

# Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de la microbiota asociada a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y otras bacterias patógenas

David Gimeno, Pedro Marco\*, Miguel Atarés y Juliana Navarro-Rocha

Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Av. Montañana 930, 50059 España.

## Resumen

La Organización Mundial de la Salud declaró en 2015 un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, lo que ha intensificado la búsqueda de alternativas, como la evaluación de extractos y compuestos de origen natural que presenten actividad antimicrobiana. Un tipo de extractos de potencial interés son los aceites esenciales obtenidos a partir de plantas aromáticas y medicinales. Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar y seleccionar diferentes aceites esenciales procedentes de diversos quimiotipos de plantas aromáticas cultivadas en Aragón (*Satureja montana*, *Mentha rotundifolia*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare* subsp. *virens*, *Salvia rosmarinus* y *Salvia officinalis*), en función de su capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos de interés agroalimentario. Estos aceites se han aplicado a microorganismos alterantes asociados a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y relacionados con la pérdida de calidad durante su conservación postcosecha. Estas cepas microbianas se aislaron de trufa fresca, para su posterior secuenciación e identificación mediante técnicas de biología molecular. El cribado inicial de los diferentes quimiotipos se realizó por la técnica de difusión en agar, y tras su selección se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida frente a estos microorganismos alterantes y otros causantes de toxoinfecciones alimentarias (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus*, y *Yersinia enterocolitica*). De todos los quimiotipos evaluados, los de *S. montana* presentaron una mayor actividad antimicrobiana frente a un mayor número de especies bacterianas. Estos resultados apoyan el uso de aceites esenciales como potenciales inhibidores de la actividad microbiana en la industria alimentaria en general y, particularmente, aporta información relevante para futuros estudios sobre conservación de trufa fresca.

**Palabras clave:** Aceite esencial, quimiotipo, trufa, *Satureja montana*, bacterias alterantes.

---

\* Autor para correspondencia: pmarcomo@cita-aragon.es

Cita del artículo: Gimeno D., Marco P., Atarés M., Navarro-Rocha J. (2024). Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de la microbiota asociada a la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y otras bacterias patógenas. ITEA- Información Técnica Económica Agraria 120(3): 208-223. <https://doi.org/10.12706/itea.2024.010>



## Antimicrobial activity of essential oils against black truffle (*Tuber melanosporum*) spoiling microorganisms and foodborne pathogens

### Abstract

The World Health Organization declared in 2015 a global action plan on antimicrobial resistance which has led to the search for natural extracts and compounds with antimicrobial activity. The essential oils from medicinal and aromatic plants have gained significant scientific relevance in the last years. Thus, the aim of the study was the evaluation and selection of different essential oils chemotypes from various cultivated plant species of Aragon (*Satureja montana*, *Mentha rotundifolia*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Origanum vulgare* subsp. *virens*, *Salvia rosmarinus* and *Salvia officinalis*) based on their ability to inhibit different microorganisms associated with the spoilage of black truffle (*Tuber melanosporum*) during its shelf life (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens*), as well as with other foodborne pathogens (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus*, and *Yersinia enterocolitica*). The mentioned spoiling bacteria were isolated from fresh black truffles and then sequenced and identified by molecular biology techniques. The screening of the antimicrobial activity was evaluated by agar disk diffusion, and microdilution broth method was used to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the selected extracts. Among the species studied, the two chemotypes of *Satureja montana* presented a greater antimicrobial activity against both Gram+ and Gram- bacteria. These results support the use of essential oils as potential inhibitors of microbial activity, especially in the food industry, and on the preservation of fresh truffles in particular.

**Keywords:** Essential oil, chemotype, truffle, *Satureja montana*, carvacrol, spoiling bacteria.

### Introducción

El uso de las plantas aromáticas y medicinales (PAM) se remonta a la antigüedad, existiendo indicios de su uso desde el año 1200 a.C en Mesopotamia, donde la química y perfumista Tapputi-Belatekallim dejó registrada en arcilla una escritura cuneiforme con la metodología para obtener esencias mediante procesos de extracción y destilación de plantas basándose en la empiria (Muñoz Páez y Garritz, 2013). Más adelante, los avances de la química y el conocimiento ecológico tradicional (TEK) de las especies locales, racionalizó el uso de estas plantas permitiendo el desarrollo de productos derivados con propiedades terapéuticas (Huntington, 2000). Por ejemplo, de *Artemisia annua* se extrae artemisina, una lactona muy efectiva para el tratamiento de la malaria y cuyos efectos fueron descritos por la medicina China tradicional (Miller y Su, 2011).

Las PAM se definen como aquellas especies vegetales cuyos principios activos proceden de compuestos aromáticos y son identificados principalmente en los aceites esenciales (AEs) que se obtienen de estas. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, siglas de Food and Drug Administration) ha reconocido más de 150 especies de plantas de las que se obtienen AEs, entre ellas destacan *Salvia rosmarinus*, *Origanum vulgare*, o el género *Thymus*, como seguras para el ser humano en el ámbito culinario. Además, existen estudios epidemiológicos que correlacionan la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales presentes en estos vegetales con una menor incidencia de enfermedades coronarias, la degeneración ocular relacionada con la edad, y el cáncer (Costa et al., 2015). Unido a estos compuestos, algunas moléculas volátiles de estos extractos tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antitumorales, antidiabéticas, antioxi-

dantes, antimicrobianas y hepatoprotectoras (Costa et al., 2015; Abdellaoui et al., 2020; Saha y Basak, 2020). La Organización Mundial de la Salud resalta que aproximadamente el 88 % de la población usa este tipo de plantas para el cuidado de la salud, lo que ha incrementado su demanda notablemente, y por tanto su cultivo (WHO, 2019). La demanda global del mercado de AEs se estimó en 247.080 toneladas en 2020 y se espera que aumente por la creciente demanda de la industria alimentaria, de cuidado personal y cosmética. La cuota de uso de los AEs en el mercado está liderada por los tratamientos para la salud, que supusieron más del 39,0 % en 2019, seguido de su uso en la industria de alimentación y bebidas (38,6 %), y de usos domésticos y otras aplicaciones médicas (Grand View Research, 2020). El valor total en importaciones y exportaciones globales de PAM supusieron 3,02 y 3,18 mil millones de dólares en 2015, respectivamente, siendo India uno de los principales exportadores, mientras que la importación estuvo liderada por Singapur, Japón, Alemania y EE.UU. (Roosta et al., 2017).

