

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA DE  
EXTRACTOS DE PLANTAS INVASORAS  
(*Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*,  
*Schinus terebenthifolius*,  
*Zygophyllum fabago*)**

Memoria de Trabajo Final de Grado

Elche

Septiembre 2019

**Autor:** Pérez Moreno, Mario

**Tutor:** Díaz Espejo, Gisela

**Modalidad:** Experimental

**Departamento:** Biología Aplicada. Área Botánica

#### Agradecimientos:

Me gustaría agradecer a todas esas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de este proyecto de investigación.

A mi familia, Oso y compañeros de clase, gracias por haberme brindado todo el apoyo que he necesitado para poder llegar hasta aquí.

A mi tutora Gisela, muchas gracias por guiarme en todo momento, por tu atención y paciencia conmigo, te estaré agradecido siempre.



# Índice

|   |    |
|---|----|
| Resumen.....  | 1  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 2  |
| Las plantas invasoras como fuente de compuestos antimicrobianos .....                               | 2  |
| Hongos patógenos y oportunistas .....   | 3  |
| Bacterias patógenas y oportunistas.....   | 4  |
| Justificación y objetivos.....  | 4  |
| METODOLOGÍA.....  | 6  |
| Especies vegetales utilizadas.....  | 6  |
| Recolección y preparación de material vegetal .....   | 9  |
| Esterilización de los extractos .....   | 11 |
| Medios de cultivo utilizados.....   | 11 |
| Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados .....                                       | 12 |
| Hongos.....   | 13 |
| Bacterias.....  | 13 |
| ENSAYOS.....  | 14 |
| Evaluación de la capacidad antifúngica mediante la técnica de difusión en disco.....                | 14 |
| Evaluación de la inhibición del crecimiento de los hongos por contacto directo con el extracto..... | 15 |
| Técnica de difusión en disco para evaluación de la capacidad antibacteriana.....                    | 16 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 17 |
| Rendimiento de los extractos .....  | 17 |
| Capacidad antifúngica de los extractos de plantas .....   | 18 |
| Inhibición del crecimiento del micelio por contacto directo con los extractos .....                 | 20 |
| Capacidad antibacteriana de extractos de plantas .....  | 25 |
| CONCLUSIONES .....  | 30 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 31 |

## Resumen

Uno de los principales problemas de salud pública y ambiental es la resistencia que desarrollan muchos microorganismos frente a los biocidas. Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos químicos que pueden ser fuente de compuestos antimicrobianos. Algunas plantas invasoras podrían ser una alternativa para la obtención de dichos compuestos debido a sus propiedades tóxicas o alelopáticas y la gran biomasa que producen.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad antifúngica y antibacteriana *in vitro* de *Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius* y *Zygophyllum fabago*, especies invasoras localizadas en Elche, España. Los extractos se prepararon con etanol, acetona y metanol y se evaluó su actividad antimicrobiana frente a 6 hongos (*Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.*, *Phytophthora citrophthora* y *Sclerotinia sp.*) y 3 bacterias (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*) mediante la técnica de difusión en disco y por aplicación directa de los extractos al medio.

Se observaron excelentes resultados con *Eucalyptus globulus* frente a todos los hongos, con inhibición del 100% de *P. citrophthora* y las tres bacterias ensayadas. Las especies del género *Schinus* mostraron actividad inhibitoria sobre los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Phytophthora citrophthora* y las bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y en menor medida *Micrococcus luteus*. Los extractos de *Zygophyllum fabago*, aunque menos eficaces que los anteriores, mostraron actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea* y *Phytophthora citrophthora* pero únicamente el extracto preparado con metanol tuvo efecto sobre *Micrococcus luteus*.

## Abstract

One of the main problems of environmental health is the resistance that many microorganisms develop against biocides. Plants synthesize a large amount of chemical compounds that can be source of antimicrobial compounds. Some invasive plants could be an alternative to obtain these compounds due to their toxic or allelopathic properties and the large biomass they produce.

In this study, the *in vitro* antifungal and antibacterial capacity of the invasive *Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius* and *Zygophyllum fabago* located in Elche, Spain, has been evaluated. The extracts were prepared with ethanol, acetone and methanol and their antimicrobial activity was evaluated against 6 fungal species (*Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.*, *Phytophthora citrophthora* and *Sclerotinia sp.*) and 3 bacteria (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus epidermidis*) by means of disk diffusion and direct extracts application methods.

Excellent results were observed with *Eucalyptus globulus* against all fungal species, with 100% inhibition of *P. citrophthora* and the three bacteria tested. *Schinus* species showed inhibitory activity against the fungi *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Phytophthora citrophthora* and the bacteria *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and to a lesser extent, *Micrococcus luteus*. *Zygophyllum fabago* extracts were less effective than the others, showing antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Phytophthora citrophthora* while only the methanol extract had effect on *Micrococcus luteus*.

**Palabras clave / Key words:** Hongos/fungi, bacteria/bacterium, plantas invasoras/invasive plants, extracto/extract, efecto alelopático/allelopathic effect.

# INTRODUCCIÓN

## Las plantas invasoras como fuente de compuestos antimicrobianos

Es ampliamente conocido que las plantas son fuente de compuestos antimicrobianos con mayor o menor toxicidad, y por ello se han utilizado tradicionalmente para la obtención de sustancias medicinales y tóxicas. Las plantas producen productos de bajo peso molecular o metabolitos secundarios, no siendo éstos esenciales para la vida de la planta, a diferencia de los metabolitos primarios. Estos resultan de un proceso evolutivo de defensa contra ataques de microorganismos, insectos y otros animales. Estas sustancias se pueden dividir en dos grandes grupos: fitoanticipinas, presentes de forma constitutiva en las plantas, y fitoalexinas, cuya presencia aumenta en respuesta a la invasión microbiana como se ha comprobado en trabajos anteriores (Domingo y López-Brea, 2003). Para defenderse, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. En trabajos previos se ha demostrado que la estructura y composición de la pared celular también cambia, tornándose más rígida (Sepúlveda *et al.*, 2003). Los principales grupos de compuestos generados por plantas están relacionados con el fenol y sus derivados. Entre otros destacan compuestos fenólicos simples, quinonas que son anillos aromáticos con una alta reactividad y un amplio potencial antimicrobiano, taninos y flavonas, cuya actividad se debe a los complejos que forma con las proteínas solubles y con las células de la pared bacteriana. También pueden producir terpenoides, compuestos nitrogenados y alcaloides.

Se definen como plantas invasoras aquellas especies que se establecen en ecosistemas de donde no son originarias y son causantes de cambios y amenazas para la diversidad biológica autóctona (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza-UICN).

Estas especies suelen llegar de la mano del hombre, ya sea de forma intencionada o con fines agrícolas, ganaderos, comercial, ornamental, etc. Estas pueden llegar a repercutir gravemente sobre los ecosistemas, son una gran amenaza de contaminación biológica además de tener efectos negativos sobre la economía, sociedad y salud humana (Andreu y Vilà, 2007).

Los ambientes degradados o alterados suelen ser aprovechados por especies invasoras. Algunos ejemplos de ambientes degradados son los hábitats muy frecuentados por el hombre que suponen una mayor probabilidad de llegada de semillas o plantas invasoras, los espacios que han sufrido una degradación natural o presentan un fuerte dinamismo como grandes pendientes, zonas dunares, o ambientes fluviales, también los ambientes ligados a condiciones extremas en los que la vegetación autóctona tiene poca predisposición a la competitividad.

Las plantas exóticas que tienden a comportarse como invasoras poseen algunas características que les confieren una mayor probabilidad de supervivencia, como pueden ser: un crecimiento rápido y vigoroso tanto de la parte aérea como radicular; la producción y exudado de sustancias alelopáticas con efecto negativo en la flora circundante (Reigosa *et al.*, 1984); facilidad para dispersar sus semillas o propágulos; capacidad de dispersión a larga distancia; su plasticidad fenotípica, que le permite adaptarse a su nuevo espacio (Shi y Ma, 2006); falta de enemigos o competidores naturales, como pueden ser plagas o enfermedades específicas o consumidores e incluso la alteración de la microflora nativa por la producción de sustancias alelopáticas (Dawson y Schrama, 2016). Se ha sugerido que estas sustancias podrían tener un importante efecto supresor sobre hongos y bacterias nativos.

## Hongos patógenos y oportunistas

Los hongos son organismos heterótrofos, eucarióticos, generalmente filamentosos, con paredes celulares con gran plasticidad que sirve de protección contra el estrés ambiental, compuestas por quitina, glucanos y glicoproteínas. Al ser heterótrofos necesitan obtener los compuestos carbonados de otras fuentes y por eso muchos son saprófitos, los descomponedores primarios de la materia muerta de plantas y de animales en muchos ecosistemas. Otros son parásitos de plantas o animales, en muchos casos llegando a producir enfermedades y por tanto patógenos (Agrios, 2005). Se consideran hongos oportunistas aquellos que son fundamentalmente saprófitos de vida libre pero que al desarrollarse de forma extensiva sobre sustratos vegetales pueden producir daños y pérdidas económicas. Muchas enfermedades de postcosecha y productos alimentarios almacenados son producidas por hongos oportunistas. Entre estos, destacamos:

*Alternaria sp.*, es un hongo del grupo de los Ascomycetos. Las diferentes especies constituyen uno de los mayores patógenos de plantas, causando daños antes y después de la cosecha de productos agrícolas. Se ha descrito que varias especies pueden producir metabolitos secundarios considerados como fitotoxinas y micotoxinas (Pavón *et al.*, 2012). Su inhalación puede producir reacciones alérgicas y problemas respiratorios asociados tales como rinitis alérgica o asma en los humanos.

*Aspergillus niger* es un hongo que produce un moho negro en vegetales, muy común en lechuga, acelga, tomate o limón. Suele estar presente en el aire, de manera abundante en sitios cerrados, conductos de aire acondicionado, hospitales, etc. y aunque no produce tantas enfermedades en humanos como en otras especies de este género, en elevadas concentraciones puede provocar enfermedades respiratorias y patologías alérgicas por inhalación.

*Botrytis cinerea* es un hongo patógeno de muchas especies vegetales, también conocido como moho gris o podredumbre gris. Puede darse en flores y frutos particularmente al final de la floración o en la maduración del fruto.

*Sclerotinia sp.* También conocido como moho blanco o moho algodonoso. Puede causar pudrición en la raíz, tallo y peciolo en las hojas de numerosas especies vegetales. Las ascosporas que se liberan de los apotecios pueden viajar largas distancias. Necesita una alta humedad o superficies mojadas para proliferar y temperaturas de 15 a 21°C.

*Fusarium sp.* Grupo muy diverso de hongos filamentosos que colonizan las partes aéreas y subterráneas de las plantas, residuos y otros sustratos orgánicos. Provocan enfermedades que se manifiestan como podredumbres y marchitamientos. Sin embargo, algunas especies son beneficiosas en agricultura ecológica.

*Phytophthora citrophthora* es también conocida como podredumbre parda de los cítricos. Es un hongo que crece en el sistema vascular de la planta.

## Bacterias patógenas y oportunistas

Las bacterias son microorganismos procariotas, unicelulares, sin un núcleo bien definido ni presentan orgánulos membranosos internos. Poseen una pared celular formada por peptidoglicano.

Son los organismos más abundantes del planeta, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos. Estas crecen hasta un tamaño fijo y después se reproducen por fisión binaria, una forma de reproducción asexual. En condiciones apropiadas una bacteria gram-positiva puede dividirse cada 20-30 minutos, mientras que una gram-negativa cada 15-20 minutos, lo que significa que en 16 horas su número puede ascender a 5000 millones. Algunas de las especies más significativas son:

*Escherichia coli*, es una bacteria de la familia de las enterobacterias, que vive en el intestino. Es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, con una temperatura de crecimiento óptima de 37°C. Es un organismo modelo utilizado frecuentemente en el laboratorio, por su velocidad de crecimiento y pocos requerimientos nutricionales, además de tener un genoma altamente flexible. Algunas cepas de *E. coli*, pueden producir diarrea, náuseas, vómitos o infecciones al transmitirse a través de los alimentos.

