *Lavandula vera*; respecto al rendimiento de AE, en todas las plantas aumenta.

## **2.6. Tomillo (*Thymus vulgaris* L.)**

*Thymus vulgaris* L. es una PAM nativa del centro y el sur de Europa, África y Asia. Su nombre genérico procede del griego “thyo”: perfume, o de “thymos”: fuerza, y alude a que los tomillos son plantas aromáticas y estimulantes. Posee cualidades aromáticas medicinales y alimenticias, comúnmente es conocido como tomillo (Muñoz, 2002; Mendiola, 2009; Nikolic *et al.*, 2014).

Crece desde los 1,600 hasta 2,600 msnm, en climas templados y de montaña, asociado a bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino. Se reproduce por semillas o por esquejes. Generalmente ninguna enfermedad afecta el cultivo de tomillo; sin embargo, en ambientes húmedos y un mal drenaje, *Rhizoctonia* sp. puede causar la pudrición de la raíz y *Alternaria* sp. el marchitamiento de las hojas. La cosecha se realiza en época de floración, cortando las plantas a unos pocos centímetros del suelo, para permitir el rebrote y la posibilidad de realizar un segundo corte a principios de otoño. A veces es probable realizar dos cosechas en el año, una a mediados entre fin de

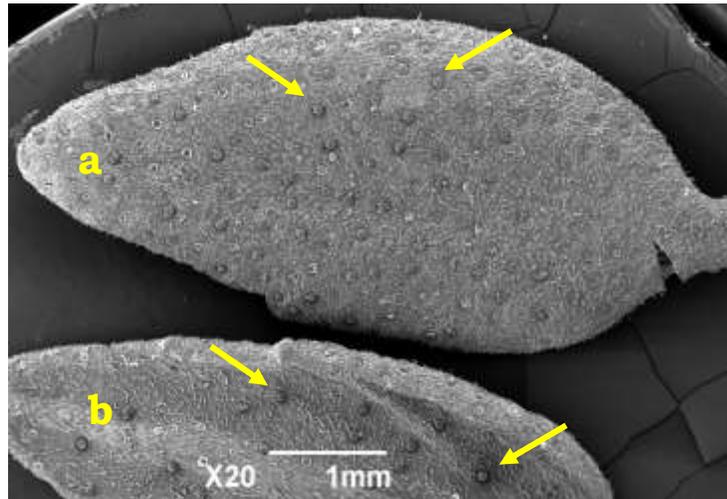
primavera, y otra a fines de verano principios de otoño, pero no es siempre posible (Doeleman J, 1989; Bareño, 2006). La cosecha debe realizarse en días secos y cuando se haya levantado el rocío, preferentemente en las primeras horas del día, ya que el rendimiento de aceite esencial cambia conforme a las horas del día, Durmus *et al.* (2013) reportan un mayor rendimiento de aceite esencial cosechando en las primeras horas del día, de 6:00 a 11:00 horas.

### **2.6.1. Descripción taxonómica**

Es una planta de la familia Lamiaceae, arbusto de 10 a 30 cm de altura, con ramas erguidas, de color verde-blanquecino o grisáceo, muy aromático. Los tallos son leñosos, rojizos, tortuosos y forman pequeñas matas muy apretadas. Las hojas son pecioladas de 1 a 4 cm linear-lanceoladas o elípticas, tomentosas por el envés, de 3.5-6.5 x 0.8-3 mm, son opuestas, decusadas y perennes (Muñoz, 2002; Mendiola, 2009). En la superficie abaxial y adaxial de las hojas presenta ceras epicuticulares y pequeñas glándulas esferoidales (Figura 5) que contienen los aceites esenciales que le confieren a la planta su sabor y aroma.

Las flores se agrupan en inflorescencias globosas, son color malva, pequeñas, completas e irregulares. El cáliz, de 3.6-5 mm, es ligeramente piloso, con el tubo acampanado. La corola es blanquecina o rosa pálido. La floración se produce a partir de marzo hasta finales del verano, aunque en determinadas

zonas puede presentarse con flor casi todo el año. Los frutos son tetra-queños lisos que contienen una semilla cada uno (Mendiola, 2009).



**Figura 5.** Micrografía de hojas de *Thymus vulgaris* L. obtenidas con MEB 20X. Se observan las glándulas que contiene el aceite esencial en la superficie a) adaxial y b) abaxial.

### 2.6.2. Producción Nacional

El tomillo se comercializa principalmente por sus hojas (destinadas a condimento y herboristería) y por la extracción de su aceite esencial.

En 2010, la producción de tomillo sólo se reportó en el Estado de Baja California Sur, con 54.50 t en una superficie sembrada y cosechada de 21.25 ha, con un rendimiento de 2.56 t ha<sup>-1</sup>. Se comercializó fresco, deshidratado (Cuadro 3) y por su AE, la comercialización de aceite de tomillo se cotizó en 11 mL por 399 pesos (Cuadro 4) (Sánchez-Verdugo *et al*, 2012). En el 2011 se

registró una superficie sembrada de 20 ha, con un rendimiento 3.36 t ha<sup>-1</sup>, cada tonelada con un costo de 10,711 pesos (Juaréz-Rosete *et al.*, 2013). El cultivo de tomillo se encuentra en expansión, además de Baja California Sur también se cultiva en Puebla (Rancho Valverde) y en el Estado de México (Ayapango y Montecillo).

**Cuadro 3.** Precios y presentaciones del tomillo fresco y deshidratado en la localidad de la Paz, Baja California Sur.

	<b>Marca</b>	<b>Presentación</b>	<b>Precio La Paz (MXN)</b>
Tomillo fresco	“Organic Leaf”	Caja de plástico de 30g	11.50
	“Tierra Nueva”	Bolsa de plástico de 45g	10.50
	No registrada	Manojo fresco de 30g	6.50
	“La Surtidora”	Bolsa de plástico de 40g	10.00
Tomillo deshidratado	“Patty”	Bolsa de plástico de 30g	10.80
	“Carabobo”	Bolsa de plástico de 14g	16.40
	“El arte del sazón”	Bolsa Hermética de 14g	16.95
	“Soriana”	Frasco de plástico 44g	11.50
Tomillo molido	Food service	Frasco de plástico 185g	52.10
	espices “Paola’s”		
	“Los Faisanes”	Bolsa de plástico de 20g	9.90

**Fuente:** Adaptado de Sánchez-Verdugo *et al.* (2012).

**Cuadro 4.** Comercialización del aceite esencial de tomillo.

<b>Presentación</b>	<b>Peso neto (ml)</b>	<b>Precio</b>	<b>Divisa</b>	<b>Empresa</b>
Frasco de cristal color ámbar	11	\$399.00	MXN	CONIE BOGART
Frasco de cristal color ámbar	5	\$12.61	EURO	FLORAME
Frasco de cristal color ámbar	10	\$9.78	US	AROMA- ZONE
Frasco de cristal color ámbar	5	\$ 12.50	EURO	FLORAME

**Fuente:** Adaptado de Sánchez-Verdugo *et al.* (2012).

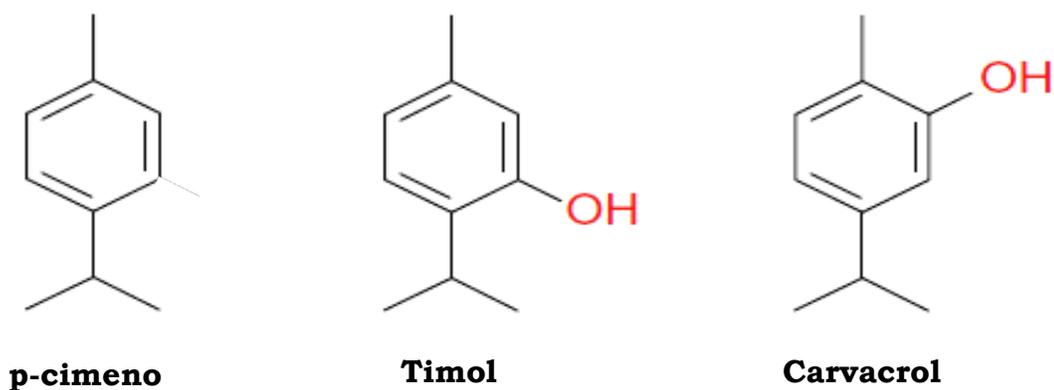
### **2.6.3. Usos del aceite esencial de tomillo**

El AE de tomillo está compuesto principalmente por monoterpenos oxigenados (timol, carvacrol y linalol) y monoterpenos hidrocarbonados ( $\gamma$ -terpineno, p-cimeno,  $\alpha$ -Pinoeno y  $\alpha$ -Tujueno) también puede contener ésteres acéticos, cetonas y aldehídos (Rota *et al.*, 2008; Ghasemi *et al.*, 2013).

El tomillo ha sido muy utilizado y recomendado desde la antigüedad. Comúnmente se usa como té de hierbas, condimento y para diversos fines medicinales, esta propiedad se atribuye a el AE de sus hojas; se usa como tónico, carminativo, digestivo, antiespasmódico, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, antiinflamatorio, sedante y expectorante. El AE de tomillo presenta actividad antitumoral, antibacteriana (frente a gram positivas y gram negativas), posee propiedades antifúngicas y antioxidantes. (Muñoz, 202; El-

Nekeety *et al.*, 2011). Las principales industrias que demandan el AE de tomillo son la farmacéutica, cosmética, veterinaria, agroalimentaria, avícola y ganadera.

Las cualidades del AE de tomillo se deben principalmente a sus componentes: timol y carvacrol (Figura 6). El timol conforma un 50% del AE de tomillo, ha sido reportado por varios autores como un potente agente antimicrobiano; este compuesto es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, debido a que se une a las membrana bacteriana de manera hidrofóbica y por puentes de hidrógeno, lo que causa perturbaciones en la membrana, incrementando la permeabilidad, que conducen a la pérdida de iones de potasio y ATP intracelular y finalmente la muerte celular. También se ha reportado que el timol inhibe la germinación de esporas, el crecimiento y la multiplicación celular en bacterias (Alonso, 2004; García *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Estructura química de p-cimeno, timol y carvacrol (Chizzola, 2013).

El carvacrol es un isómero del timol, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, su mecanismo de acción es semejante al del timol. Este componente interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa la desestabilización de la misma, aumentando su fluidez y la permeabilidad. La posición *orto* de su radical hidroxilo le permite actuar como intercambiador de protones, primero se difunde a través de la membrana hacia el citoplasma donde libera su protón, posteriormente vuelve al exterior de la célula transportando y liberando un catión (por ejemplo ion-potasio), y el carvacrol capta un nuevo catión repitiendo el ciclo, causando agotamiento de ATP, deterioro de procesos vitales y finalmente la muerte en la célula bacteriana. También se ha reportado que el carvacrol afecta la síntesis de componentes estructurales, como por ejemplo inhibe la producción de flagelos en *E. coli* (García *et al.*, 2008).

Algunos trabajos reportan que la fuerte acción antimicrobiana del timol y carvacrol se atribuye a la presencia del radical hidroxilo, debido a que p-cimeno (Figura 5), precursor biológico de estos componentes carece de este hidroxilo y presenta menor actividad (Rosas *et al.*, 2011).

El AE de tomillo comprende una amplia gama de aplicaciones, la industria farmacéutica lo usa para la elaboración de medicamentos por sus propiedades funcionales. En la perfumería se emplea para comunicar a los perfumes un aroma intenso, parecido al campo o similares a cuero. La industria cosmética lo utiliza para elaborar repelentes y para perfumar jabones por su aroma

resistente; también es empleado en la cosmética natural, en tratamientos de acné, en la preparación de cremas y lociones capilares (Ortuño, 2006; CBI, 2014). El AE es ingrediente básico en la formulación de varios productos veterinarios, como por ejemplo en jabones, pomadas y gotas; además también se utiliza en detergentes y ambientadores.

En la industria avícola el AE de tomillo se emplea como aditivo en la comida de pollos en engorda, debido a que los animales que se les suministra presentan un aumento de peso (sin que se vea afectada la calidad de carne) y estabilizan su estado de salud; en la ganadería también se usan como aditivo o como antiséptico natural (Amad *et al.*, 2011).

En la industria agroalimentaria el AE de tomillo es utilizado como conservador de carnes; y sus componentes como el cinamaldehído se añade a chicles y helados, y el carvacrol se usa en bebidas no alcohólicas. Es importante mencionar que las hojas secas de tomillo, su aceite esencial y el timol están catalogados por la FDA (Food and Drug Administration, EE. UU.) como alimentos aptos para el consumo humano, y también como aditivos alimentarios; así mismo el timol está evaluado entre las sustancias cuyo uso como condimento está permitido, siendo la cantidad máxima permitida en alimentos  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , y en bebidas  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kumar *et al.*, 2008; CBI, 2014).

## 2.7. *Escherichia coli*

En 1885 Theodor Escherich identificó y caracterizó una bacteria, aislado de las heces de los recién nacidos, y la llamo *Bacterium coli commune*, la cual en 1911 se renombro en honor a su descubridor como *Escherichia coli*. *E. coli* se se ha usado ampliamente como un organismo modelo para estudiar fisiología bacteriana, metabolismo, regulación y recombinación genética, transducción de señales, estructura y función de la pared celular. Es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa y crece de manera óptima bajo condiciones aeróbicas a 37 °C. *E. coli* es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales, la mayoría de las cepas son inofensivas, las cepas patógenas causan una variedad de enfermedades, incluyendo gastroenteritis, disentería, síndrome urémico hemolítico, infección del tracto urinario, septicemia, neumonía, y meningitis (Meng *et al.*, 2007; Leggett *et al.*, 2012)

En base sus factores de virulencia y enfermedades que causan, las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en seis subgrupos distintos: *E. coli* adhesión-difusa (DAEC), *E. coli* enteropatogena (EPEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Meng *et al.*, 2007)

La infección por *E. coli* se transmite a los seres humanos principalmente a través del consumo de alimentos contaminados, como carne cruda o poco cocida, leche cruda, la contaminación fecal del agua y vegetales. Su

importancia como problema de salud pública fue reconocida en 1982, a raíz de un brote en los Estados Unidos de América. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (Leggett *et al.*, 2012).

La principal preocupación en los últimos años ha sido el un creciente número de brotes de EHEC, esta cepa causa diarrea con sangre y síndrome urémico hemolítico, se ha aislado de las heces de gaviotas pollo, cabras, ovejas, cerdos, perros y gatos. La mayoría de las infecciones han provenido de comer carne de vacuno cruda, leche y queso no pasteurizado Meng *et al.*, 2007, OMS, 2105).

