

Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* y su efecto en la membrana citoplasmática



<https://cu-id.com/2247/v38e19>

Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil on *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and its effect on the cytoplasmic membrane

¹Annie Rubio Ortega^{1*}, ²María C. Travieso Novelles¹, ²Mylene Corso López²,
²Beatriz Alvarez Pita¹, ²Odaylin Plascencia Marquez², ²Güendis Leal Sanabria²,
²Yaíma Sánchez Pérez¹, ²Ivette Espinosa Castaño³, ²Oriela Pino Pérez¹

¹Laboratorio de Ecología Química, Grupo Plagas Agrícolas, Dirección Sanidad Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

²Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

³Departamento de Microbiología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque. Teléfono: 47863014 ext-180.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., extraído de plantas cultivadas en Cuba, sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap) y su efecto en la membrana citoplasmática. Se evaluó la actividad antibacteriana por los métodos de difusión en agar con discos y diluciones seriadas, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Se realizó el ensayo de tiempo de muerte celular para evaluar la rapidez del efecto bactericida. Para determinar el efecto sobre la membrana, se realizaron los ensayos de bacteriólisis, pérdida de contenido celular y determinación de proteínas totales liberadas por acción del aceite. El aceite esencial de *T. vulgaris* posee una actividad antibacteriana fuerte sobre la cepa Xap1, con una CMI de 0,3 mg. ml⁻¹ y una CMB de 0,6 mg. ml⁻¹. Esta esencia, a la CMB, provoca la muerte de 10⁶ UFC. ml⁻¹ de Xap1 en 30 min de exposición. El aceite de *T. vulgaris* incrementa la permeabilidad de la membrana de Xap1, con la salida de componentes celulares, lo cual desencadena la muerte celular.

Palabras claves: aceite esencial, *Thymus vulgaris*, modo de acción, *Xanthomonas phaseoli*.

ABSTRACT: The objective of this work was to determine the antibacterial activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. plants cultivated in Cuba on *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and its effect on the cytoplasmic membrane. The antibacterial activity was evaluated by agar diffusion methods, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by serial dilutions. The cell death time assay was performed to assess the bactericidal effect rapidity. To determine the effect on the membrane, assays for bacteriolysis, loss of cell content, and total proteins release by the action of the oil were carried out. *T. vulgaris* essential oil showed a strong antibacterial activity on Xap1, with a MIC of 0.3 mg. ml⁻¹ and a MBC of 0,6 mg. ml⁻¹. At the MBC, this essence caused death of 10⁶ UFC. ml⁻¹ of Xap1 in 30 min of exposure. *T. vulgaris* oil increased permeability of the Xap1 membrane with the egress of cellular components, which triggered cell death.

Keywords: essential oil, *Thymus vulgaris*, mode of action, *Xanthomonas phaseoli*.

INTRODUCCIÓN

La producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es importante a nivel mundial, debido al valor nutricional del grano. La Bacteriosis común o el Tizón Bacteriano del frijol es una enfermedad que afecta la producción del grano, de ahí que constituye una amenaza económica y agrícola para la industria de semillas (1). Esta devastadora infección bacteriana, se propaga a través de semillas infectadas por dos especies: *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* y *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (2). Esta última, se reconoce como uno de los principales patógenos aislados de

plantas de frijol, en las regiones productoras en la provincia de Mayabeque, en Cuba (3).

El uso de semillas libres de contaminación, obtenidas a partir de prácticas de saneamiento y el uso de productos químicos, es una de las principales alternativas para el control de las bacterias que constituyen plagas agrícolas (4). La aplicación de antibióticos, sales metálicas con actividad antimicrobiana y plaguicidas químicos son prácticas prohibidas en varios países, debido al impacto negativo sobre el medio ambiente, la toxicidad en los seres humanos y animales, así como en la acumulación que estos provocan en la cadena de alimentación (5, 6).

*Correspondencia a: Annie Rubio Ortega. E-mail: annie@censa.edu.cu

Recibido: 29/03/2023

Aceptado: 13/07/2023

Además, el control de bacterias fitopatógenas está limitado por la poca disponibilidad de bactericidas agrícolas (7). En la Unión Europea, la resolución 354/2014, limita el uso de compuestos de cobre (8), los cuales se utilizaron para el control de las bacterias fitopatógenas, debido al impacto negativo en el ambiente. Consecuentemente, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas de agentes antimicrobianos naturales o bioplaguicidas amigables con el medio ambiente.

Los aceites esenciales, constituyen mezclas naturales formadas por numerosos metabolitos secundarios de las plantas, que poseen actividad antibacteriana de amplio espectro de acción, incluso, sobre cepas resistentes a antibióticos (9). El aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., planta conocida popularmente como tomillo, se utiliza desde la edad antigua, por su aroma, como condimento y preservante de alimentos (10). La esencia de tomillo es rica en compuestos fenólicos como timol, ρ -cimeno y γ -terpipeno, los cuales le confieren una potente actividad antibacteriana de amplio espectro de acción (10). Sin embargo, se desconoce la actividad de la esencia de *T. vulgaris*, obtenida de plantas cultivadas en Cuba, sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* y los posibles efectos sobre la membrana citoplasmática de este fitopatógeno.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *T. vulgaris* extraída de plantas cultivadas en Cuba, sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* y su efecto en la membrana citoplasmática de este fitopatógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceite esencial y cepa bacteriana

El aceite esencial de *T. vulgaris* se obtuvo en el laboratorio de Ecología Química del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) por el método de hidrodestilación, durante 3 h con equipo Clevenger (11). Se utilizó la cepa de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1), procedente de una muestra de campo, que pertenece a la colección del laboratorio de Bacteriología Vegetal del CENSA, caracterizado por métodos bioquímicos y moleculares (3, 12).

Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana se determinó por los métodos de difusión en agar con discos (DAD) (13) y diluciones seriadas (14). Se prepararon suspensiones bacterianas de Xap1 a 10^8 UFC. ml^{-1} , en solución salina estéril (SS), según escala de McFarland, a partir de un cultivo en medio Agar Nutriente (AN, Biocen) incubado durante 24 h a 28°C. La concentración de inóculo, en las suspensiones, se verificó por conteo de colonias viables en unidades formadoras de colonia (UFC. ml^{-1}) en placas de AN.

Para el método de difusión en agar con discos, se tomaron alícuotas de 100 μl de la suspensión bacteriana y se sembraron con espátulas de Drigalsky en placas Petri estériles de 9 cm de diámetro, con 20 ml de AN. Se colocaron cuatro discos de papel de filtro estériles (Whatman No. 1) de 6 mm de diámetro, de forma equidistante, sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas.

En cada placa se aplicaron 10 μl del aceite esencial puro en dos discos, y otros dos discos se utilizaron como control negativo (sin aceite). Como control positivo se utilizaron discos de estreptomycin (10 μg /disco; Liofilchem) y discos impregnados con 10 μg de sulfato de cobre (Merck), a partir de una solución de sulfato de cobre a 1 μg . μl^{-1} . Las placas se incubaron a 28°C (24 h) y se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento alrededor de los discos. La evaluación se realizó por cuatuplicado para cada tratamiento.

Para la determinación de la CMI y CMB se utilizó método de diluciones seriadas en el medio caldo nutriente (CN, Biocen) con dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) a 1 μl . ml^{-1} para facilitar la solubilidad del aceite. El aceite esencial de *T. vulgaris* se aplicó en el rango de concentraciones de 0,150 a 2,4 mg. ml^{-1} , con diluciones en base 2. Se distribuyó 1 ml por tubo y se le adicionó 1 ml de medio con DMSO y la suspensión bacteriana (10^6 UFC. ml^{-1}), que se preparó, previamente, a partir de un cultivo en medio AN incubado durante 24 h a 28°C.

Se incluyeron, como controles del ensayo, sin suspensión bacteriana: medio de cultivo CN, medio de cultivo NC con DMSO (1 μl . ml^{-1}), medio CN con DMSO (1 μl . ml^{-1}) y aceite a la máxima concentración de los tratamientos (2,41 mg. ml^{-1}). Como control negativo, se utilizó medio de cultivo CN con DMSO (1 μl . ml^{-1}) inoculado con la suspensión de Xap1 a la misma concentración de los tratamientos. El ensayo se realizó por triplicado y todos los tubos se incubaron a 28°C con agitación a 17,8 rad/s.

La CMI se determinó después de 24 h de incubación, y se estableció como la mínima concentración del aceite que inhibió el crecimiento visible del microorganismo, después de la incubación. Para la CMB se tomó una asada de cada tubo y se sembró en una placa de medio AN, y se incubaron a 28°C (24 h). La CMB fue la concentración más baja del aceite, que resultó en un subcultivo negativo. Este ensayo se repitió en tres experimentos independientes.

Tiempo de muerte celular

El tiempo de muerte celular de Xap1, ante la exposición al aceite esencial de *T. vulgaris* se determinó por conteo de células viables (15). Una suspensión de células de 10^6 UFC. ml^{-1} se preparó en solución salina estéril (SS) según escala de McFarland, y se mezcló 1:1 con caldo nutriente (CN) que contenía el aceite

esencial de *T. vulgaris* a las CMI y CMB en tubos eppendorff de 1,5 ml, para una concentración final de 5×10^5 UFC. ml⁻¹. La concentración final del aceite en los tratamientos fue de 0,3 mg. ml⁻¹ para la CMI y de 0,6 mg. ml⁻¹ para la CMB. Se aplicó Tween 80 (0,1 %) para mejorar la solubilidad del aceite en el medio de cultivo. Como control, se utilizó la suspensión de células bacterianas en CN con el disolvente. Las muestras se agitaron e incubaron a 28°C, con agitación en zaranda termorefrigerada (IKA® KS 4000 i control).

Se tomaron muestras a tiempo 0, 1, 4, 8, 12, 16, y 24 h de incubación. Las muestras se centrifugaron a 524 rad/s por 10 min (centrífuga, Eppendorf 5424R), se lavaron con 1 ml de SS, y resuspendieron en 100 µl de SS. Se sembraron 20 µl de las diluciones seriadas en base 10, de cada muestra, en dos placas de agar nutriente, y se incubaron a 28°C (24 h). Se contaron las unidades formadoras de colonias después de la incubación. Este experimento se realizó por triplicado.

Para determinar, con mayor precisión, el tiempo de muerte celular por acción de la esencia de *T. vulgaris* a la CMB sobre Xap1, se realizó un estudio a intervalos más cortos de tiempo (0, 15, 30, 45 y 60 min). Para esto se utilizó el procedimiento descrito anteriormente, con el control y el tratamiento con el aceite a la CMB.

