

## IMPACTO DE LOS ACEITES ESENCIALES Y MONOTERPENOS SOBRE LA NITRIFICACIÓN Y LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EDÁFICAS

GISELE LOPES DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, ROMINA AYLÉN VERDENELLI<sup>2-3\*</sup>, MARÍA FLORENCIA DOMINCHIN<sup>2-3</sup>, JULIO ALBERTO ZYGADLO<sup>2-3</sup>, JOSÉ MANUEL MERILES<sup>2-3</sup>

Recibido: 10/04/2018

Recibido con revisiones: 11/04/2018

Aceptado: 11/04/2018

### RESUMEN

Los monoterpenos pueden afectar el ciclado de nutrientes debido a que son capaces de alterar las tasas de nitrificación y las comunidades microbianas edáficas. El presente trabajo estudió el impacto de la aplicación directa de diferentes aceites esenciales y algunos de sus monoterpenos mayoritarios sobre la nitrificación, funcionalidad y estructura de las comunidades microbianas del suelo. Los dos monoterpenos seleccionados fueron: 1,8-cineol (1,8-CIN) y  $\alpha$ -pineno ( $\alpha$ -PIN). En función de la presencia de dichos monoterpenos, las especies vegetales seleccionadas para la extracción de los aceites esenciales fueron: Aguaribay (*Schinusareira L.*, *Anacardiaceae*) (OA) y Eucalipto (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, *Myrtaceae*) (OE). Los muestreos del suelo fueron realizados a los 0, 10, 30 y 60 días de la aplicación de los tratamientos. El tratamiento control (CK) mostró los valores más altos de nitrificación durante todo el período de ensayo. Sin embargo, la reducción en la nitrificación fue significativa ( $p \leq 0.05$ ) para el 1,8-CIN, OE y OA a los días 1, 30 y 60 de incubación, respectivamente. Se observó un aumento de la actividad hidrolizante del diacetato de fluoresceína (FDA) en los tratamientos con  $\alpha$ -PIN, OE y 1,8-CIN a los 10, 30 y 60 días de incubación, respectivamente. Una tendencia similar fue observada en la actividad deshidrogenasa (DHA). El tratamiento CK mostró una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) de la biomasa de bacterias Gram-negativas. Las poblaciones de Actinomicetes fueron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) menores en el tratamiento CK en comparación a las poblaciones observadas en los tratamientos con aceites esenciales OA y OE. Por último, la aplicación de ambos aceites esenciales (OA y OE) incrementó la biomasa microbiana total estimada por perfiles de ácidos grasos fosfolípidicos (PLFA).

**Palabras clave:** Aceites esenciales, monoterpenos, microbiología de suelos, enzimática de suelos.

### [IMPACT OF ESSENTIAL OILS AND MONOTERPENES ON NITRIFICATION AND EDAPHIC MICROBIAL COMMUNITIES]

### ABSTRACT

Monoterpenes may affect the nutrient cycling because they are capable of altering nitrification rates and edaphic microbial communities. The present work studied the impact of the direct application of different essential oils and some of their major monoterpenes on the nitrification, functionality and structure of soil microbial communities. Two monoterpenes selected were: 1,8-cineol (1,8-CIN) and  $\alpha$ -pinene ( $\alpha$ -PIN). The vegetal species selected for the extraction of the essential oils were: Aguaribay (*Schinusareira L.*, *Anacardiaceae*) (OA) and Eucalyptus (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, *Myrtaceae*) (OE). Soil samples were taken at 0, 10, 30 and 60 days after the application of the treatments. Control treatment (CK) showed the highest nitrification values during the entire period tested. However, the reduction of the nitrification was significant ( $p \leq 0.05$ ) for 1,8-CIN, OE and OA at days 1, 30 and 60 of incubation, respectively. An increase in hydrolyzing activity of fluorescein diacetate (FDA) was observed in the treatments with  $\alpha$ -PIN, OE and 1,8-CIN at 10, 30 and 60 days of incubation, respectively. A similar trend was observed in the dehydrogenase activity (DHA). The CK treatment showed significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower biomass values for Gram-negative bacteria. The populations of Actinomicetes were significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower in CK treatment compared to the populations observed in the treatments with OA and OE essential oils. Finally, the application of both essential oils (OA and OE) increased the total microbial biomass estimated by phospholipid fatty acids (PLFA).

**Key words:** Essential oils, monoterpenes, soil microbiology, soil enzymatic.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Sul da Bahia, Instituto de Humanidades, Artes e Ciências

<sup>2</sup> Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET).

<sup>3</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA. F.C.E.Fy Nat – UNC)

\* Autor de contacto: rverdenelli@imbiv.unc.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

La calidad del suelo involucra propiedades físicas, químicas y microbiológicas que sustentan la productividad, la calidad del ambiente y la sanidad de los cultivos (Doran & Parkin, 1994; Jackson *et al.*, 2003). Los microorganismos de suelo son fundamentales para mantener el buen funcionamiento de los suelos naturales y agrícolas ya que están involucrados en una gran variedad de procesos claves, tales como la descomposición de la materia orgánica (MO), la remoción de toxinas y el ciclado de nutrientes (carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S)). Además, algunos de estos microorganismos desempeñan un importante rol en la supresión de enfermedades del suelo y en la promoción del crecimiento vegetal (Garveba *et al.*, 2004). El estudio de las comunidades microbianas del suelo puede proveer una medida integral de la calidad edáfica. Cambios en la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas pueden repercutir sobre la calidad del suelo y el rinde de los cultivos (Brussaard *et al.*, 2007). Diversos autores indicaron al estudio de las comunidades microbianas edáficas como una potente herramienta para comprender señales tempranas de alteración o disturbio en el suelo (Graham & Haynes, 2005).

Los monoterpenos son metabolitos especiales de los aceites esenciales de innumerables especies de plantas aromáticas y forestales. Estos compuestos ingresan en el suelo a través de la descomposición de hojas senescentes, exudados radicales o vía deposición volátil de las partes aéreas de las plantas. Su solubilidad en el suelo se encuentra relacionada principalmente con la estructura química característica de estos compuestos (Griffin *et al.*, 1999). Como consecuencia, los terpenos pueden ejercer una importante influencia sobre las propiedades de los ecosistemas edáficos (Wood *et al.*, 1995). Los monoterpenos poseen una potencial capacidad de interacción en el ciclado de nutrientes, son capaces de alterar las tasas de herbivoría, de descomposición, mineralización, nitrificación y desnitrificación (White, 1994).