El cultivo de PAM se está potenciando en distintos municipios de la geografía aragonesa como el Somontano-Hoya de Huesca, Moncayo o Bajo Aragón y otras zonas del Sistema Ibérico turolense, que se caracterizan por la abundancia de flora espontánea aromático medicinal. Debido a su importancia, actualmente se está trabajando en mejorar la producción de AEs seleccionando aquellos fenotipos más interesantes, destacando las especies *Salvia sclarea* L., *Salvia lavandulifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja montana*, entre otras (Navarro-Rocha et al., 2020). La composición de estos aceites esenciales puede cambiar significativamente dependiendo de la región de cultivo, condiciones ambientales y agronómicas, tiempo de cosecha, etapas de desarrollo de las plantas o el método de extracción utilizado. El término quimiotipo surge para clasificar a poblacio-

nes de la misma especie botánica pero que tienen variaciones notables en la composición y concentración de varios de los compuestos que componen su perfil químico (Soria et al., 2008; Abada et al., 2020).

Estos extractos son mezclas complejas de compuestos volátiles, sintetizados por varias estructuras de las plantas durante su metabolismo secundario. La presencia de alcaloides, fenoles, y compuestos derivados de terpenos hacen que los AEs sean efectivos frente a una amplia variedad de microorganismos patógenos (Sayeed et al., 2014). El principal mecanismo de acción de los aceites esenciales se basa en su capacidad para traspasar la pared celular bacteriana y la membrana citoplasmática, induciendo cambios en la permeabilidad o integridad de la membrana plasmática y desencadenando la lisis celular (Lopez-Romero et al., 2015). Otros estudios han ampliado el conocimiento de los cambios que preceden a la muerte celular, entre los que se incluyen la formación de mesosomas o la disminución de la tolerancia a altas concentraciones de NaCl (Radulovic et al., 2013). Se conoce que el carvacrol es capaz de inhibir la producción de toxinas de *B. cereus*, y que la aplicación de AE de orégano inhibe la producción de enterotoxinas por parte de *S. aureus*, incluyendo la inhibición de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Tariq et al., 2019), propiedad que se potencia con el uso conjunto de varios AEs, como se ha observado con las sinergias entre los AEs de *Mentha pulegium* y *Mentha piperita* frente a *S. aureus* y *E. coli* (Chraibi et al., 2021). Esta capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias resistentes y su actividad frente a otros microorganismos como levaduras, hongos e incluso virus, o la capacidad de evitar la formación de biofilms (Sayeed et al., 2014; Tariq et al., 2019) los posiciona como alternativa a otros aditivos de origen sintético.

El deterioro microbiológico de los alimentos conduce a productos no aptos para el con-

sumo, produciendo importantes pérdidas económicas en la industria alimentaria, y gran cantidad de desperdicios en los hogares. Estos pueden ser alterados por agentes físicos, químicos y biológicos, como microorganismos y enzimas, responsables de procesos metabólicos diversos. Además, los microorganismos patógenos pueden ser causantes de toxiinfecciones, suponiendo un riesgo para la salud del consumidor (Preedy, 2015). Concretamente, la trufa negra (*Tuber melanosporum*) presenta perfiles microbiológicos propios de especies de origen telúrico, con recuentos totales de microorganismos elevados que oscilan entre 8 y 9 log ufc/g, encontrándose casi exclusivamente en el peridio (exterior). En otros alimentos, esta elevada carga microbiana sería un claro indicativo de deterioro biótico, o de alimentos obtenidos por procesos fermentativos. Entre los microorganismos alterantes más importantes de la trufa negra, se encuentran el género *Pseudomonas* (7,2-8,2 log ufc/g), seguido de la familia Enterobacteriaceae (3,5-6,2 log ufc/g) y la microbiota (3,5-6,2 log ufc/g) (Tejedor-Calvo et al., 2024). Además se ha estudiado la prevalencia de bacterias patógenas en las tres especies de trufa de mayor consumo a nivel global, trufa negra (*Tuber melanosporum*), trufa de verano (*Tuber aestivum*) y trufa china (*Tuber indicum*) detectando presencia de *B. cereus*, *Y. enterocolitica* y *C. perfringens* entre otras bacterias patógenas, aunque su concentración ha sido inferior a la dosis mínima infectiva establecida por la EFSA (2005), e incluso por debajo de la normativa legal europea en el caso de *L. monocytogenes* (Marco, 2015). En cualquier caso, estas bacterias son propias de la rizosfera y su presencia no parece estar ligada ni al origen geográfico ni a la especie, y no comprometen la aptitud sanitaria de la trufa, aunque se debe tener en cuenta a la hora de consumir trufa en fresco o sus derivados.

El objetivo del trabajo ha sido determinar la capacidad de inhibición de crecimiento mi-

crobiano de cepas alterantes de trufa negra (*Tuber melanosporum*) y patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias de distintos quimiotipos de aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas cultivadas en Aragón.

## Material y métodos

### **Aislamiento, identificación y selección de las cepas microbianas asociadas a la trufa negra (*Tuber melanosporum*)**

Se emplearon 5 carpóforos enteros sanos procedentes de Anento (Zaragoza). Las trufas, una vez recolectadas, fueron transportadas en cajas de poliestireno expandido bajo refrigeración hasta su llegada al laboratorio. Se cepillaron bajo el grifo, desinfectando el cepillo entre muestras, y se dejaron secar al aire. El análisis microbiológico se realizó siguiendo las Normas ISO: toma de muestras (6887-1:1999), análisis de microorganismos aeroanaerobios mesófilos totales (4833-2:2013), *Pseudomonas* spp. (13720:2011) y bacterias ácido lácticas (15214:1998).