Esta enfermedad es prevalente en los países desarrollados, ha sido implicada en muchos brotes en los EE.UU., Europa y Canadá; en 1993, hubo un brote en EE. UU. afectando a más de 500 personas y causando 4 muertes, y a finales de 2006, hubo importante brote involucrando con espinacas y lechuga, la enfermedad afectó a 199 y provocó 3 muertes. También en Alemania en el 2011 se informó de un gran brote epidémico producido por EHEC, se trataron cerca de 3255 casos, según la OMS, con 33 fallecidos. La cepa de la bacteria aparecida en Alemania es resistente a ocho tipos antibióticos como la penicilina, las sulfamida, la cefalotina o la estreptomicina (Leggett *et al.*, 2012; OMS, 2015); por lo que es importante buscar otras alternativas para su control.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La creciente demanda de aceite esencial de tomillo nos obliga a obtener rendimientos más altos; sin embargo, las prácticas agrícolas intensivas dirigidas a alto rendimiento demandan el uso intensivo de fertilizantes químicos y pesticidas, que son caros y tienen impactos ambientales negativos. Además la tendencia de una alimentación dirigida hacia lo sano ha incrementado la demanda de los alimentos orgánicos. El uso de reguladores de crecimiento, así como de microorganismos del suelo es una alternativa económica y sustentable para incrementar el rendimiento de los cultivos, además en los últimos años han sido utilizados como inoculantes para mejorar crecimiento de las plantas en condiciones controladas, así como las condiciones naturales.

Aunado a lo anterior, la necesidad de la exclusión o eliminación de microorganismos patógenos, la aparición bacterias resistentes a los antibióticos y la tendencia en la sustitución de conservantes sintéticos ha impulsado la investigación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Por lo tanto, evaluar el efecto de reguladores de crecimiento, hongos micorrízicos arbusculares y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la cantidad, composición y efecto antimicrobiano del aceite esencial de

tomillo es muy importante ya que nos permitirá tener alternativas naturales para el control de *E. coli*.

## **4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **4.1. Objetivo general**

- Evaluar la aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares en el rendimiento, calidad y actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo.

### **4.2. Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto que tiene la aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares en el rendimiento y composición del aceite esencial de tomillo.
- Determinar el crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* en presencia de distintas concentraciones de aceite esencial de tomillo.

### **4.3 Hipótesis general**

- El crecimiento del tomillo y la producción y calidad su aceite esencial es influenciado por la aplicación de un fitorregulador comercial, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares y presenta actividad antibacteriana.

### **4.4 Hipótesis específicas**

- El uso de fitorregulador comercial, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares tienen un efecto positivo en el crecimiento del tomillo y en la composición de su aceite esencial.
- El aceite esencial de tomillo inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Obtención del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares**

El experimento se llevó a cabo en el Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo. Está ubicado en: Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México a 2250 m de altitud entre las coordenadas N 19°28'4.26" y W 98°53'42.18". El clima es templado con lluvias en verano, temperatura media anual de 15.9°C y una precipitación media anual de 710.3 mm.

#### **5.1.1 Obtención del germoplasma**

Se compraron plántulas de tomillo en el vivero comercial CONAPLOR, ubicado en Cuautla, Morelos, a 1 km al este del Ingenio Azucarero Casasano con ubicación a N 18° 50' 57.28" W 98° 58' 09.75" y 1,330 msnm.

#### **5.1.2 Identificación taxonómica**

Las plántulas se identificaron taxonómicamente (Bailey, 1963) y se proporcionaron dos ejemplares al herbario del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo.

Con el fin de conocer la morfología de las hojas de tomillo se tomaron fotografías del envés y del haz en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL-JSM 6390; también se capturaron imágenes de un corte transversal de la hoja para conocer las capas que conforman la cutícula.

### **5.1.3 Propagación**

La propagación de las plantas de tomillo se llevó a cabo en un invernadero que se encuentra a 400 metros al este del edificio de Botánica, N 19° 27' 44.70 W 98° 54' 30.77", 2242 msnm. Las plantas se propagaron por esquejes separando ramas jóvenes de 10 cm de altura, se plantaron en bolsas negras de polietileno de 5 cm de diámetro y capacidad de 0.5 L. Se utilizó sustrato compuesto de peat moss: agrolita: suelo (2:2:1 v/v), previamente esterilizado durante 3 h a 18 lb plg<sup>2</sup> de presión.

El sustrato se analizó en el laboratorio de fertilidad de suelos y química ambiental del Colegio de Postgraduados, *Campus Montecillo*.

### **5.1.4 Manejo en invernadero**

Las plantas fueron regadas diariamente por las mañanas con agua del grifo. Una vez establecidos los esquejes, estos se trasplantaron en bolsas de polietileno color negro, de 20 centímetros de diámetro y capacidad de 3 kilogramos, con sustrato compuesto de peat moss: agrolita: suelo (2:2:1 v/v)

con un pH de 4.4, CE 2.2, MO 39.4, con un contenido de P, K, Ca y Mg en 27, 0.6, 4.5 y 1.7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Al momento del trasplante se establecieron 6 tratamientos incluyendo al testigo:

- 1) inóculo del consorcio de HMA Zac19\*.
- 2) inóculo del consorcio de HMA Cedro\*.
- 3) inóculo del consorcio de HMA Zac19 con inóculo del consorcio de HMA Cedro\*.
- 4) cepa de *Paenibacillus polymyxa* (P61) (\*cepas de referencia del Área de Microbiología),
- 5) fitorregulador de crecimiento comercial Bioforte.
- 6) testigo.

### **5.1.5 Hongos micorrízicos arbusculares**

El tratamiento 1 y 2 los esquejes se inocularon con 10 g del inóculo correspondiente de HMA, en el tratamiento 3 se aplicaron 5 g de cada inóculo, aplicando directamente sobre el sistema radical (Alarcón *et al.*, 2004).

### 5.1.6 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

El tratamiento 4 se inoculó con la cepa *Paenibacillus polymixa* (P61), se utilizó una solución estandarizada en  $56.3 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , se aplicaron 5 mL de esta solución directamente sobre el sistema radical.

Para activar la cepa bacteriana se prepararon 3 L de caldo nutritivo (Merck), se repartieron en frascos de vidrio, colocando 40 mL en cada uno, se taparon y se cubrieron con papel aluminio, posteriormente los frascos se colocaron en una olla de presión y se esterilizaron a  $18 \text{ lb plg}^{-2}$  por 18 minutos.

En una campana laminar utilizando una asa esterilizada a la llama y enfriada se tomó una asada de la cepa de *Paenibacillus polymixa* (P61) y se vertió en los frascos. Los frascos se colocaron en una incubadora con agitación rotatoria (Thermo Scientific Max Q200) a 180 rpm durante 3 días hasta obtener una concentración de  $56.3 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Para extraer el caldo nutritivo los 40 mL se vertieron en tubos tipo Falcon esterilizados a  $18 \text{ lb plg}^{-2}$  por 18 minutos, se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 minutos (centrifuga SIGMA2-16), después se retiró el sobrenadante y se agregaron 40 mL de agua destilada previamente esterilizada; el pellet y el agua destilada se mezclaron con la ayuda de un vortex y se centrifugaron nuevamente, este proceso se repitió tres veces.

Para calcular el número de bacterias  $\text{mL}^{-1}$  se preparó agar, se esterilizó y se repartió en cajas Petri. Posteriormente en campana de flujo laminar se

realizaron diluciones al décimo; del inoculante ya sin caldo nutritivo con una micropipeta se tomaron 1,000 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) y se mezcló en un tubo de ensayo que contenía 90 mL de agua destilada, se agitó en un vórtex, esta dilución fue la  $10^{-1}$ . La puntilla de la micropipeta se cambió y de la dilución  $10^{-1}$  se tomaron 1,000  $\mu\text{L}$  y se mezcló en un tubo de ensayo que contenía 90 mL de agua destilada, se agitó en un vórtex, esta dilución fue la  $10^{-2}$ , este proceso se repitió hasta la dilución  $10^{-8}$ .

De cada dilución se tomaron se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una caja petrí con agar, con una varilla de vidrio esterilizada a la llama se estrío en un patrón radial, se hicieron tres repeticiones por dilución. La caja se tapó y se incubó a 37 °C por dos días. Las cajas se colocaron de tal manera que la tapa quedara hacia abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento.

La concentración de bacterias  $\text{mL}^{-1}$  se determinó por unidad formadora de colonia y se promedió. La fórmula que se utilizó fue  $\text{UCF}=\text{C}*\text{D}*10$ , en donde C es la media de las colonias y D el factor inverso de la dilución.

### **5.1.7 Fitorregulador comercial**

De acuerdo a lo observado en las hojas, para el tratamiento 5 se decidió añadir 2 ppm de un surfactante (marca DAP-PLUS FCO) al regulador de crecimiento

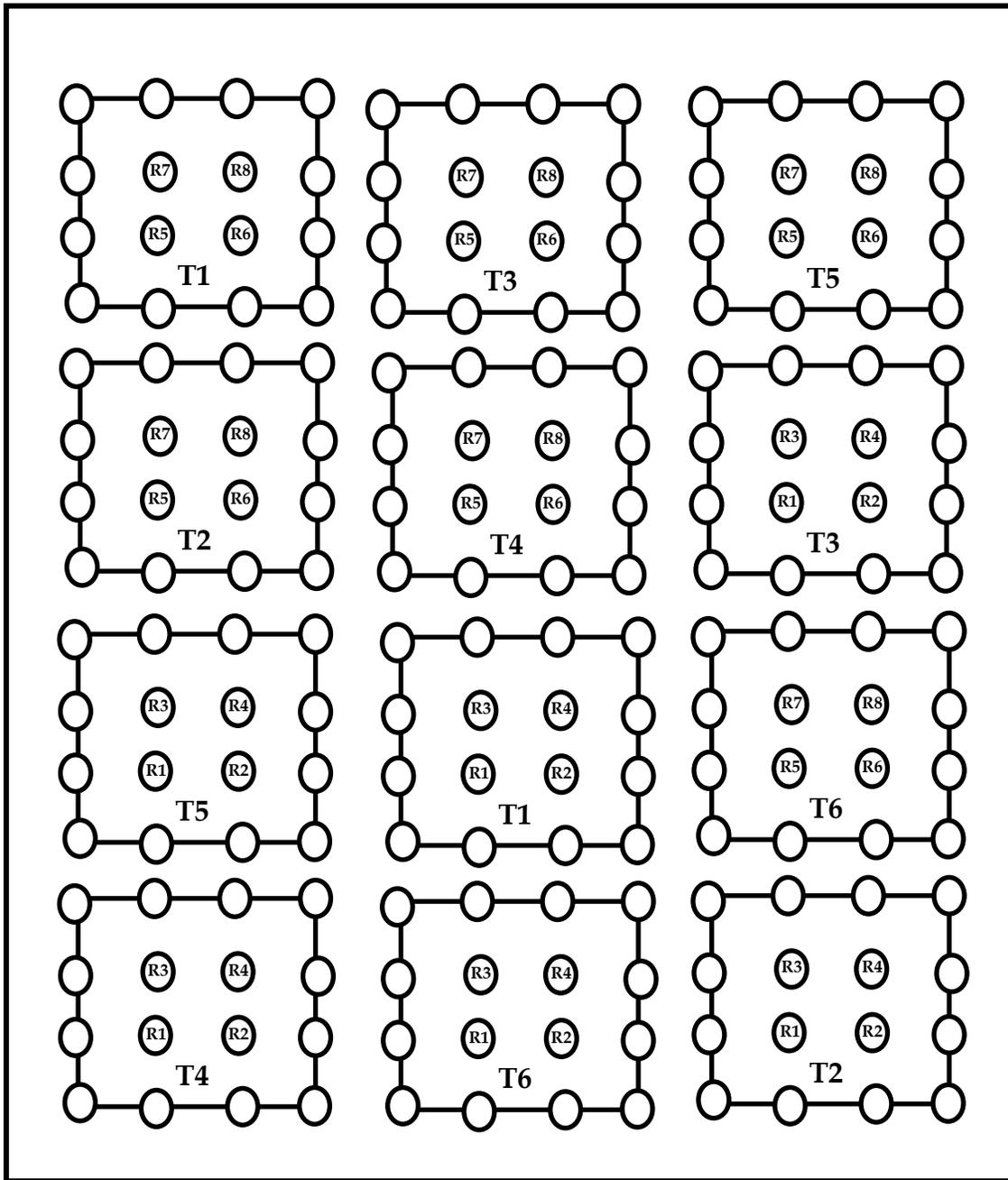
industrial BIOFORTE, el cual se aplicó en una dosis de 50ppm. Para la aplicación se realizó en las mañana cada 15 días con una bomba aspersora.

#### **5.1.8 Manejo en campo**

Después de 120 días de la inoculación el experimento se estableció en el campo experimental Montecillo lote 8b con una superficie de 500m<sup>2</sup>, con un pH de 8.3, CE 2.2, con un contenido de P, K, Ca y Mg en 15.39, 2214, 4170 y 1452 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. El riego se realizó una vez por semana en un sistema de irrigación rodado.

#### **5.1.9 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 32 repeticiones para cada tratamiento. La distancia entre hileras fue de 1.5 m y entre plantas 1.0 m (total 192 plantas) (Figura 7).



**Figura 7.** Plano de distribución de los tratamientos en campo. **T1:** HMA Zac19, **T2:** HMA Cedro, **T3:** HMA Zac19 con HMA Cedro, **T4:** P61, **T5:** Bioforte, **T6:** Testigo, **R:** repetición.

### **5.1.10 Variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo**

Para evaluar el crecimiento registraron las siguientes variables desde el momento del trasplante hasta la cosecha.

#### **5.1.10.1 Colonización micorrízica antes del trasplante**

Para saber si la simbiosis entre los HMA y el tomillo se había establecido, antes del trasplante se evaluó la colonización micorrízica de la siguiente manera: se colectaron raíces de las plantas de cada tratamiento y se utilizó el método de tinción azul de tripano descrito por Phillips y Hayman (1970), el cual consiste en colocar las raíces en KOH al 10% a 10 lb plg<sup>-2</sup> en olla de presión por 10 minutos, enjuagar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos, enjuagar, HCl al 10% por 10 minutos, se retira y las raíces se cubren con azul de tripano.

El porcentaje de colonización se calculó evaluando microscópicamente la morfología interna de la simbiosis, colocando 25 fragmentos de 1 cm de longitud en porta objetos adicionando gotas de lactoglicerol, se realizaron tres laminillas por tratamiento. Se efectuaron tres pasajes equidistantes por laminilla para registrar el número de segmentos con hifas, vesículas y arbusculos. El porcentaje de colonización micorrízica total se calculó dividiendo el número total de segmentos colonizados entre el número de segmentos totales observados multiplicado por 100.

#### **5.1.10.2 Altura**

Se midió en tallo principal cada quince días con un flexómetro. Los resultados se reportan en cm.

#### **5.1.10.3 Cobertura**

Se registró cada quince días con un flexómetro. Los resultados se reportan en cm.