Bacteriólisis

El ensayo de bacteriólisis se realizó siguiendo el método estándar de Carson *et al.* (16), con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión bacteriana en SS de $1,2 \times 10^9$ UFC. ml⁻¹, según escala de McFarland, de un cultivo de Xap1 de 24 h de incubación en AN a 28°C. Posteriormente, este inóculo se centrifugó a 524 rad/s por 10 min (centrífuga, Eppendorf 5424R), se lavó dos veces con SS (SS) y finalmente, se resuspendió en SS con Tween 80 (0,1 %; v/v). La suspensión bacteriana se ajustó a 9×10^8 UFC. ml⁻¹ McFarland, y se mezcló 1:1 con SS que contenía el aceite esencial de *T. vulgaris* a las CMI y CMB, en tubos eppendorff de 1,5 ml para una densidad final de 5×10^8 UFC. mL⁻¹. Por la poca solubilidad del aceite en el medio, se empleó como disolvente Tween 80 (0,1%).

Como control, se empleó la suspensión de células bacteriana en SS, con el disolvente empleado. Las muestras se agitaron e incubaron a 28°C, con agitación en zaranda termorefrigerada (IKA® KS 4000 i control). Se tomaron muestras a tiempo 0, 1, 2, 4 h de incubación. Las muestras se centrifugaron a 524 rad/s por 10 min (centrífuga, Eppendorf 5424R), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado formado en SS, y se agitó por 20 s en agitador de tubos (Vortex mixer). Luego, se midió la absorbancia (Abs) a 620 nm en un espectrofotómetro (Ray Light UV-2601). Cada muestra se preparó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes. Los

resultados se expresaron como la relación (en %) de la Abs₆₂₀ de cada tiempo, contra la Abs₆₂₀ en t₀.

Pérdida de contenido celular

La pérdida de contenido celular se determinó por medición de Abs a 260 nm. La preparación del inóculo y de las muestras se realizaron de igual manera que en el ensayo anterior. Las muestras se agitaron (Zaranda termorefrigerada (IKA® KS 4000 i control)) e incubaron a 28°C. Se tomaron muestras a tiempo 0, 1, 2 y 4 h de incubación. Las muestras se centrifugaron a 524 rad/s por 10 min (centrífuga, Eppendorf 5424R), se tomó el sobrenadante y se agitó por 20 s en agitador de tubos (Vortex mixer). Luego, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Ray Light UV-2601).

Cada muestra se preparó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados se expresaron como la relación (en %) de la Abs de cada tiempo contra la Abs en t₀, para 260 y 280 nm.

Determinación de proteínas totales liberadas

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (17). La preparación del inóculo y las muestras se realizó de igual modo que en el ensayo de pérdida de contenido celular. Las muestras se agitaron e incubaron por 2 h a 28°C, con agitación en zaranda termorefrigerada (IKA® KS 4000 i control). Se centrifugaron a 524 rad/s por 10 min (centrífuga, Eppendorf 5424R), se tomó el sobrenadante y se agitó por 20 s en agitador de tubos (Vortex mixer). 100 µl de cada muestra fueron disueltos en 100 µl de agua destilada (1:1), y se les añadió 1 ml de solución de Lowry; se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y se le añadieron 100 µl del reactivo de Folin (Sigma) para incubarse por 30 min. Se utilizó además, el lauril sulfato sódico al 1 % (Sigma) y la albúmina bovina sérica (Sigma) se empleó como patrón.

Se midió la absorbancia a 730 nm en un espectrofotómetro (Ray Light UV-2601). Cada muestra se preparó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes. Los resultados se expresaron en la media ± error estándar. Este ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes.

Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza simple, y las medias se compararon mediante la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan, a una probabilidad de error al 5 % ($p < 0,05$), usando el paquete estadístico InfoStat/L versión de 2018. Además, los resultados del ensayo de pérdida de contenido celular se analizaron por comparación de medias, por intervalos de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Antibacteriana

El aceite esencial de *T. vulgaris* posee actividad antibacteriana fuerte sobre Xap1 (Tabla 1). Los diámetros de inhibición del crecimiento, obtenidos por la esencia, son significativamente superiores a los valores obtenidos con los controles estreptomycinina y sulfato de cobre. Además, para este último compuesto metálico, no se observó inhibición del crecimiento.

El halo de inhibición obtenido por el aceite esencial de *T. vulgaris* sobre Xap1, se extendió en la superficie del agar, ocupando casi su totalidad, aunque solo se ubicaron 2 discos de la esencia y dos discos controles sin ella. Esto sugiere que la esencia actúa por difusión en el agar y que, además, sus vapores también poseen actividad sobre Xap1. Según la escala de actividad antibacteriana de aceites esenciales propuesta por Mazzarino, el aceite esencial de *T. vulgaris* posee una actividad antibacteriana fuerte sobre Xap1, que se denota con diámetros de halos superiores a los 20 mm (18). Este resultado concuerda con lo informado para esta esencia cubana sobre otras bacterias Gram negativas; incluso, sobre fitopatógenas como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (20).

En cuanto a los controles del ensayo, Xap1 es sensible a discos del antibiótico estreptomycinina (10 µg), y no se mostraron halos de inhibición significativos con el sulfato de cobre (10 µg). El antibiótico estreptomycinina es uno de los de mayor uso para la desinfección de semillas, aunque esta práctica se prohibió en varios países ante el incremento de la concentración de este compuesto químico en el suelo y en productos agrícolas, lo que incide en un aumento de la resistencia de los microorganismos a antibióticos (21). En cuanto a la no inhibición del crecimiento de Xap1 con el sulfato de cobre, esto puede estar relacionado con el uso extensivo de este producto para la desinfección y protección de semillas. Otros autores refirieron la resistencia del género *Xanthomonas* a este compuesto metálico, utilizado como ingrediente activo en diversos productos para la agricultura (22).