Se sabe que el contenido de N disponible en el suelo es un factor limitante en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Schlesinger, 1997). Existen agentes químicos capaces de inhibir o retardar

los procesos de nitrificación en el suelo. La bibliografía existente sobre inhibidores de nitrificación es amplia, y se encuentra principalmente focalizada en el control de la nitrificación del amonio con el objetivo de aumentar la utilización de N en los cultivos. En este sentido, los monoterpenos podrían inhibir la mineralización del N mediante el retraso en los procesos de nitrificación, por medio del aumento en la inmovilización de nitratos (N-NO<sub>3</sub>) en relación con el amonio (N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y/o por medio de la estimulación de la inmovilización del N mediante materiales ricos en C (White, 1991).

Diversos autores han recomendado la inclusión de plantas aromáticas como potencial enmienda en suelos agrícolas, debido a su multifacética actividad biológica, principalmente asociada con compuestos fenólicos y terpénicos presentes en sus aceites esenciales (Adamczyk *et al.*, 2013; Kadoglidou *et al.*, 2014). Por lo tanto, se ha sugerido que los aceites esenciales y sus monoterpenos poseen una gran influencia en el ciclo de los nutrientes, regulando procesos microbianos edáficos (Kainulainen & Holopainen, 2002).

Distintos autores mostraron que ciertos aceites esenciales presentes en diferentes especies de plantas aromáticas fueron capaces de estimular el crecimiento de poblaciones microbianas del suelo (Vokou & Liotiri, 1999; Smolander *et al.*, 2005). En este sentido, Wood *et al.* (1995) reportaron que algunos microorganismos pueden metabolizar aceites esenciales y sus componentes mayoritarios utilizándolos como fuente de C y energía. Por otra parte, diversos estudios demostraron que determinados aceites esenciales y sus compuestos resultaron tóxicos para ciertos grupos bacterianos posiblemente debido a su acoplamiento durante la fosforilación oxidativa y la inhibición de la síntesis de ATP (Houdkova *et al.*, 2017). Además, otros autores indicaron que algunos monoterpenos disminuyeron el contenido de N y C en la biomasa microbiana del suelo (Wood *et al.*, 1995; Smolander *et al.*, 2006).

Algunos estudios han propuesto a la aplicación de monoterpenos puros y/o en mezclas con agroquímicos como método potencial en el control de enfermedades en cultivos (Miñambres *et al.*, 2010). Sin embargo, muy pocos estudios han evaluado el efecto de los aceites esenciales y sus

monoterpenos sobre la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo. En general, los parámetros fisicoquímicos son indicadores poco sensibles a cambios drásticos en la matriz del suelo. Sin embargo, diversos autores sugirieron que los parámetros microbiológicos y bioquímicos demostraron ser más significativos como indicadores tempranos de estrés (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Geissler *et al.*, 2017). Junto con la evaluación de estos parámetros, se han intentado construir diferentes índices para evaluar alteración y/o calidad de los suelos (Puglisi *et al.*, 2005; Bastida *et al.*, 2008). En este sentido, algunos autores concluyeron que la estimación de la biomasa microbiana y la cuantificación de la actividad enzimática del suelo resultaron ser importantes parámetros de calidad edáfica, debido a que los microorganismos constituyen una parte vital en la cadena de producción de agroalimentos (Beelem & Doelman, 1997). Recientemente, la inclusión de herramientas moleculares (qPCR, DGGE, T-RFLP) y bioquímicas (enzimática de suelos, perfiles de fosfolípidos, etc) en el estudio de las comunidades microbianas han sido de gran utilidad para determinar cambios de diversidad y abundancia microbiana en el suelo (Maarit Niemi *et al.*, 2001). Actualmente, el monitoreo de la calidad del suelo incluye mediciones de parámetros bioquímicos como la biomasa microbiana total, biomasa de taxones, respiración microbiana y actividad enzimática, entre otros. De esta manera, el objetivo del presente estudio fue estudiar el efecto de la aplicación de aceites esenciales y de sus componentes monoterpénicos sobre los procesos de nitrificación y calidad microbiológica del suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aceites esenciales, monoterpenos y muestreo del suelo

Los monoterpenos seleccionados para el presente estudio fueron: 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno (Sigma-Aldrich Argentina). En función de la presencia mayoritaria de dichos monoterpenos, las especies vegetales seleccionadas para la extracción de los aceites esenciales fueron: Aguaribay (*Schinus molle* L., Anacardiaceae) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Dehnh., Myrtaceae). Las especies

fueron recolectadas durante el mes de julio del 2013 en Córdoba, Argentina. El material botánico recolectado fue identificado y herborizado en el Herbario de la Universidad Nacional de Córdoba con números de registro CORD00044091 y CORD00044093 para *Schinus molle* L., Anacardiaceae y *Eucalyptus globulus* Dehnh., Myrtaceae, respectivamente. Los aceites esenciales fueron extraídos de hojas frescas de Aguaribay y Eucalipto, utilizando un destilador de arrastre con vapor. Finalmente, ambos aceites esenciales fueron analizados mediante un cromatógrafo gaseoso (Perkin-Elmer Clarus 600) equipado con detector de llama (FID) y detector de masa (MS) (Tabla 1).

El suelo fue recolectado de un pastizal natural, sin intervención antrópica, ubicado en la localidad de Córdoba, Argentina. La toma de muestras se realizó a 15 cm de profundidad. La textura del suelo fue Franco areno-limoso (arena 16%, limo 55.2%, arcilla 28.8%, materia orgánica (MO) 8.47%, carbono orgánico (CO) 4.91%, nitrógeno total (NT) 0.416%, relación carbono/nitrógeno (C/N) 11.8). Con el objeto de eliminar los restos vegetales y escombros, el suelo fue tamizado (2mm) y posteriormente almacenado durante 7 días en cámara de cultivo con el objeto de equilibrar el sistema.

### Diseño del experimento

Los tratamientos fueron: 1,8-cineol (1,8-CIN),  $\alpha$ -pineno ( $\alpha$ -PIN), aceite esencial de eucalipto (OE), aceite esencial de aguaribay (OA) y control (CK). El tratamiento CK consistió en el agregado de sílice-gel sin aditivos. Para cada tratamiento se utilizaron 200 g de suelo, con una concentración del 0.3% de aceite esencial o monoterpeneo y 2.7% de sílica-gel en polvo. Los aceites esenciales y los patrones monoterpénicos se añadieron al suelo siguiendo la técnica de aplicación mediante sílica-gel (Adamczyk *et al.*, 2011). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. El ensayo fue incubado bajo condiciones controladas de humedad (60% de la capacidad de campo del suelo) y temperatura (24°C). La toma de muestras se realizó a los días 0, 10, 30 y 60 después de iniciado el ensayo. Cada muestra consistió en la toma de 50 g de suelo, la cual fue almacenada

