

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE
EXTRACTOS DE PLANTAS INVASORAS
(*Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii*,
Carpobrotus edulis, *Mirabilis jalapa*)**

Elche

Septiembre 2022

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Autor: Díez Ramírez, José Antonio

Tutor: Díaz Espejo, Gisela

Modalidad: Experimental

Departamento: Biología Aplicada. Área Botánica

COIR: 220729105547



Agradecimientos:

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra han ayudado y contribuido a la realización de este proyecto de investigación.

A mi familia, mi pareja, mis amigos y compañeros de carrera, gracias por brindarme todo el apoyo que he necesitado para llegar hasta aquí.

A mi tutora Gisela, muchas gracias por la investigación realizada, por guiarme en todo momento y por tu atención cuando lo he necesitado, estoy muy agradecido.





Contenido

Resumen.....	7
Abstract	7
INTRODUCCIÓN	8
La problemática de los patógenos vegetales y la búsqueda de compuestos bioactivos	8
Las plantas invasoras como fuente de nuevos compuestos bioactivos.....	9
Microorganismos patógenos y oportunistas.	9
Justificación y objetivos.....	11
METODOLOGÍA.....	12
Especies vegetales utilizadas.....	12
Recolección y preparación de material vegetal	15
Preparación de los extractos vegetales.....	15
Medios de cultivo utilizados.....	16
Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados	17
Hongos	17
Bacterias.....	18
ENSAYOS.....	18
Determinación de la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en disco	18
Determinación de la actividad antifúngica mediante la técnica de difusión en disco.....	19
Determinación de la inhibición del crecimiento de los hongos por contacto directo con el extracto.	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Rendimiento de los extractos	21
Actividad antifúngica de los extractos de plantas.....	22
Inhibición del crecimiento del micelio por contacto directo con los extractos	24
Actividad antibacteriana de los extractos de plantas	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36



Resumen

La pérdida global del rendimiento de los cultivos es causada en gran parte por enfermedades de las plantas provocadas por microorganismos patógenos. El método más utilizado para controlar estos microorganismos es el uso de biocidas; sin embargo, el uso de éstos ha provocado la aparición de patógenos resistentes, además de amenazas para la salud humana y el medio ambiente. Las plantas sintetizan compuestos químicos que pueden ser fuente de compuestos antimicrobianos. Ciertas plantas invasoras, podrían ser una alternativa para obtener los citados compuestos, debido a sus propiedades tóxicas o alelopáticas.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad antibacteriana y antifúngica de 4 especies invasoras: *Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii*, *Carpobrotus edulis* y *Mirabilis jalapa*. Se prepararon extractos con etanol con cloruro de benzalconio, acetona, metanol y etanol puro, y se determinó su actividad antifúngica frente a 4 hongos (*Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium sp.*) y antibacteriana frente a 3 bacterias (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*).

Los resultados fueron variables, según la especie, extractante y especie de hongo/bacteria. En general *Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii* y *Mirabilis jalapa* presentaron actividad inhibitoria en bastantes casos mientras *Carpobrotus edulis* mostró una menor actividad antifúngica y antibacteriana.

Abstract



The global loss of crop yields is largely caused by plant diseases caused by pathogenic microorganisms. The most commonly used method to manage these microorganisms is the use of biocides; however, its use has led to the emergence of resistant pathogens, as well as threats to human health and the environment. Plants synthesize chemical compounds that can be a source of antimicrobial compounds. Certain invasive plants could be an alternative to obtain these compounds, due to their toxic or allelopathic properties.

In this study, the antibacterial and antifungal capacity of four plant species, *Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii*, *Carpobrotus edulis* and *Mirabilis jalapa*, was studied. Plant extracts were prepared with Ethanol plus benzalkonium chloride, acetone, methanol and pure ethanol to evaluate their antifungal activity against 4 fungi (*Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora citrophthora* and *Fusarium sp.*) and antibacterial activity against 3 bacteria (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus epidermidis*).

Results varied depending on the plant, extractant and fungus/bacterial species. In general, *Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii* y *Mirabilis jalapa* exhibited antimicrobial activity in many cases whereas *Carpobrotus edulis* showed lower antifungal or antibacterial activity.

