

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS INVASORAS (*Robinia pseudoacacia*, *Solanum bonariense* y *Oxalis pes-caprae*)

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

Elche

Septiembre 2022

Autora: Verdú Parreño, Malena

Tutora: Díaz Espejo, Gisela

Modalidad: Experimental

Departamento: Biología Aplicada. Área Botánica

COIR: 220727184805

Agradecimientos:

A mi tutora Gisela, por tu ayuda en todo momento, por tu paciencia y dedicación y por ponerme crema cada vez que me quemaba en el laboratorio, muchísimas gracias de corazón.

A mis amigas y amigos que me han acompañado en esta aventura y que han hecho de la universidad un recuerdo muy valioso y que guardaré por siempre.

A mi madre, porque desde pequeña siempre me dijo que lo más importante era que estudiara, estudiara y estudiara... Y aquí estoy cumpliéndolo, este trabajo es para ti, gracias por cuidarme y acompañarme siempre.





ÍNDICE

Resumen.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Las plantas invasoras como fuente de compuestos antimicrobianos.....	2
Bacterias patógenas y oportunistas	3
Hongos patógenos y oportunistas.....	3
Justificación y objetivos.....	5
METODOLOGÍA.....	6
Especies vegetales utilizadas.....	6
Recolección y preparación del material vegetal	9
Esterilización de los extractos	10
Medios de cultivo utilizados.....	11
Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados.....	12
ENSAYOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.....	13
Técnica de difusión en disco para la evaluación de la capacidad antibacteriana	13
Técnica de difusión en disco para la evaluación de la capacidad antifúngica.	14
Evaluación de la inhibición del crecimiento de los hongos por contacto directo con el extracto	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
Rendimiento de los extractos.....	16
Capacidad antibacteriana de extractos de plantas	17
Capacidad antifúngica de extractos de plantas.....	21
Inhibición del crecimiento del micelio por contacto directo con los extractos	23
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30



Resumen

Aunque las especies invasoras suponen una evidente amenaza para la biodiversidad y un grave problema de gestión ambiental, podrían suponer una alternativa para ciertos usos sociales debido a potenciales aplicaciones. Algunas cualidades como invasoras son la gran producción de biomasa que generan en los procesos de erradicación y su capacidad para producir toxinas o compuestos alelopáticos que podrían inhibir el crecimiento de microorganismos. Teniendo en cuenta la resistencia que desarrollan muchos microorganismos, el interés en la búsqueda de nuevos biocidas derivados de plantas y en particular, de especies invasoras, es evidente.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad antifúngica y antibacteriana *in vitro* de las especies invasoras *Robinia pseudoacacia*, *Solanum bonariense* y *Oxalis pes-caprae*. Los extractos se prepararon con acetona, metanol y etanol y se examinó su actividad antimicrobiana ante los hongos *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* y *Phytophthora citrophthora* y las bacterias *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, y *Staphylococcus epidermidis* usando las técnicas de aplicación directa de los extractos al medio y por difusión en disco.

Se observaron resultados variables, dependiendo de la planta, el extractante y el organismo diana. El mayor rendimiento se obtuvo con el extractante metanol, y la mayor efectividad, en líneas generales, con los extractos etanólicos. *R. pseudoacacia* y *S. bonariense* mostraron buena capacidad de inhibición del crecimiento de las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*, consideradas más sensibles, así como de los hongos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora citrophthora*, mientras que *O. pes-caprae* mostró resultados más dispersos. Se discute la idoneidad de las técnicas y extractantes usados.

Abstract

Although invasive species suppose an obvious threat to biodiversity and a serious environmental management problem, they could represent an alternative for certain social uses due to possible applications. Some qualities as invaders are the great production of biomass that they generate in the eradication processes and their capacity to produce toxic or allelopathic compounds that could inhibit microorganisms. Taking into account the resistance that many microorganisms develop, the interest in the search for new biocides derived from plants and, in particular, from invasive species, is evident.

In this work, the *in vitro* antifungal and antibacterial capacity of the invasive species *Robinia pseudoacacia*, *Solanum bonariense* and *Oxalis pes-caprae* has been studied. The extracts were prepared with acetone, methanol and ethanol and their antimicrobial activity against the fungi *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* and *Phytophthora citrophthora* and the bacteria *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus epidermidis* was developed using the techniques of direct application of the extracts to the medium and by disk diffusion test.

Variable results were observed, depending on the plant, the extractant and the target organism. The highest yield was obtained with the methanol extractant, and the highest efficiency, in general, with the ethanolic extracts. *R. pseudoacacia* and *S. bonariense* showed good capacity to inhibit the growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus* bacteria, considered more sensitive, as well as the fungi *Botrytis cinerea* and *Phytophthora citrophthora*, while *O. pes-caprae* showed more scattered results. The suitability of the techniques and extractants used is discussed.

Palabras clave/Key words: Hongos/fungi, bacteria/bacterium, plantas invasoras/invasive plants, extracto/extract, difusión disco/disk diffusion.



INTRODUCCIÓN

Las plantas invasoras como fuente de compuestos antimicrobianos

Desde hace muchos años se tiene conocimiento de que las plantas suponen una fuente de compuestos antimicrobianos, por lo que tradicionalmente se han utilizado con fines medicinales o como biocidas frente a patógenos vegetales. Las plantas producen una gran cantidad y variedad de metabolitos secundarios, no necesarios para el desarrollo normal de la planta, a diferencia de los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la defensa de la planta frente a amenazas tales como los herbívoros o incluso otras especies vegetales. Entre estas sustancias destacan las fitoanticipinas, que están presentes de forma habitual en las plantas, y las fitoalexinas, cuya presencia aumenta en respuesta a la invasión bacteriana, tal y como señalan Domingo y López-Brea (2003). Para defenderse, las plantas elaboran enzimas que provocan la rotura de las paredes celulares de los microorganismos o son capaces de neutralizar las toxinas de origen bacteriano. Estudios anteriores han evidenciado que la estructura y composición de la pared celular también cambia, haciéndose más rígida (Jiménez et al., 2003). Los principales grupos de compuestos orgánicos producidos por las plantas están vinculados con el fenol y sus derivados. Destacan las quinonas, que son anillos aromáticos con alta reactividad y actividad antimicrobiana, y los taninos y flavonas, cuya actividad se debe a los compuestos que forman con las proteínas del soluto y con la pared celular bacteriana. También puede formar terpenoides, compuestos nitrogenados y alcaloides.

La mayoría de las especies introducidas y naturalizadas pueden adaptarse a sus nuevos ambientes sin suponer un riesgo para las plantas autóctonas de la zona. Sin embargo, es posible encontrar una pequeña proporción de especies no nativas que una vez introducidas son capaces de dominar un hábitat por completo, transformando comunidades ricas en diversidad a comunidades prácticamente pobladas por una sola planta. A estas especies se les refiere de manera común como invasoras (Reinhart et al., 2006). En este sentido, el Convenio de Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica (CBD, 2007) considera como especies exóticas invasoras (EEI) aquellos organismos (plantas, animales, patógenos y otros organismos) alóctonos en un ecosistema determinado que pueden causar perjuicios económicos, ambientales o afectar negativamente a la salud humana.

Se calcula que en torno a un 10-14 % de la flora total en España no es nativa, lo que supone 937 taxones al nivel de subespecie, 800 de éstos en la Península y Baleares. De estos alóctonos, unas 123 son las especies exóticas naturalizadas que causan daños ecológicos (Andreu y Vilá, 2007, Sanz-Elorza et al., 2004). Entre los hábitats que suelen colonizar, destacan los ambientes con gran influencia antrópica como los ruderales, viarios y urbanos con un 70 %, seguido por los agroecosistemas. La cifra es provisional y tiende a aumentar con el tiempo con el proceso de introducción de nuevas especies foráneas activado por la acción humana (Sanz-Elorza et al., 2004).

Históricamente, se han postulado varias hipótesis para explicar el éxito de las plantas invasoras (Hierro et al., 2005). Se destaca la hipótesis de las nuevas armas: Esta hipótesis se basa en la capacidad de algunas plantas invasoras de usar mecanismos de competencia, tales como la alelopatía y/o la producción de compuestos fitotóxicos o antimicrobianos que permiten desplazar a las especies nativas, tanto las vegetales como a su microflora del suelo asociada. En algunas especies, la capacidad competitiva puede estar también relacionada con su elevada capacidad de crecimiento, su gran eficiencia fotosintética o la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico.



Diversos trabajos apuntan a la producción de compuestos bioactivos por parte de especies invasoras, que pueden manifestar actividad inhibitoria del crecimiento de hongos o bacterias patógenas o no, tanto *in vitro* como *in vivo* (Cohrane, 1999; Dana et al., 2010; Khan y Yadav, 2011; Singh et al., 2021). Esta actividad antimicrobiana puede resultar especialmente interesante para el control de microorganismos patógenos y oportunistas.

Bacterias patógenas y oportunistas

Las bacterias son los microorganismos más numerosos del planeta y pueden encontrarse en todos los hábitats acuáticos y terrestres. La reproducción de las bacterias se da por duplicación, obteniendo células con información genética hereditaria idéntica, estas crecen hasta un tamaño determinado y después se reproducen por fisión binaria, de manera asexual. Presentan una gran variedad de tipos de metabolismo, según la fuente de carbono que utilicen y pueden formar distintas asociaciones con otros organismos. Entre estas asociaciones están el comensalismo, el mutualismo y el parasitismo. Son las bacterias parásitas las que pueden provocar enfermedades, tanto en plantas, animales o humanos. Algunos ejemplos de bacterias son:

Micrococcus luteus, bacteria gram-positiva y saprófita que no puede vivir sin oxígeno, aerobia obligada. Se puede encontrar en polvo, agua, tierra y aire o formando parte de la microbiota bacteriana de la piel de mamíferos. Puede ocasionar patologías como la endocarditis, infecciones pulmonares o artritis séptica.

Escherichia coli, bacteria gram-negativo que vive en el intestino. Es capaz de desarrollarse en entornos con y sin oxígenos (aerobio facultativo) y su temperatura óptima de crecimiento se encuentra a los 37°C. Es un microorganismo ampliamente utilizado en el laboratorio, debido a su rápido crecimiento y pocas exigencias nutricionales, además cuentan con un genoma altamente flexible. Algunas cepas pueden originar diarrea, náuseas, infecciones o vómitos al transmitirse a través de los alimentos.

Staphylococcus epidermidis, bacteria gram-positiva que forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas humanas, sin embargo puede causar distintas infecciones intrahospitalarias oportunistas.

Hongos patógenos y oportunistas

Los hongos son organismos eucariotas y heterótrofos, generalmente filamentosos, con paredes celulares altamente elásticas que protegen contra el estrés ambiental y están compuestos de quitina, glucano y glicoproteínas. Dado que son heterótrofos, necesitan obtener compuestos de carbono de otras fuentes y, por esta razón, muchas especies son saprófitos, los principales descomponedores de cadáveres de animales y plantas en muchos ecosistemas. Otros son parásitos de plantas o animales, que en muchos casos causan enfermedades y por lo tanto son patógenos (Agrios, 2005). Se denomina hongos oportunistas aquellos que son esencialmente saprófitos de vida libre pero que cuando se desarrollan de manera extensiva sobre sustratos vegetales son capaces de causar estragos y pérdidas económicas. Muchas enfermedades de postcosecha y productos alimentarios almacenados son causadas por hongos oportunistas, mientras que otras enfermedades vegetales son producidas por hongos patógenos que habitan en el suelo y atacan e sistema vascular de la planta. Por ejemplo:



Phytophthora citrophthora, se la conoce también como el hongo causante de la podredumbre parda de los cítricos. Este hongo crece en el sistema vascular de la planta. Pertenece al grupo Oomycota.

Fusarium sp, grupo altamente diverso de hongos filamentosos, constituido por muchas especies y variedades, colonizan las partes subterráneas y aéreas de las plantas, residuos y otros sustratos orgánicos. Causan enfermedades sistémicas que se presentan como marchitamientos o podredumbres. Aun así, resulta que algunas especies son provechosas en la agricultura ecológica.

Botrytis cinerea, hongo saprófito y parásito-patógeno de gran cantidad de especies vegetales, se le conoce también como moho gris o podredumbre gris. Suele colonizar flores y fruto, sobre todo al final de la floración o en la maduración del fruto.

