

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis*) Y LIMÓN CRIOLLO (*Citrus aurantifolia*) COMO CONTROL EN EL AÑUBLO BACTERIAL DE LA PANÍCULA DEL ARROZ.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF SWEET ORANGE (*Citrus sinensis*) AND KEY LIME (*Citrus aurantifolia*) AS CONTROL IN THE BACTERIAL BLIGHT OF THE RICE PANICLE.

Pérez, A. ¹; Vitola, D. ¹; Villarreal, J. ¹; Noya B., M. ¹; Pérez P. Y. ¹; Ramírez S., A. ^{1*}; Rangel P., M. ¹.

¹Universidad de Sucre. Colombia. Correos electrónicos: Mnoyabarreto@gmail.com, yingerperez20@gmail.com, analeidisramirez@gmail.com*, Margyrangel@gmail.com.

Recibido 30 de octubre de 2017; Aceptado 5 de diciembre de 2017.

RESUMEN

Debido a la utilización extensiva de productos químicos para el control de la enfermedad llamada añublo bacterial, la cual ha provocado la emergencia de patógenos resistentes, se promueve la búsqueda de alternativas viables que garanticen mayor sostenibilidad, por lo que los aceites esenciales de cascara de naranja dulce y limón criollo se propone como

alternativa fitosanitaria para el control del añublo bacterial de la panícula del arroz.

En Colombia las enfermedades por bacterias causan entre 80 a 90% de pérdidas en producción de arroz. La bacteria *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladiolis* están asociadas como las causantes de esta enfermedad. Por lo cual el objetivo fue determinar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de cascara de Naranja dulce y limón criollo como control en el añublo bacterial de la panícula del arroz. La extracción de los aceites esenciales se realizó mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas, estos se caracterizaron por cromatografía de gases, los bioproductos se encontraban en dos estados, fresco y seco a 45 °C, llevadas a ensayos MTT, analizando los resultados por medio de ANOVA y prueba de Tukey. Esto arrojó una inhibición del 100 % a 4000 ppm, presentando el aceite esencial de cascara de naranja seca la mejor actividad inhibitoria para *B. gladiolis*, por el contrario, para *B. glumae* el aceite esencial de limón fresco fue el de mayor inhibición. Con esto se muestra que los bioproductos evaluados son una alternativa fitosanitaria para contrarrestar la enfermedad y así disminuir pérdidas causadas por estas bacterias.

Autor a quien dirigir la correspondencia del Autor: Ramírez Sevilla A. Correo electrónico: analeidisramirez@gmail.com*

Palabras claves: aceites esenciales, antimicrobiano. añublo bacterial, arroz, bacterias.

ABSTRACT

Due to the extensive use of chemical products for the control of the disease called bacterial blight, which has caused the emergence of resistant pathogens, the search for viable alternatives that guarantee greater sustainability is promoted, so the essential oils of sweet orange peel and key lime is proposed as a phytosanitary alternative for the control of

bacterial blight of the rice panicle. In Colombia, diseases caused by bacteria cause between 80 to 90 % losses in rice production. The bacteria *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladiolis* are associated as the cause of this disease. Therefore, the objective was to determine the antimicrobial effect of the essential oils of sweet orange peel and key lime as control in the bacterial blight of the rice panicle. The extraction of the essential oils was carried out by hydrodistillation assisted by microwave radiation, these were characterized by gas chromatography, and the bioproducts were in two states, fresh and dry at 45 °C, taken to MTT assay, analyzing the results by means of ANOVA and Tukey's test. This gave a 100 % inhibition at 4000 ppm, with the dry orange peel essential oil showing the best inhibitory activity for *B. gladiolis*. On the contrary, for *B. glumae*, the fresh lemon essential oil was the one with the highest inhibition. This shows that the evaluated bioproducts are a phytosanitary alternative to counteract the disease and thus reduce losses caused by these bacteria.

Key words: essential oils, antimicrobial. bacterial blight, rice, bacteria.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa*) es el principal cereal utilizado como fuente de alimentación, más del 50 % de la población a nivel mundial se beneficia de este producto. En el primer semestre del año 2017 Colombia contó con una producción de arroz paddy verde de 989.959 ton con un incremento del 29.3 % frente al mismo lapso del año 2016, con un área sembrada de 414.059 ha con una

variación de 5.5 % con relación al mismo periodo 2016 (DANE, 2017). El sector arrocerero en Colombia se ha visto afectado negativamente a partir del segundo semestre del 2009 debido a diferentes factores, uno de estos es el daño económico causado por ácaros y bacterias ya reportados en el país, siendo más severa por el cambio climático que produce extremas temperaturas

afectando la fisiología de la planta (FEDEARROZ, 2010).