### **5.1.11 Variables evaluadas a la cosecha**

La cosecha se realizó al inicio de la floración (105 días después del trasplante), cortando las plantas a unos pocos centímetros del suelo, para permitir el rebrote y la posibilidad de realizar un segundo ciclo de cultivo (Doeleman, 1989).

#### **5.1.11.1 Número de inflorescencias**

Por conteo manual se obtuvo el número de inflorescencias por planta cada 15 días.

#### **5.1.11.2 Número de ramas**

Por conteo manual se obtuvo el número de ramas principales cada 15 días.

#### **5.1.11.3 Peso fresco de la parte aérea**

El material vegetal de cada tratamiento cosechado se colocó en bolsas de papel estraza y fue pesado inmediatamente en una balanza digital marca Mettler HK 160. Los resultados se expresan en gramos.

#### **5.1.11.4 Peso seco de la parte aérea**

El material fue secado en una estufa marca RiossA E-71 durante 5 a 6 días, a una temperatura de 70°C hasta que se obtuvo un peso constante de las muestras. Los resultados se expresan en gramos.

#### **5.1.11.5 Colonización micorrízica**

Para evaluar la colonización la colonización micorrízica se utilizó la técnica mencionada anteriormente. También se tomaron fotos de las estructuras internas en un Fotomicroscopio III DE Carl Zeiss.

### **5.1.12 Aceite esencial**

#### **5.1.12.1 Extracción por destilación por arrastre con vapor de agua**

El material seco colectado de cada tratamiento se colocó en un embudo bola de tres entradas, se agregó agua destilada hasta cubrir el material vegetal, el

embudo fue conectado a un equipo de destilación por arrastre con vapor de agua durante 3 h.

El destilado se colocó en un embudo de separación y se realizaron 3 extracciones con diclorometano para separar la fase acuosa del aceite. Al diclorometano con el AE recuperado se le agregó sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) con el objetivo de retirar el agua que pudo haber quedado en la muestra.

La muestra se concentró en un rotaevaporador (Brinkmann), con el agua a una temperatura de 20 °C, hasta que todo el diclorometano fue separado. La muestra se colocó en viales de 5 mL a 4 °C hasta el análisis cromatográfico.

#### **5.1.12.2 Rendimiento**

El rendimiento por cada 100 g de material vegetal de cada tratamiento se calculó por regla de tres utilizando el peso seco del material vegetal y el peso del AE obtenido.

#### **5.1.12.3 Análisis del aceite esencial por cromatografía de capa fina**

En una placa de sílica gel de 8x10 cm, con ayuda de una microjeringa se aplicaron 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra y de estándares reportados en la literatura: timol y linalol. La placa se colocó en una cámara con un eluyente compuesto

de tolueno-acetato de etilo (93:7); cuando el sistema se saturó la placa se colocó en la campana de extracción para que se evaporara el disolvente.

Cuando la placa se secó, se observó a luz ultravioleta para marcar las manchas correspondientes a los compuestos del AE. Posteriormente la placa fue asperjada con un revelador de vainillina-ácido sulfúrico y se calentó durante 5 minutos a 100°C en una estufa marca LC-Oven LAB-LINE.

Para obtener el valor del Rf se calculó el cociente de la distancia recorrida desde el centro del origen por el compuesto entre la distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente. Se calculó con la siguiente formula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el centro del origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se midió desde el centro de la mancha. Se realizó la comparación correspondiente con los estándares elegidos de acuerdo a la literatura.

#### **5.1.12.4 Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases**

La composición química del aceite esencial de tomillo se obtuvo al correr las muestras en un Cromatógrafo de Gases Marca HP6890 acoplado a un detector selectivo de masas HP5973. La identificación de los componentes estuvo basada en la composición de su espectro de masas y la base de datos del

espectrómetro. El análisis se realizó utilizando las condiciones propuestas por Alpaslan *et al.* (2013).

El sistema cromatográfico uso una columna HP-5MS 30 cm de longitud x 0.250 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de fase estacionaria. La temperatura del horno comenzó en 40 °C y aumentó 5 °C por minuto hasta alcanzar 150 °C para mantenerse a esta temperatura por 3 min y luego comenzar a aumentar 5 °C por minuto hasta alcanzar 220 °C. Se usó helio como gas acarreador con 99.9% de pureza a flujo constante de 1.3 mL por minuto y a energía de ionización fue de 70 eV. La temperatura del puerto de inyección en modo splittless fue de 220 °C, y 280 °C como temperatura de interface. Para el detector de masas la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y 250 °C para el cuadropolo.

Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de muestra diluida en hexano grado GC (1  $\mu\text{m}$  de muestra en 10 mL de hexano).

Se utilizaron estándares de timol y linalol. La identificación de los componentes se realizó mediante su índice de retención con los datos reportados en la literatura.

### **5.1.13 Análisis estadísticos**

En análisis estadístico se realizó con el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey  $\alpha=0.05$  con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

## **5.2 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares**

### **5.2.1 Obtención de la cepa *Escherichia coli***

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5-Alpha (*E. coli* DH5a). Para activar la cepa bacteriana se prepararon 15 mL de caldo nutritivo (Merck), se colocó en un matraz Erlenmeyer, se tapó y se cubrió con papel aluminio, posteriormente se colocó en una olla de presión y se esterilizó a 18 lb plg<sup>-2</sup> por 18 minutos.

En una campana laminar el caldo nutritivo se vertió en un tubo tipo Falcón, utilizando una asa esterilizada a la llama y enfriada se tomó una asada de la cepa *E. coli* (DH5a) y se vertió en el tubo, el cual se colocó en una incubadora con agitación rotatoria (Thermo Scientific Max Q200) a 37°C con 110 rpm durante 24 h.

Para extraer el caldo nutritivo, el tubo se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min (centrifuga SIGMA), después se retiró la alícuota y se agregaron 15 mL de agua destilada previamente esterilizada; el pellet y el agua destilada se mezclaron con la ayuda de un vórtex y se centrifugaron nuevamente. Este proceso se repitió tres veces.

### **5.2.2 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar. Se establecieron 4 concentraciones de AE por tratamiento (0%, 15%, 20% y 50%). Las pruebas se hicieron por triplicado y con tres repeticiones.

### **5.2.3 Bioensayos**

La actividad antibacteriana del AE de tomillo frente a *E. coli* (DH5a) se evaluó mediante el método de difusión de disco en agar. Se preparó agar (Merck), se esterilizó y se repartió en cajas Petri. Posteriormente en una campana de flujo laminar se preparó el inóculo bacteriano estandarizado en  $1 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  de la cepa *E. coli* (DH5a). De este inóculo se vertieron 10  $\mu\text{L}$  en cada caja Petri y con una varilla de vidrio esterilizada a la llama se estrió en un patrón radial.

El AE de cada tratamiento se diluyó con diclorometano a diferentes concentraciones de 0%, 15%, 20% y 50%. Después en el centro de las cajas Petri se colocó un disco de papel de filtro Whatman N°1 esterilizado de 10 mm de diámetro previamente saturado con 10  $\mu\text{m}$  de la concentración correspondiente de AE. Se utilizó ampicilina como testigo positivo en concentraciones de 0%, 15%, 20% y 50%.

Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h en una incubadora Thermo Scientific Max Q200. Se colocaron de tal manera que la tapa quedara hacia abajo para

evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento.

#### **5.2.4 Variables evaluadas**

##### **5.2.4.1 Diámetro de inhibición**

Con un vernier se midió la zona de inhibición de crecimiento de *E. coli* (DH5a) que rodea al disco, la cual incluyó el diámetro del disco de papel. Los resultados se expresan en mm.

#### **5.2.5 Análisis estadísticos**

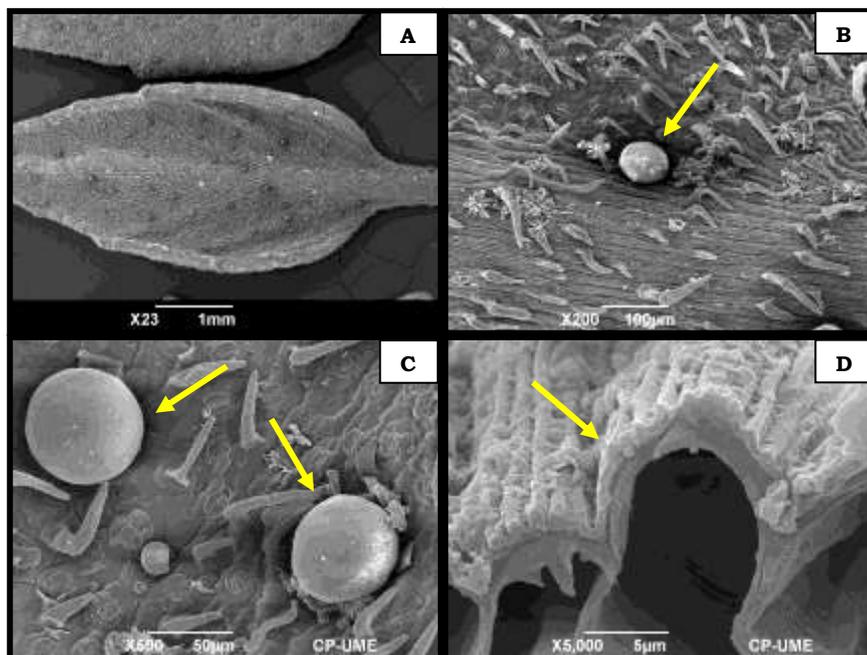
Los resultados se analizaron para cada tratamiento y el análisis de varianza se hizo con el modelo lineal general, y cuando hubo diferencias se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (DMS, 0.05). Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Crecimiento y obtención del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares

#### 6.1.1 Identificación taxonómica

Las plantas se identificaron como *Thymus vulgaris* L. basado en el margen de sus hojas (hojas revolutas) (Bailey, 1963). La morfología de las hojas de tomillo se representa en la Figura 8.



**Figura 8.** Micrografía de hojas de *Thymus vulgaris* L. obtenidas con MEB. A) superficie adaxial y abaxial 23X. B) Glándula esférica que contiene el aceite esencial 200X. C) Glándulas 500X. D) Corte transversal de la hoja, se observa que la cutícula presenta una capa cerosa 5 000X.

## 6.1.2 Variables evaluadas durante el desarrollo del cultivo

### 6.1.2.1 Colonización micorrízica antes del trasplante

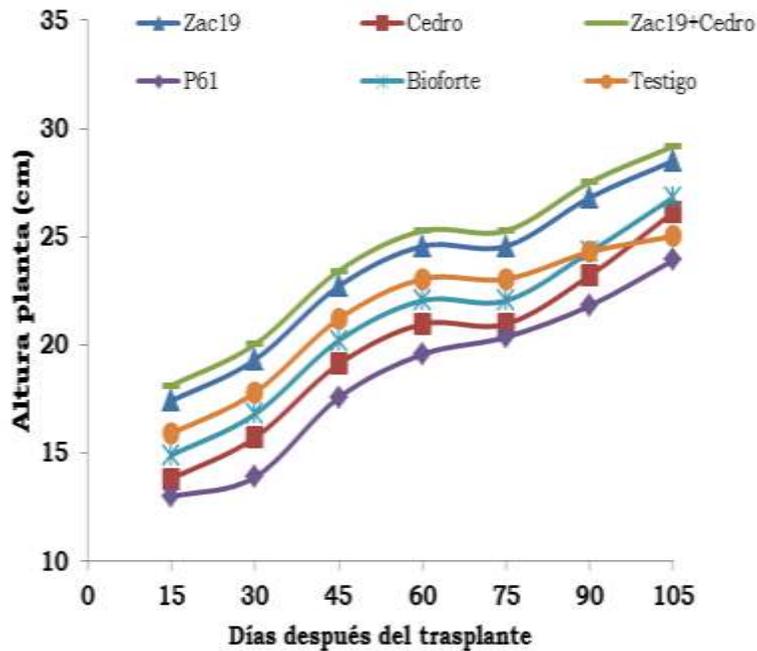
Los HMA presentaron infectividad adecuada a los 120 días después de la inoculación (Cuadro 5), por lo tanto, se consideró viable el trasplante a campo. La colonización micorrízica del tratamiento inoculado con Cedro presentó el valor más alto de colonización (55.9%), seguido por el tratamiento inoculado con HMA-Zac19 (50.3%) y el consorcio de HMA-Zac19+Cedro (48.0%).

**Cuadro 5.** Especies y géneros de hongos micorrízicos arbusculares, porcentajes de colonización micorrízica arbuscular presente en *Thymus vulgaris* L. antes del trasplante (120 días después de la propagación por esqueje).

Tratamiento	Especies de HMA	Colonización micorrízica (%)
Zac19	<i>Glomus diaphanum</i> , <i>G. albidum</i> , <i>Claroideglomus claroideum</i>	50.3
Cedro	<i>Scutellospora</i> sp., <i>S. cerradensis</i> , <i>Glomus</i> sp., <i>Claroideglomus etunicatun</i> , <i>Acaulospora</i> sp., <i>Entrophospora infrequens</i>	55.9
Zac19 + Cedro	<i>Glomus diaphanum</i> , <i>G. albidum</i> , <i>G. sp.</i> , <i>Claroideglomus claroideum</i> , <i>C. etunicatun</i> , <i>Scutellospora</i> sp., <i>S. cerradensis</i> , <i>Acaulospora</i> sp., <i>Entrophospora infrequens</i>	48.0

### **6.1.2.2 Dinámica de la altura de la planta**

En la Figura 9 se presentan las diferencias en la altura de las plantas de los tratamientos. No hay diferencia significativa entre tratamientos; sin embargo se observa que la altura que a los 15 días después del trasplante (DDT) las plantas inoculadas con Zac19+Cedro presentaban 18.12 cm de altura, mientras que las plantas con menor altura fueron las inoculadas con P61. De manera general durante el desarrollo del cultivo las plantas que presentaron mayor altura fueron las inoculadas con HMA, destacando el tratamiento de Zac19+Cedro, seguido de Zac19 y el tratamiento con la aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte). A los 90 DDT, en las plantas inoculadas con HMA se incrementó la altura en comparación con el testigo. Este incremento puede asociarse a que uno de los beneficios de los HMA es promover el crecimiento de la planta hospedante, debido a que utiliza el micelio externo para adquirir nutrientes poco disponibles para la planta (Mahmood *et al.*, 2014). Sin embargo, los efectos de la micorrización en el desarrollo de la planta pueden ser diferentes dependiendo de la especie del HMA (Sasanelli *et al.*, 2009). La mayor altura de la planta se registró a los 105 DDT (29.19 cm), este valor es mayor al obtenido por Juárez-Rossete (2010).