Palabras clave / Key words: Patógenos/pathogens, plantas invasoras/invasive plants, extractos/extracts, hongos/fungi, bacterias/bacteria

INTRODUCCIÓN

La problemática de los patógenos vegetales y la búsqueda de compuestos bioactivos

Diferentes patógenos vegetales amenazan la seguridad alimentaria de todo el mundo, ya que más de 800 millones de personas tienen un suministro de alimentos inadecuado y, al menos, el 10 % de la producción de alimentos se pierde por culpa de las enfermedades de las plantas (Strange y Scott, 2005). Los hongos patógenos de las plantas, en particular, suponen una gran amenaza, ya que unas 5.000 especies de hongos destruyen cultivos de gran valor económico (Prescott et al., 1996). Muchas de las enfermedades vegetales reducen la vida útil y el valor de mercado de los productos alimentarios y los hacen no aptos para el consumo humano. La aplicación de productos químicos sintéticos ha sido durante mucho tiempo la principal opción para controlar diversas enfermedades de las plantas. Sin embargo, el uso extensivo de productos agroquímicos ha planteado problemas graves, como la aparición de patógenos resistentes, residuo químicos y amenazas para la salud humana y el medio ambiente. El incremento de la preocupación por estos factores ha aumentado el interés por encontrar alternativas más seguras que sustituyan a los agroquímicos sintéticos. Ha habido un creciente interés en la investigación del posible uso de los fungicidas naturales derivados de las plantas, como los extractos de plantas, que pueden ser relativamente ecológicos para el control de enfermedades en la agricultura. Además, desde hace tiempo se reconoce que las plantas o los extractos de plantas proporcionan una fuente potencial de compuestos químicos o, más comúnmente, productos conocidos como fitoquímicos con una potente eficacia antifúngica y antibacteriana. (Domingo y López-Brea, 2003).

Los metabolitos secundarios cuentan con importantes funciones fisiológicas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y son responsables de las actividades biológicas de las plantas. Estos resultan de un proceso evolutivo de defensa contra ataques de microorganismos, insectos y otros animales. Estas sustancias pueden dividirse 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. Se ha demostrado además que la estructura y composición de la pared celular también cambia, tornándose más rígida (Sepúlveda et al., 2003).

Las plantas invasoras como fuente de nuevos compuestos bioactivos

Según la Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, una especie exótica invasora se define como “aquella que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética”.

Estas especies suelen llegar de la mano del hombre, ya sea de forma intencionada o con fines agrícolas, ganaderos, comercial, ornamental, etc. 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 Vilá, 2007). Los impactos ecológicos producidos por las invasiones de organismos exóticos conllevan consecuencias económicas negativas. Como ejemplo, se estima que las pérdidas económicas causadas por las especies invasoras en Europa suponen 12,5 billones de euros, de los cuales 9,6 derivan de los daños producidos por las especies invasoras y 2,8 constituyen los gastos destinados a las medidas de control (Kettunen et al., 2008). En España, los costes del manejo de las plantas invasoras se estiman en más de 50,5 millones de euros durante un periodo de 10 años, incluyendo su erradicación, control y tratamiento.

Una especie introducida solo se puede establecer en el nuevo entorno si los individuos son capaces de reproducirse a un ritmo mayor del que mueren, un escenario indispensable para que la población aumente su número. Esto depende a su vez de que el organismo encuentre un nicho ecológico adecuado en el nuevo entorno, es decir, condiciones climáticas que el organismo pueda tolerar, recursos que no estén monopolizados por las especies nativas, y una presión de enemigos que no sea muy intensa. Muchas especies invasoras aprovechan ambientes perturbados por las actividades humanas. El éxito de estas puede deberse a diversas razones (Hierro et al., 2005) como que exista cierta similitud entre los ambientes de origen e introducción, que el ambiente de introducción sea poco exigente, o que las especies exóticas tengan un nicho ecológico amplio. Pero, además, otra estrategia de las especies invasoras es el uso de mecanismos de competencia tales como la alelopatía y/o la producción de compuestos fitotóxicos o antimicrobianos que podrían desplazar a la flora y microflora nativa (Hierro y Callaway, 2003).

En los últimos años, se ha investigado sobre la presencia y naturaleza de los compuestos bioactivos en diferentes especies invasoras en distintas zonas del mundo (Cohrane, 1999; Dana et al., 2010; Khan y Yadav, 2011; Máximo et al., 2020; Singh et al., 2021), apuntando al potencial que presentan como fuente de nuevos compuestos antifúngicos o antibacterianos.

Microorganismos patógenos y oportunistas.

Las bacterias son microorganismos procariotas que se reproducen por fisión binaria. Son los organismos más abundantes del planeta, encontrándose en todos los hábitats terrestres y acuáticos. Así, en este reino, diferenciamos el grupo de las eubacterias y el de las arqueobacterias. Este último comprende bacterias sin peptidoglicanos, viviendo estas en el mar, en las aguas saladas y en las fuentes ácidas. Las eubacterias, en cambio, viven en el suelo, el

agua y los organismos vivos, encontrándose entre estas las bacterias de interés médico, las bacterias verdes fotosintetizadoras, cianobacterias, etc. Las bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano. El tamaño de las bacterias oscila entre las 0,5 y 3 μm , pudiendo llegar algunos tipos a 10 μm (Prescott et al., 1999).

Según la composición de su pared celular, las bacterias pueden clasificarse en gram-negativas y gram-positivas, estando formada la pared celular de estas últimas principalmente por peptidoglicano, lo que hace que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram. En cambio, en la pared celular de las gram-negativas, podemos observar tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una ligera capa de peptidoglicano y la membrana externa (Prescott et al., 1999). Una bacteria gram-positiva, en condiciones normales, puede dividirse cada 20-30 minutos, en cambio, una gram-negativa, puede dividirse cada 15-20 minutos.