A pesar de los avances logrados para diferentes sistemas de siembra prevalentes en Colombia, en la actualidad los cultivos de arroz posee un bajo nivel de competitividad ocasionado por los altos costos de producción, bajo rendimiento y baja calidad del grano, en muchos casos parte de esta problemática se debe al uso de variedades susceptibles a ataques bacterianos basados en la ideología cultural, esto limita al agricultor a no realizar buenas prácticas agrícolas como evaluaciones oportunas, utilizar semillas certificadas, controles biológicos y fertilización balanceada todo ello como manejo fitosanitario que mejoran la calidad y productividad del grano (Camargo, 2006).

También es importante destacar la falta de información y educación con la cual cuentan los agricultores sobre el manejo de bacterias (*Burkholderia gladioli* y *Burkholderia glumae*) presentes en el cultivo de arroz, llevándolos a realizar prácticas no deseadas para combatir estas con la aplicación de productos químicos que aún no están aprobados por las entidades correspondientes, los cuales generan daños al suelo, el cultivo y al medio ambiente. (Ham *et al.*, 2011).

El género *Burkholderia* fue establecido en 1992 (Quesada, García, 2014. (Yabuuchi *et al.*, 1992) Y está conformado por especies previamente incluidas en el género *Pseudomonas*. Para el año 2009 habían sido reportadas 59 especies (Coenye, 2009), las cuales se caracterizan por ser bacterias Gram-negativas, pertenecientes al *phylum* β -*Proteobacteria*, tienen forma de bacilo, un metabolismo oxidativo y son móviles (Schaad *et al.*, 2001). A nivel agronómico son importantes las especies *B. cepacia* asociada a la cebolla, *B. andropogonis* que infecta entre otros el sorgo y el maíz, *B. caryophylli* que se encuentra en clavel y *B. gladioli* que se encuentra asociado a gladiola y arroz, causando pudrición suave y necrosis severa en tejidos (Quesada, 2014. (Viallard *et al.*, 1998)), la *B. glumae* se asocia al suelo, a la rizosfera y a la superficie de diversas plantas donde se considera epífita, sin provocar daño al hospedero, pero constituyendo un importante reservorio que puede dar origen a patologías bajo ciertas condiciones en numerosos cultivos (Compant, 2008).

En Colombia las enfermedades por bacterias causan entre 80 a 90% de pérdidas en producción. La *Burkholderia glumae* es el agente principal del añublo bacterial de la panícula (ABP), cuyos síntomas que se presentan en el cultivo de arroz son: panículas erectas con pérdidas significativas

en el rendimiento por el vaneamiento o reducción del peso del grano, decoloración del grano tomando un color pajizo, raquis verde, hoja bandera sana de un color verde intenso, esterilidad de las flores e inhibición en la germinación de la semilla (Galvis, Carrillo, 2014) esta ha cobrado gran importancia como agente fitopatógeno así como el hecho de factores biológicos que se desconocen con las variedades colombianas, como es el caso de la capacidad del patógeno para desarrollar la enfermedad en semillas infectadas, lo cual puede ser fácilmente estudiado a través del análisis de diversos sistemas de infección y el conocimiento de sus características genéticas con sus relaciones ecológicas y de patogenicidad (Flores, Uribe, 2015).

La nueva tendencia en investigación en Colombia de explorar las propiedades de los residuos generados por las industrias busca el manejo de residuos como alternativa, favoreciendo la acción frente a patógenos que afectan la seguridad alimentaria. Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen por diferentes métodos de extracción, a partir de material vegetal (flores, tallos, raíces, hojas, frutos, y semillas), algunos de ellos indican actividad antibacteriana y antifúngica, evaluadas como una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y una alternativa para la preservación de alimentos (Perdones, 2016).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química, por ejemplo, frutos cítricos cuentan con un promedio de 40 compuestos, los cuales se ven influenciados por métodos específicos de cultivo, extracción y separación; los aceites esenciales de cítricos se encuentran principalmente en la cáscara de la fruta, su extracción es económicamente sostenible, ya que la cáscara constituye una pérdida para la industria de jugos de frutas; en consecuencia, el interés de estos como agentes antimicrobianos y conservantes en los alimentos abre una posible alternativa para sustituir los conservantes convencionales (Argote, 2016; Yañez *et al.*, 2013).