Alternaria sp, Las distintas especies componen uno de los mayores patógenos de plantas, producen daños previamente y tras la cosecha de productos agrícolas. Su inhalación repetida puede causar reacciones alérgicas y problemas respiratorios asociados como rinitis alérgica o asma en humanos.

Estos tres últimos son hongos anamórficos (no presentan o no se les conoce reproducción sexual o bien constituyen la fase asexual de otro hongo), pertenecientes al grupo Ascomycota.





Justificación y objetivos

Aunque las especies invasoras suponen una evidente amenaza para la biodiversidad y un grave problema de gestión ambiental, recientemente se viene sugiriendo que podrían suponer una alternativa para ciertos usos sociales debido a potenciales aplicaciones en fitorremediación, producción de biocombustibles o usos medicinales o fitosanitarios (Singh et al., 2021). Entre otras razones, su cualidad como invasoras reside en su capacidad para producir toxinas o compuestos alelopáticos que podrían inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. Otra de sus características como invasoras es la abundancia de poblaciones en determinadas áreas y la gran producción de biomasa, lo que suele generar enormes cantidades de materia vegetal en los procesos de erradicación y control que requiere de un procesado específico.

Por otro lado, en los últimos años ha crecido el interés por buscar nuevos compuestos antimicrobianos, principalmente los obtenidos a partir de plantas (Dana et al., 2010), al ser consideradas más respetuosas con el medio ambiente y menos perjudiciales para el ser humano. Esto se debe a que uno de los problemas más graves de salud pública y ambiental a los que se enfrenta la sociedad es la resistencia que están desarrollando muchos microorganismos, principalmente bacterias y hongos, frente a biocidas y antifúngicos que se usan para tratar las enfermedades que producen ya sea en humanos o en plantas. Como es de esperar esto conlleva a la ineffectividad de estos productos y por ende los agentes patógenos son más prevalentes. Además, como estos biocidas tienen un origen sintético producen efectos de acumulación de residuos en el medio ambiente y pueden terminar siendo perjudiciales para la salud. Muchos de estos estudios se han centrado en plantas medicinales ya que tradicionalmente son las que se han usado por sus propiedades terapéuticas y antisépticas, pero suele tratarse de especies escasas, en ocasiones vulnerables o protegidas por la legislación.

Sin embargo, existe un campo muy poco explorado y con muchas posibilidades, que es el uso potencial de las plantas invasoras en la obtención de compuestos bioactivos, lo que podría suponer un aprovechamiento secundario de material vegetal de especies abundantes pero usualmente rechazadas, todo ello sin provocar alteraciones en la flora autóctona ni poner en riesgo a ciertas especies vulnerables.

Por ello, se plantean los siguientes objetivos:

Como objetivo principal: evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas invasoras.

Como objetivos específicos se plantea:

- Objetivo preliminar: Seleccionar y localizar las especies invasoras objeto de estudio
- Elaborar extractos de plantas invasoras con diferentes extractantes y determinar su rendimiento.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana (antifúngica y antibacteriana) de los extractos.

METODOLOGÍA

Especies vegetales utilizadas

Antes de comenzar con el estudio experimental, se llevó a cabo un trabajo de búsqueda bibliográfica sobre especies invasoras que estuvieran presentes en la zona del Levante español y sobre las que se hubiera señalado cierta capacidad alelopática o tóxica, utilizando para ello al Atlas de las Plantas Alóctonas Invasoras en España, publicado por el Ministerio de Medio Ambiente (Sanz-Elorza et al., 2004; www.miteco.gob.es).

Con esta información, se realizaron varias salidas de campo durante los meses de crecimiento vegetativo (febrero-mayo) para localizar las especies. En función de su abundancia y disponibilidad, para este trabajo se seleccionaron las especies que se describen a continuación y en la tabla 1:

- *Robinia pseudoacacia*. (Figura 1)

Árbol caducifolio de hasta 25 m, espinoso, con sistema radicular robusto y largo. Hojas alternas, pecioladas, imparipinnadas, con folíolos elípticos u ovados, agudos en el ápice. Inflorescencias en racimos axilares, péndulos. Fruto en legumbre comprimida, ligeramente alada, de color pardo rojizo. Es bastante indiferente a la naturaleza del substrato, aunque prefiere luz. Es bastante resistente al frío y a la contaminación por lo que se utiliza mucho como árbol ornamental urbano.

Se introdujo como ornamental en Europa. Es invasora en buena parte de las regiones templadas del Mundo. Invadiendo claros de bosques, y provocando el desplazamiento de la flora autóctona. Su rápido crecimiento y su facilidad para emitir brotes de raíz la hacen muy difícil de eliminar. Se ha descrito que, aunque raramente, puede producir toxicidad por ingestión (Calzado et al., 2009)



Figura 1. *Robinia pseudoacacia* en la localidad de recolección. Fuente propia (izquierda). Detalle de la inflorescencia. Fuente: Sanz-Elorza et al., 2004 (derecha).

- *Solanum bonariense*. (Figura 2)

Arbusto de 1,5-2 m de altura, con los tallos jóvenes cubiertos de pelos y glabros los viejos. Hojas anchamente elípticas u ovadas, agudas en el ápice y redondeadas o deltoideas en la base que con frecuencia es asimétrica, con el margen sinuado-lobado a veces con espinas sobre las nerviaciones del envés. Inflorescencias en cincinnos compuestos terminales, multifloras, densas. Fruto en baya, esférica, amarilla o anaranjada. Se reproduce tanto por semilla como asexualmente por medio de rizomas. Prefiere suelos profundos, nitrificados y con cierta humedad.

Se conoce naturalizada en nuestro país desde finales del siglo XIX. Está considerada una especie invasora en numerosas regiones templado-cálidas y subtropicales del Planeta. En el sudoeste de Europa se encuentra plenamente naturalizada donde se comporta como ruderal y viaria. Puede llegar a ser tóxica en rumiantes (García y Capelli, 2016).

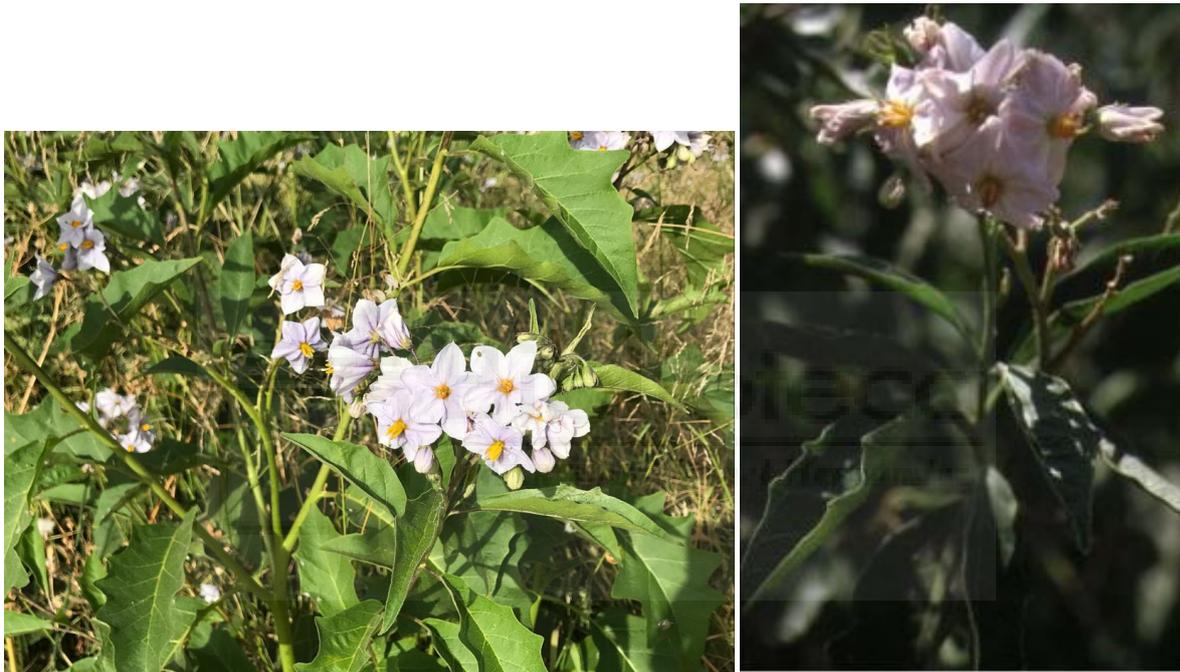


Figura 2. *Solanum bonariense* en la localidad de recolección. Fuente propia (izquierda). Detalle de la inflorescencia. Fuente: Sanz-Elorza et al., 2004 (derecha)

- *Oxalis pes-caprae* (Figura 3)

Herbácea perenne, cespitosa, con un bulbo enterrado del que emerge un tallo subterráneo anual, portador de bulbillos y que acaba en una roseta de hojas situada al nivel del suelo. Flores en cimas umbeliformes sobre un pedúnculo de 10-30 cm. En Europa y América del Norte no fructifica, propagándose exclusivamente de forma vegetativa a través de los bulbillos. Cada bulbo puede producir más de 20 bulbillos por año, de dispersión principalmente antropócora, por medio del transporte de substratos contaminados (residuos de jardinería, remoción de tierras contaminadas, etc.) o por medio de otros vectores: ornitocoria, hidrocoria, anemocoria, etc.

Produce daños económicos y ambientales, ya que invade de manera intensísima los cultivos de las zonas cálidas y subtropicales, en especial las plantaciones de cítricos. En las zonas invadidas forma cubiertas densas que acaparan la luz y el espacio, desplazando a la flora nativa, además de inhibir la



germinación de sus semillas. Contiene oxalatos que puede provocar envenenamiento en el ganado (Máximo, 2021).

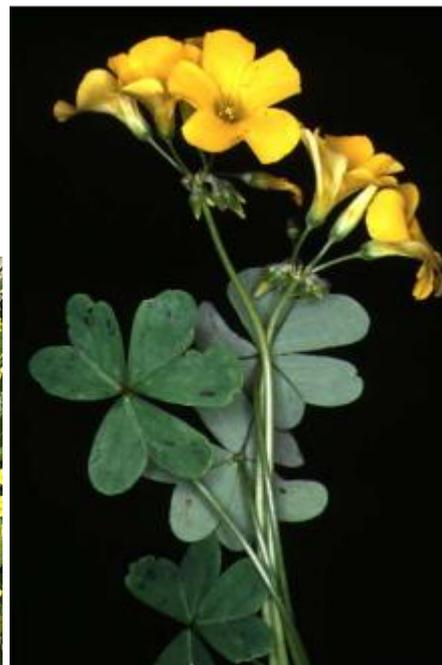


Figura 3. *Oxalis pes-caprae* en la localidad de recolección. Fuente propia (izquierda). Detalle de la inflorescencia. Fuente: Sanz-Elorza et al., 2004 (derecha).

NÚM. REGISTRO	NOMBRE CIENTÍFICO ^a	NOMBRE COMÚN	FAMILIA ^b	LOCALIDAD/COORDENADAS	HÁBITAT
5	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Falsa acacia	Fabáceas o Leguminosas	La Ñora, Murcia 37°59'30.2"N 1°11'26.2"W	Jardín
6	<i>Solanum bonariense</i> L.	Naranjito	Solanáceas	Murcia 38°00'14.1"N 1°07'25.9"W	Cultivo abandonado
7	<i>Oxalis pes-caprae</i> L.	Agrio	Oxalidáceas	La Ñora, Murcia 37°59'26.5"N 1°11'24.3"W	Terreno abandonado

Tabla 1. Plantas invasoras usadas para la elaboración de extractos. (a): Filiación taxonómica según International Plant Names Index (IPNI, 2022). (b): Localización y coordenadas según Google Maps.

Recolección y preparación del material vegetal

Para cada especie se seleccionaron al menos tres individuos adultos en buen estado, se recogieron hojas de tres zonas de la planta distintas (zona basal, media y superior), se mezclaron para formar una muestra compuesta y almacenaron en bolsas de papel convenientemente rotuladas. Las hojas que presentaron daños, síntomas de enfermedad o en mal estado fueron desechadas. Se utilizaron las hojas, ya que es la parte de la planta donde se almacena mayor cantidad de metabolitos secundarios y por tanto hay mayor probabilidad de manifestar actividad antimicrobiana. Para facilitar el trabajo en el laboratorio a cada especie se le asignó un número que las identificara y que se mantuvo constante para todos los ensayos.