Por otra parte, el valor de CMB del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre Xap1 resultó dos veces la CMI (Tabla 1). Esta relación entre los valores, es

común para los aceites esenciales y coincide con lo informado para el quimiotipo timol de esta esencia sobre *X. vesicatoria* (23). La esencia de *T. vulgaris*, a nivel mundial, se reconoce por su actividad sobre varias especies del género *Xanthomonas* (24, 25, 26). Sin embargo, en la literatura no se informa su acción sobre la especie *X. phaseoli*, lo cual demuestra la importancia de los resultados obtenidos en este trabajo.

La actividad antimicrobiana de un aceite esencial depende de la composición química del aceite esencial y de las características genéticas del microorganismo evaluado. En función de la composición química de la esencia, la actividad puede variar según el quimiotipo de la planta, las condiciones de edafoclimáticas del cultivo y el proceso de obtención (27). Por ello, es importante evaluar la actividad de un aceite esencial obtenido en condiciones diferentes a las informadas en la literatura. La actividad de la esencia varía según el microorganismo, sus características genéticas intrínsecas y aquellas adquiridas mediante el contacto con el medio ambiente; esto ocurre entre un mismo género, especie y hasta nivel de aislados (27).

Tiempo de muerte celular

La viabilidad celular de Xap1 se afecta por acción del aceite esencial de *T. vulgaris* (Fig 1). Desde el tiempo 0 se muestra una pendiente negativa, tanto para el tratamiento con la CMI (0,3 mg. ml⁻¹) como para la CMB (0,6 mg. ml⁻¹), indicando la reducción de la carga bacteriana. Este fenómeno se acentúa en la suspensión bacteriana de Xap1 tratada con la CMB, después de 1 h de contacto, con reducción de 6 Log de UFC. ml⁻¹ y a partir de este tiempo el daño es irreversible a esta concentración. Para la CMI, la reducción de la carga bacteriana ocurre con una cinética de pendiente más prolongada, con una muerte celular total a las 24 h de tratadas las células de Xap1 a esta concentración. El tratamiento control se mantuvo con una cinética de pendiente positiva, indicando el crecimiento celular, lo que sugiere que el comportamiento en los grupos tratados fue por la acción del aceite esencial de *T. vulgaris*.

En un estudio de la CMB con intervalos de tiempos más cortos, se observó que en 15 min ocurre la eliminación del 98 % de la población bacteriana, lo que se enmarca como el tiempo de muerte celular. Además, se evidenció el daño irreversible a partir de los 30 min de tratamiento (Fig 1-B).

Tabla 1. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*/ Antibacterial activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* on *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*.

Tratamientos	Diámetro de inhibición (mm)	CMI	CMB
<i>T. vulgaris</i> (10 µl)	89,5 ± 0,5 a	0,3 mg.ml ⁻¹	0,6 mg.ml ⁻¹
Estreptomycinina (10 µg)	19,5 ± 1,8 b	-	-
CuSO ₄ (10 µg)	6,5 ± 0,3 c	-	-

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Datos representados: Media ± Error estándar, n=4.

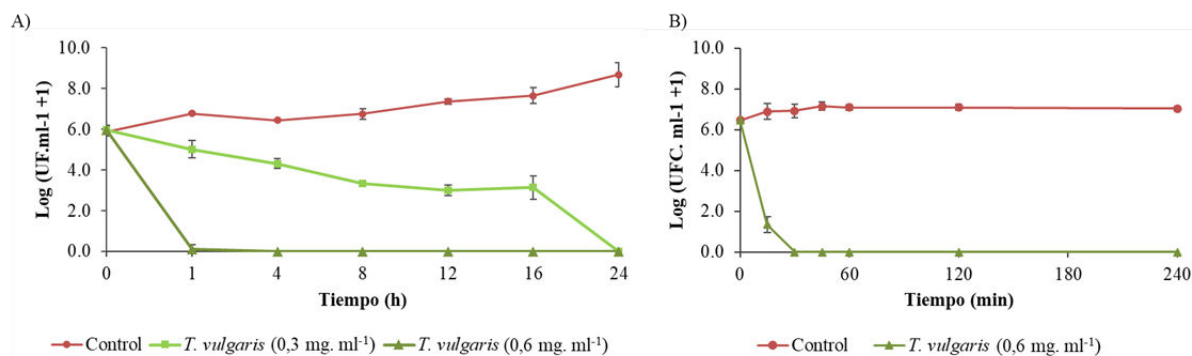


Figura 1. Tiempo de muerte celular de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1) por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris*. A) en intervalos de tiempos hasta 24 h, B) con intervalos de tiempos cortos en 4 h. Datos representados: Media \pm Error estándar, n=6. / Cell death time of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1) by action of the essential oil of *Thymus vulgaris*. A) in time intervals up to 24 h, B) with short time intervals in 4 h. Represented data: Mean \pm Standard error; n=6.

En la literatura no se encontraron estudios de muerte celular de esta especie fitopatógena y del aceite esencial, referido en este artículo. No obstante, el componente mayoritario de esta esencia es el timol (28), terpenoide que afecta el conteo de células viables de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, después de 40 min de tratamiento a una CMI 0,75 mg. ml⁻¹ (29). Por lo general, los estudios de aceites esenciales sobre bacterias fitopatógenas son menos abundantes que los estudios sobre bacterias patógenas de animales y humanos, razón por la cual se utilizan con frecuencia las cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* o *Pseudomonas* spp. como modelos de bacterias Gram negativas.

La principal actividad de los aceites esenciales, por lo general, se debe a sus componentes mayoritarios, aunque existen componentes minoritarios en el aceite esencial que pueden potenciar la acción de los mayoritarios (30, 31). Cada componente puede actuar en más de un sitio y por diferentes mecanismos (32), de ahí la importancia del estudio del aceite esencial como un producto con un análisis integral de su modo de acción y con los componentes que se encuentran en la esencia a las concentraciones reales, como el mostrado en este trabajo.