El manejo preventivo estableciendo épocas de cultivo ha ganado gran importancia (Sandoval, 2004), debido a que la utilización extensiva de productos químicos para el control de esta enfermedad ha provocado la emergencia de patógenos resistentes, y esto promueve la búsqueda de alternativas viables que garanticen mayor sostenibilidad (Tovar, 2008), es por ello que el aceite esencial de cascara de limón criollo (*Citrus aurantifolia*) y naranja dulce (*Citrus sinensis*) se propone como alternativa fitosanitaria para el control del añublo bacterial de la panícula del arroz. Por lo cual el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el

efecto antimicrobiano de aceites esenciales de cascara de Naranja dulce y limón criollo como control en el añublo bacterial de la panícula del arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal: Las muestras de cascara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y limón criollo (*Citrus aurantifolia*) se recolectaron durante septiembre del 2017, en San Marcos (Sucre) y en el mercado público de la ciudad de Sincelejo (Sucre). Las cuales se transportaron al laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre para su posterior tratamiento. El material se utilizó en dos estados fresco y seco para este último estado se utilizó un horno a 40 °C por 24h. Los Fitopatógenos (*B. gladiolis*, *B. glumae*) fueron suministrados por el (CIAT) al GIBA.

Extracción de aceites esenciales: La extracción de los aceites esenciales de cascara de naranja dulce y limón criollo en estado fresco y seco, se realizó por el método de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD), empleando un equipo de hidrodestilación con capacidad para 2L (balón de destilación), adicionando dentro del mismo aproximadamente 500g de material vegetal, seleccionado y troceado, y

400mL de agua destilada. Como fuente de radiación microondas se empleó un horno convencional (SAMSUNG AME9114ST) cuyo tiempo de extracción fue de 30 minutos divididos en 2 ciclos de 15 minutos cada uno. Los aceites esenciales (AE) se colectaron en un recipiente tipo Dean Stark. Los AE se separaron por decantación e inmediatamente fue almacenado en un vial transparente de 4 mL.

Obtención de las bacterias: Las cepas trabajadas fueron aisladas por el grupo de investigación de bioprospección agropecuaria, en el Laboratorio de investigaciones microbiológicas de la universidad de sucre.

Preparación de las concentraciones de cada bioproducto: Los tratamientos preparados para los AE de cascara de naranja dulce y limón criollo en sus dos estados fueron a concentraciones 1 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm y 4000 ppm. Se utilizó agua destilada estéril como solvente, dimetilsulfoxido como disolvente

orgánico (DMSO) y AE de cada vegetal, cuya preparación de las diferentes concentraciones de cada bioproducto se trabajó en cabina de flujo laminar. Los volúmenes utilizados de cada uno de los

componentes para la preparación de las concentraciones de los bioproductos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes utilizados de cada componente para la preparación del bioproducto.

[] (ppm)	H2O dest. Estéril (µl)	DMO (µl)	Aceite esencial (µl)
1	399,19	0,8	0,0004
1000	398,8	0,8	0,4
2000	398,4	0,8	0,8
3000	398	0,8	1,2
4000	397,6	0,8	1,6

Ajuste de la concentración de la *B. glumae* y *B. gladioli*: Se trabajó en cabina de flujo laminar. Se colocó a crecer las bacterias, de la cual se tomó una colonia tanto de *B. glumae* y *B. gladioli* y se inoculó sobre 9mL de caldo King B., incubado a 35 ± 2 °C por 18 horas. Luego se tomó 2mL de suspensión bacteriana y se agregó en un Erlenmeyer, a dicha suspensión se adicionó 20µl de caldo King B., después se tomó de esta mezcla un volumen X que se agregó a un tubo de cuarzo para llevar a espectrofotometría donde se midió

absorbancia (la absorbancia adecuada debe estar entre 0,1 y 0,08 a 625 nm).

Actividad antibacteriana de los extractos contra *B. glumae* y *B. gladioli*: Se utilizó placas de Elisa de 96 pozo para cada bacteria. En cada pozo se agregó 100µL de la suspensión ajustada a una concentración equivalente a una absorbancia de 0,1 a 0,08 a 625 nm, con el mismo volumen de los tratamientos. Se preparó un testigo absoluto (suspensión bacteriana + caldo King B.), un control positivo (suspensión bacteriana + ácido oxolinico) y un control negativo (suspensión bacteriana + DMSO 0,2 %).