*Staphylococcus epidermidis* es una especie bacteriana gram-positiva. Se presenta frecuentemente en la piel de humanos y de animales y en membranas mucosas, pero puede producir diversas infecciones intrahospitalarias oportunistas.

*Micrococcus luteus* es una especie de bacteria gram-positiva, saprófita, aerobia obligada que puede encontrarse en tierra, polvo, agua, aire y formando parte de la microbiota bacteriana de la piel de los mamíferos. Sin embargo, puede originar patologías como artritis séptica, endocarditis, o infecciones pulmonares.

## Justificación y objetivos

Uno de los principales problemas de salud pública y ambiental de la actualidad es la resistencia que desarrollan muchos microorganismos (hongos y bacterias fundamentalmente) frente a los biocidas o pesticidas que se utilizan para tratar las enfermedades que producen, tanto en vegetales y cultivos como en humanos. Esto da lugar a la ineffectividad de estos productos y en consecuencia a la mayor prevalencia de los agentes patógenos. Además, estos biocidas de origen sintético producen efectos de acumulación de residuos en el medio ambiente y pueden ser perjudiciales para la salud.

Por ello, en los últimos años se ha desencadenado un creciente interés por la búsqueda de nuevos compuestos que sean más eficaces frente a estos microorganismos resistentes. Muchas investigaciones se han centrado en las propiedades antimicrobianas de compuestos de origen vegetal, por considerarlas más respetuosas con el medio ambiente y menos perjudiciales para el ser humano.

Se ha demostrado en trabajos previos que las plantas generan numerosos compuestos antimicrobianos, como por ejemplo *Zygophyllum fabago* con efecto antifúngico (Dana *et al.*, 2010) utilizando extractos acuosos. Otros trabajos (Anzlovar y Dolenc, 2013) también han investigado la

inhibición producida por extractos acuosos y orgánicos de género *Solidago* sp., tanto en hongos (*Phytophthora*) como bacterias (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*).

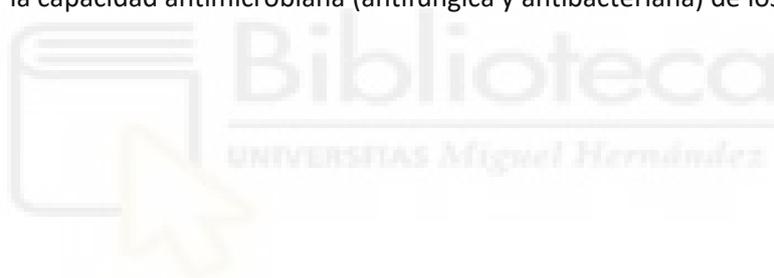
En gran parte, la fuente de investigación de estos compuestos son las plantas medicinales, que se han utilizado tradicionalmente por sus propiedades terapéuticas y antimicrobianas. Sin embargo, un campo de estudio sin explotar son las plantas invasoras. Muchas de estas especies deben su capacidad de invasión a la producción de toxinas o compuestos alelopáticos que podrían inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. Otra ventaja de la potencial utilización de plantas invasoras como fuente de compuestos bioactivos es su abundancia en determinadas áreas y la gran producción de biomasa, lo que facilitaría la obtención de materia vegetal, todo ello sin alterar la flora autóctona o poner en riesgo a 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, en función de su potencial antimicrobiano.
- Elaborar extractos de plantas invasoras con diferentes extractantes y medir su rendimiento.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana (antifúngica y antibacteriana) de los extractos.



# METODOLOGÍA

## Especies vegetales utilizadas

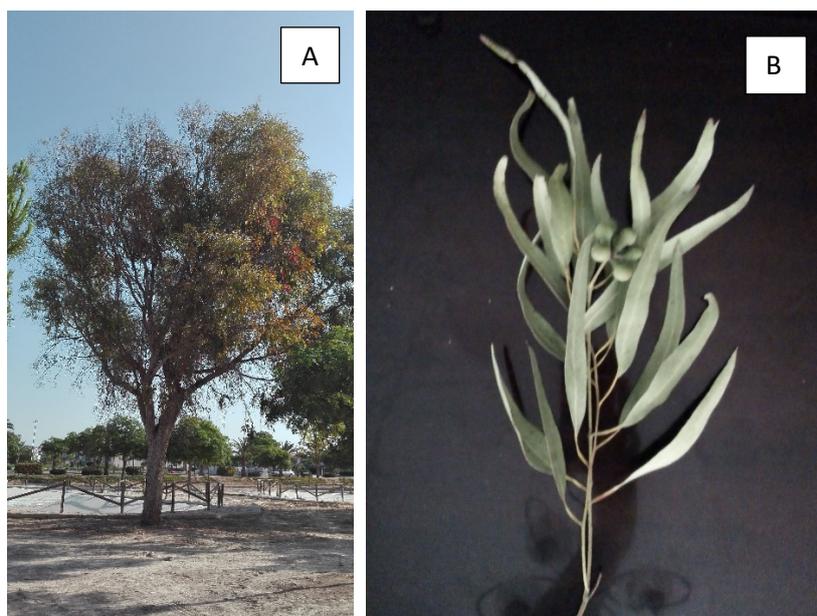
Como paso previo, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar especies invasoras que estuvieran presentes en zonas cercanas a Elche y sobre las que se hubiera destacado algún tipo de capacidad tóxica o alelopática, fundamentalmente a partir de la información contenida en el Atlas de las Plantas Alóctonas Invasoras en España, publicado por el Ministerio de Medio Ambiente (Sanz-Elorza *et al.*, 2004; [www.miteco.gob.es](http://www.miteco.gob.es)). Para este estudio, se seleccionaron las siguientes especies:

- *Eucalyptus globulus* Labill. (Figura 1)

Árbol de mediano o de gran porte que puede llegar a los 40 o 50 m de altura. Mantiene las hojas durante todo el año. Estas son opuestas, de contorno ovado, ensanchadas y redondeadas en la base, gruesas y correasas, sin pelo, con borde entero y de color verde más acusado por el haz. Las flores nacen en la axila de las hojas, solitarias, ocasionalmente en grupos de a 3, tienen la forma característica de una urna cubierta de una cera blanco-azulada. El fruto es una capsula pétreo que se abre apicalmente por 3-6 valvas triangulares que quedan al nivel del disco. Florece de octubre a enero. Se reproduce por semilla y por brotes de cepa.

Introducido en España, sobre todo en el contorno del mar Mediterráneo, como árbol forestal para cultivos madereros destinados a la obtención de pasta de celulosa.

Produce efectos muy negativos sobre el paisaje, desfigurándolo por completo al invadir bosques y matorrales y sustituir sus plantaciones a la vegetación autóctona. En cuanto a la biodiversidad, los efectos alelopáticos producidos por la hojarasca impiden el desarrollo del resto de la flora, y esterilizan casi completamente el suelo incluso mucho tiempo después de haber desaparecido los eucaliptos.



**Figura 1:** *Eucalyptus globulus*. A: aspecto del árbol; B: detalle de hojas y frutos.

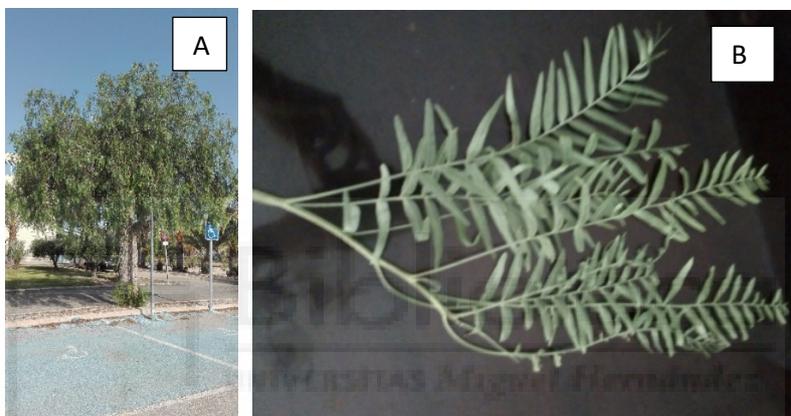
- *Schinus molle* L. (Figura 2)

Árbol perennifolio de hasta 10 m de altura pudiendo llegar a los 25 m, ramas colgantes de aspecto llorón. Hojas divididas, imparipinnadas de 10-30 cm de longitud, con foliolos opuestos o alternos. Flores unisexuales o hermafroditas, a veces existen inflorescencias axilares más cortas en la axila de las hojas superiores. Fruto en drupa globosa de 4–7 mm de diámetro.

Con un crecimiento bastante rápido, se adapta a un amplio espectro de suelos, aunque aparece más en suelos calcáreos. Planta termófila pero sensible a heladas.

Introducida como ornamental. Se cultiva con frecuencia en parques y calles de la costa mediterránea. Puede formar masas monoespecíficas que desplazan a la vegetación autóctona.

Las hojas pueden producir dermatitis en personas sensibles, debido a la presencia de una resina muy olorosa. Semillas tóxicas.



**Figura 2:** *Schinus molle*. A: aspecto del árbol; B: detalle de hojas.

- *Schinus terebinthifolius* Raddi (Figura 3)

Árbol de 5-7 m de altura, copa densa y redondeada. Hojas compuestas, pecioladas, de color verde claro, imparipinnadas, de 8-20 cm de longitud peciolo incluido. Las flores son normalmente unisexuales y se agrupan en panículas axilares, poco densas. Son pequeñas, blanco amarillentas, con 5 pétalos y 10 estambres. Frutos en drupa globosas de color rojo intenso y muy numerosas.

Introducida como ornamental. Se trata de un árbol rustico que tolera suelos calcáreos y algo ácidos, resiste muy bien la sequía, siendo muy sensible a las heladas.

Puede ser tóxica y alergógena para el ser humano. Produce sustancias alelopáticas que pueden impedir el crecimiento de la vegetación herbácea.



**Figura 3:** *Schinus terebinthifolius* A: aspecto del árbol; B: detalle de hojas.

- *Zygophyllum fabago* L. (Figura 4)

Planta herbácea de hasta 75 cm de altura, ramas articuladas, hojas con peciolo estrechamente alado y flores solitarias o pareadas en la axila de las hojas de la parte final de las ramillas, zigomorfas debido al desarrollo desigual de los estambres.

Se trata de una especie nitrófila, propia de terrenos sometidos a fuerte influencia de hombre como cunetas, orillas de caminos, cultivos agrícolas, caminos etc. Resiste la sequía y las altas temperaturas y es sensible a fríos intensos. Prefiere suelos arcillosos o margosos, algo salobres y secos.

Parece ser que su introducción fue accidental, asociada a cultivos agrícolas. Puede encontrarse ampliamente naturalizada en todo el sudeste de la Península ibérica, puntualmente aparece en algunos enclaves de la mitad oriental.

Las hojas de esta planta son tóxicas para el hombre y el ganado debido a la presencia de alcaloides.



**Figura 4:** *Zygophyllum fabago*. A: aspecto de la planta; B: detalle de hojas y frutos.

## Recolección y preparación de material vegetal

Se realizaron varias salidas previas para localizar las zonas de crecimiento de las especies seleccionadas. *Eucalyptus globulus*, *Schinus molle* y *Schinus terebenthifolius* se localizan en el campus de la Universidad Miguel Hernández de Elche, mientras que *Zygophyllum fabago*, se encontraba en el camino al pantano de Elche (Tabla 1).