Algunas de las especies de bacterias más significativas son:

Escherichia coli, se trata de un bacilo gran-negativo, anaerobio facultativo, que coloniza el intestino del ser humano pocas horas después de su nacimiento, considerándose de flora normal, sin embargo, hay diversas cepas de *E. coli* que pueden ser patógenas, causando diarrea, náuseas, vómitos, o infecciones, transmitiéndose a través de alimentos o agua contaminada. (Rodríguez, 2002). Debido a su velocidad de crecimiento y a sus escasos requerimientos nutricionales, se trata de un organismo muy utilizado en laboratorio.

Staphylococcus epidermidis, es una bacteria gram-positiva que se encuentra en la piel de manera natural, sin causar daño al organismo. Se considera un agente oportunista, a que puede llegar a causar enfermedades cuando el sistema inmunológico está debilitado (Lemos, 2020).

Micrococcus luteus, se trata de una bacteria gram-positiva, aerobia obligada (ya que necesita oxígeno para vivir), saprófita, que puede ser encontrada en la tierra, polvo, agua y aire. Además, forma parte de la microbiota bacteriana de la piel de los mamíferos. Sin embargo, estas pueden causar diferentes patologías, como endocarditis, infecciones pulmonares, o artritis séptica.

Los hongos son organismos filamentosos en su mayoría, eucariotas y heterótrofos, necesitando obtener los compuestos carbonados de otras fuentes. La gran mayoría son aerobios estrictos, ya que necesitan del oxígeno libre como aceptor de electrones para su crecimiento. La pared celular de estos organismos está constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y lípidos. El polisacárido característico es la quitina. Respecto a la forma de vida de los hongos, la mayoría son saprófitos, es decir, se alimentan de materia orgánica muerta. Otros pueden realizar asociaciones simbióticas de varios tipos con otros organismos y pueden ser mutualistas cuando el resultado de la asociación es benéfico para los organismos que intervienen en ella. Cuando se establece un tipo de relación en la cual el único beneficiado es el hongo en detrimento de su hospedero, se denominan parásitos. Su distribución es cosmopolita, encontrándose en el suelo, en el agua, en madera viva o en descomposición, restos vegetales, excrementos y otros (Cepero et al., 2012). Se denominan hongos oportunistas a los hongos que normalmente no son patógenos, pero que pueden producir una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas (Asencio et al., 2021).

Algunas especies fúngicas de interés por ser fitopatógenos son:

Alternaria sp, importante patógeno y saprófita oportunista en plantas y postcosecha. Además, puede causar reacciones alérgicas y problemas respiratorios en humanos por inhalación.

Botrytis cinerea, es un hongo ascomiceto fitopatógeno que infecta una amplia variedad de plantas y que puede hacer uso de diferentes mecanismos de infección. Se trata del agente causal de la “podredumbre gris” e infecta más de 200 especies vegetales distintas (Benito et al., 2000). Puede darse en flores y frutos al final de la floración o en la maduración del fruto.

Phytophthora citrophthora se trata de un hongo oomiceto y se conoce como podredumbre parda de los cítricos. Se desarrollan principalmente en el suelo, manteniéndose en forma de micelio e infectando a las raíces mediante estructura de supervivencia como las clamidosporas y oosporas (Vicent y Tuset, 2013).

Fusarium sp. Pertenece a un grupo de hongos oportunistas y filamentosos ampliamente distribuidos en suelo y plantas. En vegetales, coloniza las partes aéreas y subterráneas, provocando enfermedades que se manifiestan en forma de podredumbres y marchitamientos.

Justificación y objetivos

La forma principal de controlar a los microorganismos patógenos de las plantas es mediante el uso de diferentes pesticidas y biocidas. La problemática aparece con los elevados costes, riesgos de seguridad y, principalmente, con el desarrollo de resistencias de bacterias y hongos frente a estos biocidas y pesticidas. Además, el uso extensivo de productos químicos supone un incremento de la contaminación por la acumulación de residuos en el medio ambiente.

Se conoce desde hace tiempo que las plantas poseen una fuente potencial de compuestos químicos, conocidos como fitoquímicos con una potente eficacia antifúngica y antibacteriana. La conciencia pública de los factores comentados ha aumentado el interés por encontrar alternativas más seguras que sustituyan a los agroquímicos sintéticos, provocando un creciente interés en la investigación del posible uso de biocidas y pesticidas naturales derivados de las plantas, como los extractos de plantas, que sean más ecológicos para el control de enfermedades. Sin embargo, la selección de especies candidatas para este fin debe realizarse cuidadosamente, para evitar daños colaterales en la biodiversidad por el uso de especies escasas, amenazadas o de difícil cultivo.