Las muestras se lavaron posteriormente en el laboratorio con agua destilada y se eliminó el exceso de agua con papel secante, después se extendieron y se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar a la sombra. Cuando las plantas estuvieron listas se apartaron los tallos, las hojas se trituraron en un molinillo marca Braun® y se guardaron en botes de plástico cerrados y almacenados en oscuridad.

Preparación de los extractos vegetales

Para obtener los extractos se utilizaron como extractantes Acetona marca TOCHEM con una riqueza del 99%, Etanol + cloruro de Benzalconio (en adelante CLOR), CIDAS al 96 %, Etanol marca Applichem PANREAC al 96 % y Metanol Applichem PANREAC al 90 %.

Una vez las muestras vegetales trituradas se pasó a añadir el extractante a la proporción 1:10 (4 gramos de planta + 40 mL de extractante) en tubos de plástico tipo falcon de 50 cc de capacidad.

Los tubos se cerraron, se pusieron en una gradilla que se cubrió con papel aluminio y se colocaron en un agitador marca OVAN ® (Figura 4) durante 24 horas.

Posteriormente se centrifugaron en una centrifuga Heraeus modelo Labofuge 400 (Figura 4) durante 10 minutos a 3500 rpm. Al terminar se decantó el sobrenadante a unos nuevos tubos limpios que se pesaron previamente.

Para eliminar totalmente el extractante se dejaron evaporar todos los botes (debidamente marcados por planta y extractante) a temperatura ambiente bajo chorro de aire en la campana extractora. (Figura 4). En el caso del extractante etanol +CLOR y con el fin de aumentar la superficie de evaporación para acelerar la evaporación, se colocaron en placas de cristal.

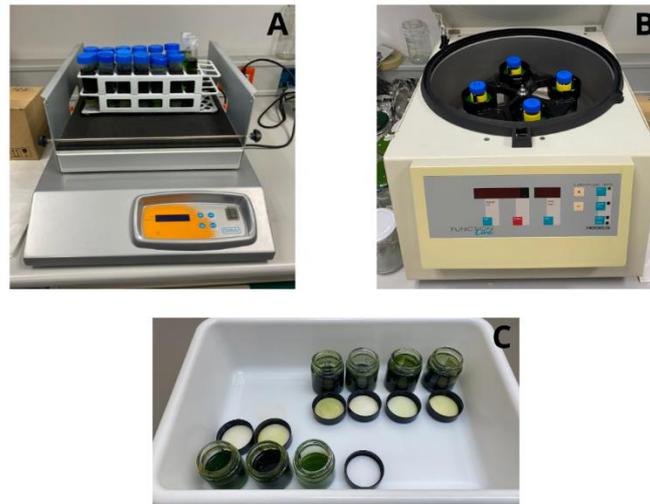


Figura 4. Detalles del proceso de obtención de los extractos vegetales. Tubos en agitación (A); Proceso de centrifugado en centrífuga Heraeus modelo Labofuge 400 (B); Botes bajo chorro de aire en la campana extractora para la eliminación del extractante (C).

Cuando se terminó el proceso de evaporación se pesaron de nuevo los extractos y se calculó el peso de extracto seco por diferencia de pesadas. Con los datos que obtuvimos se determinó el rendimiento de la extracción, dividiendo el peso del extracto entre el peso de la muestra original y multiplicándolo por 100.

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{\text{Peso extracto}}{\text{Peso seco original material vegetal}} \right) \times 100$$

Los extractos fueron reconstituidos en cada caso con su extractante original, (etanol los que se extractaron con etanol, acetona los que se extractaron con acetona) y con dimetilsulfóxido (en adelante DMSO) marca SIGMA-ALDRICH los que se extractaron con metanol. De esta manera se preparó una solución stock a 50 mg/mL que se conservó a 4° y en oscuridad hasta su uso.

Esterilización de los extractos

Una vez se obtuvieron los extractos diluidos a la concentración requerida se esterilizaron por filtración previamente a su uso mediante filtros de membrana de acetato de celulosa estériles SCA grade, CHM® de 2.5 cm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro, realizándose el proceso en condiciones de esterilidad en cabina de flujo (Figura 5).

Se traspasaron a tubos de cristal estériles y se conservaron en frío durante los ensayos.



Figura 5. Proceso de esterilización de los extractos.

Medios de cultivo utilizados

Los medios de cultivo utilizados en los ensayos se escogieron en función del organismo a cultivar.

Para el cultivo de bacterias se utilizó Agar nutritivo (AN) (Figura 6). Siguiendo las instrucciones que proporciona el fabricante, se utilizaron 23 gramos de medio por cada litro de agua destilada, usando un agitador magnético se consigue que la disolución se homogenice. Para su esterilización, los frascos se autoclavan durante 20 minutos a 120°. Se utilizó Agar nutritivo marca CONDA®.

Después del autoclavado los frascos se dejan enfriar hasta una temperatura cercana a los 45° y a continuación se procede al llenado de placas de 9 cm de diámetro en cabina de flujo laminar con tal de evitar algún tipo de contaminación.

Para el cultivo de hongos se utilizó medio de cultivo patata-dextrosa-agar (PDA, por las siglas en inglés de Potato Dextrosa Agar) (Figura 6). Atendiendo a las instrucciones del fabricante, se utilizaron 39 gramos de medio por cada litro de agua destilada, usando un agitador magnético se consigue que la disolución se homogenice. A continuación se autoclavó a 120° durante 20 minutos para su correcta esterilización. Se utilizó PDA marca CONDA®.

Después del autoclavado los frascos se dejan enfriar hasta una temperatura cercana a los 45° y a continuación se procede al llenado de placas de 9 cm de diámetro en cabina de flujo laminar para evitar contaminación.

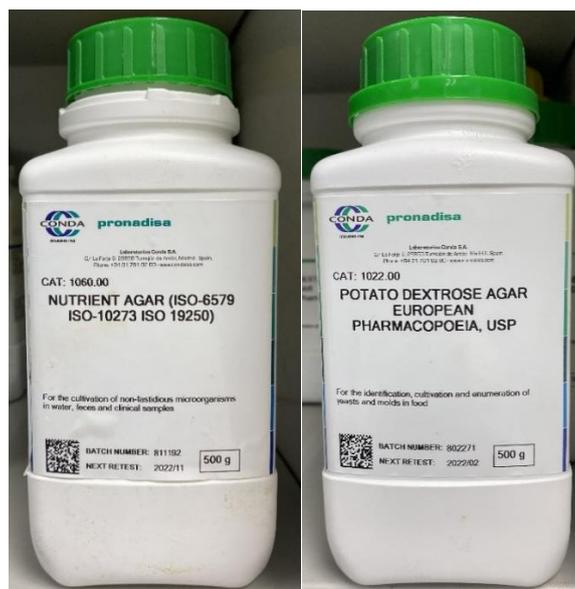


Figura 6. Agar nutritivo, medio de cultivo usado en los ensayos con bacterias (izquierda). Patata Dextrosa Agar, medio de cultivo usado en los ensayos con hongos (derecha).

Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados

Los hongos y bacterias que se han utilizado en este estudio se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente.

En el caso de los hongos, se seleccionaron especies patógenas de vegetales o saprófitos oportunistas capaces de ocasionar daños en alimentos, de nula patogenicidad en humanos. Las especies patógenas se obtuvieron de colecciones de cultivo, mientras que los saprofitos se aislaron de alimentos de origen vegetal deteriorados y con muestras aparentes de colonización fúngica. Para ello, se tomaron pequeñas porciones de hifas del hongo y se sembraron en placa con medio de cultivo PDA. Tras incubación en oscuridad durante 3-5 días se reaislaron y pasaron a medio fresco. La identificación provisional de los hongos se realizó según características morfológicas de la colonia y microscópicas del micelio y conidios o esporas.

En el caso de las bacterias, se utilizaron cepas no patógenas de colección, habitualmente usadas en docencia y ampliamente testadas en experimentos similares (Valera, R. com.pers.), proporcionadas por el Área de Microbiología de la UMH.

Hongos	Procedencia	Características
<i>Alternaria sp.</i> UMH 18007	Frutos de <i>Citrus x limón</i> (limón)	Saprófito Patógeno oportunista
<i>Botrytis cinerea</i> UMH 21005	Frutos de <i>Fragaria virginiana</i> (fresa)	Saprófito Patógeno oportunista
<i>Fusarium sp.</i>	Colección del CEBAS-CSIC, Murcia, Dr. J.A. Pascual	Parásito vascular
<i>Phytophthora citrophthora</i> CECT2353	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia	Parásito vascular

Tabla 2. Hongos utilizados en los ensayos del estudio.



Bacterias	Procedencia	Características
<i>Escherichia coli</i>	Colección de cultivos del área de Microbiología de la UMH	Enterobacteria Gram negativo
<i>Micrococcus luteus</i>	Colección de cultivos del área de Microbiología de la UMH	Saprófito Gram positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colección de cultivos del área de Microbiología de la UMH	Piel y mucosas Gram positivo

Tabla 3. Bacterias empleadas en los ensayos del estudio.

ENSAYOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

Técnica de difusión en disco para la evaluación de la capacidad antibacteriana

Con este ensayo se pretende comprobar si se produce una zona de inhibición en el crecimiento de las bacterias en placa con medio de cultivo, frente a los extractos vegetales que se han impregnado sobre un disco que se coloca en el medio de cultivo. Para ello se usa la técnica estandarizada de difusión en disco o método Kirby-Bauer (Bauer, 1996), según el protocolo M02-A12 descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2015).

El diseño experimental es el siguiente: Se utilizaron extractos de 3 plantas (*Robinia pseudoacacia*, *Solanum bonariense* y *Oxalis pes-caprae*) con 4 extractantes (etanol +CLOR, etanol, acetona y DMSO) frente a 3 bacterias (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*). Ampicilina, Amoxicilina y Cloramfenicol se usaron como controles positivos mientras que etanol +CLOR, etanol, acetona y metanol fueron los controles negativos. Esto implica un total de 19 tratamientos, con tres repeticiones para cada uno.

El procedimiento se llevó a cabo en la cabina de flujo, en condiciones estériles; además todo el material involucrado en el proceso se autoclavó previamente (agua, puntas de pipeta, discos de 6.5 mm de diámetro, placas de Petri, vacías y con medio (AN), hisopos para siembra, bisturí, pinzas...). Los extractos de las plantas y los controles negativos fueron previamente esterilizados por filtración según el método ya descrito previamente (pag. 10).

Los inóculos de las tres bacterias se prepararon inmediatamente antes de su uso, empleando un asa de Kolle para tomar una porción de la placa de Petri que contiene el cultivo stock de la bacteria y pasándolo a un tubo estéril con 5 mL de agua destilada. Se agitó durante 10-15 segundos en un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax y se ajustó la turbidez en un densímetro Biosan DEN-1 (Figura 9) a 0.5 unidades McFarland, añadiendo agua destilada o cultivo bacteriano según convenga, lo que equivale a un inóculo de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias.



Figura 7. Densímetro Biosan DEN-1 y agitador tipo vortex marca Heidolph Reax.

Para inocular las placas de Petri con el medio AN, se humedece un hisopo estéril en el inóculo, se elimina el exceso en las paredes del tubo y se siembra cada placa en césped en tres direcciones.

Las placas se dejaron secar, mientras se aplicaban los extractos correspondientes a los diferentes tratamientos impregnando discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro a razón de 25µL por disco. Se procedió de igual manera con los controles negativos. Para los controles positivos se usaron discos estériles de BioRAD® precargados con 10µg de Ampicilina, 25µg de Amoxicilina y 30µg de Cloranfenicol.

Los discos se colocaron en la superficie del medio anteriormente sembrado con ayuda de unas pinzas estériles. Se colocaron 4 discos por placa, de forma equidistante, rotulándolas debidamente.

A continuación, las placas se sometieron a un choque frío durante aproximadamente 2 horas para permitir la difusión de los compuestos, se incubaron en estufa a 37°C y a las 24 horas se midió la zona de inhibición de crecimiento de las bacterias con una regla milimetrada; en el caso de *S. epidermidis*, de crecimiento más lento se hizo otra medida a las 48 horas.