Las trufas se homogeneizaron en un stomacher Lab-Blender Circulator 400 (Seward Laboratory, Reino Unido) en agua de peptona al 0,1 % durante 2 min a 260 rpm. Las placas de Petri se incubaron durante 5 d para seleccionar las colonias según su morfología con ayuda de una lupa binocular Leica EZ4 (Wetzlar, Alemania). Se aislaron 10 colonias en base a su morfología (6 procedentes de PCA, 2 de Agar *Pseudomonas*+CFC y 2 de Agar MRS), que se sembraron por agotamiento en agar TSA (agar tripton y soja), y se incubaron a 30 °C durante 48 h. La caracterización de colonias en Gram+ y Gram- se realizó mediante la prueba del KOH, resuspendiendo una colonia de cada cepa en un portaobjetos con una gota de esta solución al 3 % (Gregersen, 1978).

Finalmente, se realizó la identificación molecular de los microorganismos aislados mediante la secuenciación de la región 16S del ADN (Tejedor-Calvo *et al.*, 2020). Para ello, se introdujo en viales una cantidad significativa de microorganismo directamente desde cultivo puro, se añadieron 100 µl de PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, EE.UU.) y se llevaron a 100 °C durante 10 min en un termobloque (Eppendorf ThermoMixer C, Alemania). Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min (Gyrozen, Corea del Sur) y se determinó la concentración de ADN en el sobrenadante con un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). La amplificación se realizó mediante PCR (94 °C - 2 min; [94 °C - 30 s; 51 °C - 1 min; 72 °C - 1 min] × 33 ciclos; 72 °C - 7 min; 4 °C - ∞) utilizando los cebadores 8F-1492R. Posteriormente, se purificó el producto de reacción con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Inc., EE. UU.).

Para verificar la calidad de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % tamponado (Buffer Tris, Ácido acético, EDTA) y 0,8 µL de Midori Green (NIPPON Genetics GmbH, Alemania). La corriente empleada fue de 60 mV, a partir de una fuente de electroforesis BioRad PowerPac HV (BioRad, EE.UU.) y la revelación de bandas se llevó a cabo en un transiluminador (Chemidoc XRS+ BioRad, EE.UU.) con la ayuda del software GeneSys (Syngene, Reino Unido). Finalmente, se añadieron 3 µL de Primer R y 10 µL del producto de la PCR en microtubos refrigerados a 10 °C, y se enviaron a secuenciar a la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal). Las secuencias se visualizaron y depuraron con el software 4Peaks (Nucleobytes, Holanda), y se compararon con la base de datos de nucleótidos en la Web BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EEUU (NCBI, 2024).

Tras la identificación, se eligieron 4 cepas en base a su capacidad de alterar las trufas, 2

Gram+ (*Bacillus* sp. y *Microbacterium* sp.), y 2 Gram- (*Pseudomonas fluorescens* y *Yersinia enterocolitica*), esta última también es causante de toxiinfecciones alimentarias. Añadidos a este patógeno, se seleccionaron otros patógenos procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), 3 de ellos Gram+ (*Staphylococcus aureus* CECT435, *Bacillus cereus* CECT135 y *Listeria monocytogenes* CECT 911) y 3 Gram- (*Escherichia coli* O157:H7 CECT516, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT4155), debido a su importancia por encontrarse de forma natural en trufas y otras setas comestibles o durante su manipulación (Venturini *et al.*, 2011; Marco, 2015; Romanazzi *et al.*, 2016).

#### **Obtención de los aceites esenciales y análisis del perfil químico**

El Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón cuenta con varias plantaciones experimentales de plantas aromático medicinales (PAM) en producción para evaluar la productividad de diferentes especies y la calidad de los aceites esenciales (AEs) obtenidos. Inicialmente se seleccionaron 10 quimiotipos en base a su rendimiento pertenecientes a los géneros *Satureja*, *Origanum*, *Thymus*, *Salvia*, *Lavandula*, y *Mentha* (Figura 1) para hacer un cribado en función de su capacidad antimicrobiana.

Los AEs fueron obtenidos mediante hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger de acuerdo con el método descrito por la Farmacopea Europea de la Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos (EDQM), y se conservaron durante todo el estudio en viales de color ámbar y en refrigeración. Los AEs se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 acoplado a un detector de masas Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (ionización electrónica,