En relación con este tema, el éxito de la habitabilidad de las especies invasoras ha provocado un interés intenso por estudiar los mecanismos de su éxito. El carácter prolífico y el éxito de la invasión en nuevos hábitats sugieren que las especies invasoras están dotadas de una bioquímica que repele especies autóctonas, debido a la producción de toxinas o compuestos alelopáticos que pueden inhibir el crecimiento no solo de plantas competidoras, sino también de hongos y bacterias. Además, otra de las ventajas de utilizar plantas invasoras como fuente de pesticidas y biocidas naturales es su abundancia en ciertas zonas y su gran producción de biomasa, lo que da lugar a una gran disponibilidad de material vegetal que usualmente requiere de su eliminación. En este aspecto, las especies invasoras podrían ser una fuente potencial de nuevos compuestos activos antimicrobianos y antifúngicos.

Con estos precedentes, en este estudio se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo principal: evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas invasoras.

Objetivos específicos:

- Objetivo preliminar: seleccionar y localizar las especies invasoras objeto de estudio.

- 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

Durante los meses de febrero-mayo y coincidiendo con el periodo de desarrollo vegetativo, se realizaron varias salidas de campo para localizar las especies invasoras. Para este trabajo se seleccionaron las especies que se describen a continuación y en la tabla 1, basándonos en la información contenida en Sanz-Elorza et al., (2004) su disponibilidad en campo.

Acacia farnesiana (L.) Willd. (Figura 1).

Se trata de un fanerófito que puede llegar a vivir varias décadas. Posee un crecimiento inicial rápido y puede alcanzar hasta 1 m de altura durante su primer año, creciendo solamente la mitad si las condiciones son áridas. Fructifica a partir del tercer año o incluso más tarde, dependiendo de las condiciones ambientales, sobre todo en verano. Se reproduce por semillas, y estas se dispersan de forma abiótica. Es resistente a condiciones áridas, fuerte viento e insolación, debido a su capacidad de comportarse como si se tratara de una caducifolia durante la estación seca. Tolerancia a la proximidad al mar, suelos calcáreos y aguas ligeramente salobres. No posee prácticamente exigencias edáficas y necesita de plena exposición solar.

La fecha de introducción en España no se conoce con exactitud, pero probablemente tuvo lugar en el siglo XIX y XX, de forma ornamental y forrajera de uso limitado.

Sobre el hábitat, provoca alteraciones geomorfológicas, además de dificultar o impedir el crecimiento de otras plantas, alterando así la estructura de la vegetación. Además, puede afectar a la abundancia relativa de especies nativas o endémicas. Se expande y crece muy rápidamente, y si forma masas compactas próximas a cursos de agua, puede limitar el acceso a algunas zonas (Sanz-Elorza et al., 2004).

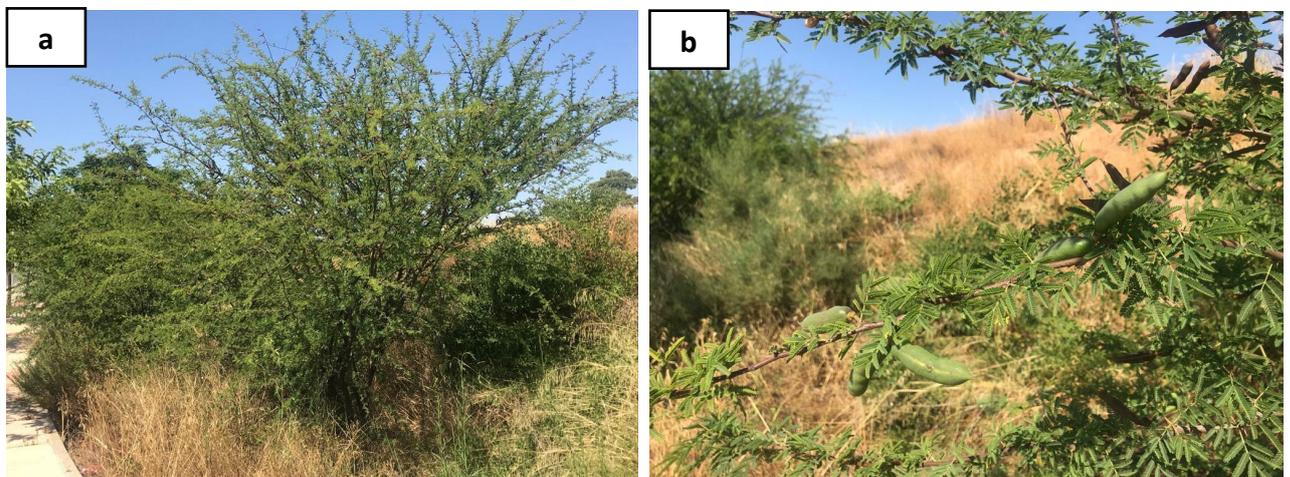


Figura 1. *Acacia farnesiana*. Aspecto del árbol (a) y detalles de frutos y hojas (b). Fuente propia.