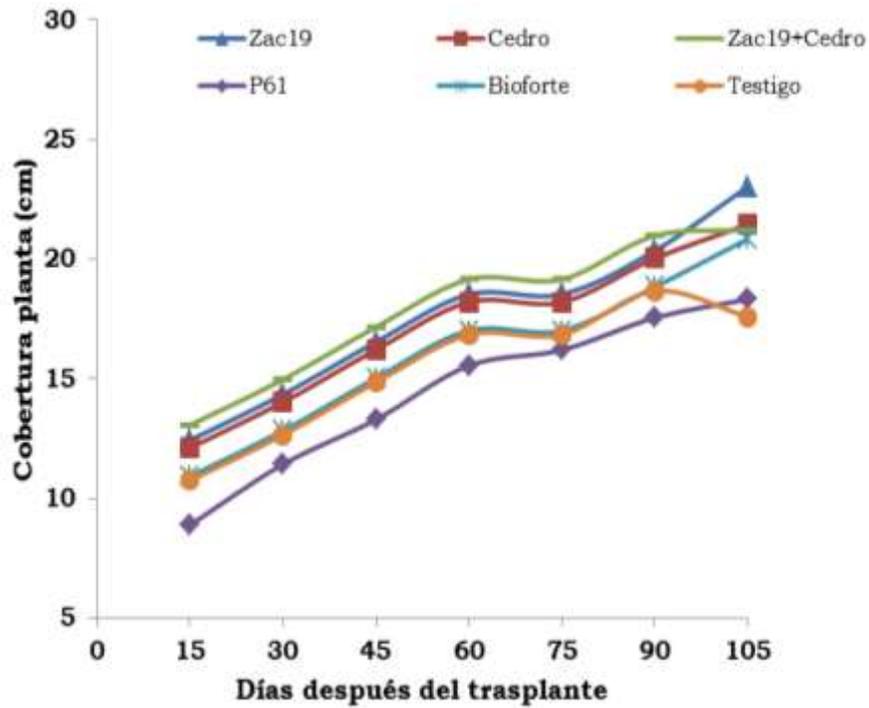


**Figura 9.** Altura de las plantas de tomillo durante el periodo de cultivo con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8.

### 6.1.2.3 Dinámica de la cobertura de la planta

La cobertura durante el periodo de cultivo se presenta en la Figura 10. Se observa que las plantas que presentaron mayor cobertura fueron la inoculadas con HMA, destacando el tratamiento de Zac19+Cedro, seguido de Zac19 y Cedro. No hay diferencia significativa entre tratamientos; sin embargo, se observa que a los 15 DDT el valor más alto de cobertura se presenta en las plantas inoculadas con Zac19+Cedro con 13.06 cm, mientras que las plantas

con menor cobertura fueron las del tratamiento de P61 con 8.8 cm. A los 105 DDT, las plantas inoculadas con HMA, P61 y el regulador de crecimiento, incrementaron su cobertura en comparación con el testigo.

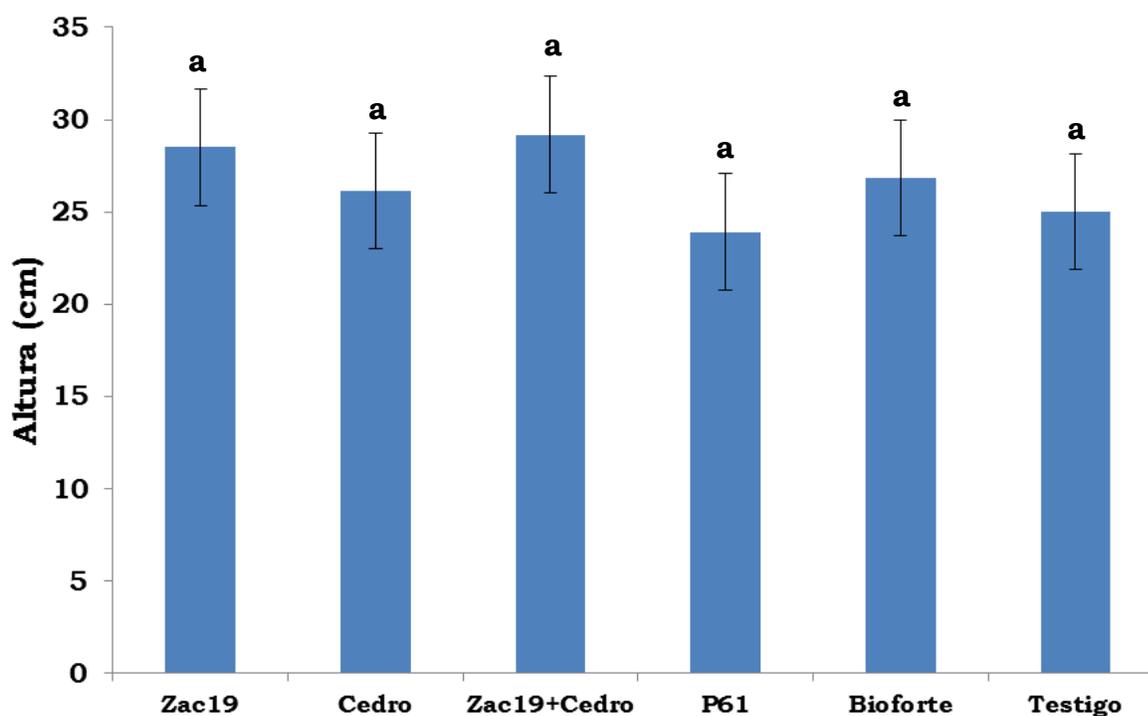


**Figura 10.** Cobertura de las plantas de tomillo durante el periodo de cultivo con diferentes tratamientos de aplicación de un fitoregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8.

### **6.1.3 Variables evaluadas al final del experimento**

#### **6.1.3.1 Altura final**

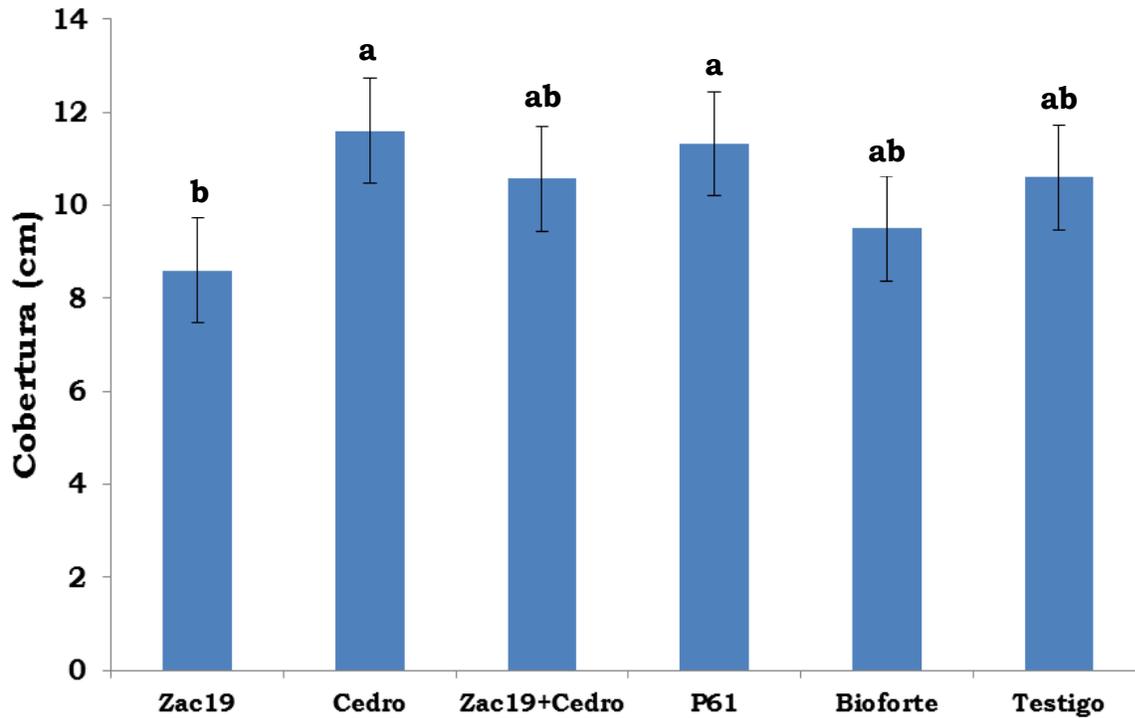
La altura final se presenta en la Figura 6. La aplicación de HMA, RPCV y del fitorregulador comercial no tuvo efectos significativos; sin embargo, los HMA produjeron mayor respuesta; mientras que las plantas tratadas con P61 presentaron menor altura. Esto puede deberse a que las RPCV promueven el crecimiento y desarrollo de la planta a través de mecanismos directos e indirectos. Los facilitan el crecimiento mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de minerales, y la síntesis de sideróforos y hormonas que aumentan la absorción de nutrientes a las plantas. Los mecanismos indirectos consisten en favorecer el crecimiento de la planta protegiéndola de patógenos a través de la producción de ciertos metabolitos o cambiando la vulnerabilidad de la planta a través de un mecanismo de defensa sistémica inducida (Mahmood *et al.*, 2014). En este caso, podría ser la producción aceite esencial y/o terpenos; el efecto que tienen los RPCV en la inducción sistémica de terpenos y compuestos aromáticos, ya ha sido reportado por otros autores (Santoro *et al.*, 2011; Cappellari *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2013) y en algunos casos con PAM se ve un efecto en el crecimiento de la planta pero no en el rendimiento y composición del AE, o viceversa.



**Figura 11.** Altura final de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### 6.1.3.2 Cobertura

En lo que respecta a la cobertura de las plantas (Figura 12), se tiene que las inoculadas con HMA presentan la mayor cobertura, destacando Zac19 con el tratamiento con 23.04cm. Los tratamientos no mostraron diferencia significativa, no obstante de manera general todos presentaron mayor cobertura respecto al testigo.

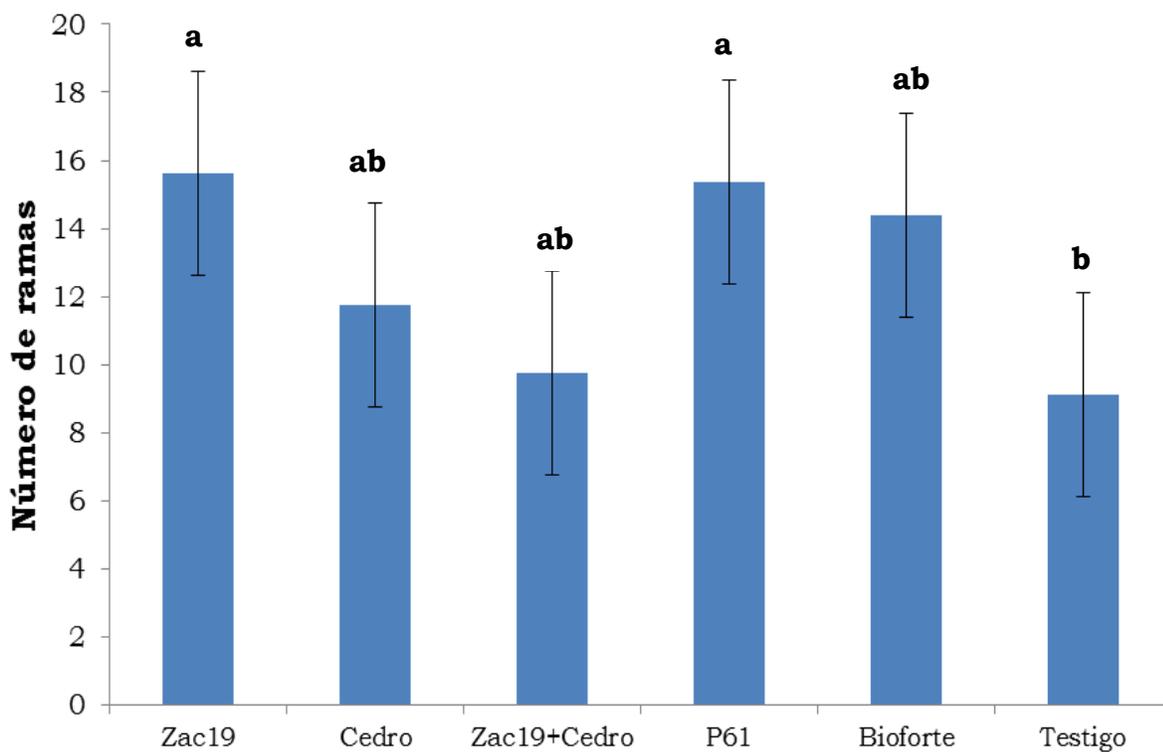


**Figura 12.** Cobertura final de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### 6.1.3.3 Numero de ramas

El número de ramas se representa en la Figura 13, en donde, se observa que los tratamientos presentaron diferencias significativas. Las plantas que presentaron mayor número de ramas fueron las inoculadas con Zac19, seguido de los tratamientos P61 y Bioforte con un valor de 15.63, 15.58 y 15.38, respectivamente. Todos los tratamientos con HMA presentaron un

número de ramas mayor que el testigo. En este último se observó el menor número de ramas con un valor de 9.1.