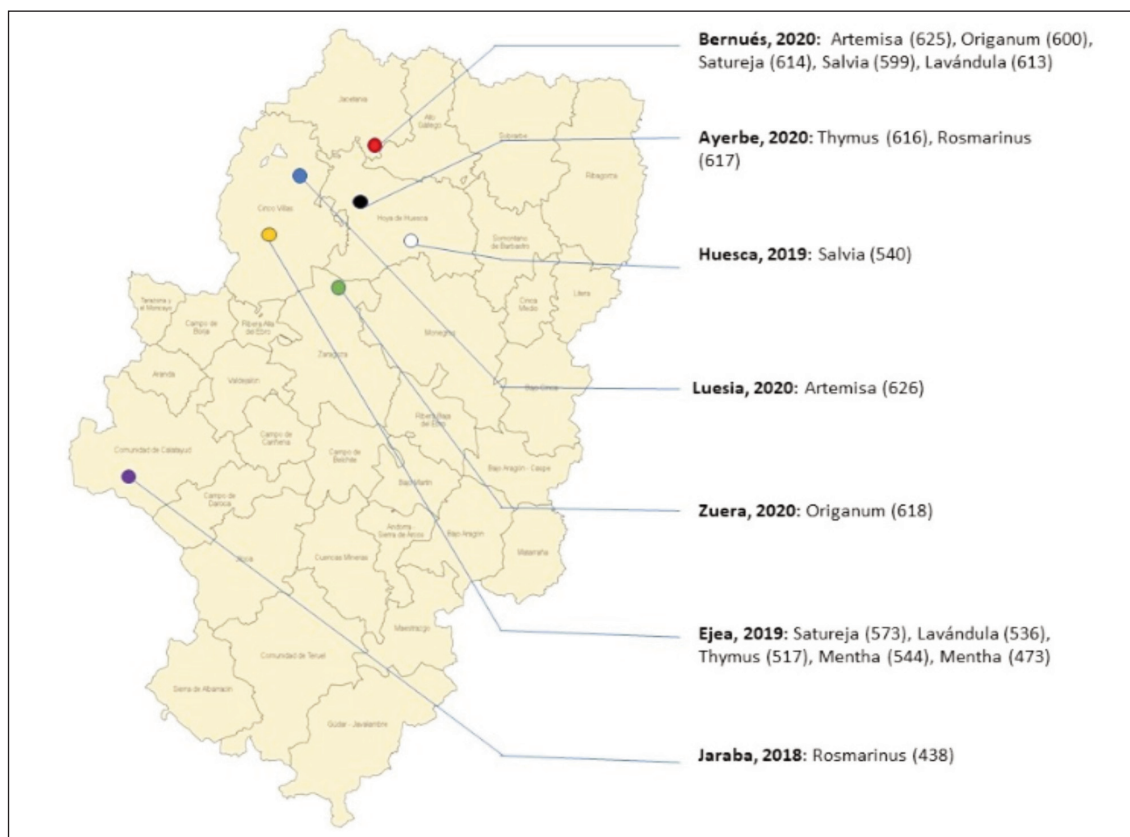


Figura 1. Parcelas experimentales de cultivo de plantas aromáticas y medicinales (PAM) localizadas en Aragón de donde se han obtenido los aceites esenciales (Aes) ensayados.

Figure 1. Experimental plots for the cultivation of aromatic and medicinal plants (PAM) located in Aragón from which the essential oils (EOs) tested were obtained.

70 eV) y equipado con una columna capilar de 30 m × 0,25 mm y 0,25 μm de espesor de película (Teknokroma TRB-5 (95 %) Dimetil-(5 %) difenilpolisiloxano). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: relación de división (20:1), T<sup>a</sup> inyector 300 °C, T<sup>a</sup> línea de transferencia conectada al espectrómetro de masas 250 °C, T<sup>a</sup> inicial de la columna 70 °C con rampa de T<sup>a</sup> (6° C/min) hasta 290 °C.

Para la identificación de compuestos, se utilizaron espectros de masas de ionización de electrones y datos de retención e índices de retención lineal calculados (LRI), que se com-

pararon con los de los estándares o encontrados en la base de datos de espectros de masas Wiley 229. Además, los tiempos o índices de retención de los estándares y marcadores conocidos de los AEs también fueron empleados para confirmar las identidades de los constituyentes.

#### **Cribado de los AEs seleccionados mediante difusión en agar**

Para seleccionar los AEs con mayor actividad antimicrobiana se hizo un ensayo de difusión

en agar por discos (Balouiri et al., 2016) enfrentando cada extracto con las 10 cepas bacterianas indicadas. Las cepas se incubaron en tubos de Caldo de Triptona y Soja (TSB) a 37 °C/24 h. Tras verificar un crecimiento visible, se realizaron diluciones hasta conseguir una concentración de 0,5 sobre la escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL). Posteriormente se sembraron 100 µL por extensión en superficie en placas de agar Mueller Hinton (MHA) y se depositaron discos de celulosa de 6 mm de diámetro impregnados con 8 µL de AE. Se utilizó agua destilada como control negativo, vancomicina como control positivo para bacterias Gram+ (20 µg/disco) y gentamicina para Gram- (10 µg/disco). Finalmente, el radio de los halos de inhibición se midió con un calibre tras incubar las placas a 37 °C/24 (Ghazanfari et al., 2020).

#### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima bactericida de los AEs**

La concentración mínima de un agente antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento visible de un microorganismos después de su incubación se denomina MIC (CLSI, 2015). Para ello, cada AE se mezcló con caldo Mueller-Hinton (MHB) y Tween 80 (Sounouvou et al., 2021) en concentraciones decrecientes (1 % -  $9,75 \cdot 10^{-4}$  %). Se añadieron 150 µL de la emulsión a la concentración correspondiente en placas de 96 pocillos y cada pocillo se inoculó con 50 µL de la suspensión bacteriana adecuada previamente ajustada a la concentración 0,5 de la escala McFarland. Se utilizó vancomicina y gentamicina como controles positivos, y MHB + Tween 80 como control negativo. Tras incubar las placas a 37 °C durante 24 h se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La MIC se estableció como la menor concentración de AE en la que hubo ausencia total de turbidez, pero sí se observó crecimiento en placa tras sembrar

100 µL en agar Mueller Hinton (MHA) e incubar las placas a 37 °C/24 h (Ghazanfari et al., 2020). Por otro lado, se consideró que la concentración mínima bactericida (MBC) de cada AE fue aquella que inhibió plenamente el crecimiento de los microorganismos en las placas de MHA tras la incubación (CLSI, 2015; Ghazanfari et al., 2020).

## **Resultados y discusión**

### **Análisis preliminar de las cepas microbianas asociadas a *Tuber melanosporum***

El origen telúrico de la trufa negra quedó patente con la alta heterogeneidad de morfologías bacterianas obtenidas tras los cultivos iniciales en placa. Dentro de la diversidad de especies microbianas asociadas a este producto, el género *Pseudomonas* resultó ser mayoritario, coincidiendo con Romanazzi et al. (2016). Las secuencias de las morfologías seleccionadas se visualizaron y limpiaron con el software libre 4Peaks (Nucleobytes, Holanda) y se identificaron mediante Blast. Finalmente, se seleccionaron 3 cepas bacterianas alterantes procedentes de la trufa negra (*Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *P. fluorescens*) y una patógena (*Y. enterocolitica*).

### **Perfil químico de los aceites esenciales**

La capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos que exhibe un AE está directamente relacionada con su perfil químico, debiéndose no solo a la actividad antimicrobiana de los compuestos químicos mayoritarios de ese extracto, si no a la sinergia ejercida entre estos compuestos y otros presentes en menor cantidad (Chraibi et al., 2021). Diversos estudios afirman que cada quimiotipo contiene una serie de moléculas que presentan un mayor efecto bactericida o bacterios-

tático responsables del potencial antimicrobiano de cada AE (Ounoughi et al., 2020; Semerdjieva et al., 2020; Kowalczyk et al., 2021). Además, los compuestos pueden presentar diferentes mecanismos de acción y establecer sinergias como sucede con el  $\alpha$ -terpineno, en sí mismo tiene un bajo efecto bactericida pero es capaz de inhibir las bombas de eflujo TetK de algunos microorganismos. En el caso de *S. aureus*, aumenta el efecto de otros antimicrobianos al no poder ser expulsados extracelularmente tan rápidamente (Limaverde et al., 2017).