Caesalpinia gilliesii Wall. Ex Hook. (Figura 2)

Arbusto de hasta 1,5 m de altura, pudiendo llegar hasta 3-5 m o incluso más. El tronco es a menudo ramificado desde la base. Hojas bipinnadas de hasta 20 x 15 cm, con 6-12 pares de pinnas provistas de numerosos pequeños folíolos elípticos de 3-4 x 2 mm, densamente dispuestos y de color verde mate. Parcialmente caducifolia en invierno. Las flores aparecen en primavera en racimos piramidales erectos de 5-15 cm, de color amarillo y llamativas por sus 10 largos estambres rojos. Fruto en legumbre indehisciente, marrones y duras cuando maduran, algo aplanadas y ligeramente falcadas, de 6-8 x 1,5-2 cm y color amarillento por fuera con pubescencia un poco viscosa, y con las semillas bien marcadas. Contiene de 4 a 8 semillas.

Esta especie es endémica de Argentina y fue introducida en España como especie ornamental.



Figura 2. *Caesalpinia gilliesii*. Aspecto del árbol (a) y detalles de frutos, hojas y flor (b). Fuente propia.

Carpobrotus edulis (L.) N.E.Br. (Figura 3)

Cametófito suculento y reptante, pluriacaule, con los tallos de hasta 2 m, radicales, semiamplexicaules, erectas o erecto-patentes, oblongas, subfalcadas o rectas, de sección transversal, verdes, ligeramente adnatas en la base. Flores de 8-10 cm de diámetro, de color amarillo o rosado con cinco tépalos. Androceo con numerosos estambres al principio erectos y después convergentes hacia los estigmas, con los filamentos amarillentos. Estigmas sésiles, radiales, subulados, plumosos. Fruto carnoso, drupáceo, indehisciente, subgloboso. Semillas grandes, obovoides, ligeramente comprimidas, rodeadas de mucílago. Florece de marzo a junio. Fecundación alógama y entomófila. Se reproduce activamente por estolones que enraízan fácilmente en los nudos. Soporta bien la sequía, la salinidad y los substratos arenosos

La vía de introducción en España es desconocida. Se citó por primera vez en Galicia en el año 1900. Se ha utilizado como planta ornamental y fijadora de suelos en zonas costeras. A partir de estos cultivos se ha naturalizado ampliamente en arenales, roquedos y acantilados costeros.

Produce un efecto de concentración y acumulación de sales en el suelo disminuyendo la disponibilidad de nutrientes y alterando el pH del sustrato. Dificulta la regeneración de especies nativas y facilita en desarrollo de otras especies invasoras (Sanz-Elorza et al., 2004).



Figura 3. *Carpobrotus edulis*. Aspecto de la planta (a) y hojas en detalle (b). Fuente propia.

Mirabilis jalapa L. (Figura 4)

Planta herbácea, perenne, con la raíz tuberosa, de hasta 1 m de altura, glabra o ligeramente pubescente. Tallos erectos, con ramificación di o tricotómica. Hojas ovadas, de 5-10 cm de longitud, acuminadas en el ápice y truncadas o subcortadas en la base. Inflorescencias minales. Flores de apertura nocturna, a partir del atardecer, olorosas. Perianto infundibuliforme, con un largo tubo de 25-35 mm. Androceo con 5 estambres cortamente exsertos. Fruto en aquenio de 6-9 mm, elipsoidal u ovoideo, acostillado o verrucoso. Florece de junio a septiembre. Es una especie termófila, con desarrollo primaveral y reproducción en verano y otoño. Habita en zonas perturbadas, como escombreras, bordes de jardines, ruinas, etc. Produce grandes cantidades de semilla con alto poder germinativo. Se reproduce también por vía vegetativa mediante la emisión de brotes de raíz. Tolera bien la sequía. En sus células acumula diversas sustancias, como triterpenos, flavonoides, alcaloides y esteroides, que inhiben el crecimiento de numerosos microorganismos.

Fue introducida en España a comienzos del siglo XVI por los conquistadores españoles.

Aunque no supone una amenaza para taxones autóctonos con interés geobotánico, su presencia genera una interferencia sobre el ecosistema nativo, por lo que debe plantearse la conveniencia de su eliminación en un contexto general en el que se trata de evitar la expansión de especies no nativas (Sanz-Elorza et al., 2004).