**Tabla 1.** Constituyentes principales (%) de los aceites esenciales de hojas de Aguaribay (*Schinusareira* L., *Anacardiaceae*) y Eucalipto (*Eucalyptus comaldulensis* Dehnh., *Myrtaceae*)**Table 1.** Main constituents (%) of the essential oils of Aguaribay leaves (*Schinusareira* L., *Anacardiaceae*) and Eucalyptus (*Eucalyptus comaldulensis* Dehnh., *Myrtaceae*)

Aceite de Eucaliptus (OE)	%	Aceite de Aguaribay (OA)	%
1,8-cineol	43,51	10-epi- $\gamma$ eudesmol	4,72
9-epi- <i>E</i> -cariofileno	0,16	Acetato de isobornil	1,15
Aromadendreno	0,49	Biciclog ermacreno	1,12
Carvacrol	0,40	canfeno	7,67
Carvona	0,31	dehydroxy isocalamendiol	2,11
<i>E</i> -carveol	0,11	<i>E</i> -cariofileno	0,55
<i>E</i> -nerolidol	0,93	elemol	1,92
Epóxido de $\alpha$ -felandreno	0,26	germacreno-D-4-ol	23,43
Espatulenol	0,18	limoneno	0,49
Globulol	0,66	mirceno	0,75
Linalool	0,82	n-decano	2,14
Mentha 2,8-dien-1-ol (trans- $\rho$ )	0,18	sabineno	0,96
Mentha-1(7),8-dien-2-ol <cis- $\rho$ >	0,18	tricicleno	1,06
Metil isoborneol <2->	0,66	$\alpha$ -felandreno	15,48
Oxido de linalool (cis)	0,16	$\alpha$ -muuroleno	3,64
Pinocarvona	0,50	$\alpha$ -gurjuneno	0,90
Piperitona	0,63	$\alpha$ -humuleno	2,67
Rosifoliol	0,11	$\alpha$ -pineno	4,83
Terpinen-4-ol	2,02	$\beta$ -elemeno	0,52
Terpinoleno	0,22	$\beta$ -eudesmol	0,74
<i>Trans</i> -pinocarveol	2,01	$\beta$ -feladreno	4,39
Viridiflorol	1,28	$\beta$ -pineno	3,44
$\alpha$ -pineno	2,48	$\delta$ -cadineno	11,08
$\alpha$ -thujeno	0,26	$\rho$ -cimeno	1,36
$\alpha$ -felandreno	6,77	10-epi- $\theta$ eudesmol	4,72
$\alpha$ -terpineno	0,17	Acetato de isobornil	1,15
$\alpha$ -terpineol	1,12		
$\beta$ -pineno	6,77		
$\gamma$ -terpineno	2,07		
$\rho$ -cimeno	20,75		

bajo condiciones apropiadas hasta su posterior análisis en el laboratorio.

### Mineralización de N y tasas de nitrificación

El contenido de NT se determinó mediante un autoanalizador de nutrientes SmartChem 200 (Westco, Scientific Instruments, Inc.). El método se basa en la conversión de componentes orgáni-

cos nitrogenados de origen biológico (tales como aminoácidos, proteínas y péptidos) en amonio, a través de un proceso de digestión ácida. El método se basó en USEPA 351.2 Rev. 2.0 (1993a). Para la digestión ácida, se disolvieron 134 g de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y 7.3 g de sulfato de cobre III pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) en 800 mL de agua y 134 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ), y se completó con agua a volumen

final de 1 L. Se colocaron 10 mL de esta solución por g de la muestra. En el proceso de digestión se utilizó una temperatura de 160°C durante 30 min y 380°C durante 45 min.

Para el análisis de nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ) y amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) se utilizó el autoanalizador de nutrientes SmartChem 200 (Westco, Scientific Instruments, Inc.). La extracción se realizó con una solución de KCL 2.0 M. El método empleado en el autoanalizador para  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NO}_2^-$  fue USEPA Method 353.2, Rev. 2.0 (1993b) y para  $\text{N-NH}_4^+$  fue USEPA 350,1 Rev. 2.0 (1993b).

El porcentaje de nitrificación fue calculado de acuerdo con Kumar et al. (2007) con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de nitrificación} = \frac{[(\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-) \times 100]}{(\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-)}$$

### Actividad enzimática y microbiana

La actividad microbiana total fue estimada mediante hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) según el protocolo de Adam & Duncan (2001). El FDA es hidrolizado por enzimas extracelulares y de membrana, permitiendo la liberación de un producto final coloreado que puede medirse por espectrofotometría. Brevemente, en un tubo para centrífuga se pesó 2 g de suelo y se agregó 15 mL de buffer fosfato pH 7.6. Para comenzar la reacción se agregó 0.2 mL de solución stock de FDA, se tapó y agitó en vortex. Se incubó a 30°C durante 30 min en un baño termostático. Después del tiempo de incubación se agregó 15 mL de la mezcla cloroformo/metanol 2:1 (v/v) para detener la reacción y se agitó. Se dejó reposar durante toda la noche para permitir la separación de las fases orgánica y acuosa. Una vez completada la separación de fases, se tomó 2 mL de la fase superior y se midió en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 25 a 490 nm.

La actividad deshidrogenasa fue determinada de acuerdo con la técnica citada por García et al. (1997). Se expuso 1 g de suelo (60% de su capacidad de campo) a 0.2 mL de una solución INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio) al 0.4% durante 24 horas a 28°C

en oscuridad. El INTF formado (iodo-nitrotetrazolioformazan) fue extraído con 10 mL de metanol mediante agitación rápida durante 1 min, y posteriormente filtrado con papel de filtro Whatman N°5. El INTF fue medido en espectrofotómetro (UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25) a 485 nm.

### Estructura de las comunidades microbianas

La estructura de las comunidades microbianas del suelo se estudió mediante sus perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA). La metodología de extracción y condiciones de análisis de los PLFA se realizó de acuerdo con Meriles et al. (2009), basada en Bossio et al. (1998). En un tubo para centrífuga se pesó 8 g de suelo y se agregó 20 mL de una mezcla cloroformo/metanol/buffer fosfato (1:2:0,8 v/v/v). Luego la muestra se agitó en vortex y se dejó reposar durante 1 h. El sobrenadante fue filtrado con papel de filtro Whatman N°5. Este procedimiento se repitió dos veces. Al tubo con el filtrado obtenido se le agregó 10 mL de cloroformo y 10 mL de buffer fosfato (pH: 7.4). Se dejó reposar durante 24 horas hasta la completa separación de las fases orgánica y acuosa. La fase orgánica fue colectada y el solvente se evaporó con  $\text{N}_2$  a 37°C. El residuo se re-suspendió en 3 mL de cloroformo. Los lípidos del suelo fueron separados en orden creciente de polaridad mediante una cromatografía en columna rellena con 0.5 g de ácido silícico (100-200 Mesh, Sigma St Louis, MO). Los lípidos neutros y los glicolípidos se eluyeron con 5 mL de cloroformo y 10 mL de acetona, respectivamente. La fracción de fosfolípidos se eluyó con el agregado de 5 mL de metanol. La metilación de los ácidos grasos se realizó con una solución de 1 mL de metanol/tolueno 1:1 (v/v) y 1 mL de KOH 0.2 M incubados a 37°C durante 15 min. Luego se agregó 2 mL de agua destilada y 0.3 mL de ácido acético 1 M. Los ácidos grasos metil esterificados fueron extraídos con hexano (3 mL) y la solución fue posteriormente concentrada hasta sequedad. El residuo obtenido se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de hexano y se midió en un cromatógrafo gaseoso (Perkin-Elmer Clarus 600) equipado con una columna Elite-5 (Crossbond 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano), detector de llama (FID) y detector de masa (MS). Los ácidos grasos fueron