Integridad celular

El aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMB, induce cambios en la absorbancia de la suspensión de células bacterianas de Xap1, a 620 nm (Fig 2). Las células tratadas con la esencia poseen menor porcentaje de absorbancia que las del tratamiento control en los tiempos evaluados, lo cual demuestra el efecto del aceite esencial. Además, se observó una reducción del porcentaje de absorbancia dependiente del tiempo, inferior al 80 %, después de 90 min de tratamiento, lo que sugiere que el aceite esencial de *T. vulgaris* induce la lisis celular a partir de este tiempo. El tratamiento control se mantuvo sin mostrar diferencias, con leve crecimiento en el tiempo, que se ajusta a las

condiciones de incubación en un medio que no contiene nutrientes, utilizado para establecer las comparaciones con los grupos tratados.

El ensayo de bacteriólisis está diseñado para deducir el daño en la integridad celular, basado en las alteraciones o ruptura en la membrana celular de las bacterias. La absorbancia inferior al 80 % con respecto a la inicial de una suspensión bacteriana, sugiere la lisis de las células tratadas (15), efecto observado en las suspensiones bacteriana de Xap1 después de 90 min de tratados con la esencia de *T. vulgaris*.

Sin embargo, la actividad antibacteriana no siempre implica una disminución de la absorbancia celular, como muestran los resultados obtenidos para los primeros 60 min. En este tiempo no se muestran cambios en el porcentaje de absorbancia significativos con el control, pero ya había ocurrido la muerte celular de la población bacteriana a la CMB del aceite esencial. Este resultado sugiere que, antes de los 30 min de tratamiento, la esencia de *T. vulgaris* puede provocar cambios en la permeabilidad de la membrana, que permiten la entrada a nivel celular con modificaciones del proceso metabólico hasta desencadenar la muerte celular (16).

El timol, componente mayoritario de esta esencia, provoca la destrucción de la membrana externa e interna de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium a 0,75 mg/mL (29). El ρ -cimeno, otro componente de esta esencia, es reconocido por expandir las membranas, lo que facilita el paso de terpenoides (timol y carvacrol) al interior celular en *E. coli* a 2,5 mg. ml⁻¹ (33). Estos datos sugieren que la acción de la esencia de *T. vulgaris* sobre Xap1 puede estar relacionada con su componente mayoritario y con compuestos minoritarios que logren potenciar la acción de dicha esencia.

En la literatura consultada no se encontraron estudios de bacteriólisis del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre *Xanthomonas*. No obstante, se conoce que los aceites esenciales provocan cambios en la fluidez, estabilidad y curvatura de la membrana, con la conse-

cuente salida de iones y componentes celulares sin dañar la estructura externa (10). Esto debilita la membrana, lo cual influye en la pérdida de la resistencia ante la presión osmótica (9).

Pérdida de contenido celular

El aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMB provoca cambios en la permeabilidad de la membrana de Xap1, lo que se refleja ante la salida de material citoplasmático absorbente a 260 y 280 nm (Fig 3). La salida de material absorbente a 260 y 280 nm de células de Xap1, depende del tiempo de exposición a la esencia, siendo significativo con respecto al control a partir de una 1 h de tratadas las células. La absorbancia a 260 y 280 nm de material citoplasmático se reconoce como

señal para ácidos nucleicos y proteínas (34). Este resultado confirma los cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana de Xap1.

Los cambios en las propiedades de la membrana externa provocan la salida de compuestos intracelulares, como iones, aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas (32). La salida de estos compuestos es considerada una medida del daño en la barrera selectiva al intercambio con el medio, y puede reflejarse con mayor proporción en la muerte celular (9).

Un factor importante en la erradicación de los patógenos bacterianos es el deterioro de la integridad de la membrana celular. Serán necesarias futuras investigaciones con la utilización de métodos más sensibles, para determinar el sitio o los sitios dianas de acción de este aceite sobre la membrana externa de Xap1, ya sea

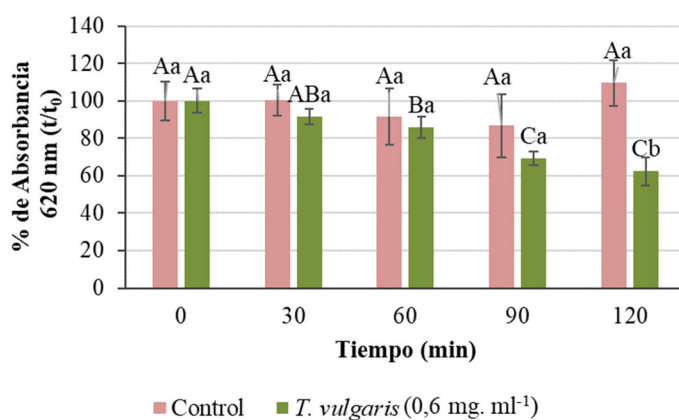


Figura 2. Integridad celular de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1) por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* a la CMB. Datos representados: % de la media de DO \pm Error estándar, n=6. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las absorbancias de los tratamientos en un mismo tiempo ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las absorbancias de los tiempos de un tratamiento ($p < 0,05$). / Cell integrity of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1) by the action of the essential oil of *Thymus vulgaris* at the MBC. Data represented: % of mean OD \pm Standard error; n=6. Different capital letters indicate significant differences between the absorbance of the treatments at the same time ($p < 0.05$). Different lower-case letters indicate significant differences between the absorbance of the times of a treatment ($p < 0.05$).