Para cada especie se seleccionaron tres individuos adultos y sanos y se recogieron hojas de tres partes de cada planta (zona basal, media y superior), que se mezclaron para formar una muestra compuesta que se guardó en bolsas de papel convenientemente rotuladas. Las hojas dañadas, en mal estado o con síntomas de enfermedad se eliminaron. Con la intención de facilitar el trabajo de laboratorio, a cada especie vegetal seleccionada para el proyecto se le asignó un número de registro que se usó en todos los ensayos.

**Tabla 1:** Especies vegetales utilizadas en el estudio para la obtención de extractos.

| Número de registro | Nombre científico               | Nombre común           | Familia       | Localidad de recogida                   | Descripción del lugar |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|---------------|---|-----------------------|
| 8                  | <i>Eucalyptus globulus</i>      | Eucalipto común        | Mirtáceas     | Elche<br>38°16' 38.96N<br>0°41'39.66"W  | Jardín                |
| 9                  | <i>Schinus molle</i>            | Falso pimentero        | Anacardiáceas | Elche<br>38°16' 23.50"N<br>0°41'26.92"W | Jardín                |
| 10                 | <i>Schinus terebenthifolius</i> | Turbinto               | Anacardiáceas | Elche<br>38°16' 31.52"N<br>0°41'31.78"W | Jardín                |
| 11                 | <i>Zygophyllum fabago</i>       | Morsana, mata acostada | Zigofiláceas  | Elche<br>38°16' 52.95"N<br>0°41'52.12"W | Borde de camino       |

Las muestras se procesaron en un tiempo no superior a 24 h. En el laboratorio se lavó el material vegetal con agua y se enjuagó con agua destilada, quitándose el exceso de agua con papel secante, se extendió y dejó secar en la oscuridad.

Una vez seco se separaron y desecharon los tallos. Las hojas se trituraron en un molinillo de café marca Braun® y se guardaron en botes cerrados e identificados en oscuridad.

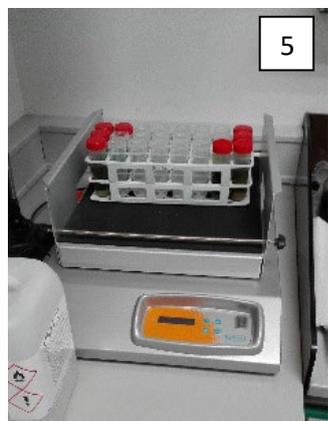
### Preparación de los extractos vegetales

Para obtener los extractos se utilizó Acetona marca TQCHEM con una riqueza del 99,5%, Etanol Applichem con una pureza del 96% y Metanol Applichem para UHPLC al 99,9% como extractantes.

Una vez que se tuvo la planta triturada se procedió a añadir el extractante, a una concentración 1:10 (3 gramos de planta + 30 ml extractante) en tubos de plástico de 50 cc de capacidad.

Los tubos se taparon, se colocaron en una gradilla cubierta con papel de aluminio y se dispusieron en un agitador marca OVAN® (Figura 5) durante 24 horas.

Posteriormente se centrifugaron en una centrifuga Heraeus modelo Labofuge 400 (Figura 6) durante 10 minutos a 3500 rpm. Se decantó el sobrenadante a otros tubos limpios y pesados previamente.



**Figuras 5 y 6:** Agitador de movimiento marca OVAN y Centrifuga Heraeus modelo Labofuge 400.

Para eliminar totalmente el extractante se siguieron distintos procedimientos según la naturaleza de éste.

En el caso de acetona, se dejaron evaporar en los tubos a temperatura ambiente bajo chorro de aire en campana extractora, obteniéndose una evaporación rápida.

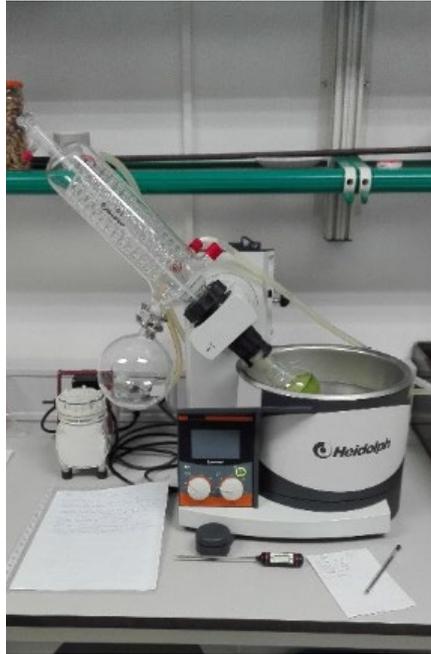
Con los extractos con etanol no se consiguió la evaporación necesaria en un tiempo aceptable, por lo que se traspasaron a placas Petri de cristal pesadas previamente, con el fin de aumentar la superficie de evaporación y se colocaron bajo chorro de aire en la campana extractora.

Los extractos con metanol se evaporaron bajo presión de vacío en un rotavapor Heidolph® (figura 7) a 39°C. Para ello, cada extracto se coloca en un balón de cristal de 250 ml de capacidad, pesado previamente, que se introduce en un baño de agua a la temperatura indicada, haciéndolo girar. Se cierran las llaves de paso para conseguir el vacío y se mantiene así hasta que el vapor ha condensado completamente en el serpentín de destilación y ya no evapora más.

Finalizado el proceso de evaporación, los extractos se pesaron de nuevo y se calculó el peso del extracto seco por diferencia entre el peso inicial y el final. Con los datos obtenidos se determinó el rendimiento de la extracción, dividiendo el peso del residuo o extracto entre el peso de la muestra original y multiplicándolo por 100.

$$\text{Rendimiento} = (\text{Peso residuo}/\text{peso seco original material vegetal}) \times 100$$

Los extractos fueron reconstituidos con etanol (en el caso del extractante etanol), acetona (en el caso del extractante acetona) y dimetilsulfóxido (DMSO marca SIGMA-ALDRICH  $\geq 99\%$ ) (en el caso del extractante metanol), preparando una solución *stock* a 100 mg/ml que se conservó a 4 °C hasta su uso. A partir de la solución *stock* se prepararon diluciones a 20 mg/ml para etanol y acetona y 50 mg/ml para metanol-DMSO.



**Figura 7:** Rotavapor marca Heidolph utilizado para evaporar metanol de los extractos.

## Esterilización de los extractos

Los extractos diluidos a la concentración deseada se esterilizaron por filtración inmediatamente antes de 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.

Se pasaron a un tubo de cristal estéril y conservaron entre 2 y 5 °C durante el proceso.

## Medios de cultivo utilizados

- PDA (por las siglas en inglés Potato Dextrosa Agar)

Este medio se utilizó para el cultivo de los hongos, tanto para el mantenimiento de las cepas como en los ensayos (Figura 8).

El procedimiento para prepararlo consiste en añadir 39 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada, y mezclar con ayuda de un agitador magnético hasta su completa disolución. Posteriormente se esteriliza, para lo cual se llenan frascos de vidrio, que se autoclavan a 120 °C durante 20 minutos. Una vez autoclavado el medio se deja enfriar a una temperatura aproximada de 45 °C. Después se procede al llenado de placas de 9 cm de diámetro en la cabina de flujo laminar.

Se utilizó PDA marca CONDA®.

- AN (Agar nutritivo)

Este medio se utilizó para el cultivo de bacterias, tanto para el mantenimiento de las cepas como en los ensayos (Figura 9).

Según las instrucciones del fabricante, se añaden 23g de medio de cultivo a 1 litro de agua destilada. Con ayuda de un agitador magnético, se mezcla hasta su correcta disolución. Para su esterilización, los frascos se autoclavan a 120 °C durante un tiempo de 20 minutos.

Finalizado el paso anterior, se dejan enfriar a una temperatura aproximada de 45°C y se procede al llenado de placas de 9 cm de diámetro en el interior de la cabina de flujo laminar.

Se utilizó AN marca CONDA®.



**Figuras 8 y 9:** PDA y AN, medios de cultivo empleados para los ensayos con hongos y bacterias, respectivamente.

## Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados

Los hongos y bacterias utilizados en este estudio se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2:** Hongos y bacterias utilizados para evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos de plantas.

| Hongos                               | Procedencia  | Características                   |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>Alternaria</i> sp.<br>UMH18007    | Frutos de <i>Citrus x limon</i> (limón)                                | Saprófito<br>Patógeno oportunista |
| <i>Aspergillus niger</i><br>UMH18005 | Bulbos de <i>Allium cepa</i> (cebolla)                                 | Saprófito<br>Patógeno oportunista |
| <i>Botrytis cinérea</i><br>UMH18008  | Frutos de <i>Fragaria virginiana</i> (fresa)                           | Saprófito<br>Patógeno oportunista |
| <i>Sclerotinia</i> sp.<br>UMH18009   | Frutos de <i>Fragaria virginiana</i> (fresa)                           | Saprófito<br>Patógeno oportunista |
| <i>Fusarium</i> sp.                  | Colección del CEBAS-CSIC, Murcia.<br>Proporcionado por Dr. JA. Pascual | Parásito vascular                 |
| <i>Phytophthora citrophthora</i>     | Colección Española de Cultivos Tipo<br>(CECT), Valencia.               | Parásito vascular                 |

| Bacterias                         | Procedencia   | Características                 |
|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>           | Colección de cultivos del Area de Microbiología de la UMH | Enterobacteria<br>Gram negativa |
| <i>Micrococcus luteus</i>         | Colección de cultivos del Area de Microbiología de la UMH | Saprófito<br>Gram positivo      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Colección de cultivos del Area de Microbiología de la UMH | Piel y mucosas<br>Gram positivo |

## Hongos

Los hongos utilizados en este trabajo se aislaron a partir de alimentos de origen vegetal con indicios visibles de daños físicos o colonización fúngica. Previa incubación en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas, en condiciones estériles, se tomaron con asa de siembra pequeñas porciones de hifas o esporas visibles en el material, y se colocaron en placas Petri con medio de cultivo PDA. Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 3-7 días. Posteriormente se seleccionaron porciones de las colonias iniciales sin signos de contaminación y se repicaron en nuevas placas Petri con medio PDA.

Además, se han utilizado los hongos *Fusarium* sp., proporcionado por el Dr. J.A. Pascual a partir de la colección de cultivos del CEBAS-CSIC, Murcia y *Phytophthora citrophthora*, proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia.

Los hongos se conservaron a 4°C para su posterior utilización, pasándose a medio fresco PDA periódicamente.

## Bacterias

Las bacterias utilizadas en este estudio han sido proporcionadas por R. Valera y la Dra. M. Torreblanca, del área de Microbiología del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández. Por cuestiones de bioseguridad, se trata de cepas no patogénicas de uso docente (figura 10).

Estas cepas se han conservado a 4°C en medio de cultivo agar nutritivo, repicándose a medio fresco periódicamente.



**Figura 10:** (De izquierda a derecha): Cultivos stock de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*.

## ENSAYOS

### Evaluación de la capacidad antifúngica mediante la técnica de difusión en disco

En este ensayo se pretende comprobar la posible formación de una zona de inhibición en el crecimiento de los hongos frente a los diferentes extractos seleccionados impregnados sobre un disco que se coloca sobre el medio de cultivo. Para ello se utilizó la técnica 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 consistió en: Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebenthifolius*, *Zygophyllum fabago*) con 3 extractantes (etanol, acetona y metanol) frente a 6 hongos (*Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Sclerotinia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora citrophthora*).

Como control positivo se utilizó nistatina y como controles negativos etanol, acetona y DMSO.

Esto supone un total de 16 tratamientos, con 3 repeticiones por tratamiento.