Esta prueba se realizó por triplicado para cada tratamiento, incubados a 35 ± 2 °C por 20 horas a 160 rpm.

Actividad antimicrobiana (MTT): Pasado el tiempo de incubación, se adicionó a cada pozo 50 μ L de una solución de (0.5 mg/ml) de MTT tanto para los tratamientos como para los controles respectivos, incubados nuevamente por 2 horas aproximadamente. Luego se descartó parte del contenido de los pozos dejando una pequeña porción de

precipitado, donde se agregó 100 μ L/pozo de DMSO concentrado, se resuspendió las muestras y se determinó la densidad óptica en un lector a una longitud de onda de 492 nm. Seguido de esto, se tomó 5 μ L de cada pozo y se adicionó 15 mL de agua destilada estéril, se inoculó 10 μ L de la disolución sobre la superficie de agar King B. incubado por 3 días 35 ± 2 °C. Posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición por unidades formadoras de colonia (UFC) mediante la siguiente formula.

$$\text{Porcentaje de Índice Bactericida (\%I.B.)} = 100 - \frac{UFC_{\text{experimental}}}{Control} * 100$$

Análisis por cromatografía de gases / espectrómetro de masa (GC/MS): La determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales se efectuó mediante la técnica instrumental de Cromatografía de Gases con detector selectivo de Masa (GC/MS), utilizando un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890N acoplado a un detector selectivo de masa Agilent 5973 N y con el inyector en modo splitless. Los índices de Kóvats fueron determinados en una columna capilar no polar DB_1MS y utilizando como gas de arrastre el Helio.

La identificación tentativa de los compuestos registrados se estableció según sus

espectros de masas, usando la base de datos que presente una mayor probabilidad de coincidencia para las bases de datos NIST02.L y NIST5a.L mayores a 90% ó en su defecto usando la base de datos NIST98.L. Toda la información importante como tiempo de retención y porcentaje de área fue generada por el software MSD ChemStation.

Análisis estadístico: Se realizó un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial. Donde se hizo un análisis de varianza estableciendo la correlación de la actividad inhibitoria en función del aceite, además se aplicó una prueba múltiple de rango Tuckey. El análisis estadístico se

desarrolló utilizando el programa Statgraphics Centurión XVI.

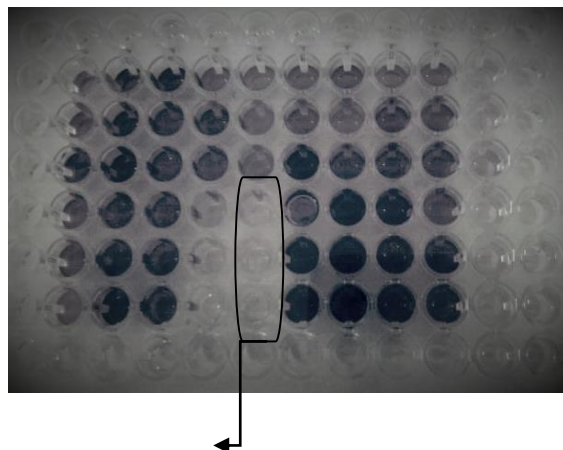
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se observan los porcentajes de inhibición de la bacteria *B. gladioli* a partir de los datos obtenidos de la ecuación del porcentaje del índice bactericida (% I.B.) de los diferentes tratamientos, en la cual se evidencia que a una concentración de 4000 ppm se inhibe el 100 % de la bacteria

utilizando AE de cascara de naranja en estado seco, no obstante, al utilizar concentraciones de 2000 ppm y 3000 ppm se alcanza inhibición mayor al 90 %, en una concentración de 1 ppm no se inhibió con AE de limón fresco con los diferentes materiales vegetales usados.

Tabla 2: Porcentaje promedio de inhibición de la bacteria *B. gladioli*.

% Bactericida en <i>B. gladioli</i> .	1 ppm	1000 ppm	2000 ppm	3000 ppm	4000 ppm
Limón Fresco (L.F)	1,093	20,929	98,142	97,459	97,350
Limón Seco (L.S)	96,940	97,432	97,350	97,377	97,568
Naranja Fresca (N.F)	97,213	96,995	96,803	97,404	97,459
Naranja Seca (N.S)	98,087	98,115	97,541	98,497	100



%I.B. N.S

Figura 1: Inhibición de crecimiento de la bacteria *B. gladioli*.