La Tabla 1 muestra los perfiles químicos de los AEs que demostraron cierta actividad antimicrobiana. *T. vulgaris* presentó concentraciones moderadas de eucaliptol (15,2 %), linalol (14,7 %) y timol (9,0 %). En *L. angustifolia*, acetato de linalilo fue el compuesto más abundante llegando a suponer la mitad de su composición (50,1 %), seguido del linalol (21,5 %).

Los dos AEs de *S. montana* se caracterizaron por una alta concentración de carvacrol (41,3 % y 37,1 %), compuesto con gran efecto biocida demostrado, seguido de otros compuestos con actividad antimicrobiana como p-cimeno (17,6 % y 25,5 %),  $\gamma$ -terpineno (14,1 % y 7,1 %) y timol (3,4 % y 7,3 %). Los perfiles químicos de estos dos AEs de la misma especie presentaron diferencias en la concentración de los compuestos mencionados, así como en otros componentes minoritarios, pudiendo ser debido a su diferente procedencia. Aunque habría que estudiar el efecto de cada compuesto químico individualmente, y combinarlos para establecer sinergias, en líneas generales se puede observar como el perfil químico de los dos AEs de *S. montana* se correlaciona con su actividad antimicrobiana.

Por otro lado, el AE de *S. rosmarinus* destacó por una alta concentración de  $\alpha$ -pineno (28,4 %) y alcanfor (9,5 %), mientras que en el de la especie *O. vulgare* subsp. *virens* destacaron  $\gamma$ -terpineno (21,4 %) y p-cimeno (10,6 %). Finalmente, el AE de *M. rotundifolia*,

mostró un perfil químico muy diferente al resto de especies estudiadas, con concentraciones más bajas de los compuestos mencionados anteriormente; únicamente destacó el limoneno como compuesto común entre ellas, con un 6,6 % de abundancia. Aunque presentó un perfil complejo y con cantidades interesantes de otros compuestos como la piperitona (20,8 %) o el óxido de piperitona (37,0 %), este hecho puede explicar la baja actividad antimicrobiana que exhibió este aceite esencial.

### Cribado de los aceites esenciales

La capacidad de inhibición de crecimiento bacteriano en medio sólido de los de 10 quimiotipos fue mayor contra las bacterias Gram+ (Tabla 2). La falta de membrana externa de las bacterias Gram+ hace que sean más susceptibles a los mecanismos de acción de los AEs, a diferencia de las Gram-, más resistentes, y que sí poseen esta envoltura celular (Breijyeh et al., 2020). Los dos AEs de *S. montana* presentaron la mayor actividad antibacteriana frente a *Bacillus* sp. (14 mm y 9,5 mm). Además ambos AEs presentaron una actividad antimicrobiana superior en la mayoría de bacterias evaluadas, seguidos de los AEs de *O. vulgare* subsp. *virens* y *T. vulgaris*. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores que otorgan a los AEs de *S. montana* una gran capacidad de inhibición con halos de  $38,50 \pm 2,5$  mm (Djenane et al., 2011).

Aunque los AEs de *L. angustifolia* y *M. rotundifolia* no fueron efectivos frente a *P. fluorescens*, *S. enterica*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica*, estos extractos también se seleccionaron por su capacidad de inhibir otros de los microorganismos ensayados. Por otro lado, los dos quimiotipos de *R. officinalis* y *S. officinalis* mostraron muy baja o nula actividad frente a todas las bacterias estudiadas, por lo que no fueron seleccionados para los siguientes ensayos.



Tabla 1. Perfil químico de los aceites esenciales de las distintas especies de plantas aromático medicinales con efecto antimicrobiano empleadas.

Table 1. Chemical profile of the essential oils of the different species of aromatic medicinal plants with antimicrobial effect tested.

Compuesto	T.v.	L.a.	S.m.	S.m.	O.v.v.	M.r.
triciclono	0,04	0,01	0,02			
$\alpha$ -tuyeno	0,68		1,11	1,34	0,98	
$\alpha$ -pineno	1,63	0,15	0,76	0,98	0,45	
canfeno	0,94	0,20	0,31	0,40	0,16	
sabineno	1,26	0,06	0,22		1,16	1,05
$\beta$ -pineno	1,89	0,12	1,29	0,44	0,36	1,65
3-octanona	0,03	0,49			0,08	
mircenol	6,38	0,31	1,70	1,20	2,09	1,21
3-octanol	0,05	0,05	0,07		0,02	
octanal		0,01				
$\alpha$ -felandreno	0,06	0,02	0,29	0,23	0,23	
$\Delta$ -3-careno	0,02		0,08		0,05	
$\alpha$ -terpineno	0,65		1,93	1,94	2,72	
<i>p</i> -cimeno	9,83	0,06	17,57	25,48	10,58	
limoneno	1,67	1,30	0,76	1,22	0,63	6,63
eucaliptol	15,17	2,07	0,42	0,77	0,25	0,59
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	0,02	1,98	0,30		2,00	0,63
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,04	1,08	0,17		2,34	
$\gamma$ -terpineno	2,36	0,02	14,14	7,13	21,43	0,25
sabineno hidrato	1,91	0,05	0,93	1,05	0,46	
terpinoleno	0,28	0,21	0,11		0,18	
linalol	14,74	21,51	0,72	0,88	8,42	
alcanfor	0,96	4,26	0,04		0,04	
borneol	0,81	3,36	0,85	1,39	0,32	
terpinen-4-ol	1,26	0,06	0,41	0,63	0,38	0,25
$\alpha$ -terpineol	2,49	0,67	0,04		1,94	
dehidrocarvona	0,12					
metil ester de timol	0,50		0,02		1,55	

T.v.: *Thymus vulgaris*. L.a.: *Lavandula angustifolia*. S.m.: *Satureja montana* O.v.v.: *Origanum vulgare* subsp. *virens*. M.r.: *Mentha rotundifolia*.