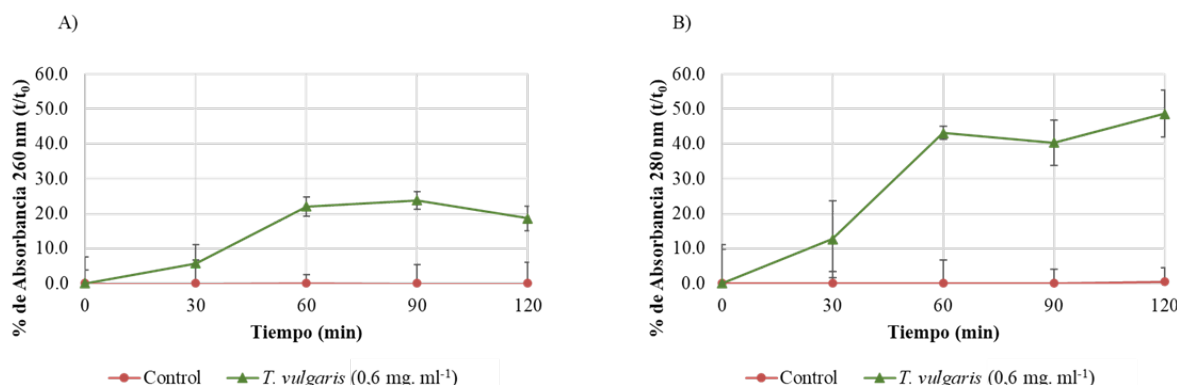


Figura 3. Cinética de pérdida de contenido celular de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1) por acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* a la CMB, en porcentaje de material citoplasmático, liberado al medio extracelular, absorbente a 260 nm (A) y 280 nm (B). Datos representados: Media del % \pm Error estándar, n=4. / Cell content loss kinetics of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1) by the action of the essential oil of *Thymus vulgaris* at the MBC in percentage of (A) 260- and (B) 280-absorbing cytoplasmic material released to the extracellular medium. Represented data: Mean % \pm Standard Error; n=4

por daño en la estructura del lipopolisacárido o en las proteínas de membrana.

Determinación de proteínas totales liberadas

Las células planctónicas de Xap1, después de 2 h de tratamiento con el aceite esencial de *T. vulgaris* a la CMB, liberaron proteínas totales al medio de forma significativa, con respecto al control (Tabla 2). La medición se realizó a las 2 h de tratado, debido a la señal de mayor absorbancia del ensayo de pérdida de contenido celular a 280 nm. Se observaron diferencias significativas en la cuantificación de proteínas totales liberadas de Xap1 tratadas con el aceite esencial de *T. vulgaris* después de 2 h de tratadas, ratificando la acción de la esencia cubana.

Tabla 2. Determinación de proteínas extracelulares método de Lowry, después de la acción del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xap1). / Determination of extracellular proteins by Lowry method after the action of AeTv on Xa p1.

Tiempo (h)	Proteínas totales (mg. ml ⁻¹)	
	Control	<i>T. vulgaris</i> a la CMB
0	8,34 ± 0,41 B a	193,28 ± 2,83 A b
2	9,41 ± 0,17 B a	207,24 ± 3,07 A a

Letras mayúsculas distintas en la misma fila implica medias significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras minúsculas distintas en la misma columna implica medias significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La cuantificación de proteínas totales en el exterior del medio extracelular sugiere la presencia de proteínas citoplasmáticas y de membranas, lo que ratifica el daño a esta barrera. El resultado obtenido demuestra la potente acción de esta esencia sobre la membrana de Xap1, aunque para mayor especificidad se requieren otros ensayos que comprueben la actividad de complejos enzimáticos claves para la vida celular.

Por otra parte, la hidrofobicidad de los componentes de los aceites esenciales pueden inhibir inespecíficamente estructuras de las membranas o proteínas embebidas, como las ATPasas, involucradas en la generación de ATP en la generación de pH intracelular o sobre enzimas involucradas en la regulación del proceso energético celular (15). Se conoce que, componentes como el timol, modifican la expresión y la composición de proteínas en la membrana externa de *Erwinia amylovora* (ATCC 29850) aislada de pera y de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ICMP 9017) aislada de papa (35).

Los resultados de este estudio demuestran que el aceite esencial de *T. vulgaris*, de plantas cultivadas en Cuba, posee actividad antibacteriana fuerte sobre *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. provocando cambios en la permeabilidad de membrana, sin lisis de la estructura, con la salida de componentes celulares al medio

extracelular, afectación de procesos metabólicos ante la salida de ácidos nucleicos y proteínas, hasta provocar la muerte celular. Esta investigación tiene significación en el marco de los productos naturales contra plagas bacterianas. Según la literatura consultada, existen muy pocos estudios de modos de acción de productos botánicos sobre bacterias fitopatógenas, las cuales provocan enormes daños económicos y alimentarios.

Los estudios de modos de acción son herramientas claves para el registro de un producto, combinarlo con otros y/o alternarlo con otros componentes que pudieran tener efecto sinérgico, aditivo o por diferentes mecanismos. De ahí, que son fundamentales para incorporar este tipo de productos en el manejo integrado de plagas y así evitar la creciente resistencia a productos plaguicidas.

Los aceites esenciales, como plaguicidas botánicos, son biodegradables, de baja toxicidad, no dañan el medio ambiente y su costo de producción es bajo (36). Sin embargo, pocos productos basados en aceites esenciales han llegado al mercado internacional debido a las grandes exigencias de organismos reguladores (37), que demandan la demostración del modo o los mecanismos de acción de estos compuestos empleados, como ingredientes activos de formulaciones.