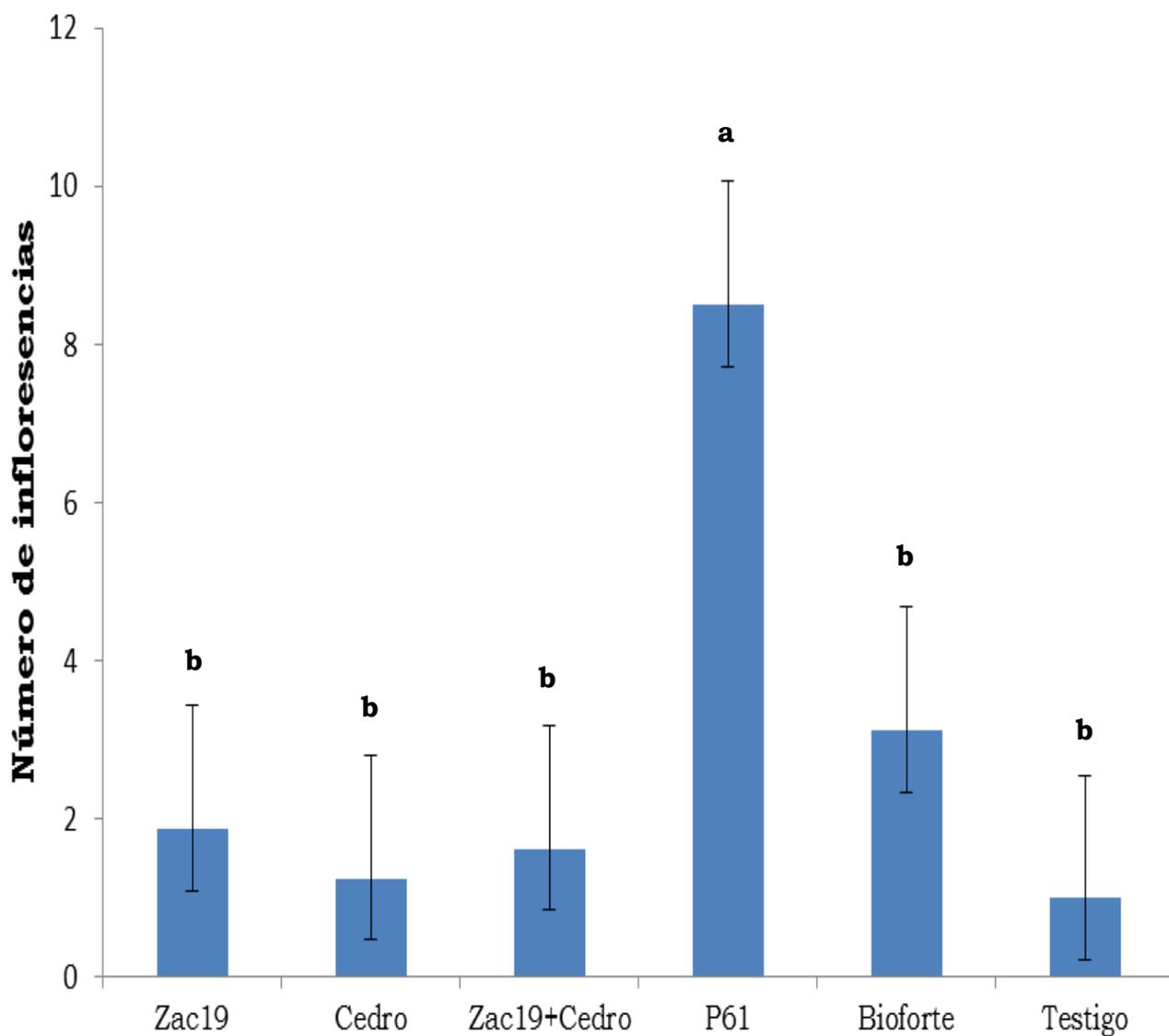


**Figura 13.** Número de ramas de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

#### **6.1.3.4 Número de inflorescencias**

La aplicación de HMA, RPCV y del fitorregulador comercial tuvo diferencias significativas en la producción de inflorescencias (Figura 14). Las plantas tratadas con P61 presentaron mayor respuesta con 8.5 inflorescencias planta<sup>-1</sup>. Esto posiblemente se debe al aumento de producción y/o emisión de hormonas de crecimiento de las RPCV, puesto que se ha demostrado que las RPCV contribuyen directamente en el crecimiento de la planta a través de la síntesis fitohormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas (Ahmed *et al.*, 2014; Capellari *et al.*, 2015); cabe mencionar la floración comenzó primero en las plantas con P61.

El segundo tratamiento que presentó mayor número de inflorescencias fue Bioforte con 3.1, seguido de Zac19, Zac19+Cedro y Cedro con 1.8, 1.6 y 1.2 respectivamente. Las plantas inoculadas con HMA no se vieron favorecidas en la producción de inflorescencias debido a que los beneficios pudieron haber sido en la producción de la biomasa. De manera general, todos los tratamientos tuvieron más producción de inflorescencias en comparación con el testigo.

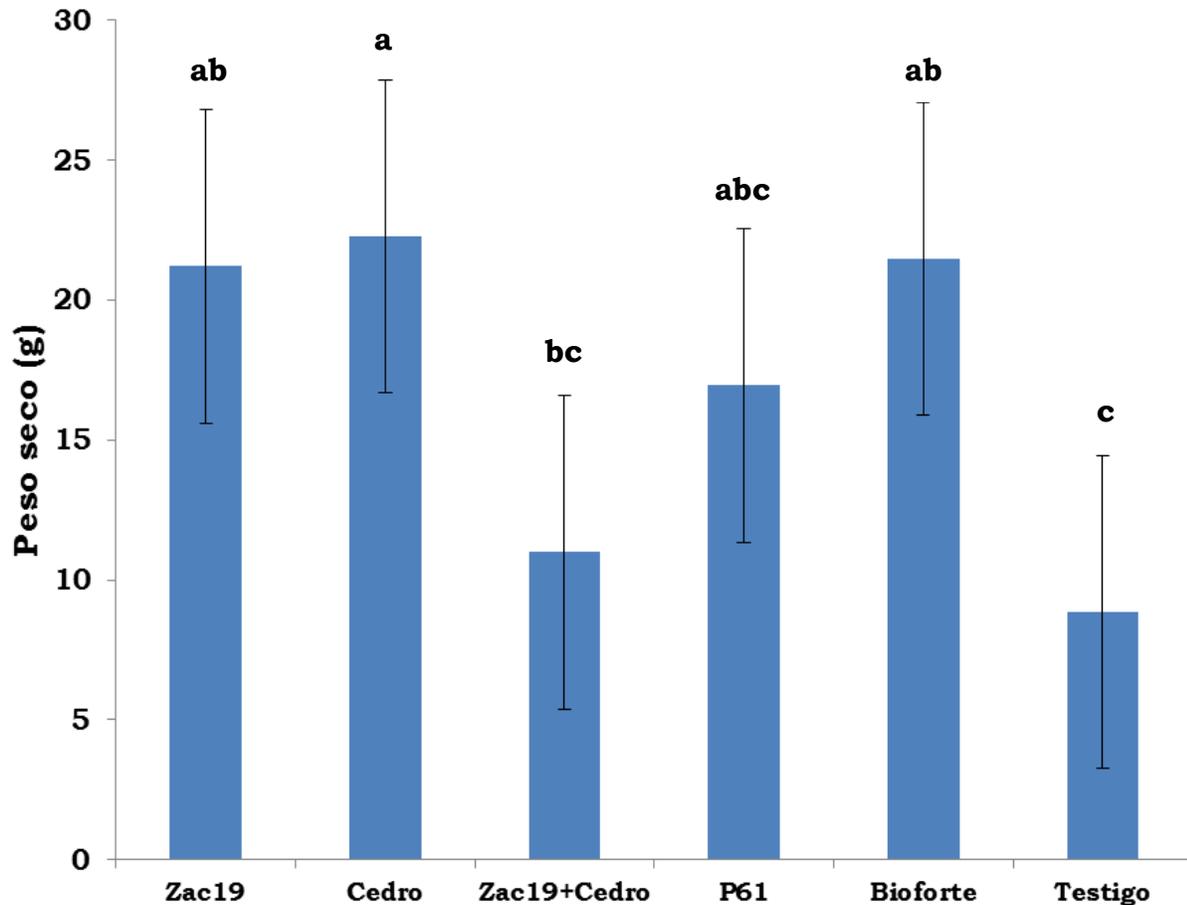


**Figura 14.** Número de inflorescencias de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

#### **6.1.3.5 Peso seco de la parte área**

En el peso seco de la parte aérea los tratamientos tuvieron diferencias significativas (Figura 15). El tratamiento con mayor peso seco correspondió a las plantas inoculadas HMA de Cedro con 22.2 g; en contraste el tratamiento inoculado con menor peso seco correspondió al del consorcio de Zac19 y Cedro. Los beneficios de HMA se relaciona con la promoción de crecimiento y peso seco de la parte aérea, el uso de inóculos mixtos aumenta la posibilidad de que uno de los hongos colonice el sistema radical (De La Rosa, 2010); sin embargo, el beneficio de los HMA puede tener variaciones y en algunos casos mantener la simbiosis puede ser muy costoso para la planta y causar efectos negativos en el crecimiento (Zubek *et al.*, 2012; An-Dong *et al.*, 2013).

Los tratamientos Bioforte, Zac19 y P61 presentaron mayor peso seco en comparación con el testigo con 21.4, 21.2 y 16.9 g, respectivamente.



**Figura 15.** Peso seco de la parte aérea de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### 6.1.3.6 Colonización micorrízica

La colonización micorrízica arbuscular se incrementó durante el cultivo. En los datos se observa que el porcentaje de colonización fue más alto que el obtenido al momento del trasplante; se sabe que la asociación micorrízica aumenta cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada (An-Dong *et al.*, 2013).

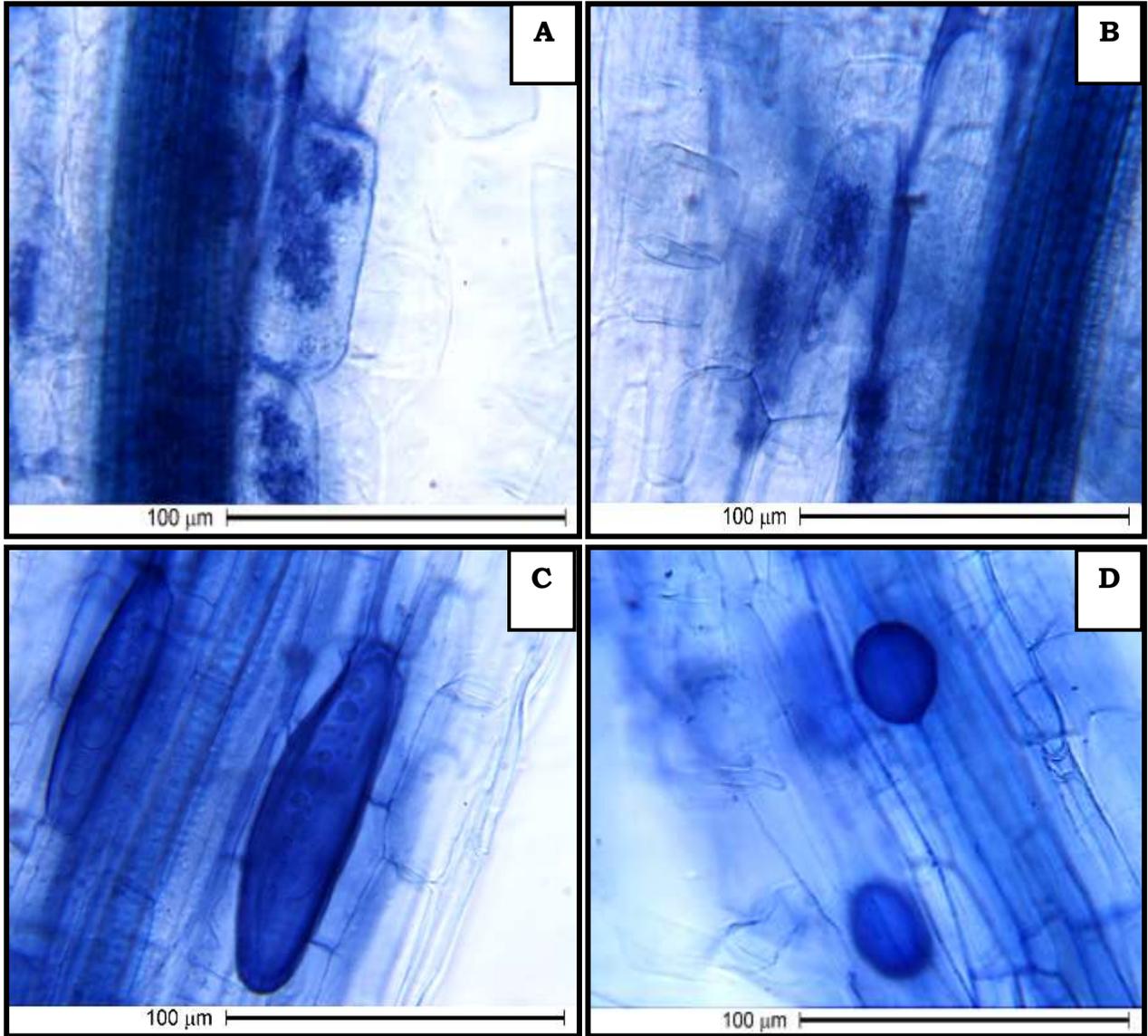
Los HMA presentaron alta infectividad (Tapia *et al.*, 210) (Cuadro 6). El tratamiento inoculado con Zac19 presentó el valor más alto de colonización micorrízica (72%) y abundancia de arbusculos y vesículas, seguido por el tratamiento inoculado con Cedro (71.3%) y el consorcio de Zac19+Cedro (68.8%). Los datos reflejan variación en la compatibilidad de *Thymus vulgaris* L. y los tipos de HMA usados. Las variaciones en el porcentaje de colonización se explican principalmente por la interacción planta-huesped (De La Rosa, 2010). La evaluación de la asociación planta-hongo se presentan en la Figura 16. Las estructuras internas que se observaron en la evaluación micorrízica fueron hifas, vesículas y arbusculos.

En cuanto a la relación de la colonización micorrización con otras variables, no tuvo relación clara con en el número de inflorescencias; sin embargo el inoculo de Zac19 produjo mayor respuesta. En el peso seco de la parte aérea se observó que el testigo tuvo diferencias significativas con los tratamientos Zac19 y Cedro, los cuales produjeron más peso. Respecto al rendimiento de AE no hay diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo; sin embargo, se observa que los HMA favorecieron el rendimiento de AE, destacando el tratamiento de Zac19 con 10.6 mg AE g<sup>-1</sup> MS. Este valor es menor al que obtuvo Guerrero *et al.* (2010) en un cultivo hidropónico. El efecto que tienen los HMA en la producción de aceites esenciales ya ha sido reportado, Nemeč y Lund (1990) informaron de que *Glomus intraradices* induce variaciones significativas en el la proporción y la composición de las sustancias volátiles de

la hoja en Citrus Jambhiri. Tres estudios realizados sobre *Mentha arvensis* indican que la presencia de HMA favorecen el crecimiento, la acumulación de aceite esencial, y la mejora de absorción de nutrientes (Khaliq *et al.*, 1997; Gupta *et al.* 2002; Freitas *et al.*, 2004; Copetta *et al.*, 2006).

**Cuadro 6.** Colonización micorrízica, numero de inflorescencias y peso seco de parte aérea en *Thymus vulgaris* L. por efecto de inoculación de hongos micorrízicos arbusculares a 105 DDT. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

<b>Tratamiento</b>	<b>Colonización micorrízica (%)</b>	<b>Numero de inflorescencias</b>	<b>Peso seco de parte aérea (g)</b>	<b>Rendimiento de aceite esencial en (mg AE g<sup>-1</sup> MS)</b>
Zac19	72.0	1.875 <b>a</b>	21.204 <b>a</b>	10.6
Cedro	71.3	1.25 <b>a</b>	22.288 <b>a</b>	9.0
Zac19 + Cedro	68.8	1.62 <b>a</b>	10.983 <b>b</b>	9.0
Testigo	0.0	1.0 <b>a</b>	8.844 <b>b</b>	8.5



**Figura 16.** Estructura interna de la simbiosis entre HMA y la raíz de *Thymus vulgaris* L. en microscopio óptico. A y B arbúsculos en la célula hospedante (Zac19). C vesículas (Cedro). D espora e hifa del HMA (Zac19+Cedro).