Todo el proceso se realiza en condiciones estériles en cabina de flujo descendente y con todo el material autoclavado previamente (agua, puntas de pipeta, tubos Eppendorf, discos de 6,5 mm de diámetro, placas Petri vacías y placas con medio (PDA), discos de control (nistatina), bastoncillos de siembra o hisopo, pinzas, bisturí, etc.). (Figura 11). Los extractos de las plantas y los controles negativos se esterilizaron por filtración, según el método descrito anteriormente (pág. 11).

Para preparar los inóculos fúngicos que se utilizaran para sembrar las placas se siguió el protocolo para hongos filamentosos M38 A, del CLSI (Cantón *et al.*, 2007) modificado. Para ello se parte de cultivos de 7 días crecidos a una temperatura de 25°C. Con un asa bacteriológica se toman pequeñas porciones del cultivo del hongo y se introduce en un tubo de cristal con 5 ml de agua estéril. Se agita vigorosamente durante 10-15 segundos en un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax, se ajusta la turbidez en un densímetro Biosan DEN-1 a 0,5 unidades McFarland, añadiendo agua destilada y hongo hasta lograr la turbidez adecuada. Para *Phytophthora* se ajustó una densidad de 0,6.

En trabajos previos (Cantón *et al.*, 2007) se ha comprobado que una turbidez de 0,5 unidades McFarland corresponde 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).

El inóculo para cada hongo se preparó inmediatamente antes de su uso.

Para sembrar las placas se impregna un hisopo estéril en el inóculo preparado y se elimina el exceso contra la pared del tubo; luego se inocula cada placa Petri, siguiendo el método de siembra en césped en tres direcciones. Las placas se dejaron secar unos minutos.

Los extractos correspondientes a los diferentes tratamientos se aplicaron sobre discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro a razón de 25 µl por disco, lo que corresponde a 500 µg por disco para los extractos de etanol y acetona y 1250 µg/disco para los extractos de metanol-DMSO. Asimismo, se impregnaron discos con 25 µl de los extractantes etanol y acetona.

Para el control con nistatina se utilizaron discos de 6,5 mm de diámetro impregnados con 100 IU de producto, de la marca Biorad®.

Los discos se colocan en la superficie de las placas previamente sembradas mediante la ayuda de pinzas estériles. Se colocaron 4 discos por placa, debidamente rotuladas.

Las placas se incubaron en oscuridad, a 28 °C, realizándose observaciones diariamente, con luz directa y por ambos lados de la placa, sobre fondo claro y fondo negro con el fin de distinguirlos mejor. A los tres días se midieron las zonas de inhibición con una regla milimetrada.



**Figura 11:** Cabina de flujo descendente con placas Petri antes la inoculación del hongo

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

En este ensayo se evaluó el efecto de la aplicación de los extractos al medio de cultivo sobre el crecimiento de micelio fúngico.

El diseño experimental consistió en: Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebenthifolius*, *Zygophyllum fabago*) frente a los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.*, *Phytophthora citrophthora*. Se utilizaron extractos vegetales obtenidos con etanol y acetona; como controles negativos se utilizó etanol y acetona, el control positivo consistía en placas sin ningún aditivo.

Se prepararon placas de Petri con medio PDA, a razón de 14 placas por hongo. En cada placa se añadió 600 µl de los extractos correspondientes o los controles etanol y acetona extendiéndose por la placa mediante movimientos circulares hasta conseguir una distribución homogénea.

Una vez que el extracto se secó, se colocó una porción de cada hongo en la placa de 8 mm de diámetro obtenido de un cultivo de al menos 7 días, con la ayuda de un sacabocados y un bisturí.

Todo el ensayo se realizó en condiciones estériles en una cabina de flujo descendente (figura 11).

Las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad y se evaluó su crecimiento mediante regla milimetrada a lo largo de seis días con luz directa, fondo claro y fondo oscuro, hasta que la colonia alcanzó su tamaño máximo.

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

En este ensayo se pretende comprobar la posible formación de una zona de inhibición en el crecimiento de las bacterias frente a los extractos seleccionados impregnados sobre un disco que se coloca sobre el medio de cultivo. Para ello se utilizó la técnica 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 consistió en: Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebenthifolius*, *Zygophyllum fabago*) con 3 extractantes (etanol, acetona y metanol) frente a 3 bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*).

Como controles positivos se utilizó Ampicilina, Amoxicilina y Cloramfenicol y como controles negativos etanol, acetona y DMSO.

Esto supone un total de 18 tratamientos, con 3 repeticiones para cada uno.

Todo el proceso se realiza en condiciones estériles en cabina de flujo descendente y con todo el material autoclavado previamente (agua, puntas de pipeta, tubos Eppendorf, discos de 6,5 mm de diámetro, placas Petri vacías y placas con medio (AN), bastoncillos de siembra o hisopo, pinzas, bisturí, etc). Tanto los extractos de las plantas como los controles negativos se esterilizaron por filtración según el método descrito anteriormente (pág. 11).

Para preparar los inóculos de las tres bacterias, con un asa de siembra se toma una porción de la placa Petri con un cultivo *stock* de la bacteria en cuestión, y se pasa a un tubo estéril con 5 ml de agua destilada. Se agita vigorosamente durante 10-15 segundos en un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax y se ajusta la turbidez en un densímetro Biosan DEN-1 a 0,5 unidades McFarland, añadiendo agua destilada o bacteria hasta que su densidad óptica sea de 0,5 unidades McFarland, lo que corresponde a un inóculo de  $10^6$ - $10^8$  unidades formadoras de colonias (Figuras 12 y 13).

Los inóculos bacterianos se prepararon inmediatamente antes de su uso.

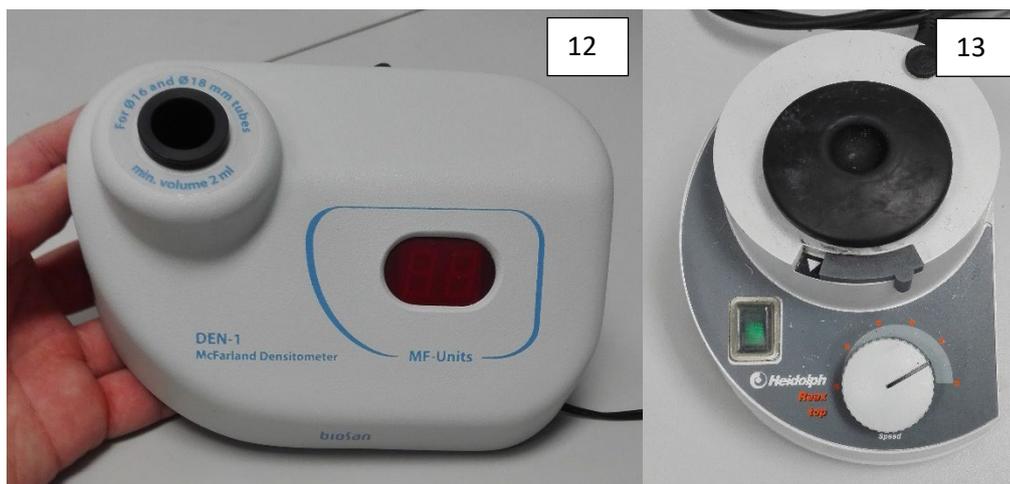
Para inocular las placas Petri se impregna un hisopo estéril en el inóculo, se elimina el exceso contra la pared del tubo y se siembra cada placa en césped en tres direcciones. Las placas se dejaron secar unos minutos.

Los extractos correspondientes a los diferentes tratamientos se aplicaron sobre discos de papel Whatman, tipo AA, de 6mm de diámetro a razón de 25  $\mu$ l por disco, lo que corresponde a 500  $\mu$ g por disco para los extractos de etanol y acetona y 1250  $\mu$ g/disco para los extractos de metanol-DMSO. Asimismo, se impregnaron discos con 25  $\mu$ l de los extractantes etanol, acetona y DMSO.

Para los controles positivos se utilizaron discos estériles de BioRAD<sup>®</sup> precargados con 10  $\mu$ g de Ampicilina, 25  $\mu$ g de Amoxicilina y 30  $\mu$ g de Cloranfenicol.

Los discos se colocan en la superficie de las placas previamente sembradas mediante la ayuda de pinzas estériles. Se colocaron 4 discos por placa, debidamente rotuladas.

Las placas se incubaron en una estufa a 37 °C y a las 24 horas se midió la zona de inhibición de crecimiento bacteriano con una regla milimetrada, realizándose otra medida a las 48 horas en los casos de crecimiento bacteriano más lento.



**Figuras 12 y 13:** Densitómetro Biosan DEN-1 y agitador tipo vortex marca Heidolph Reax

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Rendimiento de los extractos

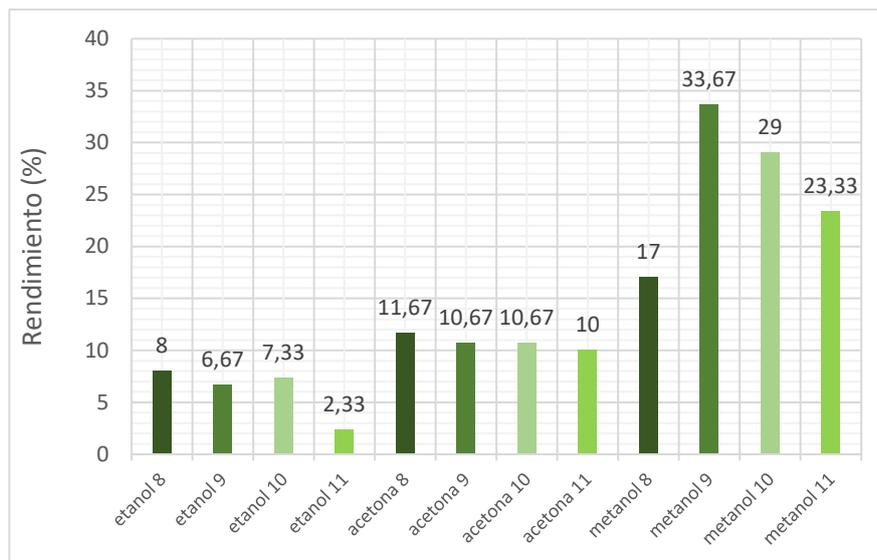
Como se observa en la figura 14, los extractos obtenidos con metanol han obtenido un rendimiento mucho mayor que los obtenidos con etanol y acetona, siendo los pertenecientes al género *Schinus* sp. los que han obtenido mayor porcentaje, seguido de *Z. fabago* y por último el perteneciente a *E. globulus*.

Los extractos de acetona son los siguientes en cuanto a rendimiento, con unos porcentajes entre 10 y 11,67 %.

Por último, los extractos con etanol son los que han tenido un menor rendimiento con valores entre 8 y 2,3 %.