En la tabla 3 muestra los resultados obtenidos del % I.B donde la actividad inhibitoria del AE de cascara de limón fresco alcanzo el 100 % a 4000 ppm, sin embargo,

en las concentraciones de 1 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm y 3000 ppm se hallaron resultados por encima del 90 %, es decir que el AE de cascara de limón fresco es más eficiente contra la acción de *B. glumae*.

La inhibición en este caso es bajo puesto que los AE de cascara de limón seco y naranja en sus dos estados están por debajo del 90 % en los diferentes tratamientos, excepto el AE de N.F a 4000 ppm el cual arrojó un resultado de 97,623 %.

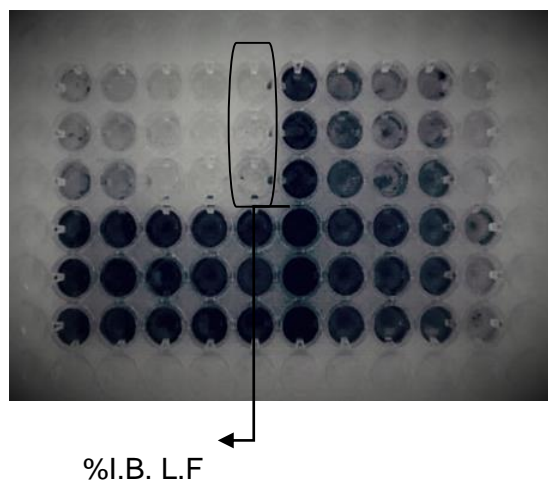


Figura 2: inhibición de crecimiento de la bacteria *B. glumae*.

El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC/MS) arrojó como metabolito mayoritario el D-Limoneno para todos los aceites esenciales evaluados.

Sin embargo, para los aceites de cascara de limón se presentó en menores proporciones con un 44,78 % para fresco y 33,33 % para seco. Mientras que para la naranja dulce mostró un 88,08 % para fresco y 87,78 % para seco.

Tabla 3: Porcentaje promedio de inhibición de la bacteria *B. Glumae*.

% Bactericida <i>B. glumae</i> .	1 ppm	1000 ppm	2000 ppm	3000 ppm	4000 ppm
Limón Fresco (L.F)	97,978	97,760	97,842	98,661	100
Limón Seco (L.S)	7,404	61,038	76,202	77,768	80,163
Naranja Fresca (N.F)	10,432	24,726	22,650	41,871	97,623
Naranja Seca (N.S)	10,246	38,469	23,607	41,885	22,677

De manera general, la figura 1 utilizando Tuckey con relación al estado de la cascara y su actividad inhibitoria muestra que el AE de cascara de limón fresco arrojó los mejores resultados en las cinco concentraciones utilizadas (1ppm, 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm y 4000ppm), mientras que la inhibición de naranja fue menor porcentajes en sus dos estados (fresco y seco). Con respecto a el porcentaje de inhibición con relación a las bacterias *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*.

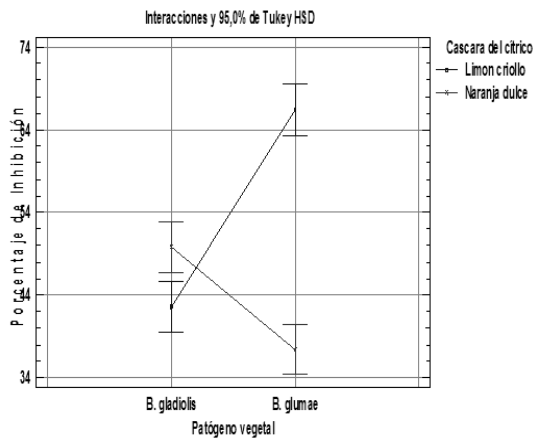


Figura 1: Porcentaje de inhibición según la condición de la cascara.

Por medio de Tuckey se determinó que el AE de limón criollo mostro mayor actividad inhibitoria frente *B. glumae*, pero para *B. gladioli fue* más eficiente el AE de cascara de naranja dulce, estos resultados presentados en la figura 2.