analizados con una pendiente térmica de 180 a 240°C a 4°C min<sup>-1</sup> y una velocidad de flujo de 0.8 mL min<sup>-1</sup>. La cuantificación se realizó mediante el agregado de un estándar interno (19:0). Los ácidos grasos fueron identificados mediante una corrida previa de un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos (Bacterial Acid Methyl Esters mix, Supelco, Bellefonte, PA). La concentración total de PLFA fue estimada mediante la sumatoria de todos los ácidos grasos de fosfolípidos identificados y utilizada como estimador de la biomasa microbiana total (Böhme *et al.*, 2005). Una nomenclatura estándar fue utilizada para describir cada PLFA: el número de átomos de carbono seguido por el número de dobles enlaces, separados por dos puntos. Las conformaciones cis y trans son designadas con el sufijo “c” y “t”, respectivamente. Otras notaciones son “Me” para el grupo metilo, “cy” para los grupos ciclopropanoicos, y el prefijo “i” y “a” para las ramificaciones iso- y anteiso- de los ácidos grasos.

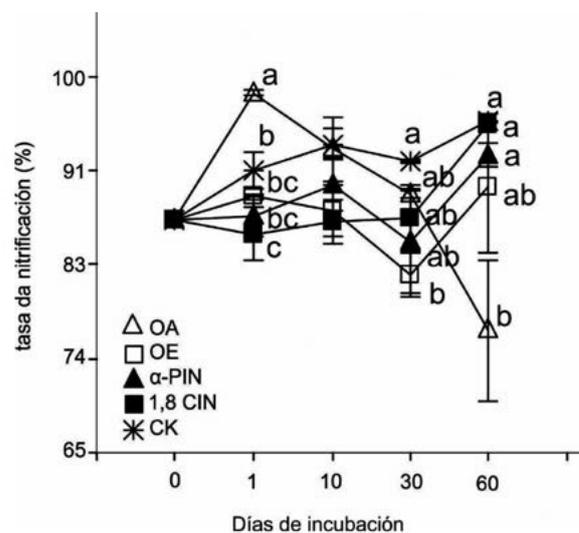
### Análisis estadísticos

El contenido de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-H<sub>4</sub><sup>+</sup>, NT, tasas de nitrificación, actividades enzimáticas, biomasa microbiana total y grupos taxonómicos microbianos estimados mediante perfiles de PLFAs fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y test a posteriori LSD ( $p \leq 0,05$ ). La normalidad de los datos fue testeada mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software INFOSTAT/Professional 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2013).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestro trabajo tuvo por finalidad el estudio de la acción directa de los monoterpenos y componentes de los aceites esenciales sobre la microflora edáfica, no sólo de sus compuestos volatilizados. Por este motivo se prescindió de la utilización de trampas de vapor, y en su lugar, los compuestos terpénicos puros y los aceites esenciales fueron agregados al suelo de manera directa, acorde a procedimientos utilizados por diferentes autores (Adamczyk *et al.*, 2011).

Nuestro estudio reveló que los aceites esenciales (OA y OE) afectaron de manera poco clara el contenido de amonio y nitrato del suelo (Tabla 2). Se observaron reducciones significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los contenidos de nitrato en los tratamientos con  $\alpha$ -PIN comparada con CK principalmente a los 10 y 60 días de incubación. En todos los días de incubación evaluados,  $\alpha$ -PIN mostró los menores contenidos de nitrato respecto del resto de los tratamientos. Debido a que los terpenos pueden actuar como fuente de C para microorganismos, la disminución en el contenido de nitrato podría ser causado por un aumento en el proceso de inmovilización microbiana de N y/o una inhibición en los procesos de nitrificación (Marmulla & Harder, 2014). Un resultado similar fue observado al analizar las tasas de nitrificación (Figura 1). Excepto para el día 1 de incubación, CK mostró los valores más altos de nitrificación durante todo el período ensayado. En tanto que 1,8-CIN, OE y OA registraron una reducción sig-



**Figura 1.** Tasas de nitrificación en suelos tratados con aceites esenciales y sus monoterpenos. OA: aceite esencial Aguaribay (*Schinusareira L.*, Anacardiaceae). OE: aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, Myrtaceae).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pineno, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a los 0, 1, 10, 30 y 60 días de incubación ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 1.** Nitrification rates in soils treated with essential oils and their monoterpenes. OA: Aguaribay essential oil (*Schinusareira L.*, Anacardiaceae). OE: Eucalyptus essential oil (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, Myrtaceae).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pineno, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. Different letters indicate significant differences between treatments at 0, 1, 10, 30 and 60 days of incubation ( $p \leq 0,05$ ).

nificativa ( $p \leq 0.05$ ) de la nitrificación a los 1, 30 y 60 días de incubación, respectivamente. El tratamiento CK presentó los más bajos contenidos de amonio (**Tabla 2**). En general, los valores más altos de amonio fueron observados en el suelo tratado con OE y 1,8-CIN hasta el día 30 de incubación. Algunos estudios han reportado que  $\alpha$ -PIN es capaz de inhibir los procesos de mineralización y/o nitrificación (Uusitalo *et al.*, 2008). En nuestro estudio, a la concentración y tipo de suelo ensayado,  $\alpha$ -PIN no modificó la mineralización de N (estimado como contenido de  $N-NH_4^+$ ). Es posible que este efecto diferencial de  $\alpha$ -PIN sobre la mineralización de N esté relacionado con la dosis aplicada del monoterpeno y/o el tipo de suelo (White, 1994). Sin embargo, el presente trabajo es el primer reporte en informar una

acción inhibitoria de la nitrificación como consecuencia de la aplicación directa de 1,8-CIN y OE. Cabe aclarar que dicha inhibición no fue observada en el OA debido a que al 1,8-CIN no forma parte constitutiva de los monoterpenos presentes en el OA. Diferentes autores demostraron que la inhibición de ambos procesos (mineralización y nitrificación) es una función de la dosis aplicada de monoterpenos (White, 1991). Aplicaciones con dosis bajas o intermedias de monoterpenos ( $10-125 \mu g g^{-1}$ ) mostraron poco o ningún cambio en la mineralización. Por el contrario, altas dosis de monoterpenos ( $1250 \mu g g^{-1}$ ) estimularon la inmovilización neta de amonio. Es probable que la falta de uniformidad en la respuesta de inhibición en la mineralización y/o nitrificación observada en nuestro trabajo esté relacionada con bajas do-