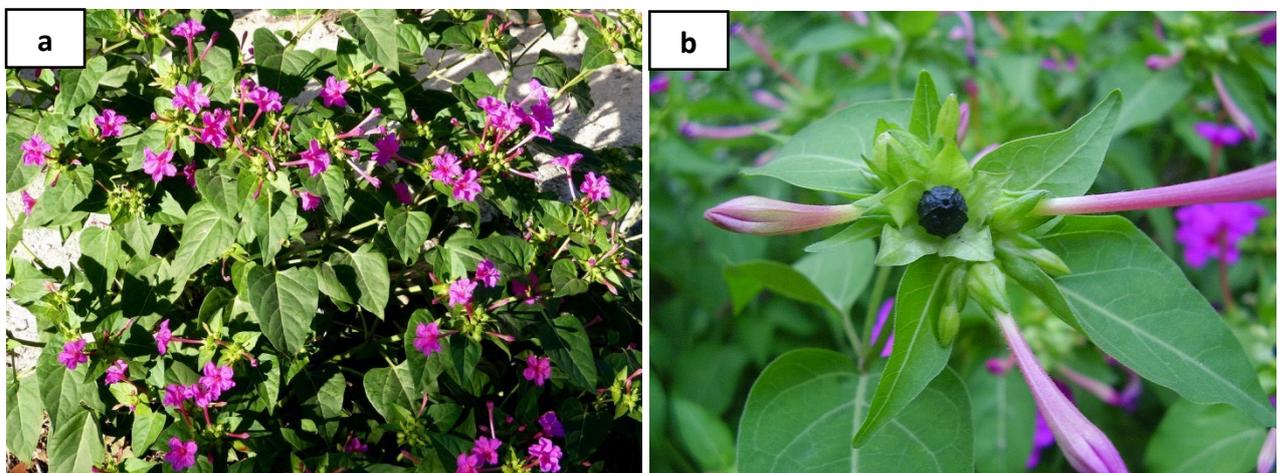


Figura 4. *Mirabilis jalapa*. Aspecto de la planta (a) y detalles de hojas (b). Fuente: *Mirabilis jalapa* (2022).

Recolección y preparación de material vegetal

Tabla 1. Plantas invasoras usadas para la elaboración de extractos.

Núm. registro	Nombre científico ^a	Nombre común	Familia ^a	Localidad/ Coordenadas ^b	Hábitat
1	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Espinillo blanco	Leguminosas	La Ñora, Murcia 37°59'28.1"N 1°11'16.2"W	Terreno abandonado
2	<i>Caesalpinia gilliesii</i> Wall. ex Hook.	Barba de chivo	Leguminosas	Matola, Elche 38°13'37"N 0°45'33"W	Jardín
3	<i>Carpobrotus edulis</i> (L.) N.E.Br.	Hierba de cuchillo	Aizoáceas	Guadalupe, Murcia 37°59'34.0"N 1°11'13.6"W	Jardín
4	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Dondiego de noche	Nictagináceas	Guadalupe, Murcia 37°58'52.2"N 1°10'56.4"W	Borde de camino

(a) Asignación taxonómica según International Plant Names Index (IPNI, 2022)

(b) Localización y coordenadas según Google Maps

Una vez localizadas las ubicaciones con las especies invasoras (tabla 1), se seleccionaron individuos adultos y sanos de cada especie, y se obtuvieron hojas de tres partes de cada planta (zona basal, media y superior), que posteriormente se mezclaron para formar una muestra compuesta que se guardó en bolsas de papel rotuladas. A cada especie vegetal se le asignó un número de registro para facilitar el trabajo de laboratorio, utilizando este registro en todos los ensayos y en la presente memoria.

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

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

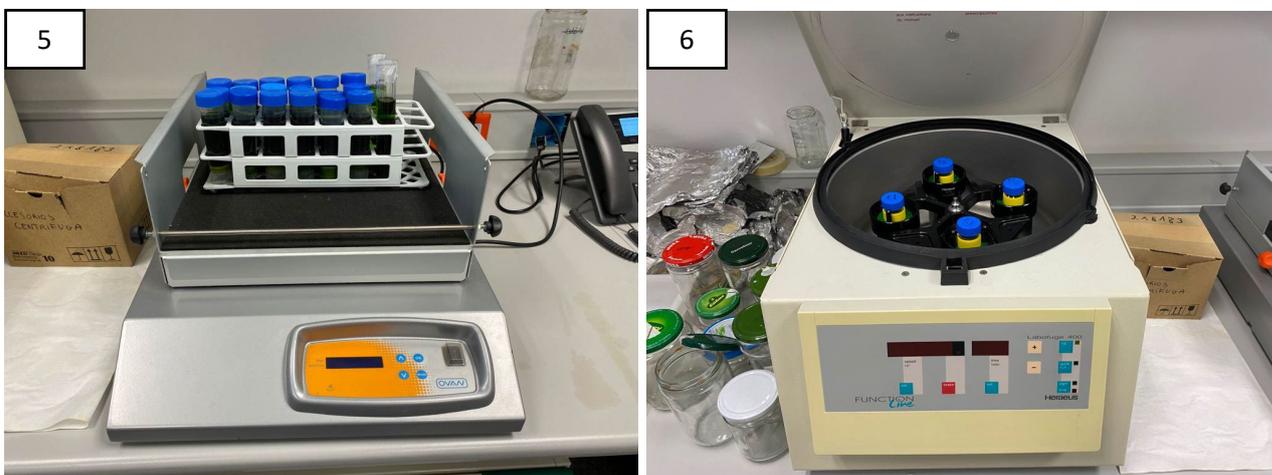
Preparación de los extractos vegetales.