Tabla 1. Perfil químico de los aceites esenciales de las distintas especies de plantas aromático medicinales con efecto antimicrobiano empleadas (continuación).

Table 1. Chemical profile of the essential oils of the different species of aromatic medicinal plants with antimicrobial effect tested (continuation).

Compuesto	T.v.	L.a.	S.m.	S.m.	O.v.v.	M.r.
butirato de hexilo		0,65				
nerol		0,03				
neral	0,06					
cuminal		0,29	0,03			
carvona			0,14			
metil ester de carvacrol	0,37		0,10		5,50	
acetato de linalilo	5,85	50,11			0,86	1,25
geranial	0,10					
acetato de bornilo	0,31	0,11			0,02	
acetato de lavandulilo		2,73				
timol	9,02		3,36	7,25	11,51	
carvacrol	1,96	0,02	41,29	37,14	6,78	
acetato de $\alpha$ -terpinilo	7,29					
acetato de timilo	0,05		0,03			
acetato de carvacrol			0,22			
acetato de nerilo	0,06	0,14				0,28
$\alpha$ -cubebeno					0,03	
$\alpha$ -copaeno	0,08	0,02	0,03		0,07	
$\beta$ -burboneno			0,28		0,21	0,31
acetato de geranilo	1,51	0,29				
$\alpha$ -gurjuneno		0,02	0,02			
$\beta$ -elemeno						0,46
$\beta$ -cariofileno	3,84	1,98	3,37	3,90	5,16	
aromadendrene			0,14		0,11	
cumarina		0,03				
$\alpha$ -humuleno	0,14	0,07	0,19		0,61	0,83
trans- $\beta$ -farneseno		1,16	0,02		0,07	
allo aromandrene	0,06		0,05		0,06	

T.v.: *Thymus vulgaris*. L.a: *Lavandula angustifolia*. S.m: *Satureja montana* O.v.v: *Origanum vulgare* subsp. *virens*. M.r: *Mentha rotundifolia*.

Tabla 1. Perfil químico de los aceites esenciales de las distintas especies de plantas aromático medicinales con efecto antimicrobiano empleadas (continuación).

Table 1. Chemical profile of the essential oils of the different species of aromatic medicinal plants with antimicrobial effect tested (continuation).

Compuesto	<i>T.v.</i>	<i>L.a.</i>	<i>S.m.</i>	<i>S.m.</i>	<i>O.v.v.</i>	<i>M.r.</i>
germacreno-D	1,00	1,53	1,77	0,33	3,66	7,39
biciclogermacreno	0,74	0,06			1,90	
$\alpha$ -muuroleno	0,05		0,08		0,04	
$\beta$ -bisaboleno	0,06		2,63	3,36	2,76	
$\gamma$ -cadineno	0,19	0,16	0,24	0,39	0,15	
$\Delta$ -cadineno	0,28	0,07	0,58	0,42	0,48	
espatulenol	0,13		0,23		0,60	
óxido de cariofileno	0,85	0,30	0,81	1,18	0,46	
$\beta$ -eudesmol	0,07					
$\alpha$ -eudesmol	0,12					
$\alpha$ -bisabolol		2,15			0,07	
t-muurolol			0,10		0,08	
chamazuleno	11,54					
farnesol						1,85
calameneno						0,53
viridiflorol						0,51
acetato de 1-octen-3-ilo						1,24
endo-borneol						2,31
p-cimen-8-ol						0,51
cuminaldehído						1,12
piperitona						20,77
óxido de piperitona						36,97
cis-jasmona						0,35
cinerolona						2,72
trans-cariofileno						6,07
$\beta$ -cubeneno						0,41
epi-biciclosesquifelandreno						0,69

*T.v.*: *Thymus vulgaris*. *L.a.*: *Lavandula angustifolia*. *S.m.*: *Satureja montana* *O.v.v.*: *Origanum vulgare* subsp. *virens*. *M.r.*: *Mentha rotundifolia*.

Tabla 2. Radio de halos de inhibición (mm) producidos por distintos aceites esenciales por el método de difusión en agar frente a bacterias asociadas a la pérdida de calidad de la trufa negra (*Tuber melanosporum*), y otras bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias.

Table 2. Radius of inhibition halos (mm) produced by different essential oils by the agar diffusion method against bacteria associated with the loss of quality of black truffle (*Tuber melanosporum*), and other food-borne toxin-infective bacteria.

	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	C+	C-
<i>S. aureus</i>	2,5	1	5	2	0	5	0
<i>B. cereus</i>	3,5	5,5	7	3,5	2,5	6	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	1	4	2	2	1	0
<i>Bacillus</i> sp.	2	0	14	4	8	5	0
<i>Microbacterium</i> sp.	4	2,5	8	3	3	7	0
<i>S. enterica</i>	1	0	4,5	1	3	10	0
<i>Y. enterocolitica</i>	2,5	2,5	5,5	3,5	0	9	0
<i>P. fluorescens</i>	2	0	4	2	0	11	0
<i>E. coli</i> O157:H7	2	5,5	4	3	2	12	0
<i>P. aeruginosa</i>	3	1,5	7	3	2,5	8	0

C+: control positivo, 20 µg/disco de vancomicina para bacterias Gram+ y 10 µg/disco de gentamicina para bacterias Gram-. C-: control negativo.

### Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y mínima bactericida (MBC)

Aunque para algunas bacterias estudiadas no se llegó a alcanzar la MIC con la mayor concentración de AE aplicada, la mayor eficacia bactericida de los AEs de *S. montana* fue frente a *S. aureus* (0,0625 %) y *E. coli* O157:H7 (0,125 % y 0,0625 %), seguido de *L. monocytogenes* (0,25 %) confirmando su potencial capacidad antimicrobiana (Tabla 3). Por otro lado, la bacteria más resistente a los AEs resultó ser *S. enterica*, con un MIC superior al 1 % frente a todos los AEs estudiados. *S. enterica* es un patógeno ampliamente conocido en la industria alimentaria y se han observado múltiples resistencias a antibióticos por parte de esta bacteria Gram- (Alenazy, 2022).