## **6.1.4 Aceite esencial**

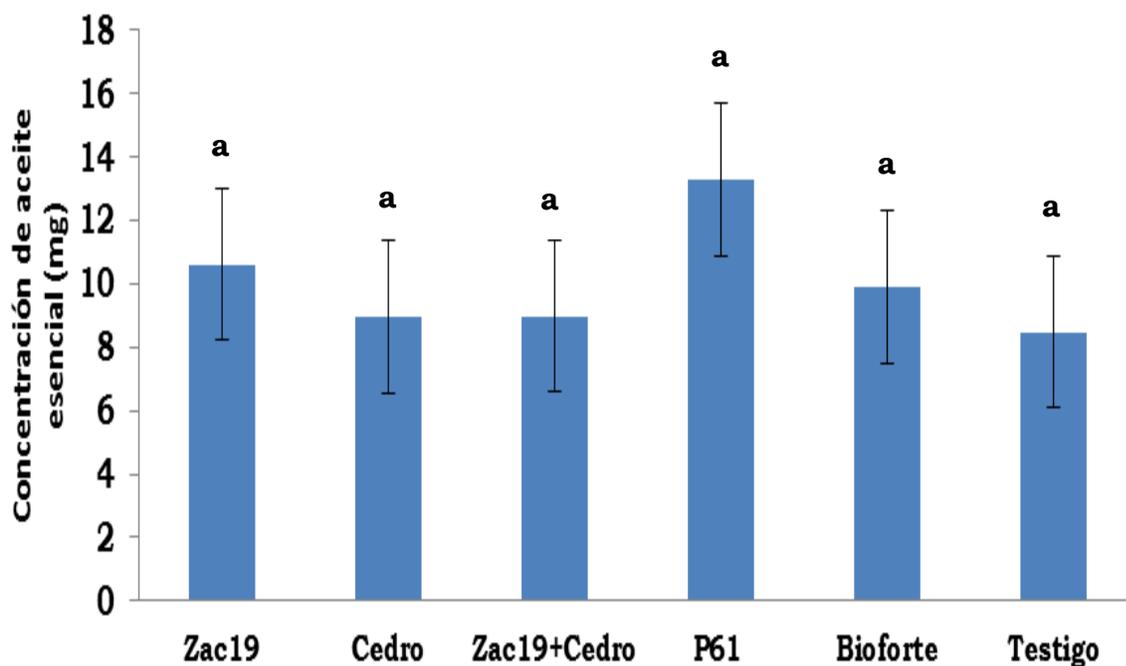
### **6.1.4.1 Rendimiento**

El rendimiento de AE ( $\text{mg AE g}^{-1} \text{MS}$ ) se representa en la Figura 17, los tratamientos no tuvieron diferencias significativas. Sin embargo, el mayor rendimiento se obtuvo en las plantas inoculadas con microorganismos. De manera general, el aumento en la síntesis de AE pueden ser considerada como una respuesta defensiva a la colonización por HMA y RPCV, ya que varios componentes del AE tienen propiedades antimicrobianas. Otra explicación puede ser que la simbiosis le provee a la planta, principalmente acceso a nutrientes que favorecen la acumulación de AE (Banchio *et al.*, 2008; Capellari *et al.*, 2013).

El mayor rendimiento lo presentó el tratamiento inoculado con P61 con  $13.3 \text{ mg AE g}^{-1} \text{MS}$ . La explicación probable de este fenómeno es que las plantas inoculadas con RPCV pueden absorber más agua y nutrientes, por lo tanto, presenta un mayor estado nutrimental, mayor tasa de asimilación de carbono y, de este modo aumentan la biosíntesis de AE (Capellari *et al.*, 2015). Resultados similares han sido reportados por Banchio *et al.* (2008), Colombo *et al.* (2013), Capellari *et al.* (2015), estos trabajos demostraron que la inoculación de RPCV aumentan el rendimiento de AE en diferentes PAM.

Las plantas micorrizadas presentaron mayor contenido de AE en comparación con el testigo, destacando el inoculo de Zac19 con 10.6 mg AE g<sup>-1</sup> MS. En lo que respecta a Bioforte, la aplicación de foliar de este fitorregulador presentó mayor rendimiento de AE (9.9 mg AE g<sup>-1</sup> MS) que los inóculos de Cedro, Zac19+Cedro y el testigo.

Respecto al rendimiento de AE por planta (Cuadro 7) si hay diferencias significativas, el testigo fue menor y diferente a todos los demás en las unidades mg AE planta<sup>-1</sup>, en contraste P61 y Zac19 presentaron mayor rendimiento.



**Figura 17.** Rendimiento de aceite esencial (mg) en 1g de muestra seca de las plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

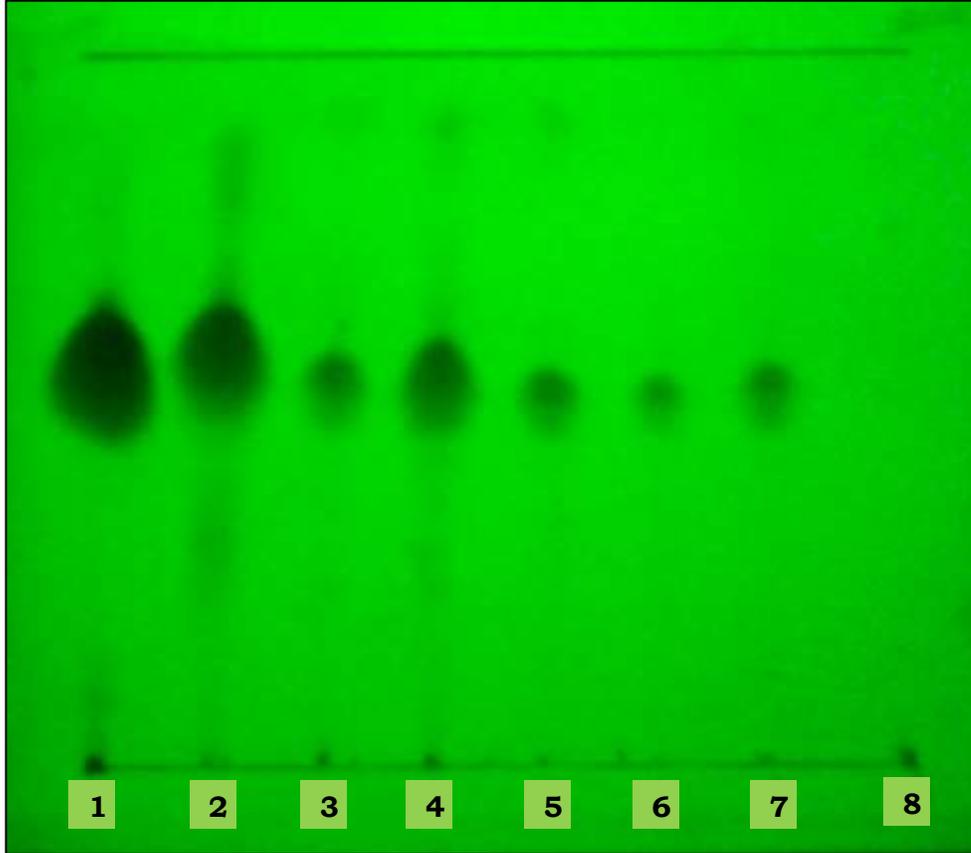
**Cuadro 7.** Rendimiento de aceite esencial en plantas de tomillo a los 105 DDT con diferentes tratamientos de aplicación de un fitorregulador comercial (Bioforte) e inoculación con HMA y RPCV. n=8. Medias + DMS. Letras idénticas sobre las barras indican que los promedios de los tratamientos son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

<b>Tratamiento</b>	<b>Rendimiento de aceite esencial en (mg AE g<sup>-1</sup> MS)</b>	<b>mg AE planta<sup>-1</sup></b>
Zac19	10.6	224.7 <b>a</b>
Cedro	9.0	200.7 <b>ab</b>
Zac19+Cedro	9.0	87.6 <b>bc</b>
P61	13.3	225.4 <b>a</b>
Bioforte	9.9	212.7 <b>a</b>
Testigo	8.5	75.2 <b>c</b>

#### **6.1.4.2 Análisis del aceite esencial por cromatografía de capa fina**

Los resultados revelados en las placas de sílica gel mostraron similitud en las manchas y en los valores de retención ( $R_f$ ) para todos los tratamientos. Bajo luz ultravioleta se observó la presencia de un componente (Figura 18). Con la aplicación de revelador con un revelador de Vainillina-Ácido Sulfúrico se acentuaron tres componentes más (Figura 19).

En esta prueba, para todos los tratamientos destaca una mancha color morada, rosa fuerte, azul fuerte y azul-verdoso, las cuales de acuerdo con Wagner (2001) coinciden con trazas de tujueno y con estándares de timol, de linalol y borneol, respectivamente. En el Cuadro 8 se describen los tiempos de retención para cada mancha observada de los tratamientos y el de los estándares. Los tiempos de retención obtenidos coinciden con los que han sido reportados en la literatura.

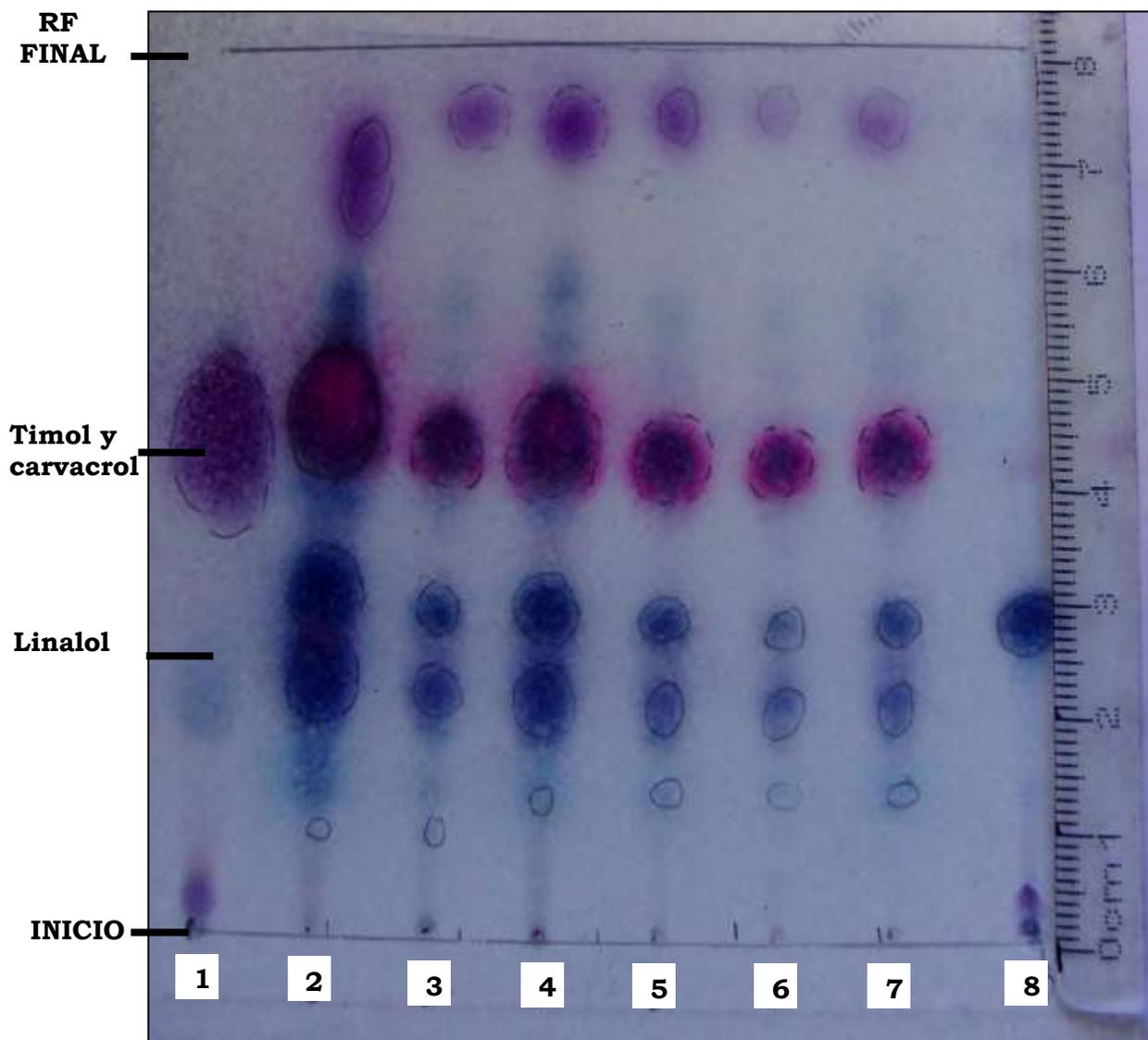


**Figura 18.** Imagen de la placa cromatográfica de sílica gel observada en luz ultravioleta. 1.Estándar de timol; 2.Testigo; 3.P61; 4.Zac19; 5.Cedro; 6.Zac19+Cedro; 7.Bioforte; 8.Estándar linalol.

**Cuadro 8.**  $R_{fs}$  (tiempos de retención) de los componentes del aceite esencial de tomillo en los tratamientos.

<b>Manchas y estándares</b>	<b>Color (revelado con Vainillina-Ácido Sulfúrico)</b>	<b><math>R_f</math></b>
1	Morado	0.91
2	Rosa fuerte	0.56
3	Azul oscuro	0.37
4	Azul-verdoso	0.31
Estándar timol	Rosa fuerte	0.55
Estándar linalol	Rosa fuerte	0.36

**Figura 19.** Imagen de la placa cromatográfica de sílica gel. 1.Estándar de timol; 2.Testigo; 3.P61; 4.Zac19; 5.Cedro; 6.Zac19+Cedro; 7.Bioforte; 8.Estándar linalol.



#### **6.1.4.3 Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases**

En el análisis por cromatografía de gases del aceite esencial de tomillo se observó un total de 36 componentes. Los monoterpenos oxigenados, así como los monoterpenos hidrocarbonados son los metabolitos con mayor abundancia en el aceite esencial. Los compuestos mayoritarios encontrados son timol (52.55–43.24%), O-Cimeno (21.79-16.6%), J-Terpineno (17.9-11.8%), linalol (3.66-1.77%) y carvacrol (3.42-0.51) (Cuadro 8).

El tratamiento que presentó mayor concentración de timol fue el Testigo (52.55%), seguido por el tratamiento inoculado con P61 (51.05%) y Zac19+Cedro (50.66%). Para O-Cimeno el tratamiento inoculado con Zac19 (21.79) presenta la mayor concentración, seguido de Zac19+Cedro y Bioforte con 20.38% y 19.37%, respectivamente. Respecto a la concentración de J-terpineno, Cedro y P61 mostraron valores más altos, con 17.91 y 17.84%, respectivamente.