Técnica de difusión en disco para la evaluación de la capacidad antifúngica.

Con este ensayo se pretende comprobar si se produce una zona de inhibición en el crecimiento de los hongos en placa con medio de cultivo, frente a los extractos vegetales que se han impregnado sobre un disco que se coloca en el medio de cultivo. Para ello se usa la técnica estandarizada de difusión en disco o método Kirby-Bauer (Bauer, 1996), adaptada para hongos filamentosos según el protocolo M51-A descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010).

El diseño experimental es el siguiente: se utilizaron extractos de 3 plantas (*Robinia pseudoacacia*, *Solanum bonariense* y *Oxalis pes-caprae*) con 4 extractantes (etanol +CLOR, etanol, acetona y DMSO) frente a 3 hongos (*Alternaria sp*, *Botrytis cinérea* y *Phytophthora citrophthora*). Se usó Nistatina como control positivo, mientras que etanol +CLOR, etanol acetona y metanol fueron los controles negativos.

Esto implica un total de 17 tratamientos, con tres repeticiones para cada uno.

El procedimiento se llevó a cabo en cabina de flujo, en condiciones estériles. Además todo el material involucrado en el proceso se autoclavó previamente (agua, puntas de pipeta, discos de 6.5 mm de diámetro, placas de Petri, vacías y con medio (PDA), hisopos para siembra, bisturí, pinzas, discos de

control, etc.). Los extractos de las plantas y los controles negativos fueron previamente esterilizados por filtración según el método ya descrito previamente (pág. 10).

Siguiendo el protocolo para hongos filamentosos M38 A del CLSI (Cantón et al., 2007) modificado, para preparar los inóculos fúngicos, se parte de cultivos de 7 días crecidos a una temperatura ambiente de 25°C. Con la ayuda de un asa de Kolle se tomaron pequeñas porciones del cultivo y se introducen un tubo estéril con 5mL de agua destilada. Se agitó durante 10-15 segundos en un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax y se ajustó la turbidez en un densímetro Biosan DEN-1 (Figura 9) a 0.6 unidades McFarland, añadiendo agua destilada u hongo según convenga. Según estudios previos (Cantón et al., 2007), se comprobó que la turbidez de 0.5 unidades McFarland equivale a un rango de 70-80% de transmitancia medida a 530 nm, y a una densidad del inóculo de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias por mL, suficiente para garantizar un crecimiento homogéneo en el medio de cultivo (Martos et al., 2012). En el caso de *Phytophthora citrophthora*, y según pruebas previas, la turbidez se ajustó a 0.9 unidades McFarland. Los inóculos se prepararon justo antes de su uso. Para inocular las placas de Petri se humedece un hisopo estéril en el inóculo, se elimina el exceso en las paredes del tubo y se siembra cada placa en césped en tres direcciones.

Las placas se dejaron secar, mientras se aplicaban los extractos correspondientes a los diferentes tratamientos impregnando discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro a razón de 25µL por disco (Figura 8).

Se procedió de igual manera con los controles negativos. Para el control positivo de nistatina se usó discos estériles de BioRAD® impregnados con 100 IU de producto.

Los discos se colocaron en la superficie del medio anteriormente sembrado con ayuda de unas pinzas estériles. Se colocaron 4 discos por placa, de forma equidistante, rotulándolas debidamente.

A continuación, las placas se sometieron a un choque frío durante aproximadamente 2 horas para permitir la difusión de los compuestos, se incubaron en oscuridad a 28°C, y se realizaron seguimientos diarios, examinando las placas por ambos lados con luz directa, y sobre fondo claro o negro para poder distinguirlos mejor. Al cabo de tres-cinco días, según la velocidad de crecimiento del hongo, se midieron las zonas de inhibición con una regla milimetrada.



Figura 8. Carga de extractos sobre discos Whatman dentro de cabina de flujo laminar.

Evaluación de la inhibición del crecimiento de los hongos por contacto directo con el extracto

Con este ensayo se pretende determinar el efecto de la aplicación de los extractos al medio de cultivo sobre la dinámica de crecimiento de los hongos.

El diseño experimental es el siguiente: Se utilizaron extractos de 3 plantas (*Robinia pseudoacacia*, *Solanum bonariense* y *Oxalis pes-caprae*) con 4 extractantes (etanol + CLOR, etanol, acetona y metanol) que se enfrentaron con 3 hongos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. y *Phytophthora citrophthora*). Como controles negativos se usaron los mismos extractantes (etanol + CB, etanol, acetona y DMSO) y como control positivo se usaron placas sembradas sin ningún otro componente. El ensayo se realizó por duplicado.

Esto supone un total de 17 tratamientos para cada hongo.

En una cabina de flujo laminar en condiciones estériles, se dispusieron placas Petri con el medio adecuado para los hongos (PDA). En cada placa se agregó 600µL de los extractos y controles correspondientes extendiéndose por la placa con un asa de Drigalski estéril hasta conseguir una distribución homogénea.

Cuando se secaron los extractos se dispuso una porción de cada hongo, de 8 mm de diámetro en el centro de cada placa, obtenido de un cultivo de al menos 7 días, mediante el uso de un bisturí y un sacabocados.

Las placas se incubaron a 28⁰C en oscuridad y se examinándose su crecimiento con luz directa y un fondo claro u oscuro, midiendo el diámetro de la colonia con ayuda de una regla milimetrada cada dos-tres días, hasta que la colonia alcanzó el tamaño máximo posible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos

Como se puede observar en la figura 9, los extractos que han producido un mayor rendimiento son los que se obtuvieron con metanol, siendo los pertenecientes al género *Solanum bonariense* los que han obtenido un mayor porcentaje, seguidos por *Oxalis pes-caprae* y por último *Robinia pseudoacacia*.

Le siguen los extractos de etanol, con porcentajes entre 12.67 y 8.5%.

Después se encuentran los extractos de etanol con cloruro benzalconio, con unos porcentajes entre 7 y 3.75%.

Por último, los extractos de acetona son los que han demostrado un menor rendimiento, con porcentajes que se encuentran entre 3.75 y 2.5%.

Estos datos son consistentes con la bibliografía existente sobre este tema, que en general indica que el metanol es uno de los mejores solventes en cuanto a cantidad o rendimiento de productos extraídos, además de mejorar la extracción de algunos metabolitos como flavonoides, fenoles y otros compuestos antioxidantes (Kothari et al., 2012), lo que puede resultar interesante a la hora de plantear



extracciones a mayor escala. En contra, la toxicidad de este compuesto hace plantear la limitación de su uso. Por ello, se suele utilizar dimetilsulfóxido como solvente tras la extracción. El etanol, el metanol o la acetona son disolventes orgánicos que extraen compuestos de una amplia gama de polaridades. Sin embargo, dado que la eficiencia del metanol es mayor que la del etanol, se ha utilizado ampliamente para realizar extractos vegetales con diferentes finalidades.

Aunque existe una gran variación en el rendimiento obtenido dependiendo del método de extracción, especies de plantas y otros factores, se puede indicar que el rango del valor de rendimiento en este estudio (2.5 - 26.75%) está dentro de los valores obtenidos en otros trabajos (Mdee et al., 2009; Díaz et al., 2011; Mostafa et al., 2018; García, 2019; Pérez, 2019).

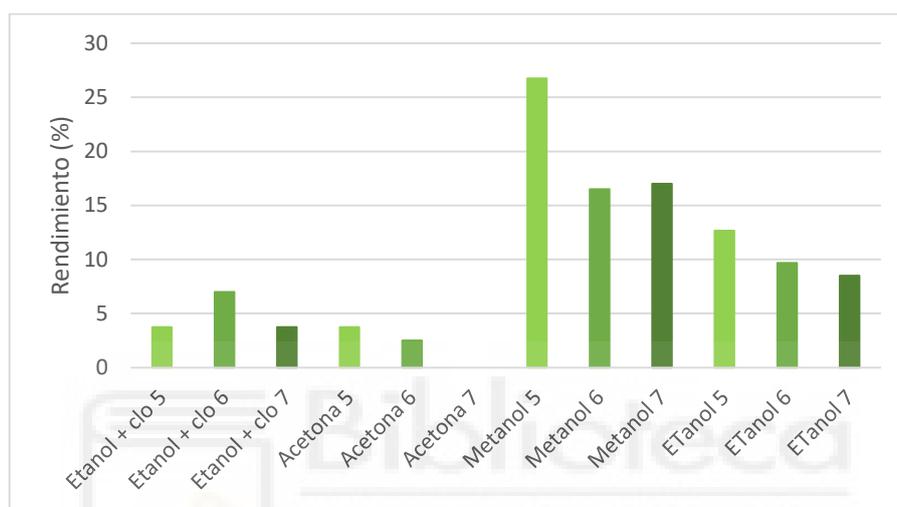


Figura 9. Rendimiento de los extractos obtenidos con los diferentes extractantes. El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*.

Capacidad antibacteriana de extractos de plantas

En las figuras 10-15 se muestran los valores e imágenes de las zonas de inhibición observadas producidas por los diferentes extractos, con resultados variables.

En el caso de la bacteria *Escherichia coli* (figuras 10 y 11), únicamente se observó halo de inhibición con los extractos obtenidos con etanol +CLOR, aunque este efecto se debe en parte al propio extractante, pues también se observó inhibición en el control correspondiente. No se descarta, sin embargo, un pequeño efecto inhibitorio de *R. pseudoacacia* y *O. pes-caprae*

En los controles positivos, cloranfenicol fue el que generó mayor halo de inhibición. El resto de controles negativos (DMSO, acetona y etanol) no inhibieron el crecimiento bacteriano.

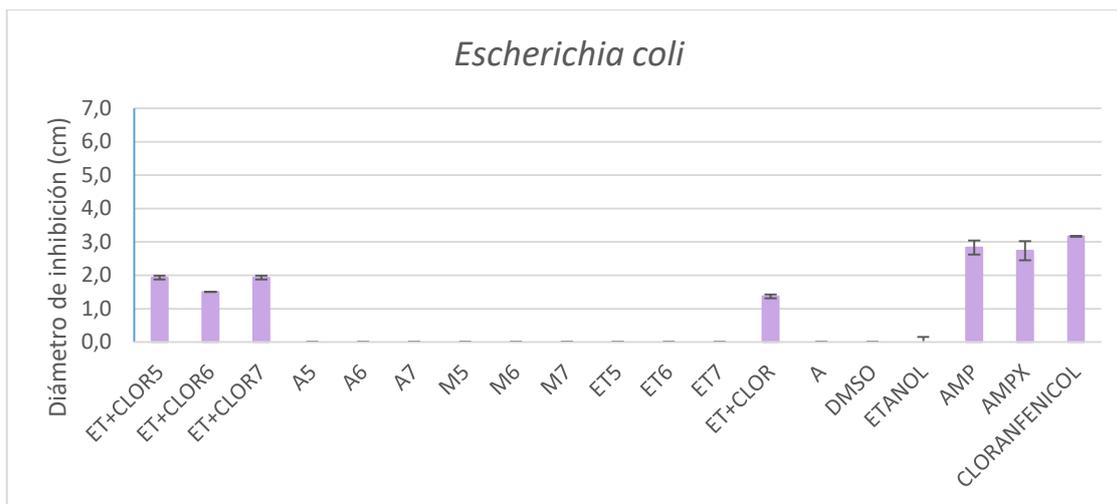


Figura 10. Diámetro de la zona de inhibición de *Escherichia coli* a las 24 horas del inicio del cultivo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (ET+CLOR), acetona (A), metanol (DMSO) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*. Como control positivo se ha utilizado ampicilina (AMP), amoxicilina (AMPX) y cloranfenicol.