Los resultados de Concentración Mínima Bactericida (MBC) se presentan en la Tabla 4 en forma de porcentajes de AE empleado. Como cabía esperar, ambos AEs de *S. montana* presentaron gran poder bactericida frente a *S. aureus* (0,125 %), *L. monocytogenes* (0,25 %) y *E. coli* O157:H7 (0,125 %). Por el contrario, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* mostraron una gran resistencia frente a estos AEs.

Por otro lado, cabe destacar la escasa eficacia de otros AEs como *O. vulgare* subsp. *virens*, *L. angustifolia* y *T. vulgaris* con valores de MBC de 1 % y superiores, que concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, que emplearon concentraciones del 5 % y 1 % de AE de *T. vulgaris* frente a cepas *S. aureus* y *E. coli* (Motlagh et al., 2014). Para establecer unos resultados satisfactorios de MIC y MBC, las concentraciones utilizadas para estos AEs deberían aumentarse, sin embargo, esto supone un problema para técnicas basadas en espectrofotometría en las que la propia turbidez del aceite dificulta las medidas de proliferación bacteriana.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de aceites esenciales (%) de distintas especies de plantas aromático medicinales ensayados en bacterias alterantes de la calidad de la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y causantes de toxiinfecciones alimentarias.

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of essential oils (%) of different species of aromatic medicinal plants tested on bacteria associated with the loss of quality of black truffle (*Tuber melanosporum*), and other food-borne toxi-infective bacteria.

	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
<i>S. aureus</i>	0,50	>1	0,0625	0,0625	>1	1-0,5
<i>B. cereus</i>	>1	>1	0,25	0,25	>1	1-0,5
<i>L. monocytogenes</i>	0,50	>1	0,125	0,125	>1	1-0,5
<i>Bacillus</i> sp.	>1	>1	0,25	0,25	>1	1-0,5
<i>Microbacterium</i> sp.	0,50	>1	0,25	0,25	>1	1-0,5
<i>S. enterica</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>Y. enterocolitica</i>	0,50	>1	0,50	0,25	>1	>1
<i>P. fluorescens</i>	>1	>1	0,50-0,25	>1	>1	>1
<i>E. coli</i> O157:H7	>1	>1	0,0625	0,125	>1	1-0,5
<i>P. aeruginosa</i>	1-0,5	>1	>1	0,50-0,25	>1	>1

Tabla 4. Concentraciones mínimas bactericidas (MCB) de aceites esenciales (%) de distintas especies de plantas aromático medicinales ensayados en bacterias alterantes de la calidad de la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y causantes de toxiinfecciones alimentarias.

Table 4. Minimum bactericidal concentrations (MCB) of essential oils (%) of different species of aromatic medicinal plants tested on bacteria associated with the loss of quality of black truffle (*Tuber melanosporum*), and other food-borne toxi-infective bacteria.

	<i>T. vulgaris</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>virens</i>	<i>M. rotundifolia</i>	
<i>S. aureus</i>	1	>1	0,125	0,125	>1	1
<i>B. cereus</i>	>1	>1	0,50	0,50	>1	1
<i>L. monocytogenes</i>	1	>1	0,25	0,25	>1	1
<i>Bacillus</i> sp.	>1	>1	0,50	0,50	>1	1
<i>Microbacterium</i> sp.	1	>1	0,50	0,50	>1	1
<i>S. enterica</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>Y. enterocolitica</i>	1	>1	1	0,50	>1	>1
<i>P. fluorescens</i>	>1	>1	0,50	>1	>1	>1
<i>E. coli</i> O157:H7	>1	>1	0,125	0,25	>1	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	>1	>1	0,50	>1	>1

## Conclusiones

La trufa negra (*Tuber melanosporum*) presenta una carga microbiológica heterogénea, compuesta por diferentes géneros microbianos entre los que destaca el género *Pseudomonas*, estrechamente relacionado con la pérdida de calidad de este producto fresco.

A pesar de haberse identificado compuestos con demostrado poder antimicrobiano en los aceites esenciales procedentes de diferentes especies de plantas aromáticas, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* presentó la mayor resistencia frente a los diferentes aceites esenciales ensayados.

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Satureja montana* con alto contenido en eucaliptol, y carvacrol, respectivamente, han mostrado un efecto prometedor para inhibir la proliferación de los microorganismos estudiados, demostrando su potencial aplicación para la conservación de alimentos, y más concretamente para la conservación de trufa en fresco, pudiendo ser una alternativa a los tratamientos convencionales.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Diputación Provincial de Zaragoza (proyecto "Mejora de la Eficiencia de la Producción y la Innovación Agroalimentaria de la Trufa en la Provincia de Zaragoza, ejercicio 2024"), y al proyecto nº 101007623 "INTACT - Innovation in truffle cultivation, preservation, processing and wild truffle resources management") financiado por la Unión Europea en el Programa Marco de Investigación e Innovación (2014-2020) de Horizonte 2020.

## Referencias bibliográficas

- Abada M.B., Hamdi S.H., Masseoud C., Jroud H., Bousshah E., Jemâa J.M.B. (2020). Variations in chemotypes patterns of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils and applications for controlling the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Pyralidae). *South African Journal of Botany* 128: 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.010>.
- Abdellaoui M., Bouhlali E. dine T., Derouich M., El-Rhaffari L. (2020). Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *South African Journal of Botany* 135: 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.004>.
- Alenazy R. (2022). Antibiotic resistance in *Salmonella*: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. *Journal of King Saud University - Science* 34(7): 102275. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102275>.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. (2020). Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules* 25(6): 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.
- Chraïbi M., Fadil M., Farah A., Lebrazi S., Fikri-Benbrahim K. (2021). Antimicrobial combined action of *Mentha pulegium*, *Ormenis mixta* and *Mentha piperita* essential oils against *S. aureus*, *E. coli* and *C. tropicalis*: Application of mixture design methodology. *LWT* 145: 111352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111352>.
- CLSI (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Tenth edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.