Se observa que el número de componentes y el porcentaje presente en el aceite esencial es diferente en cada tratamiento. El tratamiento con Bioforte presentó 26 componentes, y una concentración de 43.73% de timol y favoreció la producción de Terpinen-4-ol y acetato de bornilo. El efecto que tienen los fitorreguladores industriales en el rendimiento y composición del AE ya ha sido reportado, posiblemente su efecto se asocia a que estimulan las enzimas que participan en la producción de monoterpenos. Keltawi *et al.* (1997) demostró

que las citoquininas ejercen una influencia notable en la acumulación general de monoterpenos

El AE de las plantas inoculadas con P61 presenta 21 componentes en comparación con el testigo que presenta 20, además de favorecer la concentración de timol (51.05) también promueve la concentración de carvacrol (3.37%) y cariofileno (1.84) en comparación con los otros tratamientos. Además en este AE es el único que presenta N-methyl-2-Piridinemetanamina y 3-Careno. Posiblemente se debe a que la planta secreta hacia la rizósfera exudados como mecanismo de señalización para las rizobacterias, también puede ser considerada como una respuesta defensiva a la colonización de RPCV. Otra posible explicación es que la inducción de resistencia sistémica puede ser promovida por estos organismos benéficos, de tal manera que la respuesta defensiva de las plantas contra patógenos y herbívoros es más eficiente. Estudios anteriores coinciden con los resultados obtenidos, los trabajos mostraron que las RPCV aumentan la producción monoterpenos en varias especies de plantas aromáticas (Banchio *et al* 2009, 2010; Cappellari *et al* 2013; Capellati *et al* 2015).

Para las plantas inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares se observa 23 componentes para Zac19, 24 para Cedro y el consorcio de Zac19+Cedro. Se observa que el AE del tratamiento Cedro es el único que contiene limoneno, mientras que el AE del consorcio Zac19+Cedro es el único que presenta Acetato de L-Bornilo. El Alcanfor es el monoterpeno oxigenado presente únicamente en

los tratamientos inoculados con HMA. La modificación de aceites esenciales por la presencia de HMA ya ha sido reportada por varios autores y lo atribuyen como una consecuencia de los mecanismos de señalización entre los HMA y la planta (Zubek *et al.*, 2010). Al respecto, el establecimiento temprano de la simbiosis del HMA y del crecimiento vegetal la concentración de compuestos fenólicos es imprescindible, debido a que estos compuestos fenólicos pueden activar señales moleculares en el sistema simbiótico e influir en la colonización de la raíz por los HMA (De La Rosa, 2009).

También se considera que estas modificaciones pueden ser una respuesta de defensa a la colonización HMA, debido a que las propiedades fungicidas de varios constituyentes de los aceites esenciales, y el aumento de la producción de estos metabolitos en plantas micorrizadas podían ser sintetizados como una respuesta de defensa a la presencia de la HMA en las raíces (Coppeta *et al.*, 2006; Karagiannidis *et al.*, 2011).

**Cuadro 9.** Presentación comparativa de la composición química del AE de *Thymus vulgaris* L. 1. Zac19; 2.Cedro; 3.Zac19+Cedro; 4.P61; 5.Bioforte; 6.Testigo.

N°	Componente	Concentración (%)					
		1	2	3	4	5	6
1	2-metil ácido butanoico		0.21	-	-	0.19	-
2	$\alpha$ -Tujueno	0.84	1.06	0.87	0.7	1.15	0.87
3	$\alpha$ -Pinoeno	0.66	0.73	0.74	0.54	0.84	0.66
4	Camfeno	0.54	0.61	0.75	0.5	0.73	0.63
5	$\beta$ -Pinoeno	-	-	-	-	0.2	-
6	1-Octen-3-ol	0.6	0.74	0.85	0.79	0.99	0.68
7	N-methyl-2-Piridinemetanamina	-	-	-	0.98	-	-
8	3-Octano	-	0.21	-	-	-	-
9	$\beta$ -Mirreno	1.14	1.38	1.13		1.45	1.17
10	$\alpha$ -Terpineno	-	1.76	-	1.25	-	1.37
11	$\alpha$ -Felandreno	-	-	-	-	0.18	-
12	2-Careno	1.08	-	1.16	-	1.83	-
13	<b>O-Cimeno</b>	<b>21.79</b>	<b>18.62</b>	<b>20.38</b>	<b>17.15</b>	<b>19.37</b>	<b>16.66</b>
14	3-Careno	-	-	-	0.44	-	-
15	Limoneno	-	0.54	-	-	0.59	-
16	D-Limoneno	0.5	-	0.51	-	-	-
17	Eucaliptol	0.63	0.42	1.41	0.75	0.52	0.7
18	<b>J-Terpineno</b>	<b>11.8</b>	<b>17.91</b>	<b>11.94</b>	<b>12.8</b>	<b>17.84</b>	<b>13.97</b>
19	cis- $\beta$ -Terpineol	0.75	0.83	0.78	0.74	0.73	0.82
20	<b>Linalol</b>	<b>3.06</b>	<b>2.88</b>	<b>2.21</b>	<b>2.13</b>	<b>2.51</b>	<b>1.77</b>
21	d-2-Bornanon	-	-	-	-	1.11	-
22	<b>Alcanfor</b>	<b>0.65</b>	<b>0.97</b>	<b>0.67</b>	-	-	-
23	Borneol	-	-	1.94	1.94	1.27	-
24	L-Borneol	1.69	1.06	-	-	-	1.93
25	Terpinen-4-ol	0.66	0.62	0.58	0.64	0.75	0.39
26	$\alpha$ -Terpineol	0.23	-	0.28	-	0.73	-
27	Timol metil éter	0.68	0.24	0.39	0.57	-	-
28	Isotimol metil éter	-	0.79	-	-	0.73	0.73
29	Acetato de Bornilo	-	-	-	-	0.25	0.54
30	Acetato de L-Bornilo	-	-	0.26	-	-	-
31	<b>Timol</b>	<b>48.08</b>	<b>43.24</b>	<b>50.66</b>	<b>51.05</b>	<b>43.73</b>	<b>52.55</b>
32	<b>Carvacrol</b>	<b>2.78</b>	<b>2.04</b>	<b>1.15</b>	<b>3.37</b>	<b>0.51</b>	<b>3.42</b>
33	2-cyano-Acetamida	-	1.28	-	1.82	1.00	-
34	Cariofileno	1.31	1.56	0.93	1.84	1.27	0.68
35	Oxido de Cariofileno	0.53	-	0.39	-	0.23	-
36	Isolimoneno	-	0.27	-	-	-	-

## **6.2 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo con la aplicación de un fitorregulador de crecimiento, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares**

### **6.2.1 Diámetro de inhibición**

Los aceites de *Thymus vulgaris* L. mostraron tener un gran potencial de la actividad antibacteriana contra *E. coli*. (Cuadro 10), ya que según Uzel *et al.* (2004) las zonas de inhibición  $\geq 3$  mm se consideran como de alta actividad. La dilución diferentes diluciones de AE mostraron diferencia significativa en el diámetro de inhibición, la concentración que demostró tener mejor efecto fue al 50% (Cuadro 10).

En la concentración al 50% los tratamientos tuvieron diferencias significativas (Figura 20); el tratamiento con mayor diámetro de inhibición correspondió a las plantas inoculadas con P61; en contraste el tratamiento con menor diámetro de inhibición fue el testigo. En el análisis del AE por cromatografía de gases se observó que en cada tratamiento la composición del AE es diferente.

El efecto antibacteriano del AE está relacionado con sus componentes, el timol conforma un 40 a 53% del AE de tomillo, ha sido reportado por varios autores como un potente agente antimicrobiano; este compuesto es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, debido a que se une a las

membrana bacteriana de manera hidrofóbica y por puentes de hidrógeno, lo que causa perturbaciones en la membrana, incrementando la permeabilidad, que conducen a la pérdida de iones de potasio y ATP intracelular y finalmente la muerte celular. También se ha reportado que el timol inhibe la germinación de esporas, el crecimiento y la multiplicación celular en bacterias (Alonso, 2004; García *et al.*, 2008; Nejad *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2014).

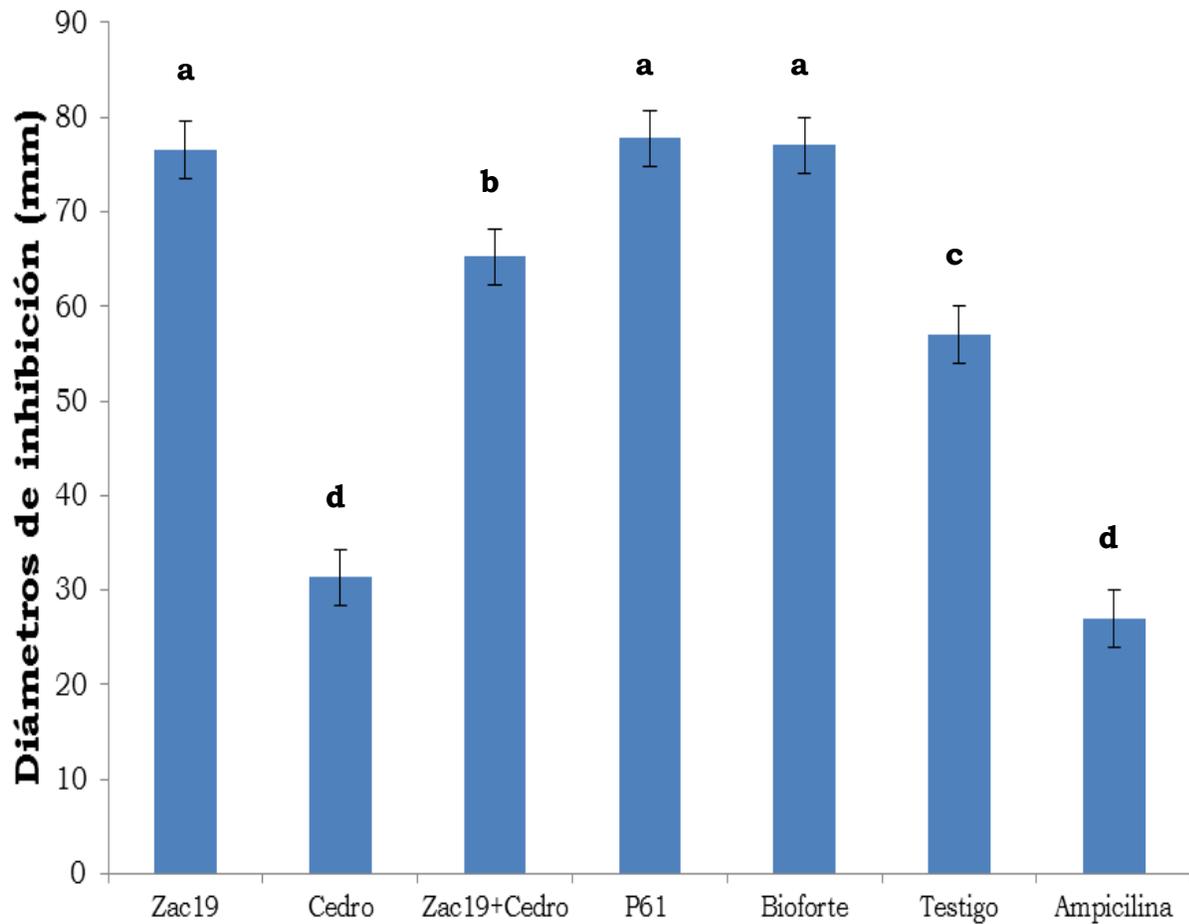
**Cuadro 10.** Actividad antibacteriana del AE de *Thymus vulgaris* L. en *Escherichia coli* DH5-Alpha en función de los diámetros de inhibición del crecimiento de la bacteria (mm  $\pm$  error estándar; n=9).

<b>Tratamiento y concentración (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Zac19</b>	<b>Cedro</b>	<b>Zac19+ Cedro</b>	<b>P61</b>	<b>Bioforte</b>	<b>Testigo</b>	<b>Ampicilina</b>
15	25.2 <b>c</b> ( $\pm$ 2.3)	11.3 <b>b</b> ( $\pm$ 0.5)	31.3 <b>b</b> ( $\pm$ 1.9)	35.1 <b>c</b> ( $\pm$ 0.8)	34.1 <b>c</b> ( $\pm$ 1.3)	27.0 <b>c</b> ( $\pm$ 1.2)	27.1 <b>a</b> ( $\pm$ 1.1)
20	68.4 <b>b</b> ( $\pm$ 1.4)	33.0 <b>a</b> ( $\pm$ 1.1)	64.8 <b>a</b> ( $\pm$ 1.5)	46.3 <b>b</b> ( $\pm$ 1.6)	72.5 <b>b</b> ( $\pm$ 2.2)	39.0 <b>b</b> ( $\pm$ 2.3)	26.4 <b>a</b> ( $\pm$ 0.85)
50	76.5 <b>a</b> ( $\pm$ 1.7)	31.3 <b>a</b> ( $\pm$ 1.4)	65.2 <b>a</b> ( $\pm$ 1.4)	77.7 <b>a</b> ( $\pm$ 1.1)	77.0 <b>a</b> ( $\pm$ 1.5)	57.0 <b>a</b> ( $\pm$ 1.2)	27.0 <b>a</b> ( $\pm$ 1.0)

Medias con letras iguales en una columna no fueron significativamente diferentes (DMS, 0.05). El diámetro del testigo fue 10.0 mm.

Sin embargo, también se considera la sinergia de los componentes menores, así como una posible interacción. Otros constituyentes, tales como C-terpineno, han demostrado ejercer buena actividad debido a su posible sinérgica o efectos antagónicos. El monoterpeno hidrocarbonado p-Cimeno

(precursor biológico del timol) es hidrofóbico y causa turgencia en la membrana citoplasmática, esta sustancia no es tan efectiva cuando se usa sola, pero cuando es combinada con Carvacrol se ha observado sinergismo (Rosas *et al.*, 2011). Se ha observado que la sinergia de los componentes inhiben distintas rutas bioquímicas y enzimas. Los componentes de los AE también pueden actuar sobre las proteínas que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática. Hay estudios que demuestran los efectos antibacterianos de eugenol y carvacrol en *E. coli*, los resultados demuestran una disminución del potencial de membrana al exponer las células microbianas a estos compuestos (Ennomoto *et al.*, 1991). Burt *et al.* (2007) señalaron que las células de *E. coli* crecen en presencia de carvacrol a una concentración de 1mM pero se inhibe la síntesis de flagelos provocando que el microorganismo crezca sin movilidad.