Los estudios de modo de acción de un aceite esencial son complejos, debido a que estas esencias están formadas por múltiples componentes que pueden actuar por diferentes vías, o incluso compuestos minoritarios pueden potenciar la actividad de los que se encuentran en mayor proporción y unido a que un mismo compuesto puede actuar sobre diferentes sitios dianas. No obstante, deducir cuales son las principales vías que desencadenan el daño celular son imprescindibles el registro de un producto y en la lucha contra la resistencia a plaguicidas.

CONCLUSIONES

Con este trabajo se demuestra la actividad antibacteriana fuerte del aceite esencial obtenido a partir de *Thymus vulgaris* cultivado en Cuba sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. El efecto bactericida se asocia con el incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, que induce a la salida de componentes celulares que comprometen la vida celular.

A pesar de ser un trabajo preliminar, constituye el primer estudio de modo de acción de un aceite esencial de origen cubano sobre una bacteria fitopatógena y el primero de *Thymus vulgaris* sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. Se requieren investigaciones de mayor profundidad para descubrir qué otros componentes interactúan con la membrana externa o con proteínas de membrana, cuáles pueden ser las rutas proteicas afectadas a nivel celular, o si existen modificaciones en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el excelente trabajo técnico realizado por Cecil González en la extracción de los aceites esenciales, la disposición y colaboración de los laboratorios de Bacteriología Vegetal, y el concurso del Laboratorio de Microbiología de Control de la Calidad del CENSA, en especial a la Dra. Amalia Núñez y a la técnico Dianelys Blanco. Gratitud también a la Dra. Ileana Miranda por su apoyo en el análisis estadístico. Esta investigación se realizó en el marco del proyecto “Productos basados en aceites esenciales para el control de plagas en semillas de interés económico”, financiado por el Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal del Ministerio de la Agricultura, Cuba.

REFERENCIAS

1. Gaudin C, Gihaut C, Briand M, Marques ASA, Ferreira MASV, Jacques M-A, *et al.* Whole Genome Sequences of Nine *Xanthomonas* Strains Responsible for Common Bacterial Blight of Bean. *Microbiol Resour Announc.* 2023;12(3): e01259-22. DOI: [10.1128/mra.01259-22](https://doi.org/10.1128/mra.01259-22)
2. de Paiva B, Wendland A, Rossato M, Velloso Ferreira M d. S. Virulence and type III effector diversities of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* in Brazil. *Journal of Phytopathology.* 2022;170(1):1–14. DOI: [10.1111/jph.13049](https://doi.org/10.1111/jph.13049)
3. Corzo-López M, Rivero-González D, Zamora-Gutiérrez L, Martínez-Zubiaur Y, Martínez-Coca B. Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. *Revista de Protección Vegetal* [Internet]. 2015;30(2):97–103. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522015000200003&script=sci_arttext&tlng=pt
4. Manda R, Addanki V, Srivastava S. Bacterial wilt of solanaceous crops. *International Journal of Chemical Studies.* 2020;8(6):1048–57. DOI: [10.22271/chemi.2020.v8.i6o.10903](https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i6o.10903)
5. Kumar M, Jaiswal S, Sodhi K, Shree P, Singh D, Agrawal *et al.* PK. Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International.* 2019;124:448–61. DOI: [10.1016/j.envint.2018.12.065](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.065)
6. Katsoulas N, Løes A, Andrivon D, Cirvilleri G, de Cara M, Kir *et al.* A. Current use of copper, mineral oils and sulphur for plant protection in organic horticultural crops across 10 European countries. *Organic Agriculture.* 2020;10:159–71. DOI: [10.1007/s13165-020-00330-2](https://doi.org/10.1007/s13165-020-00330-2)
7. Kumar J, Ramlal A, Mallick D, Mishra V. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants.* 2021;10(6):1–15. DOI: [10.3390/plants10061185](https://doi.org/10.3390/plants10061185)
8. Commission implementing regulation (EU) No 354/2014 of 8 April 2014. *Official Journal of the European Union* [Internet]. 2014;354:1–18. Available from: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:JOL_2014_106_R_0004&from=EN
9. Falleh H, Ben Jemaa M, Saada M, Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry.* 2020;330:127268. DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.127268](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268)
10. Galovičová L, Borotová P, Valková V, Vukovic NL, Vukic M, Štefániková J, *et al.* *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants.* 2021;10(9):1959. DOI: [10.3390/plants10091959](https://doi.org/10.3390/plants10091959)
11. Benachour H, Ramdani M, Lograda T, Chalard P, Figueredo G. Chemical composition and antibacterial activities of *Capparis spinosa* essential oils from Algeria. *Biodiversitas.* 2020; 21 (1):161–9. DOI: [10.13057/biodiv/d210121](https://doi.org/10.13057/biodiv/d210121)
12. Constantin E, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Malderghem C Van, Vos PD, *et al.* Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology Journal.* 2016;65:792–806. DOI: [10.1111/ppa.12461](https://doi.org/10.1111/ppa.12461)
13. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests [Internet]. 13th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02>
14. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-M07 [Internet]. 11th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018 [cited. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07>]
15. Guinoiseau E, Luciani A, Serra DDR, Quilichini Y, Berti L, Lorenzi V. Primary mode of action of *Cistus ladaniferus* L. essential oil active fractions on *Staphylococcus aureus* strain. *AiM.* 2015;05(13):881–90. DOI: [10.4236/aim.2015.513092](https://doi.org/10.4236/aim.2015.513092)
16. Carson C, Mee B, Riley T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002;46(6):1914–20. DOI: [10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002)
17. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry.* 1951; 193(1):265–75. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