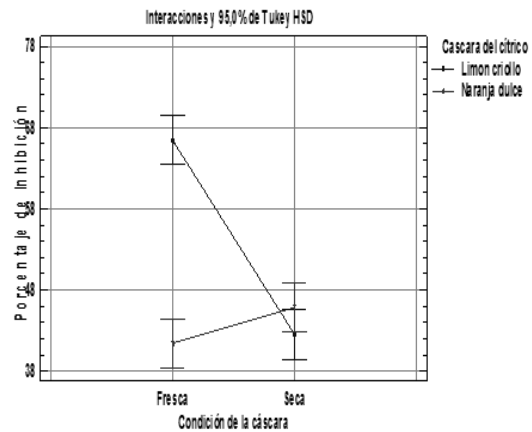


Figura 2: porcentaje de inhibición de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*

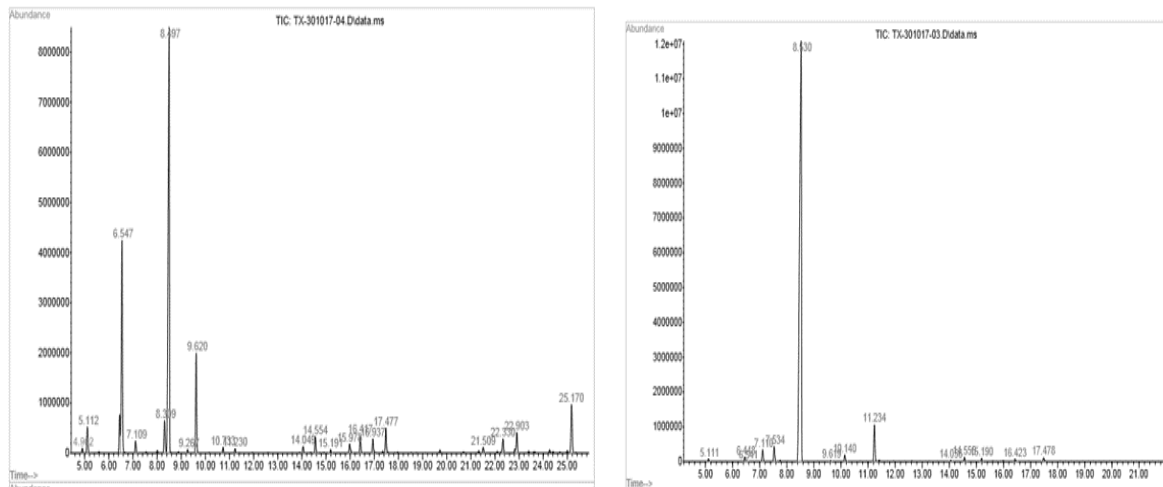


Figura 3. Porcentaje de compuesto mayoritario en L.F y N.S

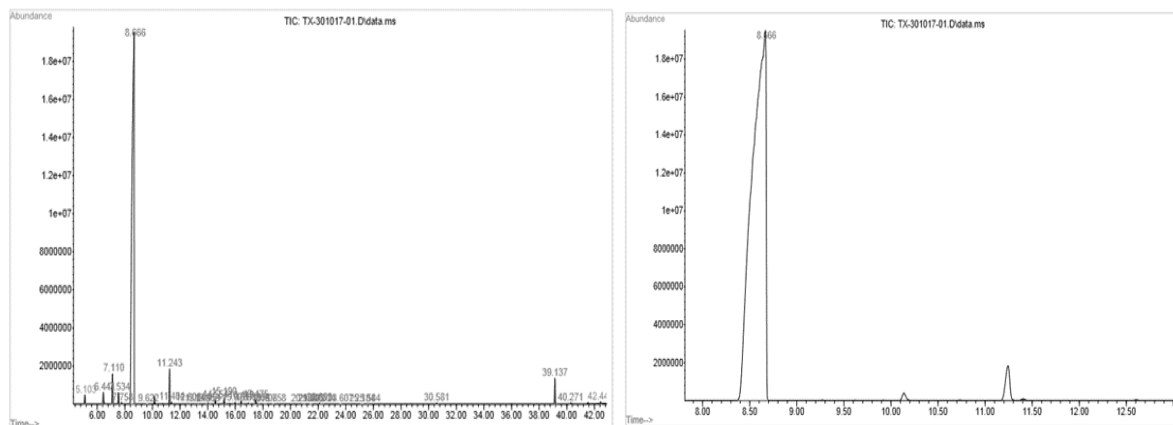


Figura 4. Porcentaje de compuesto mayoritario en N.F y LS

La técnica MWHD debido a la acción de las microondas sobre las paredes glandulares que contiene el aceite esencial, lo cual hace que el material vegetal se rompa más rápido y eficientemente. La hidrodestilación asistida por microondas utiliza tres formas de transferencia de calor dentro de la muestra: la irradiación, conducción y convección. Como resultado, produce calor con mayor

rapidez dentro y fuera de las glándulas (León, 2015). El rendimiento del AE es dependiente del método de extracción utilizado para su obtención. El proceso de hidrodestilación asistida por radiación con microondas es considerado un método rápido, eficiente, verde y relativamente económico en comparación con los métodos

de extracción convencional (Ver figuras 3 y 4).