- Costa D.C., Costa H.S., Albuquerque T.G., Ramos F., Castilho M.C., Sanches-Silva A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science and Technology* 45(2): 336-354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009>.
- Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22(7): 1046-1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.015>.
- Ghazanfari N., Mortazavi S.A., Yazdi F.T., Mohammadi M. (2020). Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon* 6(9): e04893. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04893>.
- Grand View Research, Inc. (2020). U.S. Essential oil market size, share and trends analysis report by product (Eucalyptus, Lemon), by application (Flavors, Fragrances), and segment forecasts, 2016-2024. Disponible en: <https://www.grandviewresearch.com> (Consultado: 12-04-2022)
- Gregersen T. (1978). Rapid Method for Distinction of Gram Negative from Gram Positive Bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5: 123-127. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00498806>.
- Huntington H.P. (2000). Using traditional ecological knowledge in science: Methods and applications. *Ecological Applications* 10(5): 1270-1274. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[1270:UTEKIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[1270:UTEKIS]2.0.CO;2).
- Kowalczyk A., Piątkowska E., Ku P., Marijanovi Z., Jerkovi I., Tuberoso C.I.G., Fecka I. (2021). Volatile compounds and antibacterial effect of commercial mint cultivars – chemotypes and safety. *Industrial Crops and Products* 166: 113430. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113430>.
- Limaverde P.W., Campina F.F., da Cunha F.A.B., Crispim F.D., Figueredo F.G., Lima L.F., Oliveira-Tintino C.D.M., de Matos Y.M.L.S., Morais-Braga M.F.B., Menezes I.R.A., Balbino V.Q., Coutinho H.D.M., Siqueira-Júnior J.P., Almeida J.R.G.S., Tintino S.R. (2017). Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology* 109(2): 957-961. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.031>.
- Lopez-Romero J.C., González-Ríos H., Borges A., Simões M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015(1): 795435. <https://doi.org/10.1155/2015/795435>.
- Marco P. (2015). Caracterización bromatológica y microbiológica del G° *Tuber* y aplicación de procesos combinados para su conservación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Miller L.H., Su X. (2011). Artemisinin: Discovery from the Chinese herbal garden. *Cell* 146(6): 855-858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.024>.
- Motlagh M.K., Kazemi M., Ghasemi H.A., Farahani K., Yahyaei M., Rezaei M., De Rensis F., Taddei S. (2014). Antibacterial effect of medicinal plant essence (*Thymus vulgaris*) on major bacterial mastitis pathogen *in vitro*. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2(2): 286-294.
- Muñoz Páez A., Garritz Ruiz A. (2013). Mujeres y química. Parte I: de la antigüedad al siglo XVII. *Educación Química* 24(1): 2-7. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73187-2](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73187-2).
- Navarro-Rocha J., Andrés M.F., Díaz C.E., Burillo J., González-Coloma A. (2020). Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja montana*. *Industrial Crops and Products* 145: 111958. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111958>.
- NCBI (2024). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Consultado: 12-04-2022)
- Ounoughi A., Ramdani M., Lograda T., Chalard P., Figueredo G. (2020). Chemotypes and antibac-

- terial activities of *Inula viscosa* essential oils from Algeria. *Biodiversitas* 21(4): 1504-1517. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210431>.
- Preedy V.R. (2015). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press, Elsevier. pp. 99-117. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-06581-7>.
- Radulovic N.S., Blagojevic P.D., Stojanovic-Radic Z.Z., Stojanovic N.M. (2013). Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry* 20(7): 932-952. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>.
- Romanazzi G., Servili A., Murolo S. (2016). Postharvest diseases of *Tuber melanosporum*. *Acta Horticulturae* 1144: 129-132. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1144.18>
- Roosta R.A., Moghaddasi R., Hosseini S.S. (2017). Export target markets of medicinal and aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 7: 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.06.003>.
- Saha A., Basak B.B. (2020). Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 145: 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>.
- Sayeed M., Degaga B., Azam T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research* 2(1): 1-7.
- Semerdjieva I.B., Zheljazkov V.D., Dincheva I., Asatkie T., Ka ániová M. (2020). Chemotypes of *Juniperus oxycedrus* in Bulgaria and the antimicrobial activity of galbuli essential oils. *Industrial Crops and Products* 158: 113005. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113005>.
- Soria A.C., Esteban J., Morales R., Martín-Álvarez P.J., Sanz J. (2008). Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botanica Complutensis* 32: 225-236.
- Sounouvou H.T., Toukourou H., Catteau L., Toukourou F., Evrard B., Van Bambeke F., Gbaguidi F., Quetin-Leclercq J. (2021). Antimicrobial potentials of essential oils extracted from West African aromatic plants on common skin infections. *Scientific African* 11: e00706. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00706>.
- Tariq S., Wani S., Rasool W., Shafi K., Bhat M.A., Prabhakar A., Shalla A.H., Rather M.A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis* 134: 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>.
- Tejedor-Calvo E., García-Barreda S., Sánchez S., Marco P. (2020). Effect of bacterial strains isolated from stored shiitake (*Lentinula edodes*) on mushroom biodeterioration and mycelial growth. *Agronomy* 10(6): 898. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060898>.
- Tejedor-Calvo E., Baquero-Aznar V., Vega-Diez S., Salvador M.L., Sanz M.A., Sánchez S., Marco P., García-Barreda S., González-Buesa J. (2024). Potential of a smart gelatine hydrogel-based package to extend fresh black truffle (*Tuber melanosporum*) shelf-life preserving its aroma profile. *Food Hydrocolloids* 151: 109874. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109874>.
- Venturini M.E., Reyes J.E., Rivera C.S., Oria R., Blanco D. (2011). Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food Microbiology*, 28(8): 1492-1498. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.007>.
- WHO. (2019). *WHO Global report on traditional and complementary medicine*. World Health Organization. Ginebre, Suiza. 226 pp.

(Aceptado para publicación el 5 de agosto de 2024)