Estos datos concuerdan con la bibliografía existente al respecto, donde se indica de forma general que el metanol es uno de los mejores solventes en cuanto a cantidad de producto extraído o eficiencia, además de mejorar la extracción de determinados metabolitos como los flavonoides, fenoles y otros compuestos antioxidantes (Kothari *et al.*, 2012). Tanto etanol como metanol o acetona son disolventes orgánicos que extraen los compuestos con un amplio rango de polaridades. Sin embargo, debido a la mayor eficiencia del metanol comparado con etanol se ha utilizado de forma más amplia para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

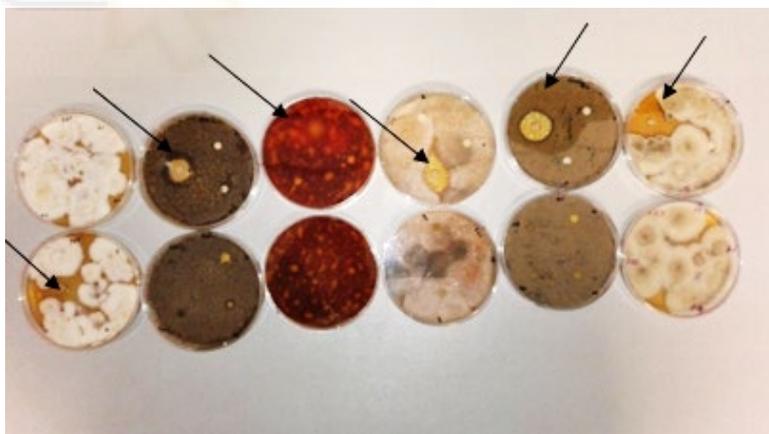
Aunque existe mucha variación en el rendimiento obtenido según el método de extracción, la especie vegetal y otros factores, se puede afirmar que el rango de valores de rendimiento en este estudio (2,3-33,7 %) se encuentra dentro de los valores obtenidos en otros trabajos. Así, Díaz *et al.*, obtienen un rendimiento de 34,5 % con *Schinus molle*.



**Figura 14:** Rendimiento de los extractos obtenidos con los diferentes extractantes. El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10 -*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

## Capacidad antifúngica de los extractos de plantas

Se observó un crecimiento total de los hongos por todas las placas. Únicamente alrededor de los discos de nistatina colocados en las placas control se produjo un claro efecto inhibitorio, lo que valida el ensayo (figura 15).



**Figura 15:** De izquierda a derecha: cultivos de *Phytophthora citrophthora*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp., *Botrytis cinerea* y *Alternaria* sp. con extractos en etanol y acetona de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10 -*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*. Las flechas señalan los discos con el antibiótico nistatina.

Sin embargo, cabe destacar la formación de pequeños halos de inhibición en los hongos *Fusarium* sp y *Phytophthora citrophthora* por parte de los extractos de *E. globulus* (entre 1 y 1,4 cm de diámetro). También el extracto de *Z. fabago* con etanol tubo efecto inhibitorio en *Fusarium* sp. y *S. molle* con etanol y acetona sobre *Phytophthora citrophthora*. Se observó también un efecto

inhibitorio del extracto de *S. terebinthifolius* sobre *Sclerotinia*, aunque este fue muy reducido (1,1 cm de diámetro) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Diámetro de la 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 (E) y acetona (A). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10 -*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

| Zona de inhibición 72 h | <i>Altenaria</i> sp. | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Phytophthora citrophthora</i> | <i>Sclerotinia</i> sp. |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|------------------------|
| E8                      | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 1,4 $\pm$ 0,08      | 1,3 $\pm$ 0                      | 0 $\pm$ 0              |
| E9                      | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 1 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| E10                     | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| E11                     | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 1,2 $\pm$ 0,22      | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| A8                      | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 1,4 $\pm$ 0,33      | 1 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| A9                      | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 1,1 $\pm$ 0,08                   | 0 $\pm$ 0              |
| A10                     | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 1,1 $\pm$ 0,08         |
| A11                     | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| Etanol                  | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| Acetona                 | 0 $\pm$ 0            | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| Nistatina               | 3,07 $\pm$ 0,15      | 2,07 $\pm$ 0,42          | 3,2 $\pm$ 0,42          | 2 $\pm$ 0,2         | 2,73 $\pm$ 0,25                  | 2,25 $\pm$ 0,2         |

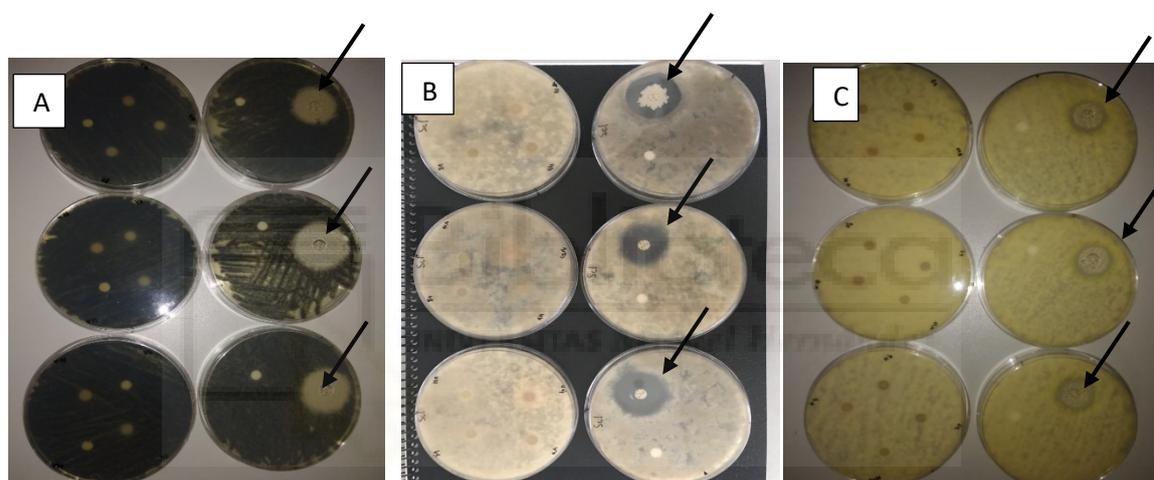
Con los extractos con metanol no se produjo efecto inhibitorio sobre ninguno de los hongos (tabla 4), a pesar que éstos tenían una concentración del 50 mg/ml frente a los 20 mg/ml de los extractos en etanol y acetona. Sin embargo, se observaron zonas de inhibición alrededor de los discos control nistatina, al igual que ocurrió con los extractos en etanol y acetona (Figura 16).

Es posible que los hongos utilizados sean especialmente resistentes a los posibles compuestos antimicrobianos presentes en las plantas, o que sea necesaria una mayor concentración del extracto para observar los efectos. De forma similar a nuestros resultados, Rahua *et al.* (2000) no observaron inhibición de *Aspergillus niger* con extractos de 29 especies de plantas. Sin embargo, los resultados de otros trabajos previos son poco homogéneos y contradictorios. Así por ejemplo, Singh *et al.* (2014) y Díaz *et al.* (2009) encontraron inhibición del crecimiento de *Alternaria* por extractos de *Eucalyptus camaldulensis* y *Schinus molle* respectivamente, utilizando estos últimos extractos sin diluir; esto hace pensar que la inhibición depende de la cantidad de extracto utilizado. También Gakuubi *et al.* (2017) demostraron actividad antifúngica de aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* frente a *Fusarium* sp.

Ante estos resultados, nos planteamos hacer otro ensayo aumentando la cantidad de extracto y facilitando el contacto del mismo con los hongos.

**Tabla 4:** Diámetro de la 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 metanol (M). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10 -*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

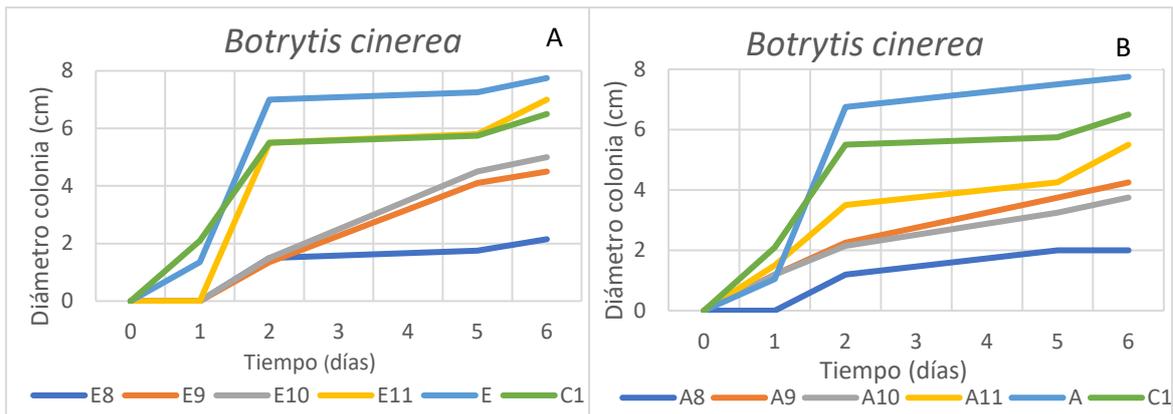
| Zona de inhibición | <i>Alternaria</i> sp. | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Fusarium</i> sp. | <i>Phytophthora citrophthora</i> | <i>Sclerotinia</i> sp. |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|------------------------|
| M8                 | 0 $\pm$ 0             | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| M9                 | 0 $\pm$ 0             | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| M10                | 0 $\pm$ 0             | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| M11                | 0 $\pm$ 0             | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| DMSO               | 0 $\pm$ 0             | 0 $\pm$ 0                | 0 $\pm$ 0               | 0 $\pm$ 0           | 0 $\pm$ 0                        | 0 $\pm$ 0              |
| Nistatina          | 3,02 $\pm$ 0,1        | 2 $\pm$ 0                | 2,8 $\pm$ 0,24          | 1,5 $\pm$ 0,16      | 1,3 $\pm$ 0,94                   | 3 $\pm$ 0              |



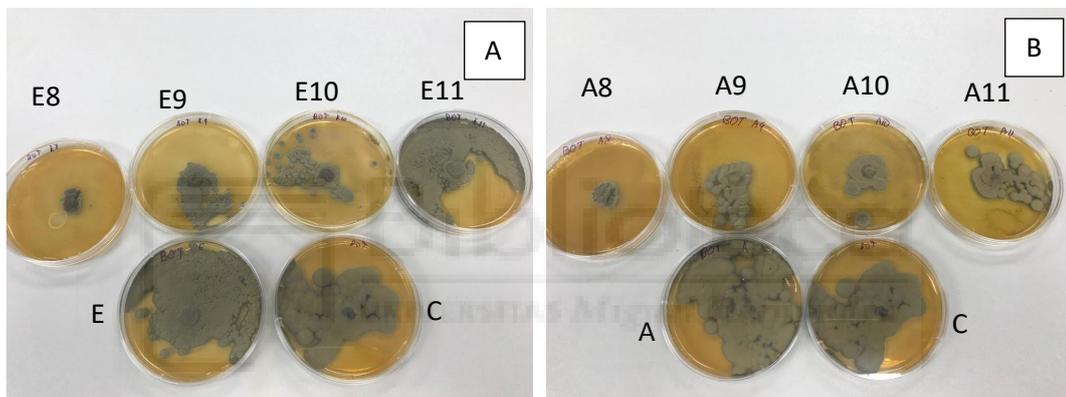
**Figura 16 A, B y C:** Cultivos de *Aspergillus niger* (A), *Sclerotinia* sp. (B) y *Botrytis cinerea* (C) con extractos en metanol de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10 -*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

## Inhibición del crecimiento del micelio por contacto directo con los extractos

En el caso de *Botrytis cinerea* (figuras 17 y 18) se puede observar que con los extractos con etanol se produce una inhibición clara por parte de *E. globulus*, *S. molle* y *S. terebinthifolius* pero no con *Z. fabago*. Los extractos con acetona de todas las especies también produjeron una inhibición importante del crecimiento del micelio con respecto a la placa control. Con los controles etanol y acetona se obtuvieron resultados muy similares o incluso superiores al control.