Se reconoce que los AE dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, por ej. ciertos componentes del AE pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP (Cano, 2008). Anteriores investigaciones por autores como (Canabal, 2017), quien evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra la *Burkholderia glumae* obtuvo como resultados una inhibición mayor al 90 % utilizando concentraciones de 80 ppm, 85 ppm y 90 ppm. Por otro lado (Guédeza *et al.*, 2014) estudió el efecto fungicida de los aceites esenciales con inhibición del 100% con concentraciones de AE de 2,5% y 5% frente a hongos en postcosecha. Para (Guerra, 2014) donde el AE de naranja extraído por hidrodestilación presenta actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gran Negativas por una concentración inhibitoria mínima de 10 % y 9 %.

El mecanismo de reacción de los AE como agentes antibacterianos se debe considerar

el gran número de compuestos químicos que se encuentran presentes en los AE, cuyas actividades antibacterianas no presenta un mecanismo específico. De hecho, se desconoce que componentes o mezcla de estos son los responsables de su actividad antimicrobiana. No obstante, las características lipofílicas estas involucradas en la disolución de membranas biológicas, desarreglando estructuras y volviéndose más permeables. Químicamente el aceite esencial contiene mayoritariamente monoterpenos siendo el limoneno el que se encuentra con un mayor porcentaje de abundancia relativa como se encontró. Los resultados permiten afirmar que el componente mayoritario presente tanto en la cascara de naranja y limón criollo en sus dos estados es el D – Limoneno, aunque en los porcentajes en estado seco dicho compuesto sigue siendo el de mayor presencia por unidad de área en el material vegetal trabajado, esto debido a la volatilidad de los compuestos ante el calor. Estos resultados pueden ser corroborados por otros autores que estudiaron dos variedades de limón (*Swinglea glutinosa*) y una variedad de naranja (*Citrus sinensis* L). Díaz, *et al.*, (junio 2005) afirma que el componente mayoritario en limón es el D- Limoneno. (Carlos Díaz, 2005). Otra investigación hecha por Mariano Cerutti y Fernando Neumayer (2004) afirman que D – Limoneno tiene un 63%. (Neumayer,

2004). Otra investigación Sonia Ruby Martínez Useche (2015) afirma que el componente mayoritario en naranja es el D – Limoneno con un (90,93 %). (Useche, 2015).

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales AE evaluados mostraron inhibición *in vitro* contra los fitopatógenos ensayados (*B. glumae* y *B. gladioli*), lo que demuestra que estos bioproductos son una excelente alternativa fitosanitaria para contrarrestar la enfermedad del añublo bacterial de la panícula de arroz, y así disminuir las pérdidas causadas por

estos agentes. Los aceites esenciales AE de cascara de limón criollo (*Citrus sinensis*) y naranja dulce (*Citrus aurantifolia*) maximizan el uso de los residuos de origen agroindustrial como las empresas dedicadas a la producción de bebidas a partir de estos cítricos, por lo cual se minimiza la carga ambiental de tales residuos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Al-Jabri, N., Hossain, M. Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. (2016). *Journal of King Saud University – Science*. 60(30):1-7.

Argote, F. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (2017). *Rev. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 15(2): 52-60.

Camargo, I. Manejo del complejo acaro-hongo-bacteria nuevo reo para arroceros centroamericanos. I Taller de Seguimiento Tecnico de Proyectos Fontagro. (2006). Disponible en: https://www.fontagro.org/wp-content/uploads/2007/01/infotec_final_05_311.pdf. Consultado: 29 de octubre de 2017.

Canabal A. evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de aceites esenciales y de bacterias endófitas de *Lippia alba* y *Lippia organoides* contra *Bulkholderia glumae*.