Como solventes para obtener los extractos se usó Acetona de la marca TQCHEM, con un 99,5 % de riqueza, Etanol + cloruro de Benzalconio (en adelante Clor), marca CIDAS al 96 %, Etanol Applichem PANREAC con un 96 % de pureza, y Metanol Applichem PANREAC para UHPLC al 99,9 %.

El extractante se añadió una vez la planta estuvo triturada, a una concentración 1:10 (4 gramos de planta + 40 ml de extractante) en tubos de plástico tipo falcon de 50 cc de capacidad. Estos

tubos se taparon y fueron colocados en una gradilla, la cual se cubrió con papel de aluminio, y se colocaron en un agitador marca OVAN[®] (Figura 5) durante 24 h a 110 rpm.

A continuación, se utilizó la centrífuga Heraeus modelo Labofuge 400 (Figura 6) para centrifugar los extractos durante 10 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se decantó a otros tubos limpios y previamente pesados.



Figuras 5 y 6. Agitador de movimiento marca OVAN (5) y Centrífuga Heraeus modelo Labofuge 400 (6). Fuente propia.

Para eliminar el extractante, se dispusieron en campana extractora a temperatura ambiente bajo flujo de aire hasta su evaporación. Una vez finalizado el proceso de evaporación, se pesaron de nuevo los extractos y se calculó el peso del extracto seco por diferencia entre el peso inicial y el peso final.

Con los datos obtenidos, se obtuvo el rendimiento de la extracción, según la fórmula:

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

Los extractos fueron reconstruidos con el solvente original, es decir etanol + Clor, acetona y etanol puro, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO marca SIGMA-ALDRICH, pureza 99%) para los extractos en metanol, preparando una solución *stock* a 50 mg/ml que se conservó a 4°C hasta su uso.

Medios de cultivo utilizados

- AN marca CONDA[®] (por las siglas de Agar nutritivo)

El AN se utilizó como medio de cultivo para las bacterias (mantenimiento de cepas y ensayos).

Como indican las instrucciones del fabricante, se añaden 23 g de medio de cultivo a 1 litro de agua destilada. Mediante un agitador magnético, se mezclan hasta su completa disolución. Los frascos se autoclavan a 120°C durante 20 minutos para su correcta esterilización.

- PDA marca CONDA[®] (por las siglas en inglés de Potato Dextrosa Agar)

Se utilizó este medio de cultivo para el cultivo de los hongos (mantenimiento de cepas y ensayos).

Se añadieron 39 g de PDA en un litro de agua destilada, y se mezcló mediante un agitador magnético hasta su total disolución. A continuación, se esterilizó, llenando frascos de vidrio que se autoclavarón a 120^o durante 20 minutos.

En ambos casos, una vez autoclavado, se dejó enfriar el medio a una temperatura de 45^o C. Por último, se llenaron las placas de Petri de 9 cm de diámetro en la cabina de flujo laminar.

Aislamiento y cultivo de los microorganismos utilizados

Tabla 2. Hongos empleados como organismos diana en los ensayos del estudio

Hongos	Procedencia	Características
<i>Alternaria sp.</i> UMH 18007	Fruto 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>Phytophthora citrophthora</i> CETC2353	Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia	Parásito vascular
<i>Fusarium sp.</i>	Colección del CEBAS-CSIC, Murcia, Dr. J.A. Pascual	Parásito vascular

Tabla 3. Bacterias utilizadas como organismos diana 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

Hongos

Se utilizaron especies de hongos que fueran patógenas de vegetales o, en todo caso, saprófitos oportunistas que suelen provocar daños en diversos alimentos, tal como se ha comentado en la introducción (página 6 y 7), pero de nula patogenicidad para los humanos. Las cepas fúngicas se aislaron de alimentos de origen vegetal deteriorados y con signos de colonización fúngica. Se sembraron pequeños fragmentos de hifas con ayuda de asas de siembra en placas Petri con PDA. A continuación, se incubaron en oscuridad unos 3-5 días, y se reaislaron y pasaron a medio fresco (4^oC). En cambio, en cuanto a los hongos patógenos vasculares se obtuvieron de colecciones de cultivo. Se han utilizado los hongos *Fusarium sp.*, el cual fue proporcionado por el Dr. J.A. Pascual a partir de la colección de cultivos del CEBAS-CSIC, Murcia y *Phytophthora citrophthora*, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia. (Tabla 2)

Bacterias

Se utilizaron cepas no patogénicas de colección, utilizadas en docencia y testadas en experimentos similares (Valera, R.com.pers.), proporcionadas por el Área de Microbiología de la UMH. (Tabla 3).