**Figura 17 A y B:** 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 (E) y acetona (A). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10 - *Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

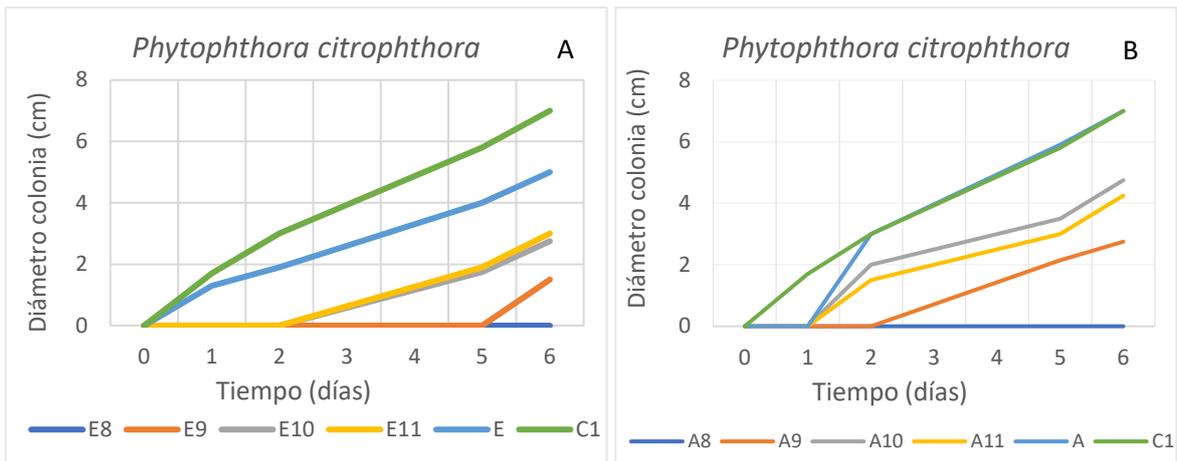


**Figura 18 A y B:** Crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en medio PDA con diferentes extractos de plantas y diferentes extractantes. E etanol, A acetona. El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

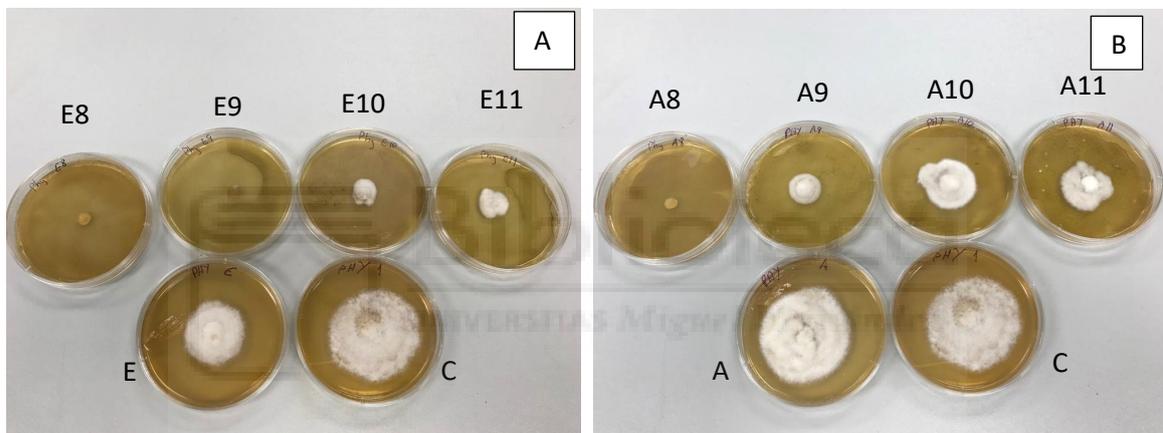
En el caso de *Phytophthora citrophthora* (figuras 19 y 20) se produjo una disminución del crecimiento en todas las placas donde se añadió extracto al medio de cultivo. Tanto en los extraídos con etanol como en acetona se han producido resultados similares. El extracto con mayor efecto antifúngico fue *E. globulus* no produciéndose ningún crecimiento por parte del hongo. Los extractos de *S. molle* también mostraron gran poder inhibitorio, retrasando el inicio del crecimiento de la colonia hasta 5 días y 2 días con etanol y acetona respectivamente.

*S. terebinthifolius* y *Z. fabago* también impidieron el crecimiento del hongo hasta 2 días en los extractos obtenidos con etanol reduciendo su crecimiento en los días posteriores. En el caso de los obtenidos con acetona, aunque el micelio de *P. citrophthora* creció a las 24 horas su crecimiento fue inferior a las placas control.

Tanto en las placas control como las placas con los extractantes etanol y acetona (controles negativos) el hongo ha tenido un crecimiento similar, lo que confirma el poder antifúngico de los extractos y da validez al ensayo.



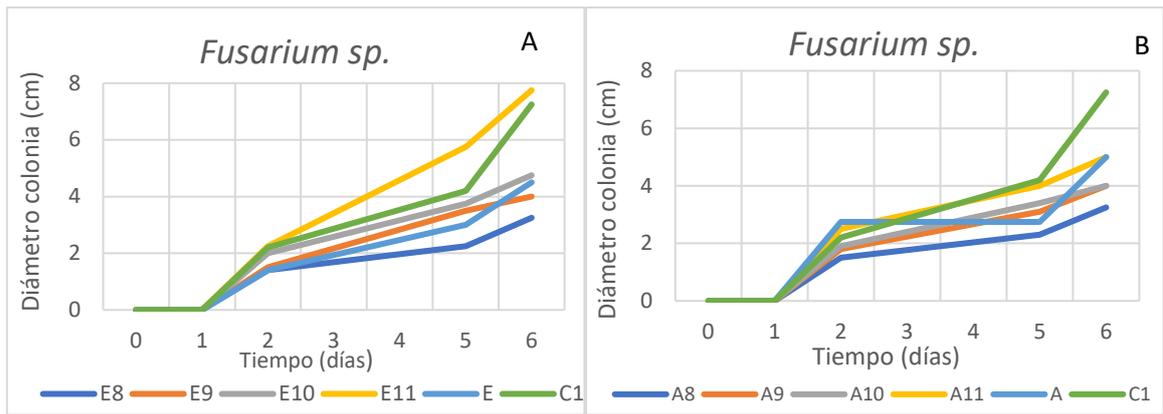
**Figura 19 A y B:** Crecimiento del micelio de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA adicionado con extractos de plantas a lo largo del tiempo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol (E) y acetona (A). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.



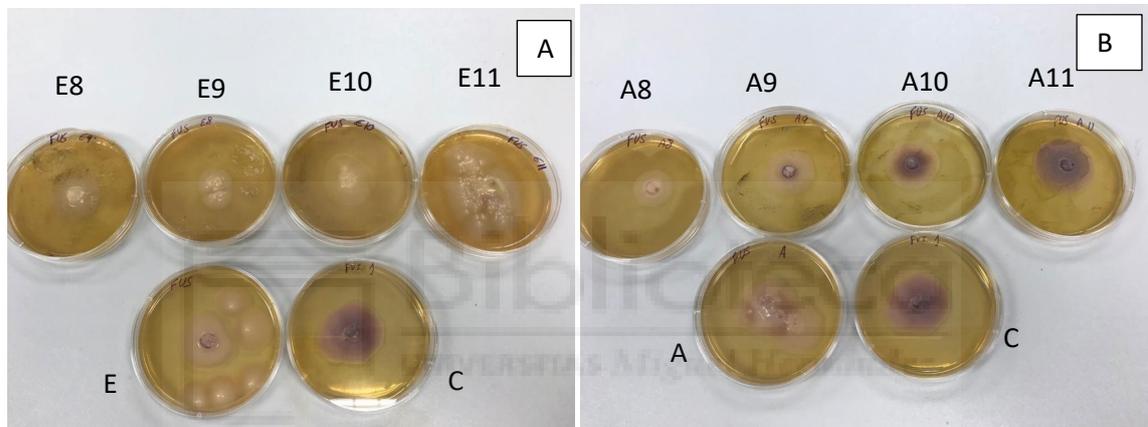
**Figura 20 A y B:** Crecimiento del hongo *Phytophthora citrophthora* en PDA con diferentes extractos de plantas y diferentes extractantes. E etanol, A acetona. El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

Con respecto a *Fusarium* (Figuras 21 y 22) se observó una ligera disminución en el crecimiento por en las placas con el extracto de las especies del género *Schinus sp.*, la mayor inhibición la produjo sin embargo *E. globulus*. En cambio, el extracto de *Z. fabago* no dio lugar a inhibición alguna, llegando incluso a superar en crecimiento a la placa de control en algunos casos y/o la placa con el extractante.

Es también interesante mencionar que se observó una clara variación en la morfología de la colonia especialmente en el caso de los extractos obtenido con etanol, con un color más claro y una menor densidad de hifas que el control.



**Figura 21 A y B:** 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 (E) y acetona (A). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.



**Figura 22 A y B:** Crecimiento del hongo *Fusarium sp.* en PDA con diferentes extractos de plantas y diferentes extractantes. E etanol, A acetona. El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición, que se muestra en las tablas 5 y 6.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Diámetro placa control} - \text{Diámetro placa tratamiento}}{\text{Diámetro placa control}} \times 100$$

El mayor porcentaje de inhibición se produjo sobre *Phytophthora citrophthora*. Todos los extractos etanólicos produjeron porcentajes de inhibición de 100% en las primeras 48 horas. *E. globulus* mantuvo un 100% en los 6 días que duró el ensayo, *S. molle* también tuvo una inhibición del 100% hasta el sexto día que bajó al 78,6%. Con *S. terebinthifolius* y *Z. fabago* también bajó la inhibición a los 5 días del 100% al 60,7 y 57,1% respectivamente.

El segundo hongo con mayor porcentaje de inhibición fue *Botrytis cinerea*. En el caso de *E. globulus* se produjo un porcentaje de inhibición notable disminuyendo a lo largo de los días llegando al 66,9 % en el día 6. En cambio, el extracto etanólico de *Z. fabago* no produjo inhibición.

En el caso de *Fusarium*, todos los extractos excepto el de *Z. fabago* inhibieron en menor medida el crecimiento del micelio.

**Tabla 5:** Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio con los extractos de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago* obtenidos con etanol, a lo largo de 6 días.

| Tiempo | Extractos | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Phytophthora citrophthora</i> |
|--------|-----------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Día 2  | E8        | 72,7                    | 36,4                | 100                              |
|        | E9        | 75,5                    | 31,8                | 100                              |
|        | E10       | 72,7                    | 18,36               | 100                              |
|        | E11       | -                       | -                   | 100                              |
|        | ETANOL    | -                       | 36,4                | 36,7                             |
| Día 5  | E8        | 69,6                    | 46,4                | 100                              |
|        | E9        | 28,7                    | 16,7                | 100                              |
|        | E10       | 21,7                    | 10,7                | 69,8                             |
|        | E11       | -                       | -                   | 67,2                             |
|        | ETANOL    | -                       | 28,6                | 31                               |
| Día 6  | E8        | 66,9                    | 55,2                | 100                              |
|        | E9        | 30,8                    | 44,8                | 78,6                             |
|        | E10       | 23,1                    | 34,5                | 60,7                             |
|        | E11       | -                       | -                   | 57,1                             |
|        | ETANOL    | -                       | 37,9                | 28,6                             |

**Tabla 6:** Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio con los extractos de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago* obtenidos con acetona, a lo largo de 6 días.

| Tiempo | Extractos | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Phytophthora citrophthora</i> |
|--------|-----------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Día 2  | A8        | 78,2                    | 38,7                | 100                              |
|        | A9        | 59,1                    | 26,5                | 100                              |
|        | A10       | 60,9                    | 22,4                | 33,3                             |
|        | A11       | 36,4                    | -                   | 50                               |
|        | ACETONA   | -                       | -                   | -                                |
| Día 5  | A8        | 65,2                    | 37,8                | 100                              |
|        | A9        | 34,8                    | 26,2                | 62,9                             |
|        | A10       | 43,5                    | 19                  | 39,7                             |
|        | A11       | 26,1                    | -                   | 48,3                             |
|        | ACETONA   | -                       | 34,5                | -                                |
| Día 6  | A8        | 69,2                    | 55,2                | 100                              |
|        | A9        | 34,6                    | 44,8                | 60,7                             |
|        | A10       | 42,3                    | 44,8                | 32,1                             |
|        | A11       | 15,4                    | 31,1                | 39,3                             |
|        | ACETONA   | -                       | -                   | -                                |

Los extractos obtenidos con acetona produjeron valores de inhibición similares a los obtenidos con etanol. *Phytophthora citrophthora* fue el hongo más sensible al contacto directo con los extractos seguido de *Botrytis cinerea* y por último *Fusarium sp.* Todos los extractos tuvieron algún efecto inhibitorio. El extracto de *E. globulus*, al igual que en los extractos obtenidos con etanol, fue el que produjo mayor inhibición.