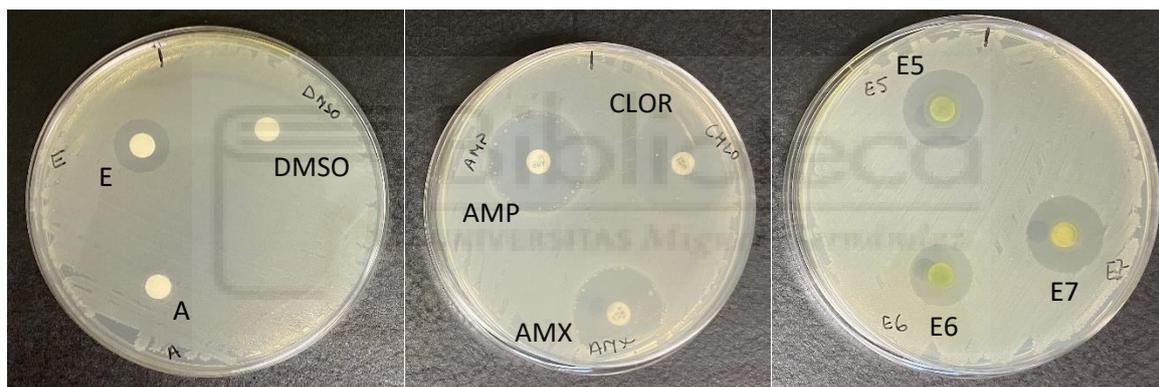


Figura 11. Cultivos de *Escherichia coli* en medio AN a las 24 horas de la siembra con extractos de etanol con cloruro benzalconio y controles positivos y negativos.

En cuanto a *Micrococcus luteus* (figuras 12 y 13), los controles positivos con antibiótico originaron un gran halo de inhibición, lo que sugiere la mayor sensibilidad de esta bacteria, tal como observaron (García, 2019 y Pérez, 2019). En los controles negativos podemos observar que el control de etanol +CLOR produce también un halo de inhibición.

Con respecto a los extractos ensayados, se puede observar que los más efectivos como antibacterianos fueron los de *R. pseudoacacia*, con todos los extractantes utilizados. También se observó un pequeño halo en el extracto de *S. bonariense* con el extracto de etanol y etanol +CLOR.

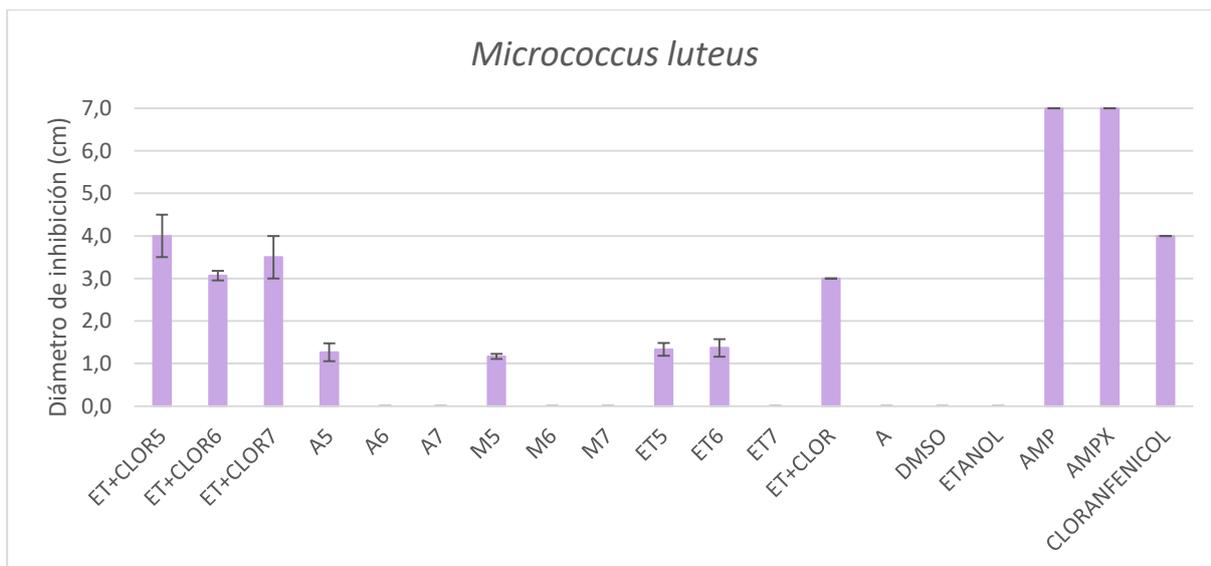


Figura 12. Diámetro de la zona de inhibición de *Micrococcus luteus* a las 24 horas del inicio del cultivo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (ET+CLOR), acetona (A), metanol (DMSO) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*. Como control positivo se ha utilizado ampicilina (AMP), amoxicilina (AMPX) y cloranfenicol.

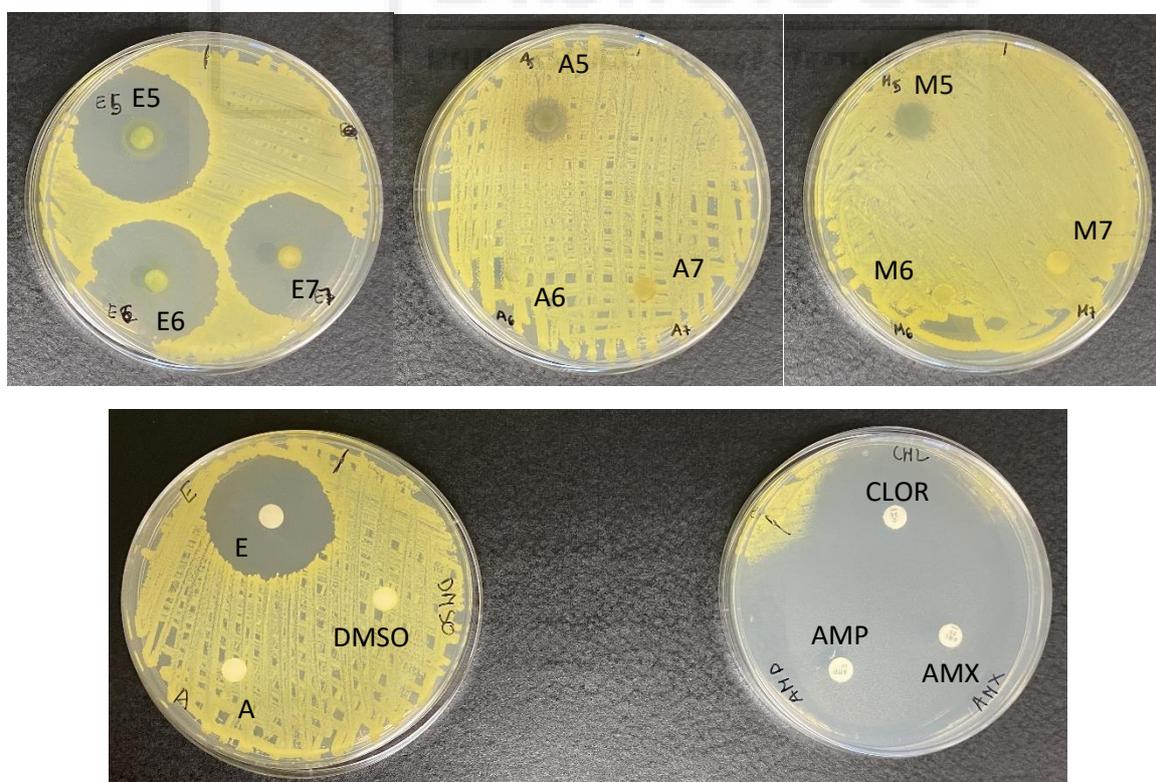


Figura 13. Cultivos de *Micrococcus luteus* en medio AN a las 24 horas de la siembra con extractos de etanol con cloruro de benzalconio (E), acetona (A) y metanol (M) de 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*. Y controles positivos y negativos.

Los resultados de *Staphylococcus epidermidis* se pueden observar en las figuras 14 y 15. Se pueden observar grandes halos de inhibición formados por los controles positivos, sobre todo por cloranfenicol, lo que valida el ensayo y apunta a la sensibilidad de esta especie, aunque en menor medida que *Micrococcus luteus*. Respecto a los controles negativos de nuevo podemos observar que el etanol con cloruro benzalconio produce halo de inhibición.

En este caso, *R. pseudoacacia* produjo halos de inhibición con todos los extractantes que se usaron. *Solanum bonariense* formó halo de inhibición con el extractante de etanol y algo con etanol+CLOR. Sin embargo en el caso de *O. pes-caprae* solo se observa halo de inhibición en el extractante de etanol + CLOR.

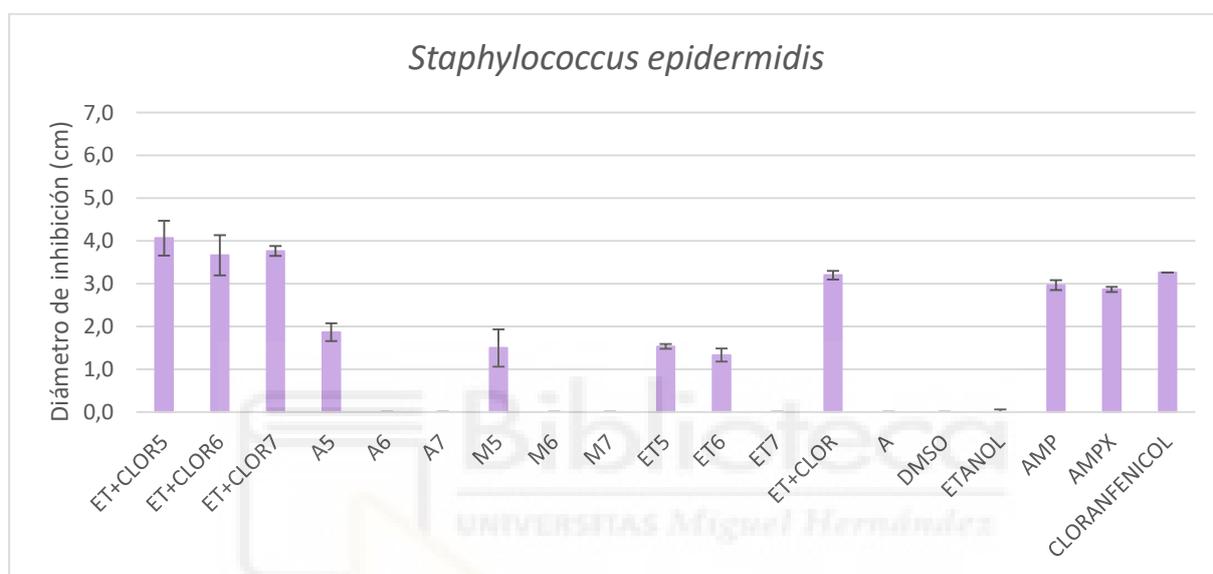


Figura 14. Diámetro de la zona de inhibición de *Staphylococcus epidermidis* a las 24 horas del inicio del cultivo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (ET+CLOR), acetona (A), metanol (DMSO) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*. Como control positivo se ha utilizado ampicilina (AMP), amoxicilina (AMPX) y cloranfenicol.

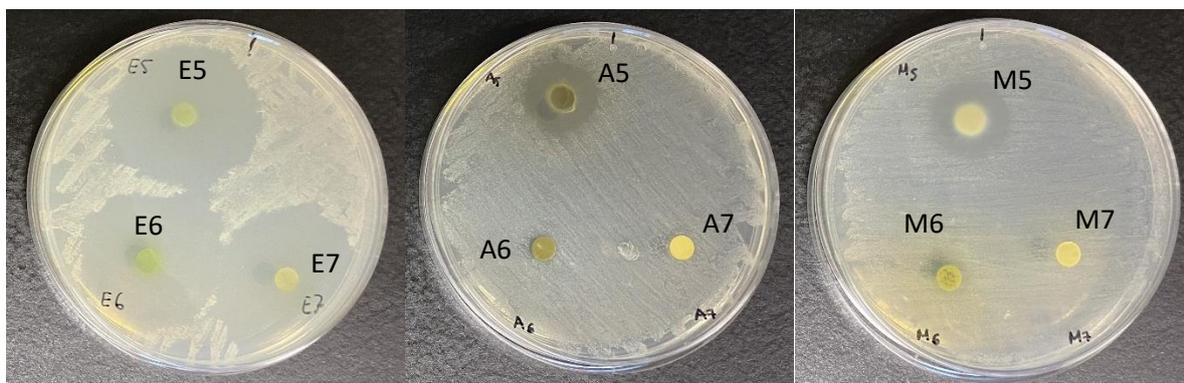




Figura 15. Cultivos de *Staphylococcus epidermidis* en medio AN a las 24 horas de la siembra con extractos de etanol con cloruro benzalconio (E), acetona (A) y metanol (DMSO) de 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*. Y controles positivos y negativos.