**Figura 20.** Actividad antibacteriana del AE al 50% de *Thymus vulgaris* L. en *Escehriquia coli* DH5-Alpha en función de los diámetros de inhibición del crecimiento de la bacteria (mm  $\pm$  DMS; n=9). Medias con letras iguales no fueron significativamente diferentes (DMS, 0.05).

## 7. CONCLUSIÓN

La aplicación de un fitorregulador comercial, la inoculación de HMA y RPCV tienen efectos diferentes en el desarrollo vegetativo de *Thymus vulgaris* L. así como en la calidad, composición y rendimiento de su aceite esencial.

La actividad antibacteriana del AE de tomillo depende de su composición química, en este caso los resultados demuestran que el potencial de la actividad antibacteriana del AE se ve afectada por la respuesta del tomillo frente a los diferentes tratamientos de cultivo.

El rendimiento más alto de AE se presentó en las plantas inoculadas con P61, así mismo en este tratamiento el timol conforma un 50% del AE. Los resultados obtenidos cumplen con las características que demanda el mercado ya que los aceites más demandados son aquellos que presentan compuestos fenólicos como constituyentes mayoritarios, también se acatan a los requisitos de calidad que exige la Norma ISO 6754:1996.

Respecto a los HMA, los resultados demuestran que existen diferencias en el proceso de colonización de los HMA y en los beneficios que le proporciona a las plantas de tomillo. Respecto al rendimiento de AE y la concentración de timol el inóculo Zac19 fue el más efectivo.

La presente investigación nos brinda una mejor comprensión respecto a la interacción organismos benéficos del suelo (HMA y RPCV) y *Thymus vulgaris* L. en condiciones de cultivo en campo. Los HMA y las RPCV (P61) tuvieron un

papel importante en la mejora crecimiento de las plantas de tomillo, así como en la calidad y rendimiento de su AE; por lo tanto son una buena opción para ser utilizados como inoculantes para mejorar crecimiento de las plantas en condiciones de campo.

El AE de tomillo tiene un gran potencial de actividad antibacteriana contra *E. coli*, lo que sugiere puede tener una amplia gama de aplicaciones.

## 8. LITERATURA CITADA

- Alarcón A. 2007. Micorriza arbuscular. In Ferrera-Cerrato R., Alarcón A. Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Trillas, México. 97-98 p.
- Ahmed E, Hassan E, Tobgy K, Ramadan E. 2014. Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. *Annals of Agricultural Science* 59(2): 273–280.
- Alonso J. 2004. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Editorial Corpus. Argentina. 1350 p.
- Alpaslan D, Arslan M, Rusu L. 2013. Effects of harvesting hour on essential oil content and composition of *Thymus vulgaris*. *Farmacia* 61 (6): 1194-1203.
- Amad A, Männer K, Wendler KR, Neumann K, Zentek J. 2011. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ideal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry Science* 90: 2811–2816.
- An-Dong S, Qian L, Jian-Guo H, Ling Y. 2013. Influence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth, Mineral Nutrition and Chlorogenic Acid Content of *Lonicera confusa* Seedlings Under Field Conditions. *Pedosphere* 23: 333–339.
- Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi E, Casabianca H, Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud F, Elaissari A. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 483: 220–243.

- Assured Produce The Growing Partnership. 2009. Crop specific protocol. Herbs (culinary). UK: CROP ID 38. Assured Food Standars.
- Avalos G, Perez-Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Bailey L. 1963. Manual of cultivated plants. Macmillan Pub Co. 1116 p.
- Banchio E., Bogino P., Zygadlo J., Giordano W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology 36: 766–771.
- Bareño P. 2006. Hierbas aromáticas culinarias para la producción en fresco manejo agronómico, producción y costos. En Clavijo J, Bareño P, Guido C, Chaparro L. Últimas tendencias de hierba aromáticas culinarias para exportación en fresco. Colombia: Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008 Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology 46: 446–475.
- Bose S, Kumar R, Mishra S, Sangwan R, Singh A, Mishra B, Srivastava A, Sangwan N. 2013. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. Plant Physiology and Biochemistry 66: 150-158.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001 Production of plant secondary metabolites: a historical perspective . Plant Science 161: 839–851.
- Brahmkshatriya P, Brahmkshatriya PS. 2013. Natural Products. KG Ramawat, Mérillon JM. Terpenes: Chemistry, Biological Role and Therapeutic Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2667-2684.

- Cappellari L, Santoro M, Nieves F, Giordano W, Banchio E. 2013. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* 70: 16– 22.
- Cappellari L, Santoro M, Reinoso H, Travaglia C, Giordano W, Banchio E. 2015. Anatomical, morphological, and phytochemical effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on peppermint (*Mentha piperita*). *J Chem Ecol* 41:149–158.
- Cortez-Gallardo V, Macedo-Ceja JP, Hernández-Arroyo M, Arteaga-Aureoles G, Espinosa-Galván D, Rodríguez-Landa JF. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Annual Review of Biomedical Engineering* 15:123-136.
- Cheng A, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen XY. 2007. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (2): 179–186.
- Chizzola R. 2013. Natural Products. KG Ramawat, Mérillon JM. Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2973-3003.
- Chlodwig F, Johannes N. 2010. Sources of Essential Oils. K. Can HB, Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. US: CRC Press, 39-73.
- Colombo R, Martínez A, Fernández F, Fernández L, Baren C, Lirab P, Godeasa A. 2013. Differential effects of two strains of *Rhizophagus intraradices* on dry biomass and essential oil yield and composition in *Calamintha nepeta*. *Rev Argent Microbiol.* 45(2):114-118.

- Copetta A, Lingua G, Berta G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* 16:485–494.
- De La Rosa C. 2009. Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Cantharanthus roseus* (L.) G. Don. (Tesis de doctorado) Estado de México: Colegio de Postgraduados, 2009.
- Durmus A, Mehmet A, Rusu L. 2013 Effects of harvesting hour on essential oil content and composition of *thymus vulgaris*. *Farmacía* 61 (6): 1994-1203.
- El-Nekeety A, Mohamed S, Hathout A, Hassan N, Aly S, Abdel-Wahhab M. 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. *Toxicon* 57: 984–991.
- Ferguson L, Lessenger J. 2006. Plant Growth Regulators. Lessenger J. *Agricultural medicine*. Springer, New York, 156-166 p.
- Fontana A, Reichelt M, Hempel S, Gershenzon J, Unsicker SB. 2009. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on direct and indirect defense metabolites of *Plantago lanceolata* L. *J Chem Ecol* 35:833–843.
- García-Nieto L. 2000. Las plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín económico de ICE*. 2652.
- Ghasemi A, Hashemib M, Taherian F. 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 48: 43– 48.

- Guerrero L, Ruiz P. 2012. El cultivo de plantas aromáticas, una alternativa agroindustrial para ejidos y comunidades agrarias. México. Editorial del Colegio de Postgraduados. 67 p.
- Gupta M.L., Prasad A., Ram. M., Kumar S. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81:77-79.
- González-Stuart A, Rivera JO. 2009. Comparison of herbal products use in two largest border communities between the US and México. *Herbalgram* 81: 58-66.
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93.
- Hendawy S, El-Din A, Aziz E, Omer E. 2010. Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization conditions. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3(2): 203-216.
- Holmes, C. 2005. IENICA summary report for the European Union 2000-2005. Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications.
- Ibarra E, Téllez R, Soto-Hernández Marcos, Martínez M, García-Mateos R, Miguel-Chávez Rubén. 2009. Actividad antimicótica in vitro de erisovina. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (4): 327-330.
- Juárez-Rosete CR, Aguilar-Castillo JA, Juárez-Rosete ME, Bugarín-Montoya R, Juárez-López P, Cruz E. 2013 Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Bio Ciencias* 2: 119-129.

- Juárez-Rosete CR. Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo (Tesis de doctorado) Estado de México: Colegio de Postgraduados, 2010.
- Kapoor R, Chaudhary V, Bhatnagar AK. 2007 Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza* 17:581–587.
- Karagiannidisa N, Thomidisa D, Panou-Filothoua E, Karagiannidoua C. 2011 Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. *Scientia Horticulturae* 129: 329–334.
- Karamanos A, Sotiropoulou D. 2013. Field studies of nitrogen application on Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) essential oil during two cultivation seasons. *Industrial Crops and Products* 46: 246– 252.
- Keltawi N, Croteau R. 1987. Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of the lamiaceae. *Phytochemistry* 26 (4): 891-895.
- Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M, Zitterl-Eglseer K, Novak J. 2006 Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16 (6): 443-446.
- Kumar A, Shukla R, Singh P, Shekhar C, Kishore N. 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 575–580.
- Kuklinski C. 2003. *Farmacognosia*. Ed. Omega. Madrid. 515 p.

- Leggett H, Cornwallis C, West S. 2012. Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. Springer New York.
- Lubbe A, Verpoorte R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 34: 785–801.
- Mahmood S, Ahmad M, Ahmad Z, Javaid A, Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429–448.
- Marcel G, Heijden A, Bardgett RD, Straalen NM. 2008 The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296–310.
- Mendoza C. 2002. Usos terapéuticos del temazcal. México: UACH\_Fitotecnia. Chapingo.
- Mendiola U, Montalbán J. 2009. Plantas aromáticas gastronómicas. Madrid: Mundi-Prensa Libros. 191 p.
- Meng L, Schroeder C. 2007. *Escherichia coli*. En Simjee S. Infectious Disease: Foodborne Diseases. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 132 p.
- Mona M, Oraby AM. 2014. Essential oils from some Egyptian aromatic plants as an antimicrobial agent and for prevention of potato virus y transmission by aphids. *Annals of Agricultural Science* 58(1): 97–103.
- Mok M, Martin R, Mok D. 2000. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:102–107.

- Muñoz F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. España: Mundi-Prensa. 365 p.
- Muñeton PP. 2009 “Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo”. Revista Digital Universitaria.
- Naghdi H, Yazdani D, Mohammad S, Nazari F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. Industrial Crops and Products 19: 231–236.
- Nejad S, Hadian J, Mirjalili M, Sonboli A, Yousefzadi M. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food Chemistry 110:927–931.
- Nikolić M, Glamoclija J, Ferreirab I, Calhelhab R, Fernandesb A, Markovicc T, Markovicd D, Giwelie A, Sokovica M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumoractivity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Industrial Crops and Products 52:183– 190.
- OMS. Mayo 2015. Disponible en [www.who.int](http://www.who.int).
- Ortuño M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones AIYANA. España. 274 p.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Microbiology 6: 763-775.
- Phillips J, Hayman D. 1970. Improved procederes for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55:158-161.

- Pérez CR. 2009. Frutas y hortalizas orgánicas de la red de mercados y tianguis orgánicos de México. Estudio del Sial. Claridades Agropecuarias 194: 25-45.
- Rapparini F, Llusà J, Peñuelas J. 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua*. L. Plant Biol (Stuttg) 10(1):108-22.
- Reyes I, Valery A. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento Del maíz (*Zea mays* l.) Con *Azotobacter* spp. Bioagro 19 (3): 117-126.
- Regnault-Roger C, Charles V, John T. 2012 Essential Oils in Insect Control. Annu. Rev. Entomology: 57:405-424.
- Riahia L, Ghazghazic H, Ayarid B, Aouadhie C, Klayb I, Chogranif H, Cherifb A, Zoghlamia N. 2015. Effect of environmental conditions on chemical polymorphism and biological activities among *Artemisia absinthium* L. essential oil provenances grown in Tunisia. Industrial Crops and Products 66: 96–102.
- Rota M, 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.
- Sánchez-Verdugo C, Lucero-Flores M. 2012. Nichos de mercado de especies aromáticas orgánicas tipo gourmet. México. CINBOR. Editorial Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.
- Sangwan NS, Farooqi AH, Shabih F and Sangwan RS. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation 34: 3–21.

- Santoro S, Zygadlo J, Giordano W, Banchio E. 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry* 49:1177-1182.
- Sárosia S, Siposb L, Kókaib Z, Pluhára Z, Szilvássyc B, Nováka I. 2013. Effect of different drying techniques on the aroma profile of *Thymus vulgaris* analyzed by GC-MS and sensory profile methods. *Industrial Crops and Products* 46: 210– 216.
- Sasanelli N, Anton A, Takács T, D’addabbo T, Biro I, Malov X. 2009 Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the nematicidal properties of leaf extracts of *Thymus vulgaris* L. *Helminthologia* 46 (4): 230 – 240.
- Schauenberg P, Ferdinand P. 1972. *Guía de plantas medicinales*. Barcelona Ediciones Omega.
- Schmidt E. 2010. Production of Essential Oils. K. Can HB, Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. US: CRC Press, 83-120.
- Sell C. 2010. Chemistry of Essential Oils. K. Can HB, Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. US: CRC Press, 121-150.
- Simon R, Haydayb A, Bottomlyc K. 1991. Cytokines in T-cell development. *Immunology Today* 12: 239–245.
- Sneader W. 2005 *Drug discovery: A history*. UK: John Wiley & Sons, Ltd. 448 p.

- Sudriá C, Piñol M, Palaz J, Cusidól R, Vila R, Morales C, Bonfill M, Cañigüeral S. 1999. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 177–184.
- Tapia-Goné J., Ferrera-Cerrato R., Varela-Fregoso L., Rodríguez-Ortiz J., Soria-Colunga J., Tiscareño-Iracheta M., Loredó-Osti C., Alcalá-Jáuregui A., Villar- Morales C. 2010. Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salino en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana De Micología* 31: 69-74.
- Tarkka M, Schrey S, Hampp R. 2008. Plant Associated Soil Micro-organisms. C Nautiyal, P Dion. *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Soil Biology* 1-51 p.
- Teles S, Pereirab J, Muniz L, Malheiro R, Lucchese A, Silva F. 2014. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. *Industrial Crops and Products* 60: 217–225.
- Usano J. Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* VAHL (Tesis de doctorado). Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2012.
- Uzela A, Guvensena A, Cetinb E. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 95:151–154.
- Xinxin C, Beizhou S, Yuncong Y. 2014 Aromatic plants play an important role in promoting soil biological activity related to nitrogen cycling in an orchard ecosystem. *Science of The Total Environment* 472: 939–946.

- Wagner H, Bladt S. 2001. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 369 p.
- Zellner B, Dugo P, Dugo G, Mondello L. 2010. Analysis of Essential Oils. . K. Can HB, Buchbauer G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. US: CRC Press, 151-177.
- Zeng Y, Lan-Ping G, Bao-Dong C, Zhi-Peng H, Ji-Yong W, Lu-Qi H, Guang Y, Xiu-Ming C, Li Y, Zhao-Xiang W, Mei-Lan C, Yan Z. 2013 Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives. *Mycorrhiza* 23: 253-265.
- Zubek S, Stojakowska A, Anielska T, Turnau K. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Inula ensifolia* L. *Mycorrhiza* 20:497–504.