**Tabla 2.** Concentración de  $N-NO_3^-$ ,  $N-NO_2^-$ ,  $N-NH_4^+$  y NT en el suelo tratado con aceites esenciales y terpenos durante 60 días de incubación. OA: aceite esencial Aguaribay (*Schinusareira L.*, Anacardiaceae). OE: aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, Myrtaceae).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pineno, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a los 0, 1, 10, 30 y 60 días de incubación ( $p \leq 0.05$ ).

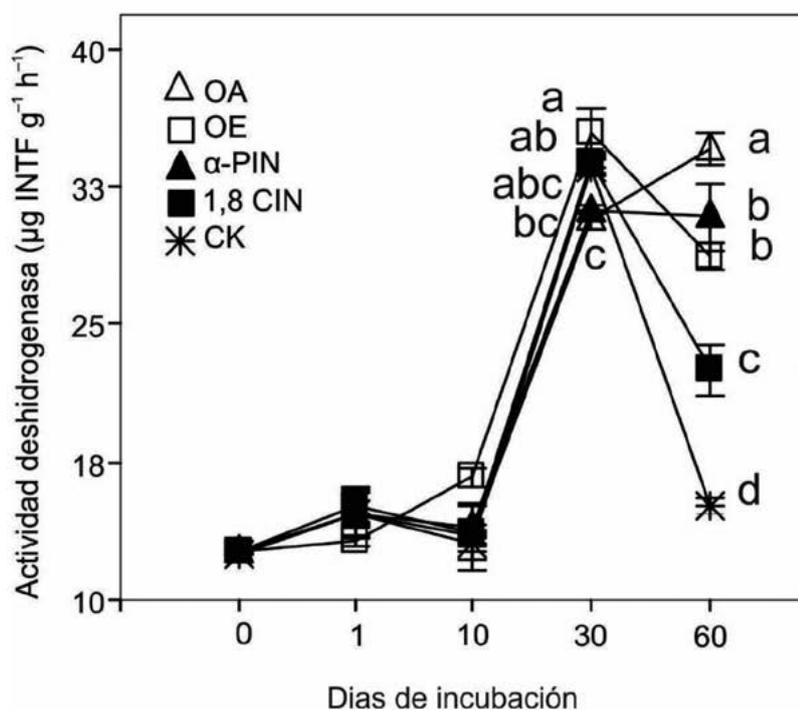
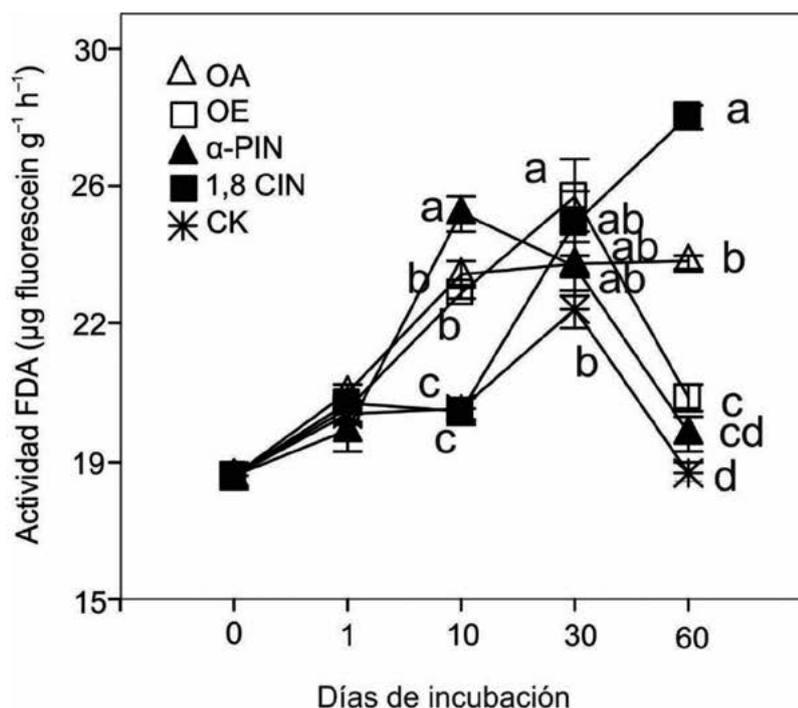
**Table 2.** Concentration of  $N-NO_3^-$ ,  $N-NO_2^-$ ,  $N-NH_4^+$  and NT in soil with the application of essential oils and terpenes during 60 days of incubation. OA: Aguaribay essential oil (*Schinusareira L.*, Anacardiaceae). OE: Eucalyptus essential oil (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, Myrtaceae).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pineno, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. Different letters indicate significant differences between treatments at 0, 1, 10, 30 and 60 days of incubation ( $p \leq 0.05$ ).

	días	OA	OE	$\alpha$ -PIN	1,8 CIN	CK	LSD ( $p \leq 0,05$ )
$N-NO_3^-$ (mg Kg <sup>-1</sup> )	0					33.51	
	1	33.07 ab	36.02 a	24.78 b	40.09 a	24.85 b	11.15
	10	37.90 ab	31.87 ab	28.92 b	37.10 ab	40.86 a	9.57
	30	30.71 a	27.76 ab	25.43 b	29.66 a	25.43 b	3.96
	60	39.24 a	31.41 bc	25.52 c	31.50 bc	33.58 ab	6.51
$N-NO_2^-$ (mg Kg <sup>-1</sup> )	0					0.04	
	1	0.01 d	0.05 ab	0.03 c	0.06 a	0.03 bc	0.02
	10	0.02 a	0.02 a	0.01 a	0.03 a	0.02 a	0.02
	30	0.01 bc	0.04 ab	0.02 bc	0.04 a	0.01 c	0.02
	60	0.02 a	0.02 a	0.02 a	0.04 a	0.02 a	0.03
$N-NH_4^+$ (mg Kg <sup>-1</sup> )	0					3.51	
	1	0.36 d	3.12 b	2.55 c	4.60 a	1.65 c	2.33
	10	1.92 a	3.14 a	2.30 a	3.96 a	1.87 a	2.47
	30	2.59 ab	4.21 a	3.12 ab	3.16 ab	1.51 b	2.36
	60	7.98 a	2.51 b	1.39 b	1.03 b	1.00 b	4.39
NT (g Kg <sup>-1</sup> )	0					3.93	
	1	5.29 a	5.48 a	4.96 a	5.27 a	4.16 a	1.62
	10	7.16 a	7.15 a	6.91 a	5.18 a	6.03 a	2.27
	30	5.96 a	5.28 a	5.60 a	6.62 a	5.90 a	1.22
	60	4.80 a	4.98 a	6.12 a	5.12 a	6.05 a	1.51

sis de monoterpenos y aceites esenciales. Finalmente, los tratamientos con aceites esenciales y monoterpenos afectaron pobremente el contenido de nitrato. El contenido de nitrógeno total (NT) no varió entre tratamientos durante la totalidad del período de incubación (**Tabla 2**).