- (2017). Tesis de grado. Universidad de Sucre.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., Ruiz, J. Actividad anticótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (Muña). (2008). *Rev. Perú Med Exp Salud pública*. 25(3):298-301.
- Cerutti, M., Neumayer, F. introducción a la obtención de aceite esencial de limón. (2015). *Rev. Invenio*. 7(12):149-155.
- Coenye, T. 2009. Modern bacterial systematics in practice: Polyphasic taxonomy of the *Burkholderia cepacia* complex. (2009). Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/presentati/on/1436/ae1ad243e82554701ad4bb297a5f448e433e.pdf>. Consultado: 29 de octubre de 2017
- Compant, S., Nowak, J., Coyene, T., Clément, C., Ait Barka, E. Diversity and occurrence of *Burkholderia spp.* in the natural environment. (2008). *Rev. FEMS. Microbiology*. 32(4):607-626.
- DANE. Boletín Técnico Encuesta Nacional de Arroz. (2017). Disponible en: www.dane.gov.co. Consultado: 12 noviembre de 2017.
- Díaz, C., Arrazola, G., Ortega, F., Gaviria, J. caracterización del aceite esencial en la corteza del limón swinglea (*Swinglea glutinosa*). (2005). *Rev. Temas Agrarios*. POR CG/EM. 5.
- FEDEARROZ. Avances del Grupo Multidisciplinario. (2010). Disponible: www.fedearroz.com.co. Consultado: 16 de noviembre de 2017.
- Flores, N.; Uribe, D. Determinación de la infección de *Burkholderia glumae* en semillas de variedades comerciales colombianas de arroz. (2014). *Rev. Facultad Nacional de Agronomía*. 64(2):6093-6104.
- Galvis, F.; Carrillo, M. Identificación y caracterización molecular de aislados de *Burkholderia glumae*, Agente Causante del Añublo Bacterial en el Cultivo de Arroz. 2015. *Rev. Información Tecnológica*. 26(3), 33-40.
- Guédez, C., Cañizaleza, L., Avendaño, L., Scorzab, J., Castillio, C., Olivarc, R., Méndez, Y., Sánchez, L. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). (2014). *Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 34:81-85.

- Guerra, L., Soto, L., Medina, Z., Ojeda, G., Peña, J. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de corteza de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. (2014). *Rev Facultad de Agronomía*. 31:215-232.
- Ham J., Melanson R., Rush M. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. *Molecular Plant Pathology*. 2011. 12(4):329-39.
- León, G., Osorio, M., Martínez, S. Comparación de los métodos de extracción del aceite esencial del *Citrus sinensis* L. (2015). *Rev. Cubana de Farmacia*. 49(4):742-750.
- Martínez, M. Karen P., Lamk. O. Lizeth S., y Álvarez G. Andrea C. (2014). Efecto Antimicrobiano del Vinagre Blanco y del Limón Criollo sobre *Staphylococcus Aureus* en ensaladas de Restaurantes del programa de alimentación escolar (PAE) de San José de Cúcuta. *Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. ISSN 1692-7125. Volumen 12 N° 1. Pp: 48 -54.
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A., Vargas, M. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. (2016). *Rev. Food Chemistry*, 197(Part a):979-986.
- Quesada, A.; García, F. *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. (2014). *Rev. Agronomía Mesoamericana*. 25(2):371-381.
- Sandoval, C. Manual técnico. Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. (2004). Disponible en: <http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/2931/1/Sandoval.pdf>. Consultado: 16 de noviembre de 2017.
- Schaad, N., Jones, J., Chun, W. *Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. Minnesota, USA. APS Press. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*.
- Tovar, J. Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma* ssp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. (2008). Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Useche, S. R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Rev. Cubana de Farmacia*. 49(4): 742-750).
- Vitola, D.; Pérez, A. Bioactividad de extracto de *Annona muricata* y aceites esenciales de *Citrus aurantium* contra *Phytophthora*

cinnamomi. (2016). *Rev Colombiana Ciencia Animal*. 8 (Supl):325-334.

Viallard, V., I. Poirier, B. Cournoyer, J. Haurat, S. Wiebkin, K. Phhel-Keller, y J. Balandreau. (1998). *Burkholderia graminis* a novel species of rhizospheric *Burkholderia* and reassessment of *Pseudomonas phenazinum* pyrrocinia and *Pseudomonas glathei* into *Burkholderia*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48:549-563.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, y M. Arakawa. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni y Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Inmunol* 36:1251-1275.

Yañez R., Xiomara, Granados C., Clemente y Durán L., Marlene. (2013). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxylla* de Pamplona (Colombia). *Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Volumen 11 N° 1. Pp: 48 -54.

Xiomara R., Yanez, Vanegas V. Gelmy, Arámbula, Claudia L., (2013). Volatile Constituents of the Essential Oil from Dried Leaves of *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) Burret obtained by using two methods. *Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. ISSN 1692-7125. Volumen 11 N° 1. Pp: 51 – 55.