Estos resultados ponen de manifiesto que especies como *R. pseudoacacia* y en menor medida *S. bonariense* o *O. pes-caprae* pueden mostrar actividad antibacteriana frente a bacterias sensibles como *Staphylococcus epidermidis* o *Micrococcus luteus*. La actividad antibacteriana de *R. pseudoacacia* se ha atribuido anteriormente al alto contenido en compuestos volátiles fenólicos, flavonoides y taninos (Rosu et al., 2012), aunque estos autores observaron mayor actividad antibacteriana probablemente debido a la utilización de una cantidad de extracto mucho mayor que la utilizada por nosotras. En otros trabajos se ha descrito también que algunas especies de *Staphylococcus* son más susceptibles a extractos de plantas que *Escherichia coli* (Mostafa et al., 2018). También Cochrane (1999), en un estudio con plantas exóticas observó que *Staphylococcus aureus* era inhibida por 11 especies de plantas, mientras que *Escherichia coli* por ninguna. Una explicación sería que los extractos de plantas son más efectivos frente a bacterias Gram +, porque tienen una pared más simple que las Gram - como *Escherichia coli* (Wong et al., 2015). Esto explicaría el que las plantas sean más susceptibles a enfermedades producidas por bacterias Gram -, y que se hayan encontrado pocos extractos efectivos frente a éstas.

Capacidad antifúngica de extractos de plantas

Los valores de los diámetros de la zona de inhibición se muestran en la tabla 4. Los extractantes control no produjeron zona de inhibición, mientras que el control positivo Nistatina produjo zonas de inhibición en torno a 3 cm, en rangos similares a los observados por García (2019) y Pérez (2019), lo que valida el ensayo. Los extractos obtenidos con etanol+CLOR produjeron zonas de inhibición en *Alternaria* y *Botrytis cinerea*, siendo mucho menores los obtenidos con los extractos acetónicos, mientras que únicamente el extracto metanólico de *R. pseudoacacia* produjo inhibición. En el resto de los casos se observó una pequeña zona de inhibición al inicio del cultivo, que fue sobrepasada al poco tiempo por el micelio y que se ha registrado como cero. Es precisamente la especie *R. pseudoacacia* la planta que produjo inhibición en los dos hongos que crecieron con la mayoría de los extractantes.

Sin embargo, *Phytophthora citrophthora* no fue capaz de crecer en ningún medio, lo que atribuimos a deficiencias en la preparación del inóculo. Uno de los problemas más habituales en los test de difusión en disco con hongos filamentosos es preparar un inóculo lo suficientemente rico para producir un crecimiento homogéneo tras la siembra en césped pero que no genere colonias excesivas (Cantón et al., 2007). De hecho, este test está diseñado para bacterias. Aunque seguimos las indicaciones de la bibliografía y la experiencia previa a este respecto, no se obtuvo crecimiento, posiblemente debido al micelio frágil y poco denso y a la escasez de esporas producidas por esta cepa.

ZONA DE INHIBICIÓN 72h	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>
E+CLOR5	2,67±1,17	1,4±0,79	0±0
E+CLOR6	1,40±0,53	1,07±0,51	0±0
E+CLOR7	3,07±0,86	1,87±0,32	0±0
A5	2,10±2,01	0±0	0±0
A6	0,50±0,87	0,50±0,87	0±0
A7	0,50±0,87	0,50±0,87	0±0
M5	1,50 ± 0,10	1,50±0,10	0±0
M6	0±0	0±0	0±0
M7	0±0	0±0	0±0
ET5	0±0	0±0	0±0
ET6	0±0	0±0	0±0
ET7	0±0	0±0	0±0
E+CLOR	0±0	0±0	0±0
ACETONA	0±0	0±0	0±0
DMSO	0±0	0±0	0±0
ET	0±0	0±0	0±0
NISTATINA	3,40±0	3,10±0	0±0

Tabla 4. Diámetro de zona de inhibición a las 72 horas del inicio del cultivo. Los datos obtenidos son el resultado de la media de tres repeticiones \pm la desviación típica. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E+CLOR), acetona (A), metanol (M) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-Robinia pseudoacacia, 6-Solanum bonariense y 7-Oxalis pes-caprae.

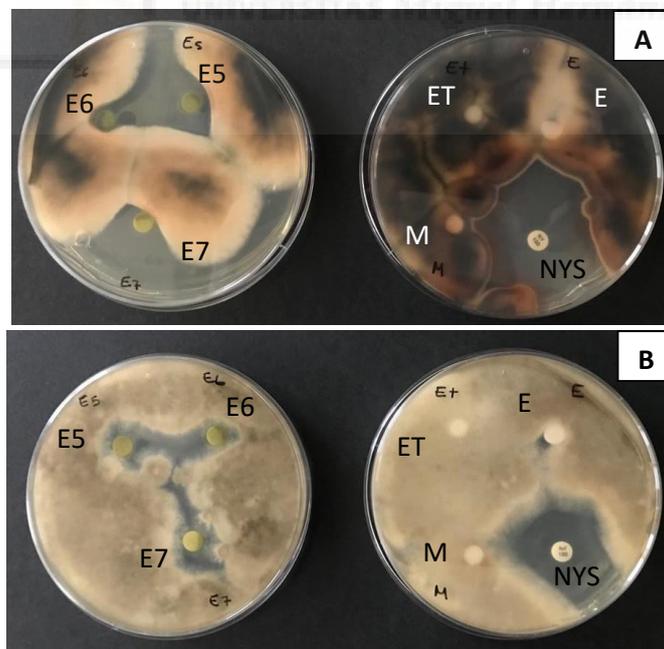


Figura 16 A y B. Cultivos de *Alternaria* (A) y *Botrytis cinerea* (B) en medio PDA a las 24 horas de la siembra con diferentes extractos vegetales y diferentes extractantes. La letra de los extractos (E) corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio. El número corresponde con la especie vegetal: 5-Robinia pseudoacacia, 6-Solanum bonariense y 7-Oxalis pes-caprae. (izquierda). Los controles negativos de dichos cultivos se tratan de Etanol con cloruro benzalconio (E), Etanol (E) y metanol (M) y control positivo Nistatina (NYS) (derecha).

Inhibición del crecimiento del micelio por contacto directo con los extractos

En el caso de *Botrytis cinerea* (Figuras 17 y 18) se puede observar una clara disminución del crecimiento con los extractos de etanol + CLOR de las tres especies ensayadas, aunque parece deberse parcialmente al extractante. En cuanto a los extractos en acetona, ninguno mostró poder inhibitorio. Respecto al etanol sí que podemos encontrar que los extractos de *R. pseudoacacia* y *S. bonariense* produjeron reducción en el diámetro de la colonia, y en menor medida el de *O. pes-caprae*.

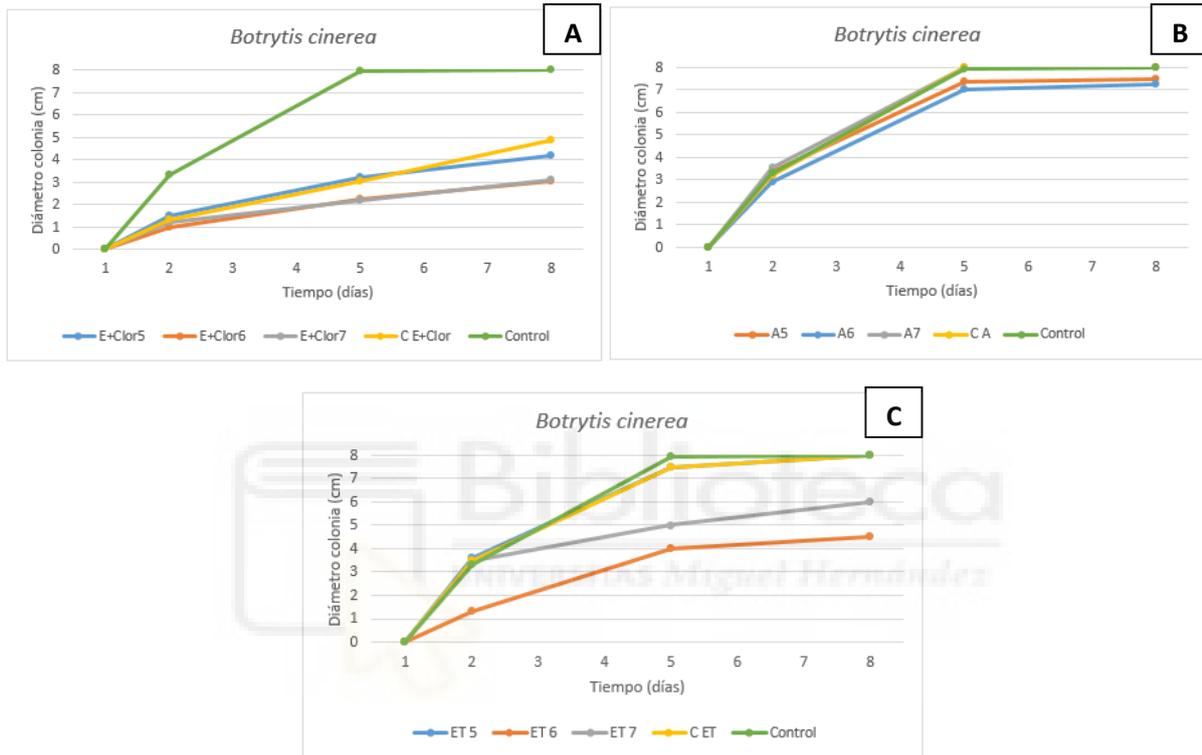


Figura 17 A, B y C: Crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* en medio PDA adicionado con extractos de plantas a lo largo del tiempo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E+CLOR), acetona (A) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-Robinia pseudoacacia, 6-Solanum bonariense y 7-Oxalis pes-caprae.

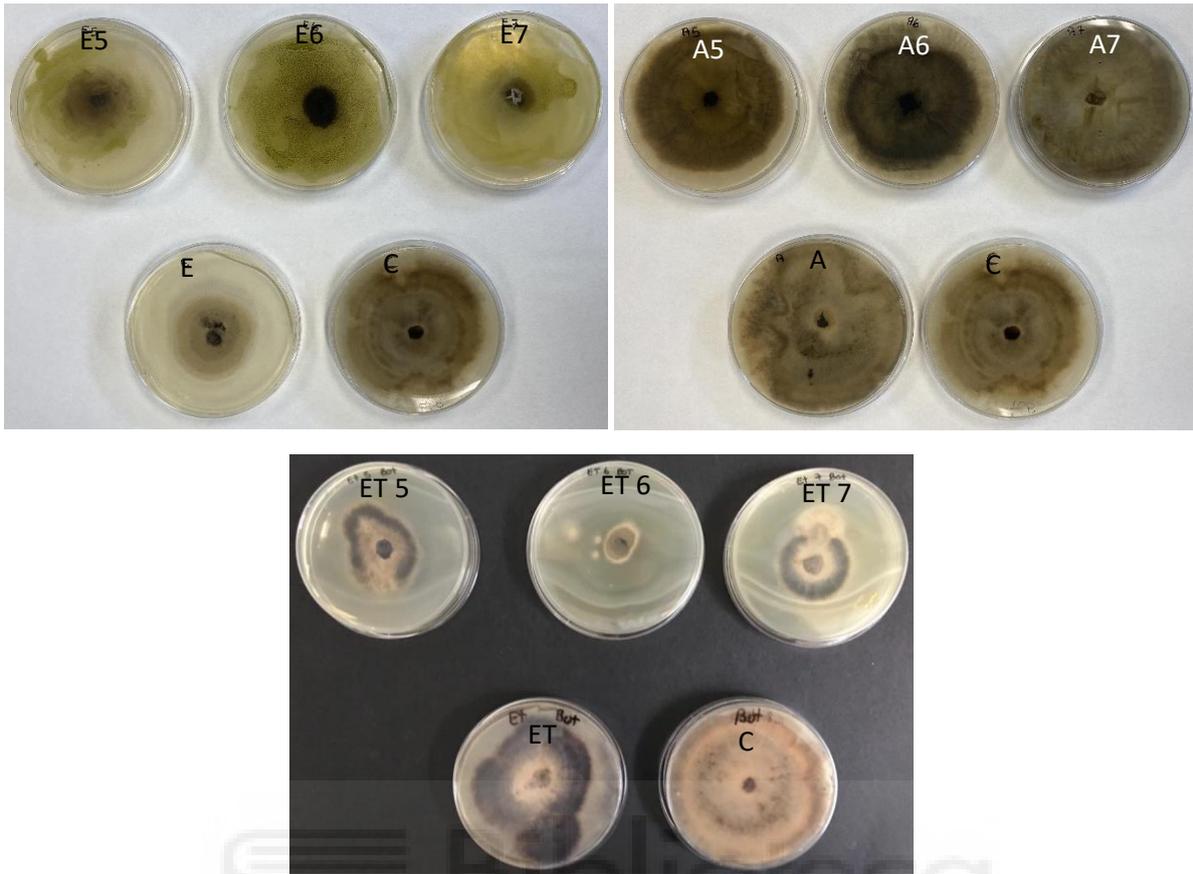
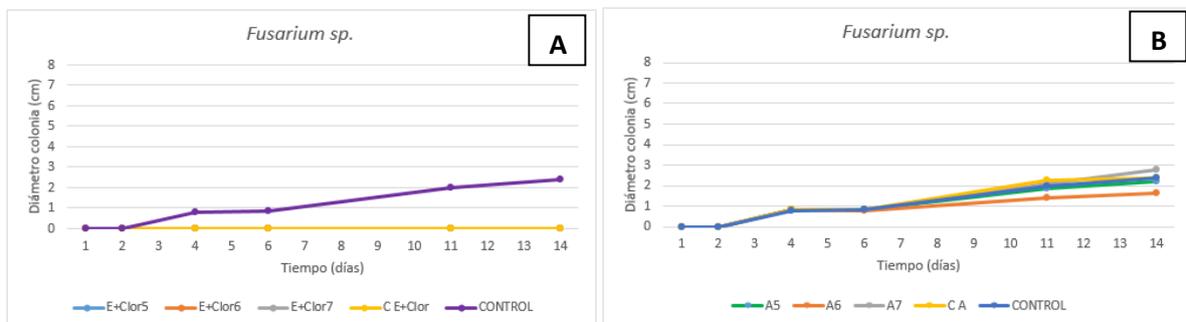