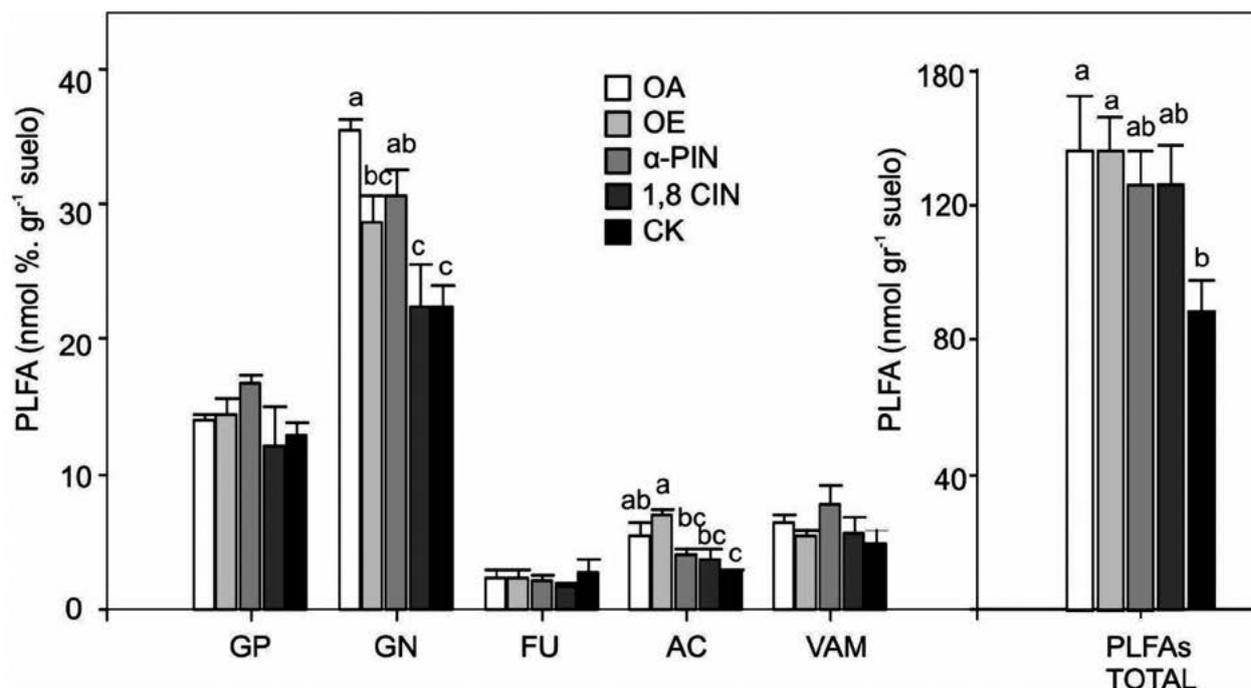
La hidrólisis de FDA es llevada a cabo por exoenzimas y enzimas de membrana. Debido a

la gran variedad de enzimas capaces de degradar este sustrato, la técnica hidrolizante de FDA ha sido utilizada como un estimador de la actividad microbiana total (Adam & Duncan, 2001). En nuestro trabajo, la actividad FDA varió en función del tiempo y de los tratamientos (**Figura 2**). Excepto en el día 1, se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos. Se



**Figura 2.** Actividad microbiana en suelos tratados con aceites esenciales y sus monoterpenos. OA: aceite esencial Aguaribay (*Schinusareira* L., Anacardiaceae). OE: aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus comaldulensis* Dehnh., Myrtaceae).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pineno, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a los 0, 1, 10, 30 y 60 días de incubación ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Microbial activity in soils treated with essential oils and their monoterpenes. OA: Aguaribay essential oil (*Schinusareira* L., Anacardiaceae). OE: Eucalyptus essential oil (*Eucalyptus comaldulensis* Dehnh., Myrtaceae).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pinene, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. Different letters indicate significant differences between treatments at 0, 1, 10, 30 and 60 days of incubation ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.** Estructura de las comunidades microbianas estimada por PLFA en suelos tratados con aceites esenciales y sus monoterpenos. OA: aceite esencial Aguaribay (*Schinusareira L.*, *Anacardiaceae*). OE: aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, *Myrtaceae*).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pineno, 1,8 CIN: 1,8 cineol, CK: control. GP: Bacterias Gram-positivas, GN: Bacterias Gram-negativas, FU: Hongos, AC: Actinomicetes, VAM: Micorrizas vesículo-arbusculares. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a los 0, 1, 10, 30 y 60 días de incubación ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3.** Structure of microbial communities estimated by PLFA in soils treated with essential oils and their monoterpenes. OA: Aguaribay essential oil (*Schinusareira L.*, *Anacardiaceae*). OE: Eucalyptus essential oil (*Eucalyptus comaldulensis Dehnh.*, *Myrtaceae*).  $\alpha$ -PIN:  $\alpha$ -pinene, 1,8 CIN: 1,8 cineole, CK: control. GP: Gram-positive bacteria, GN: Gram-negative bacteria, FU: Fungi, AC: Actinomycetes, VAM: Vesicular-arbuscular mycorrhizae. Different letters indicate significant differences between treatments at 0, 1, 10, 30 and 60 days of incubation ( $p \leq 0.05$ ).