Las placas que contenían únicamente el medio de cultivo con acetona tuvieron un crecimiento muy similar a las placas control, por lo que se puede concluir que la acetona no posee capacidad antifúngica, aunque no puede decirse lo mismo del etanol, que sí produjo inhibición.

Con los datos obtenidos (tablas 5 y 6) se puede afirmar que la aplicación directa de los extractos permite detectar una actividad antifúngica que no se vió por el método de difusión.

Los extractos de *E. globulus* tanto los obtenidos con etanol como con acetona poseen la mayor capacidad antifúngica, siendo *Phytophthora citrophthora* el hongo más sensible. Los extractos de *S. molle* y *S. terebinthifolius* tuvieron gran poder inhibitorio sobre *Phytophthora citrophthora*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium sp.* Los extractos de *Z. fabago* y más concretamente en el obtenido con etanol solo mostraron propiedades antifúngicas frente a *Phytophthora citrophthora*.

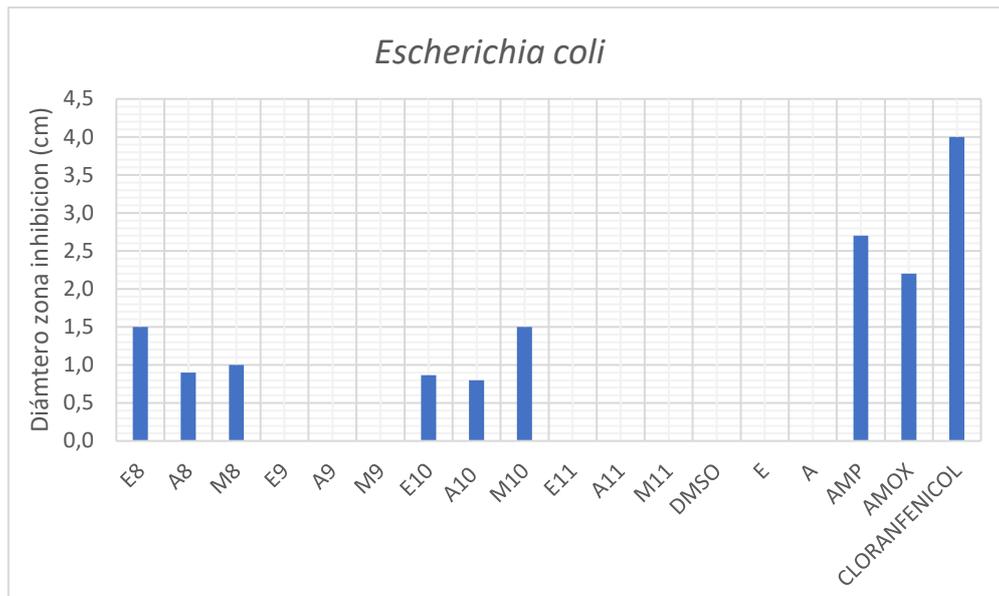
## Capacidad antibacteriana de extractos de plantas

La mayoría de los extractos ensayados produjeron halos de inhibición patentes en los cultivos de bacterias.

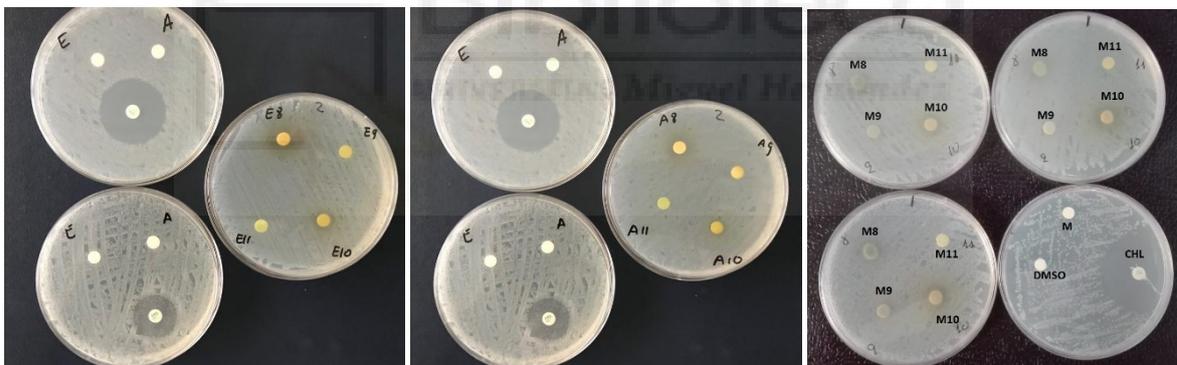
En el caso de la bacteria *E. coli* (figuras 23 y 24) se observó halo de inhibición con los extractos de *E. globulus* y *S. terebinthifolius* independientemente del extractante con el que se obtuvieron.

Entre los controles positivos, cloranfenicol fue el que generó el mayor halo de inhibición. Como controles negativos se utilizó DMSO, etanol y acetona. Ninguno de ellos produjo halo de inhibición, lo que confirma el poder antibacteriano de los extractos, debidos exclusivamente a la planta.

Los resultados obtenidos con nuestras cepas de *Escherichia coli*, coinciden con los trabajos previos de Bachir y Benali (2012) y Mota *et al.* (2014) donde se demostró que las hojas de *Eucalyptus globulus* tienen capacidad antimicrobiana. También se ha demostrado previamente en el trabajo Deveci *et al.* (2010) la actividad antibacteriana de *Schinus molle*.



**Figura 23:** 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 (E), acetona (A), metanol (M). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygodphyllum fabago*. Como control positivo se ha utilizado ampicilina (AMP), amoxicilina (AMOX) y cloranfenicol.

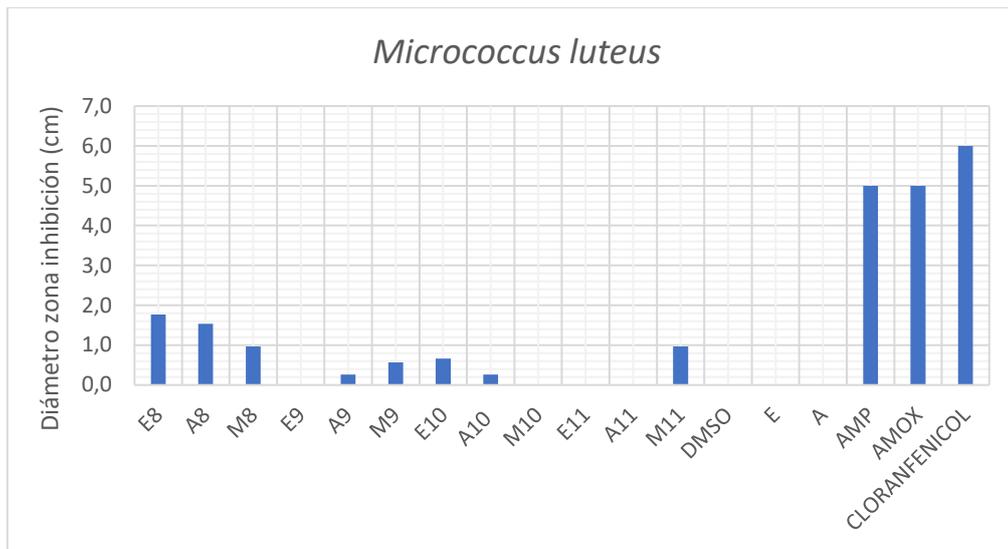


**Figura 24:** Cultivos de *Escherichia coli* en medio AN a las 24 horas de la siembra con extractos en etanol (E), acetona (A) y metanol (M) de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygodphyllum fabago*.

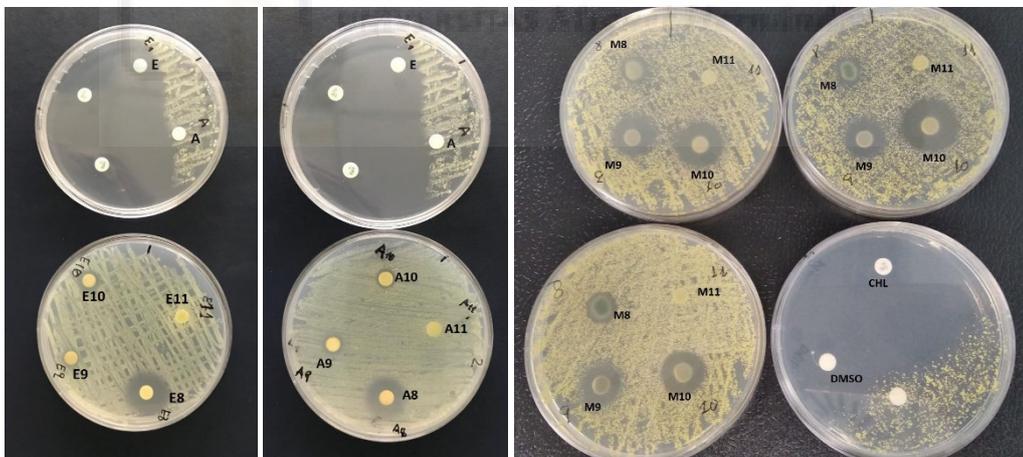
Para *Micrococcus luteus*, los resultados pueden observarse en las figuras 25 y 26. Los controles positivos produjeron un gran halo de inhibición, siendo el de cloranfenicol el que ha tenido mayor diámetro (6 cm). Esto pone de manifiesto la gran sensibilidad de esta especie. Por otra parte, ninguno de los controles negativos produjo halo de inhibición.

Con relación a los extractos ensayado, los más efectivos fueron los de *E. globulus*, aunque también se observó un pequeño halo en los extractos de *S. molle* con acetona y DMSO y *S. terebinthifolius* con etanol y acetona. Con los extractos de *Z. fabago* únicamente se apreció inhibición en el extracto de DMSO.

Los resultados obtenidos con nuestras cepas de *M. luteus* coinciden con el trabajo de Scopel *et al.* (2015) donde se demuestra la capacidad de *Schinus molle* para inhibir el crecimiento de *Micococcus luteus*.



**Figura 25:** 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 (E), acetona (A), metanol (M). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*. Como control positivo se ha utilizado ampicilina (AMP), amoxicilina (AMOX) y cloranfenicol.