Figura 18: Crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en medio PDA con diferentes extractos vegetales y diferentes extractantes. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E), acetona (A) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*.

En cuanto a *Fusarium sp.*, (figuras 19 y 20) es de destacar que el hongo presentó un crecimiento muy lento, con medidas de diámetro de la colonia en torno a tan solo 3-4 cm a los 14 días. Aunque esta cepa mostró crecimiento vigoroso anteriormente, es posible que, como patógeno vascular, requiera de su paso por planta para reactivarse tras repetidos subcultivos (Agrios, 2005). Este comportamiento dificulta la interpretación de resultados. Sin embargo, se puede observar que en general, los extractos no han tenido efecto inhibitorio, con valores muy similares al control. Cuando el extractante fue etanol +CLOR se produjo inhibición total del hongo.



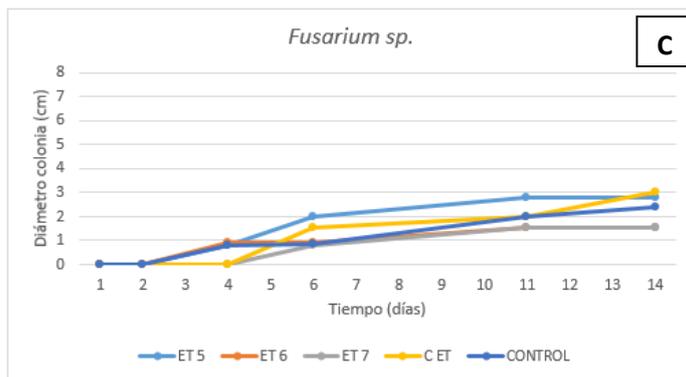


Figura 19. A, B y C: Crecimiento del micelio de *Fusarium sp.* en medio PDA adicionado con extractos de plantas a lo largo del tiempo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E+CLOR), acetona (A) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*.

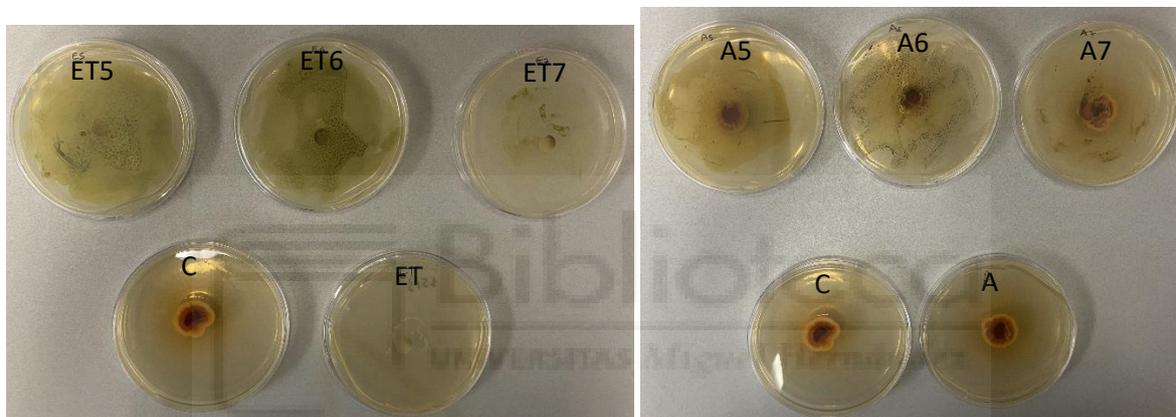


Figura 20 A: Crecimiento del hongo *Fusarium sp.* en medio PDA con diferentes extractos vegetales y diferentes extractantes. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E) y acetona (A). El número corresponde con la especie vegetal: 5-*Robinia pseudoacacia*, 6-*Solanum bonariense* y 7-*Oxalis pes-caprae*.

En cambio, el hongo *Phytophthora citrophthora* ha resultado ser el más sensible a los extractos vegetales. Como se puede observar en las figuras 21 y 22, respecto a los extractos de etanol con cloruro benzalconio sí que ha existido cierto poder inhibitorio, aunque de nuevo el mismo extractante también ha tenido capacidad de inhibición. Respecto a los extractos de acetona, podemos ver que los extractantes están muy parejos al control, por lo que no ha habido inhibición. En los extractos de etanol en cambio, sí que se ha producido una clara inhibición por parte de los extractos, sobre todo el por *S. bonariense* seguido de *O. pes-caprae* y de *R. pseudoacacia*.

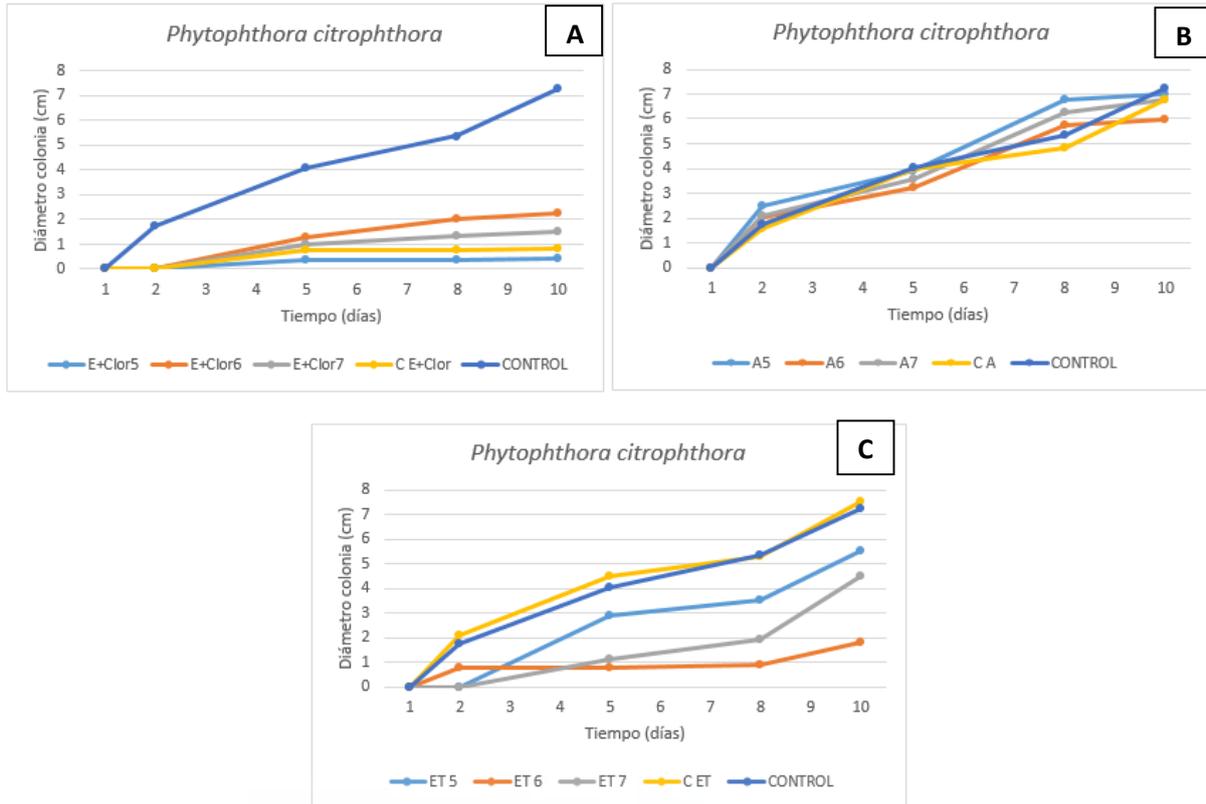


Figura 21 A, B y C: Crecimiento del micelio de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA adicionado con extractos de plantas a lo largo del tiempo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E+CLOR), acetona (A) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-Robinia pseudoacacia, 6-Solanum bonariense y 7-Oxalis pes-caprae.

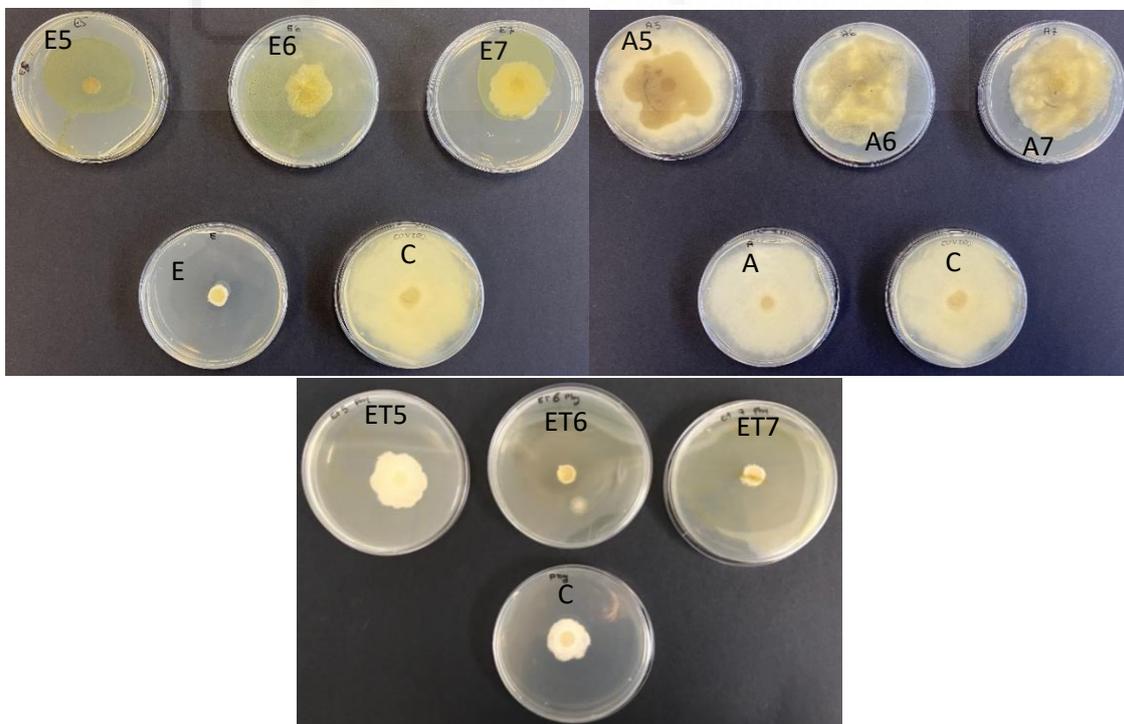


Figura 22 A y B: Crecimiento del hongo *Phytophthora citrophthora* en medio PDA con diferentes extractos vegetales y diferentes extractantes. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro benzalconio (E), acetona (A) y etanol (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 5-Robinia pseudoacacia, 6-Solanum bonariense y 7-Oxalis pes-caprae.