registró una alta actividad FDA en tratamientos con  $\alpha$ -PIN, OE y 1,8-CIN en los 10, 30 y 60 días de incubación, respectivamente. Este resultado indica que la actividad FDA varió con el tiempo de incubación. A pesar de esta variación temporal en el patrón de respuesta, el CK mostró bajos valores de actividad FDA en todos los días de incubación. Aunque menos marcada, una tendencia similar fue observada en la actividad DHA. En el día 60 de incubación, el tratamiento CK mostró valores significativamente ( $p \leq 0.05$ ) más bajos que los encontrados en suelos tratados. Este resultado indica que el agregado de terpenos puros o de aceites esenciales es capaz de aumentar la actividad microbiana del suelo. Además, para ambas actividades enzimáticas, las mayores diferencias entre tratamientos fueron observadas hacia los 60 días de incubación. Se observó una significativa diferencia entre la acción del aceite esencial y su

monoterpeno sobre la actividad microbiana, indicando un posible efecto sinérgico entre los componentes de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008). Según la bibliografía consultada, muy pocos trabajos han evaluado el efecto del agregado directo de terpenos al suelo sobre la actividad microbiana en enzimas generalistas. Sin embargo, un aumento de la actividad microbiana total ha sido frecuentemente observada luego de la aplicación de dosis subletales de biocidas de uso agrícola (Chowdhury *et al.*, 2008). Recientemente, Koçak & Darici (2016) compararon la incorporación al suelo de hojas de laurel (*Laurusnobiliscon L.*) con la aplicación directa de 1,8-CIN y concluyeron que la incorporación de hojas de laurel y la aplicación de 1,8-CIN incrementaron significativamente la actividad microbiana edáfica y las tasas de mineralización de C. Tanto la degradación de terpenos como los procesos relacionados con

la detoxificación celular producen un significativo incremento en la actividad microbiana (Musilova *et al.*, 2016). La actividad antimicrobiana de los monoterpenos ha sido reportada por diversos autores y se asocia con sus características lipofílicas (Ludley *et al.*, 2009). Los monoterpenos actúan por disrupción de la membrana citoplasmática microbiana, disminuyendo su impermeabilidad a protones y grandes iones, y cambiando su fluidez (Bakkali *et al.*, 2008; Ryu *et al.*, 2018). En concordancia con estos resultados, diversos autores han observado un incremento a corto plazo de la actividad enzimática de suelos que han sido expuestos a diversos aceites esenciales (Vokou & Liotiri, 1999).

Pocos estudios han evaluado el efecto de terpenos y/o aceites esenciales sobre la estructura de las comunidades microbianas edáficas. En el presente estudio, la aplicación de monoterpenos y/o aceites esenciales fue capaz de alterar la estructura de las comunidades microbianas del suelo (**Figura 3**). Excepto con la aplicación de 1,8-CIN, el tratamiento CK mostró valores significativamente menores de bacterias Gram-negativas que el resto de los tratamientos. En parcial concordancia con este resultado, diversos autores han informado que algunos metabolitos secundarios de plantas, tales como monoterpenos pueden incrementar las poblaciones de bacterias Gram-negativas, ya que algunos de estos organismos son capaces de utilizar estructuras terpénicas como fuente de carbono (Uhlik *et al.*, 2013). Es posible que el diferente comportamiento de las comunidades bacterianas Gram-negativas frente a la aplicación del 1,8-CIN pueda deberse a su actividad biocida antimicrobiana, reportada previamente por diferentes autores (Marmulla & Harder, 2014). Similarmente, aunque con una tendencia menos marcada, las menores poblaciones de actinomicetes fueron detectadas en el tratamiento CK, siendo significativamente diferente a las poblaciones encontradas en suelo tratado con ambos aceites esenciales (OA y OE). La liberación de compuestos terpénicos desde poblaciones de actinomicetes y su ruta biosintética han sido descritas con anterioridad (Rabe *et al.*, 2013), lo que sugiere una baja susceptibilidad de estos microorganismos a terpenos volátiles. Estos resultados son

concordantes con otro estudio en el que se registró un significativo incremento en poblaciones de actinomicetes luego de que un suelo cultivado con ajo fuera tratado con diferentes dosis del monoterpeno timol (Miñambres *et al.*, 2010). Los específicos mecanismos por los que estos aceites esenciales pueden incrementar las poblaciones de actinomicetes deberán ser investigados en trabajos futuros. Las bacterias Gram-positivas, biomasa fúngica y micorrizas vesículo-arbusculares no fueron afectadas por las concentraciones de aceites esenciales y monoterpenos utilizados en el presente trabajo. Sin embargo, la aplicación de ambos aceites esenciales (OA y OE) incrementó la biomasa microbiana total. En contraste con nuestros resultados, Asensio *et al.* (2012) reportó que los componentes orgánicos volátiles (conformados mayoritariamente por compuestos terpénicos) provenientes de rastrojo forestal pueden disminuir la biomasa microbiana. Sin embargo, otros autores han demostrado que algunos compuestos terpénicos de alto peso molecular, aplicados de manera directa al suelo, pueden incrementar la biomasa microbiana total (Adamczyk *et al.*, 2011). Esta aparente contradicción podría estar relacionada con la composición y estructura edáfica, estructura química de los compuestos y/o dosis terpénica. Los tratamientos con monoterpenos (1,8-CIN y  $\alpha$ -PIN) no incrementaron significativamente la biomasa microbiana edáfica. Así, estos resultados sugieren que el incremento de la biomasa microbiana observada en suelos tratados con aceites esenciales podría deberse, al menos en parte, a un efecto sinérgico de sus componentes (Kalemba & Kunicka, 2003).

## CONCLUSIONES

La aplicación de aceites esenciales y sus monoterpenos mayoritarios disminuyó las tasas de nitrificación sólo en algunos tiempos de incubación. En general, el suelo tratado con aceites esenciales y monoterpenos mostró alta actividad enzimática, especialmente hacia el final del período de incubación. Por último, la aplicación de aceites esenciales incrementó las poblaciones de bacterias Gram-negativas, actinomicetes y biomasa microbiana total. La potencialidad a campo de estos productos naturales para controlar las

poblaciones microbianas y la actividad enzimática en diferentes condiciones edáficas necesitan ser estudiados en trabajos futuros.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV. CONICET - UNC) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA - UNC) donde fue posible la realización de la investigación. Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Este trabajo fue financiado por CONICET y SECyT - UNC.