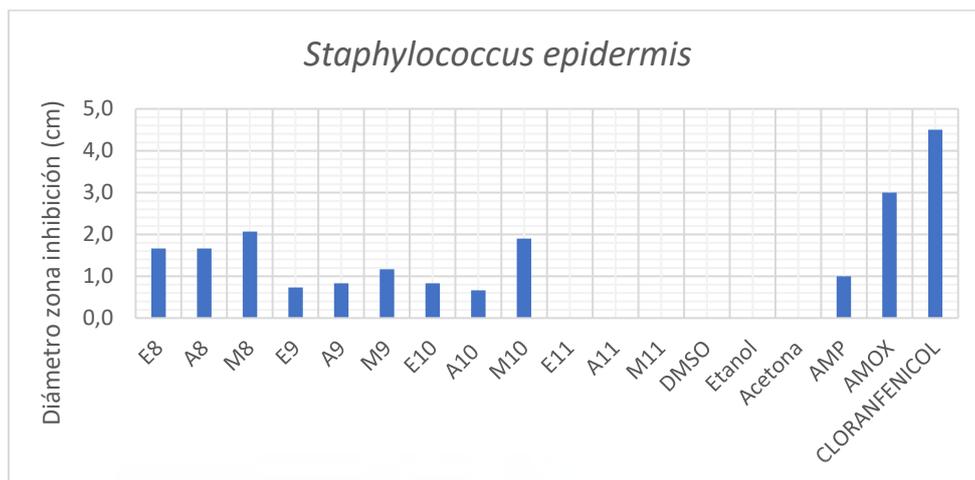
**Figura 26:** Cultivos de *Micrococcus luteus* en medio AN a las 24 horas de la siembra con extractos en etanol (E), acetona (A) y metanol (M) de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

Los resultados relativos a *Staphylococcus epidermis* se muestran en las figuras 27 y 28.

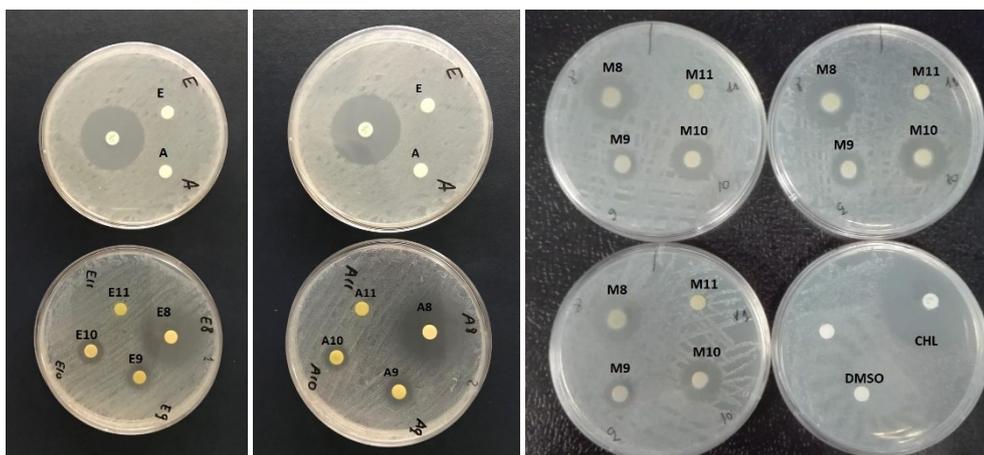
Se puede observar los halos de inhibición formados por los controles positivos (amoxicilina, ampicilina y cloranfenicol), de hasta 4 cm en el caso de cloranfenicol mientras que los controles negativos empleados (DMSO, etanol y acetona) no han producido ninguno.

En cuanto a los extractos ensayados, *E. globulus* formó halo de inhibición con los tres extractantes empleados; *S. molle* y *S. terebinthifolius* también han formado halo, pero de tamaño claramente inferior salvo en el caso de *S. terebinthifolius* con DMSO. La actividad de *S. terebinthifolius* frente a *Staphylococcus epidermidis* se ha puesto de manifiesto con anterioridad (Cohrane *et al.* 1999)

En cambio, en el caso de *Zygophyllum fabago* no se ha producido inhibición con ninguno de los extractantes.



**Figura 27:** 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 (E), acetona (A), metanol (M). El número corresponde con la especie vegetal: 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*. Como control positivo se ha utilizado ampicilina (AMP), amoxicilina (AMOX) y cloranfenicol.



**Figura 28:** Cultivos de *Staphylococcus epidermidis* en medio AN a las 24 horas de la siembra con extractos en etanol (E), acetona (A) y metanol (M) de 8-*Eucalyptus globulus*, 9-*Schinus molle*, 10-*Schinus terebinthifolius* y 11-*Zygophyllum fabago*.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que algunas especies de plantas invasoras pueden presentar propiedades antifúngicas y antibacterianas y por tanto se ha confirmado la hipótesis de partida. Las especies con las que se ha ensayado en este trabajo se han seleccionado en función de su referenciada capacidad alelopática y/o tóxica. Se ha sugerido que estas especies invasoras poseen metabolitos secundarios con una función ecológica que les permite prosperar en medios de donde no proceden. Puede ser una función antibiótica, antifúngica o incluso de modificación de las comunidades microbianas nativas (Capuccino y Arnason, 2006; Dawson y Schrama, 2016).

Sin embargo, reproducir esta actividad en condiciones experimentales *in vitro* requiere una optimización metodológica.

En nuestro caso, conforme a lo esperado según datos previos (Subramaian *et al.*, 2006; Kothari *et al.*, 2010) hemos comprobado que el metanol es el solvente con mayor eficiencia de extracción, es decir, con el que se obtiene mayor cantidad de producto, lo que puede resultar muy interesante a la hora de plantear extracciones a mayor escala con plantas invasoras. Sin embargo, no hay que dejar de lado la posible toxicidad de este compuesto. Además de la eficiencia hay que tener en cuenta la eficacia. Se sabe que el metanol extrae una gran cantidad de compuestos polares y no polares, entre los que están los fenoles. Efectivamente, hemos observado una mayor eficacia de los extractos metanólicos frente a *Staphylococcus epidermidis* y en algunos casos con *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*. Sin embargo, habría que comprobarlo también frente a hongos.

La técnica estandarizada de difusión sobre disco es cómoda y permite ensayar una cantidad elevada de extractos con relativamente poco esfuerzo (Cantón *et al.*, 2007). Aunque con bacterias las dosis ensayadas han sido suficientes para visualizar los efectos, no ha ocurrido igual con hongos. Posiblemente sea necesario aumentar la dosis de aplicación, trabajando con extractos más concentrados o ajustar la cantidad de inóculo fúngico a la mínima cantidad necesaria. Para medir el efecto antifúngico de los extractos, el método de inhibición por contacto directo ha resultado más eficaz que la técnica de difusión en disco. Aunque este método ha sido utilizado también por otros autores con *Zygophyllum fabago* (Dana *et al.*, 2010), es mucho más costoso y laborioso en términos de extracto necesario, placas, tiempo empleado, etc.

Ha quedado patente que, en las condiciones ensayadas, las bacterias son más sensibles que los hongos. Incluso con los antibióticos control, las zonas de inhibición han sido mucho mayores en bacterias que en hongos. Se da la circunstancia que los hongos utilizados son patógenos o saprófitos de amplio espectro, con gran capacidad de crecimiento y muy resistentes a diversos pesticidas (Agrios, 2005), lo que posiblemente explique los resultados obtenidos.

Hay que considerar también que la cantidad y calidad de fitoalexinas en las plantas puede variar según su estado fenológico y fisiológico, el lugar donde crece la planta, la población a la que pertenecen los individuos o incluso la fecha y hora de recolección pueden variar la capacidad antimicrobiana de los extractos.

## CONCLUSIONES

Dados los objetivos propuestos y con los resultados obtenidos se puede concluir que:

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

- Los extractos de *Eucalyptus globulus* han mostrado excelentes resultados para los hongos *Botrytis cinerea*, *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium* sp., mediante el método de inhibición por contacto directo. Ha mostrado también actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*.
- Los extractos de *Schinus molle* han mostrado actividad antifúngica frente a los hongos *Botrytis cinerea*, *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium* sp., y actividad antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis*.
- Los extractos de *Schinus terebinthifolius* han mostrado actividad antifúngica para *Botrytis cinerea*, *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium* sp. y actividad antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*, y en menor medida *Micrococcus luteus*.
- Los extractos de *Zygophyllum fabago* mostraron actividad antifúngica frente a *Phytophthora citrophthora* y, con los extractos preparados con acetona, *Botrytis cinerea*. Únicamente el extracto preparado con metanol tubo efecto antibacteriano sobre *Micrococcus luteus*.

Se sugiere como perspectivas futuras:

- Determinar la naturaleza de los metabolitos secundarios de los extractos responsables de la actividad antimicrobiana mediante la realización de análisis fitoquímicos.
- Optimizar el método de extracción del material vegetal mediante la incorporación de distintas variables (extractantes, temperatura de extracción, tiempo de extracción, concentración, reconstitución).
- Utilizar otros métodos para comprobar la capacidad antimicrobiana de los extractos, en particular frente a hongos (difusión en pozillo, mínima concentración inhibitoria).

## BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 2005. Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 pp.

Andreu, J., Vilà, M. 2007. Análisis de la gestión de las plantas exóticas en los espacios naturales españoles. *Ecosistemas* 16(3):109-124.

Anzlovar, S., Dolenc, J. 2013. Antibacterial and antifungal activity of aqueous and organic extracts from indigenous and invasive species of goldenrod (*Solidago spp.*) grown in Slovenia. *Phyton* 54 (1). 135-147.

Bachir, R., Benali, M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3(9): 739-742.

Bauer, A.W. 1966. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4):493-496.

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). *Rev. Iber. Mic.* 15.

Cappuccino, N., Arnason, J.T. 2006. Novel chemistry of invasive exotic plants. *Biology Letters* 2: 189-193.

CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard document M38-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 34

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 *Zhygophyllum fabago* on the growth of *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* and *Pythium aphanidermatum*. *Weed Biology and Management* 10: 170-175.

Dawson, W., Schrama, M. 2016. Identifying the role of soil microbes in plant invasions. *Journal of Ecology* 104: 1211-1218.

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

Deveci O., Sukan A., Tuzun N., Hames K. E. 2010. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *J. Med. Plant. Res.* 4(21): 2211-2216.

- Domingo, D., López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp. Quimioterap., 16: 385-393.
- Gakuubi, M. M., Maina, A. W., y Wagacha, J. M. 2017. Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against Selected *Fusarium* spp. International journal of microbiology, 2017: 1-7.
- Kothari, V., Gupta, A., Naraniwal, M. 2012. Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. A comparative study. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 155pp.
- 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. Diagn Microbiol Infect Disc 73(1):53-6.
- Pavón, M. Á., González, I., Martín de Santos, R., García, T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. Nutrición Hospitalaria 27(6): 1772-1781.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology 56 (1): 3-12.
- Reigosa, M.J., Casal, J.F., Carballeira, A. 1984. Efectos alelopáticos de *Acacia dealbata* durante su floración. Studia Oecologica 5: 135-150.
- Sanz-Elorza, M., Sobrino, E., Dana, E.D. 2001. Aproximación al listado de plantas alóctonas invasoras reales y potenciales en España 22: 121-131.
- Scopel, R., Góes R., Alves, M., Cassel, E., Figueiró, R. 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Schinus molle* L with co-solvent: mathematical modeling and antimicrobial application. Braz. Arch, biol. Technol. 56 (3): 513-519.
- Sepúlveda, G., Ducoing, H., Rocha, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista mexicana de Fitopatología 21 (3) :355-363.
- Singh G., Gupta S., Sharma N. 2014. *In vitro* screening of selected plant extracts against *Alternaria alternate*. Journal of Experimental Biology 2(3):344–351.
- Siquiera, V., Turrini, R., de Brito, P., 2015. Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xilitol and papain. Revista da Escola de Enfermagem da USP 49: 216-220.
- Subramanian, S., Kumar, D.S., Arulselvan, P., Senthilkumar, G.P. 2006. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of ethanolic extract of *Aloe vera* leaf gel. J. Plant Sci. 1: 348-355.

[https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet flora\\_vasc\\_aloect\\_invas.aspx](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet flora_vasc_aloect_invas.aspx)