Los extractos en metanol que se disolvieron en DMSO produjeron inhibición total del crecimiento de los tres hongos ensayados, por lo que no se muestran los resultados. Este efecto inhibitorio del DMSO resultó inesperado, ya que no se observó en los ensayos de difusión en disco en hongos ni en bacterias. Parece ser que es un compuesto poco difusible en medios de cultivo, por lo que no afectaría a tests antimicrobianos de difusión. Tampoco se ha descrito, que sepamos, efecto negativo sobre bacterias. Sin embargo, algunos estudios informan de efectos inhibitorios sobre hongos unicelulares (Hazen, 2013) o filamentosos (Randhawa, 2006) y concretamente sobre *Botrytis cinerea* (Petruccelli et al., 2020). En cambio, es un disolvente ampliamente utilizado por su polaridad, ya que es miscible tanto en agua como en disolventes orgánicos, y que se ha usado de forma tradicional como disolvente de extractos metanólicos de plantas. Son numerosos los trabajos en este sentido, aunque en ocasiones no aportan datos de los preceptivos controles (Khan y Yadav, 2011; Mostafa et al., 2018; Bajpai et al., 2012). En nuestro caso, el contacto directo del disolvente DMSO con el hongo, a concentraciones elevadas pudo probablemente producir la muerte del micelio.

El solvente utilizado influye notablemente en la actividad antifúngica. En este estudio se ha observado que los extractos etanólicos son, en general, más efectivos para inhibir el crecimiento microbiano en general, aunque se debe tener en cuenta la pureza y composición del producto, con el fin de evitar efectos debidos al propio extractante.

De los hongos utilizados como organismos diana, el que mostró mayor susceptibilidad fue *Phytophthora citrophthora*. Esto puede deberse a que *Phytophthora* es un Oomiceto, con hifas sin tabiques, cuya pared celular está formada por celulosa, a diferencia de los hongos verdaderos que tienen una pared celular compleja, formada por quitina-glucano. Esto podría influir en su mayor sensibilidad frente a compuestos antimicrobianos (alcaloides, terpenoides, fenoles, taninos, etc) que interactúan con componentes de la membrana celular microbiana causando su ruptura y posterior muerte celular.

Las técnicas de evaluación de la susceptibilidad antifúngica son controvertidas y dan resultados variables (Durand et al., 2021). En nuestro estudio se ha comprobado que el test estandarizado de difusión sobre disco es apropiado para bacterias, pero plantea diversos problemas metodológicos para hongos, sobre todo relacionados con la preparación del inóculo y el tipo de crecimiento característico de los hongos filamentosos, menos homogéneo que el de bacterias. El método de inhibición por contacto directo es mucho más costoso y requiere mayor esfuerzo, material, espacio disponible y tiempo, pero ha resultado algo más eficaz para evaluar actividad antifúngica. Sin embargo, el test de difusión en disco es más manejable ya que permite ensayar una cantidad elevada de extractos con relativamente poco esfuerzo (Cantón et al., 2007).

Ya que las especies invasoras evaluadas pertenecen a diferentes familias botánicas, poseen probablemente diferentes compuestos fitoquímicos que pueden manifestar diferentes comportamientos antimicrobianos. Nuestros resultados son novedosos, ya que no se conocen datos previos de actividad antifúngica de extractos de las especies ensayadas, excepto la actividad del control, *in vivo*, de la enfermedad producida por *Botrytis cinerea* o *Phytophthora infestans* por extractos metanólicos de *R. pseudoacacia* (Bajpai et al., 2012). De hecho, son pocos los trabajos que evalúan la actividad antifúngica de extractos de plantas. En este sentido, nuestros resultados confirman estos datos previos, ya que *R. pseudoacacia* fue la planta con efectos negativos en mayor número de organismos (tabla 5). Sin embargo, la reconocida presencia de alcaloides en la familia Solanaceas y la actividad antimicrobiana de otras especies de *Solanum* (Mdee et al., 2009), junto con la presencia de fenoles, flavonoides y oxalatos en *O. pes-caprae* (Máximo et al., 2021), apoyan los resultados preliminares obtenidos en este estudio.



	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>
<i>Robinia pseudoacacia</i>		X	X	X	X		X
<i>Solanum bonariense</i>		X	X	(X)	X		X
<i>Oxalis pes-caprae</i>					X		X

Tabla 5. Resumen de efectos por parte de los extractos vegetales sin diferenciación de método o extractante.



CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos y con los resultados que se han obtenido se puede concluir que:

Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de algunas especies de plantas invasoras:

- Los extractos de *Robinia pseudoacacia* han mostrado la mayor actividad antimicrobiana. Han manifestado actividad antibacteriana sobre *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis* y capacidad antifúngica frente a *Alternaria*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora citrophthora*, aunque con mejores resultados en el ensayo de difusión en disco que por contacto directo.
- Los extractos de *Solanum bonariense* han mostrado unos resultados intermedios. En cuanto a bacterias han conseguido mostrar efecto inhibitorio en *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis* aunque solo con el extractante etanol. En cuanto a su poder antifúngico, la mayor susceptibilidad fue en *Phytophthora citrophthora* y en menor medida en *Botrytis cinerea*, aunque cabe destacar que estos resultados han sido observables en el ensayo por contacto directo ya que en el ensayo de difusión en disco el extracto no ha actuado.
- Los extractos de *Oxalis pes-caprae* en general han demostrado un bajo o casi nulo poder antibacteriano. En cuanto a hongos, se pudo observar cierto efecto en *Botrytis cinerea* y *Phytophthora citrophthora*.

En cuanto a aspectos metodológicos:

- El mayor rendimiento se obtuvo con el extractante metanol.
- Se ha constatado efecto inhibitorio del dimetilsulfóxido sobre hongos, por contacto directo con el micelio, así como efecto antiséptico del cloruro de benzalconio.

Como perspectivas futuras se sugiere:

- Optimizar los métodos para comprobar la capacidad antifúngica de extractos vegetales en hongos filamentosos (proceso de extracción, efectos de los solventes, riqueza del inóculo)
- Determinar la naturaleza de los metabolitos secundarios de los extractos mediante análisis fitoquímicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, pp: 952.
- Andreu J., Vilà M. (2007). Análisis de la gestión de las plantas exóticas en los espacios naturales españoles. Ecosistemas, 2007 (3).
- Bajpai, V., Baek, K-H, Kim, E S, Han, J. Kwak, M., Oh, K., Kim, J-Ch., Kim, S., Choi, G. (2012). *In vivo* antifungal activities of the methanol extracts of invasive plant species against plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal, 28(3): 317-321.
- Bauer, A.W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 36: 493-496.
- Calzado, M.A., Ortolá, J., Cubells, E., Nuño, M.A., Pereda, A. (2009). Intoxicación por *Robinia pseudoacacia*. Anales de Pediatría, 70: 399-400.
- Cantón, E., Martín E., Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberica de Micología, 15.
- Convention on Biological Diversity-CBD. (2007). Guide to the Global Taxonomy Initiative, CBD Technical Series # 27. www.cbd.int/gti/taxonomy.shtml
- CLSI. (2010). Method for Antifungal Disk Diffusion susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2015). Performance Standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohrane, C.B. (1999). Antibacterial and antifungal screening of Florida's exotic invasive plant species. En: Florida's Garden of Good and Evil. David T. Jones and Brandon W. Gamble (Eds.). South Florida Natural Resources Center.
- Dana, E.D., García de Lomas, J. Sanchez, J. (2010). Effects of the aqueous extracts of *Zygophyllum fabago* on the growth of *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* and *Pythium aphanidermatum*. Weed Biology and Management, 10: 170-175.
- Díaz Dellavalle, P.D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., Dalla Riza, M. (2011). Antifungal activity of medical plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria spp.* Chilean journal of Agricultural Research, 71(2): 231-236.
- Domingo, D., López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia., 16 (4): 385-393.
- Durand, C., Maubon D., Cornet, M., Wang, Y., Aldebert, D., Garnaud, D. (2021). Can we improve antifungal susceptibility testing? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11: 720609.
- García, C., Capelli, A. (2016). Plant and mycotoxin poisonings in ruminants diagnosed in Uruguay, Veterinaria, 52 (201): 28-42.



- García, O. (2019). Evaluación de la capacidad antifúngica y antibacteriana de extractos de plantas invasoras (*Acacia saligna*, *Lantana camara*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis*). Universidad Miguel Hernández. Grado Ciencias Ambientales. (Elche).
- Hazen, K.C. (2013). Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing *in vitro*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75 (1): 60-3.
- Hierro, J.L, Maron, J.L., Callaway, R.M. (2005). A biogeographical approach to plant invasions: The importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology*, 93: 5-15.
- IPNI (2022). International Plant Names Index. Published on the Internet <http://www.ipni.org>, The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens. [Retrieved 05 July 2022].
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de Fitopatología*, 21(3): 355-363.
- Khan, J.A., Yadav, K.P. (2011). Assessment of Antifungal properties of *Ricinus communis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 11: 1-3.
- Kothari, V., Gupta, A., Naraniwal, M. (2012). Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. A comparative study. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, pp: 155.
- Martos, A.I., Martín-Mazuelos, E., Serrano, C., González, T., Almeida, C., Puche, B., Cantón, E., Pemán, J., Espinel-Ingroff, A. (2012). Evaluation of disk diffusion method compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of 3 echinocandins against *Aspergillus spp.* *Diagnostic in Microbiology Infectious Disease*, 73(1): 53-6.
- Máximo, P., Ferreira LM, Branco PS, Lourenço A. (2021). Invasive Plants: Turning Enemies into Value. *Molecules*, 1: 25(15): 3529.
- Mdee, L.K., Masoko, P., Eloff, J.N. (2009). The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. *South African Journal of Botany*, 75 (2): 375- 379.
- Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N., Bakri, M.M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25: 361-366.
- Pérez, M. (2019). Evaluación de la capacidad antifúngica y antibacteriana de extractos de plantas invasoras (*Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebenthifolius*, *Zygophyllum fabago*). Universidad Miguel Hernández. Grado Ciencias Ambientales. (Elche).
- Petrucelli, V., Brasili, E., Varone, L., Valletta A., Pasqua, G. (2020), Antifungal activity of dimethyl sulfoxide against *Botrytis cinerea* and phytotoxicity on tomato and lettuce plants, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154 (4): 455-462.
- Randhawa, M.A. (2006). The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 47(4): 313-318.
- Reinhart, K. O., Callaway, R. M. (2006), Soil biota and invasive plants. *New Phytologist*, 170(3): 445-457.
- Rosu, A., Bitu, A., Calina, D., Rosu, L., Zlatian, O., Calina, V. (2012). Synergic antifungal and antibacterial activity of alcoholic extract of the species *Robinia pseudoacacia L.* (Fabaceae). *European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice*, 19, pp: 216.



Sanz-Elorza, M., Dana-Sánchez, E.D., Sobrino-Vesperinas, E. (2004). Atlas de las plantas alóctonas invasoras en España. Dirección General para la Biodiversidad, Ministerio de Medio Ambiente Madrid, pp: 384.

Singh, P.K., Yadav, J.S., Kumar, I., Kumar, U., Sharma, R.K. (2021). Invasive Alien plant species: an exploration of social aspect and phytoremediation acceptability. In: Phytoremediation for Environmental Sustainability. Prasad, R. (Ed.). Springer, Singapore cap. 9, pp:231-250.

Wong,K.Y., Vikram, P., Chiruvella, K.K., Mohammed, A. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria sps* (Rubiaceae). Journal of King Saud University - Science, 27 (4): 302-311.