## BIBLIOGRAFIA

- Adam, G & H Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951.
- Adamczyk, S; B Adamczyk; V Kitunen & A Smolander. 2011. Influence of diterpenes (colophony and abietic acid) and a triterpene (beta-sitosterol) on net N mineralization, net nitrification, soil respiration, and microbial biomass in birch soil. *Biol. Fertil. Soils* 47: 715-720.
- Adamczyk, S; O Kiikkilä; V Kitunen & A Smolander. 2013. Potential response of soil processes to diterpenes, triterpenes and tannins: Nitrification, growth of microorganisms and precipitation of proteins. *Applied Soil Ecol.* 67: 47-52.
- Asensio, D; JC Yuste; S Mattana; À Ribas; J Llusà & J Peñuelas. 2012. Litter VOCs induce changes in soil microbial biomass C and N and largely increase soil CO<sub>2</sub> efflux. *Plant Soil* 360: 163-174.
- Bakkali, F; S Averbeck; D Averbeck & M Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Bastida, F; A Zsolnay; T Hernández & C García. 2008. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma* 147: 159-171.
- Beelem, PV & P Doelman. 1997. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34: 455-499.
- Böhme, L; U Langer & FBöhme. 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agric. Ecosys. Environ.* 109(2): 141-152.
- Bossio, D; KN Scow & K Graham. 1998. Determinants of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microb. Ecol.* 36: 1-12.
- Brussaard, L; PC de Ruiter & GG Brown. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric. Ecosys. Environ.* 121: 233-244.
- Chowdhury, A; S Pradhan; M Saha & N Sanyal. 2008. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian J. Microbiol.* 48(1): 114-127.
- Di Rienzo, JA; F Casanoves; MG Balzarini; L Gonzalez & M Tablada. 2013. Infostat - Software estadístico. Grup. InfoStat, FCA, Univ. Nac. Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Doran, JW & TB Parkin. 1994. Defining and assessing soil quality. En: JW Doran; DC Coleman; DF Bezdicek & BA Stewart (Eds.). *Defining soil quality for a sustainable environment.* Vol. 35. Pp. 3-21. Madison, WI, USA.
- García, C; T Hernandez & F Costa. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28: 123-134.
- Garveba, P; JA van Veen & JD van Elsas. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 243-270.
- Geisseler, D; BA Linnquist & PA Lazicki. 2017. Effect of fertilization on soil microorganisms in paddy rice systems – A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* 115: 452-460.
- Gil-Sotres, F; C Trasar-Cepeda; MC Leirós & S Seoane. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37: 877-887.
- Graham, M & R Haynes. 2005. Organic matter accumulation and fertilizer-induced acidification interact to affect soil microbial and enzyme activity on a long-term sugarcane management experiment. *Biol. Fertil. Soils.* 41: 249-256.
- Griffin, S; SG Wyllie & J Morkhoom. 1999. Determination of octanol water partition coefficient for terpenoids using reversed-Phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. A.* 864: 221-228.
- Houdkova, M; J Rondevaldova; I Doskocil & L Kokoska. 2017. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia* 118: 56-62.
- Jackson, LE; FJ Calderon; KL Steenwerth; KM Scow & DE Rolston. 2003. Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma* 114: 305-317.
- Kadoglidou, K; D Chalkos; K Karamanoli; IG Eleftherohorinos; HIA Constantinidou & D Vokou. 2014. Aromatic

- plants as soil amendments: Effects of spearmint and sage on soil properties, growth and physiology of tomato seedlings. *Scientia Horticulturae* 179: 25-35.
- Kainulainen, P & JK Holopainen. 2002. Concentrations of secondary compounds in Scot pine needles at different stages of decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 34: 37-42.
- Kalemba, D & AKunicka. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10(10): 813-829.
- Koçak, B & C Darici. 2016. Priming effects of leaves of *Laurus nobilis* L. and 1,8-cineole on carbon mineralization. *Chilean J. Agric. Res.* 76: 100-104.
- Kumar R; C Devakumar; V Sharma; G Kakkar; D Kumar & P Panneerselvam. 2007. Influence of physicochemical parameters of Neem (*Azadirachta indica* A Juss) oils on nitrification inhibition in soil. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1389-1393.
- Ludley, KE; CH Robinson; S Jickells; PM Chamberlain & J Whitaker. 2009. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forests is revealed by novel experimental system. *Soil Biol. Biochem.* 41(1): 117-124.
- Maarit Niemi, R; I Heiskanen; K Wallenius & K Lindstrom. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Meth.* 45: 155-165.
- Marmulla, R & JHarder. 2014. Microbial monoterpene transformations - A review. *Front. Microbiol.* 5: 346.
- Meriles, J; S Vargas Gil; C Conforto; G Figoni; E Lovera; G March & C Guzmán. 2009. Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil Tillage Res.* 103: 271-281.
- Miñambres, GG; MY Conles; El Lucini; RA Verdenelli; JM Meriles & JA Zygodlo. 2010. Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 161-170.
- Musilova, L; J Ridl; M Polivkova; T Macek & OUhlik. 2016. Effects of secondary plant metabolites on microbial populations: Changes in community structure and metabolic activity in contaminated environments. *Int. J. Molec. Sci.* 17(8): 1205.
- Puglisi, E; M Nicelli; E Capri; M Trevisan & AAM Del Re. 2005. A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere* 61: 1548-1557.
- Rabe, P; CA Citron & JS Dickschat. 2013. Volatile terpenes from actinomycetes: a biosynthetic study correlating chemical analyses to genome data. *Chem. Biochem.* 14: 2345-2354.
- Ryu, V; DJ McClements; MG Corradini & L McLandsborough. 2018. Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. *Food Chem.* 245: 104-111.
- Schlesinger, WH. 1997. Biogeochemistry. Academic Press. San Diego, California. USA.
- Smolander, A; J Lopoanon; K Suominen & V Kitunen. 2005. Organic matter characteristics and C and N transformations in the humus layer under two tree species, *Betula pendula* and *Piceaabies*. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1309-1318.
- Smolander, A; RA Ketola; T Kotiaho; S Kanerva; K Suominen & V Kitunen. 2006. Volatile monoterpenes in soil atmosphere under birch and conifers: Effects on soil N transformations. *Soil Biol. Biochem.* 38: 3436-3442.
- Uhlik, O; L Musilova; J Ridl; M Hroudova; C Vlcek; J Koubek; M Holeckova; M Mackova & T Macek. 2013. Plant secondary metabolite-induced shifts in bacterial community structure and degradative ability in contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotech.* 97(20): 9245-9256.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 1993a. Determination of ammonia nitrogen by semi-automated colorimetry. Environmental Monitoring Systems Laboratory. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. URL: [http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/351\\_2.pdf](http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/351_2.pdf)
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 1993b. Determination of nitrate-nitrite nitrogen by semi-automated colorimetry. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Environmental Protection Agency, Cincinnati, URL: [http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/353\\_2.pdf](http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/353_2.pdf). URL: [http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/350\\_1.pdf](http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/350_1.pdf)
- Uusitalo, M; V Kitunen V & ASomlander. 2008. Response of C and N transformations in birch soil to coniferous resin volatiles. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2643-2649.
- Vokou, D & S Liotiri. 1999. Stimulation of soil microbial activity by essential oils. *Chemoecology* 9(1): 41-45.
- White, CS. 1991. The role of monoterpenes in soil nitrogen cycling processes in ponderosa pine. *Biogeochem.* 12: 43-68.
- White, CS. 1994. Monoterpenes: Their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* 20(6): 1381-1406.
- Wood, SE; JF Gaskin & JH Langenheim. 1995. Loss of monoterpenes from *Umbellularia californica* leaf litter. *Biochem. Syst. Ecol.* 23: 581-591.