18. Mazzarrino G, Paparella A, Chaves-López C, Faberi A, Sergi M, Sigismondi C, *et al.* Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. Food Control. 2015;50:794–803. DOI: [10.1016/j.foodcont.2014.10.029](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029)
19. Rubio-Ortega A, Travieso-Novelles M, Riverón-Alemán Y, Peña-Rodríguez J, Espinosa-Castaño I, Pino-Pérez O. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. Revista de Salud Animal [Internet]. 2018;40(3):1–10. Available from: <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/998>
20. Rojas-Fernández M, López-Corzo M, Sánchez-Pérez Y, Brito D, Montes De Oca R, Martínez Y, *et al.* Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Revista de Protección Vegetal [Internet]. 2014;29(3):197–203. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000300006
21. Miller S, Pinto Ferreira J, LeJeune J. Antimicrobial use and resistance in plant agriculture: A one health perspective. Agriculture. 2022;12 (289). DOI: [10.3390/vetsci10050319](https://doi.org/10.3390/vetsci10050319)
22. Lamichhane J, Osdaghi E, Behlau F, Köhl J, Jones J, Aubertot J Noél. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development. 2018;38(28). DOI: [10.1007/s13593-018-0503-9](https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9)
23. Proto MR, Biondi E, Baldo D, Levoni M, Filippini G, Modesto M, *et al.* Essential Oils and Hydrolates: Potential Tools for Defense against Bacterial Plant Pathogens. Microorganisms. 2022;10(4):702. DOI: [10.3390/microorganisms10040702](https://doi.org/10.3390/microorganisms10040702)
24. Chudasama K, Thaker V. Screening of potential antimicrobial compounds against *Xanthomonas campestris* from 100 essential oils of aromatic plants used in India: an ecofriendly approach. Archives Of Phytopathology And Plant Protection. 2012;45(7):37–41. DOI: [10.1080/03235408.2011.595967](https://doi.org/10.1080/03235408.2011.595967)
25. Alonso-Gato M, Astray G, Mejuto JC, Simal-Gandara J. Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection. Antibiotics. 2021;10(1):34. DOI: [10.3390/antibiotics10010034](https://doi.org/10.3390/antibiotics10010034)
26. Mačionienė I, Čepukoit D, Šalomskienė J, Černauskas D, Burokienė D, Šalaševičienė A. Effects of Natural Antimicrobials on *Xanthomonas* Strains Growth. Horticulturae. 2021;8(1):7. DOI: [10.3390/horticulturae8010007](https://doi.org/10.3390/horticulturae8010007)
27. Aziz Z, Ahmad A, Setapar S, Karakucuk A, Azim M, Lokhat D, *et al.* Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. Current Drug Metabolism. 2018;19(13):1100–10. DOI: [10.2174/1389200219666180723144850](https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850)
28. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A, *et al.* Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. Phytotherapy Research. 2018;32(9):1688–706. DOI: [10.1002/ptr.6109](https://doi.org/10.1002/ptr.6109)
29. Chauhan A, Kang S. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* serovar *Typhimurium* *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. Research in Microbiology. 2014;165(7):559–65. DOI: [10.1016/j.resmic.2014.07.001](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.001)
30. Hossain F, Follett P, Dang Vu K, Harich M, Salmieri S, Lacroix M. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. Food Microbiology. 2016;53:24–30. DOI: [10.1016/j.fm.2015.08.006](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.006)
31. Mirzaei-Najafgholi H, Tarighi S, Golmohammadi M, Taheri P. The effect of citrus essential oils and their constituents on growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Molecules. 2017; 22(4):591. DOI: [10.3390/molecules22040591](https://doi.org/10.3390/molecules22040591)
32. Maurya A, Prasad J, Das S, Dwivedy AK. Essential Oils and Their Application in Food Safety. Front Sustain Food Syst. 2021;5:653420. DOI: [10.3389/fsufs.2021.653420](https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420)
33. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, *et al.* Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007;55(15):6300–8. DOI: [10.1021/jf070094x](https://doi.org/10.1021/jf070094x)
34. Mohandas N, Kent LM, Raudsepp A, Jameson GB, Williams MAK. Progress toward plug-and-play polymer strings for optical tweezers experiments: Concatenation of DNA using streptavidin linkers. ACS Omega. 2022;7(7):6427–35. DOI: [10.1021/acsomega.2c00198](https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00198)
35. Horváth G, Kovács K, Kocsis B, Kustos I. Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of *Erwinia* strains studied with microfluid chip technology. Chromatographia. 2009;70:1645–50. DOI: [10.1365/s10337-009-1374-7](https://doi.org/10.1365/s10337-009-1374-7)
36. Isman MB. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. Phytochemistry Reviews. 2020;19(2):235–41. DOI: [10.1007/s11101-019-09653-9](https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9)
37. Pavela R, Benelli G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. Trends in Plant Science. 2016; 21(12):1000–7. DOI: [10.1016/j.tplants.2016.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005)

Conflicto de intereses: Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Annie Rubio Ortega: **Conceptualización, metodología, análisis formal, escritura - borrador original.** María del Carmen Travieso Novelles: **Validación y redacción: revisión y edición.** Mylene Corso López: **Investigación y validación.** Beatriz Alvarez Pita: **Investigación, curación de datos.** Odaylin Plascencia Márquez: **Investigación, curación de datos.** Güendys Leal Zanabria: **Investigación, curación de datos.** Yaíma Sánchez Pérez: **Investigación y validación.** Ivette Espinosa Castaño: **Supervisión y redacción: revisión y edición.** Oriela Pino Pérez: **Conceptualización, supervisión, administración de proyecto, recursos, redacción: revisión y edición.** Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del documento.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)