A partir del material proporcionado, las cepas se conservaron a 4°C en medio de cultivo agar nutritivo, repicándose a medio fresco periódicamente.

ENSAYOS

Determinación de la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en disco

El propósito de este ensayo es medir la posible formación de un halo de inhibición del crecimiento de bacterias debido a los extractos elaborados, los cuales se impregnan en un disco colocado sobre el medio de cultivo. Se utilizó la técnica de difusión en disco o método de Kirby-Bauer (Bauer, 1996), según el protocolo M02-A12 descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2015).

Se evaluaron los 4 extractos de plantas (*Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii*, *Carpobrotus edulis*, y *Mirabilis jalapa*) con 4 extractantes (acetona, metanol, etanol con cloruro belzanconio y etanol puro) frente a 3 bacterias (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*).

Como controles negativos se utilizó etanol + Clor, etanol puro, acetona y DMSO, y como controles positivos Ampicilina, Amoxicilina y Cloranfenicol. Se establecieron 3 repeticiones por tratamiento.

El proceso se realiza con todo el material esterilizado previamente (discos 6 mm de diámetro, agua, puntas de pipeta, hisopos, placas Petri vacías y placas con medio AN, pinzas, etc.) y en condiciones estériles en la cabina de flujo descendente.

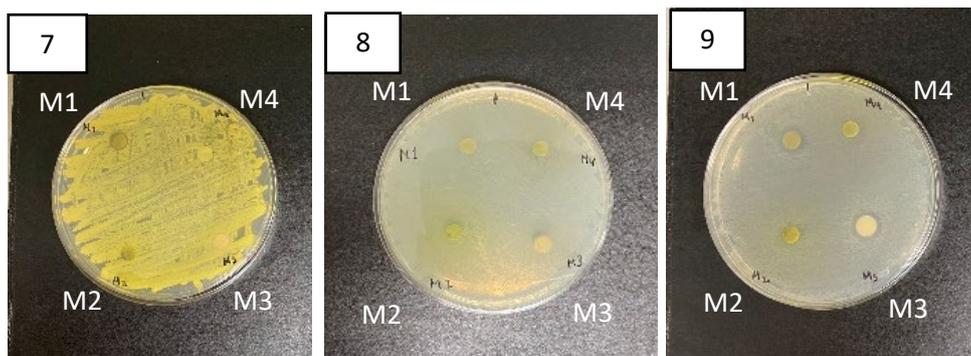
Para preparar los inóculos, se tomó una porción de la placa Petri con un cultivo *stock* de la bacteria con ayuda de un asa de Kolle, pasándolo a continuación a un tubo estéril con 5 ml de agua destilada. Durante unos 10-15 segundos, se agitó con un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax y se ajusta la turbidez en un densitómetro Biosan DEN-1 a 0,5 unidades McFarland, añadiendo agua destilada o cultivo de la bacteria, correspondiendo a un inóculo de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias. Se prepararon los inóculos justamente antes de su uso. Para inocular las placas Petri, se impregnó un hisopo estéril en el inóculo, se eliminó el exceso contra la pared del tubo y se sembró cada placa en césped en tres direcciones, dejándolas secar a continuación durante unos minutos.

Los extractos de los diferentes tratamientos se aplicaron sobre discos de papel Whatman, tipo AA, de 6 mm de diámetro a razón de 25 µl por disco. Además, se impregnaron discos con 25 µl de los extractantes etanol + Clor, etanol, acetona y DMSO.

Se utilizaron discos estériles de BioRAD[®] precargados con 10 µg de Ampicilina, 25 µg de Amoxicilina y 30 µg de Cloranfenicol para los controles positivos.

Los discos se colocaron sobre las placas ya inoculadas mediante pinzas estériles a razón de 4 discos por placa de forma equidistante, y se rotularon con los distintos tratamientos.

Tras un choque de frío durante 2 horas, con el fin de favorecer la difusión de los compuestos, estas placas se incubaron en una estufa a 37°C y al cabo de 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 7, 8 y 9. Cultivos de *Micrococcus luteus* (7) *Escherichia coli* (8) y *Staphylococcus epidermidis* (9), sembrados en césped y con los discos colocados. Fuente: Elaboración propia.

Determinación de la actividad antifúngica mediante la técnica de difusión en disco

El propósito de este ensayo es observar y medir la posible formación de una zona de inhibición en el crecimiento de los hongos bajo la acción de los diferentes extractos elaborados, impregnados sobre un disco colocado sobre el medio de cultivo. Al igual que en el ensayo anterior, se utilizó la técnica de difusión en disco o método de Kirby-Bauer (Bauer, 1996), adaptada en este caso para hongos filamentosos según el protocolo M51-A descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010).

Se evaluaron los 4 extractos de plantas (*Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii*, *Carpobrotus edulis*, y *Mirabilis jalapa*) con 4 extractantes (etanol + Clor, acetona, metanol y etanol puro), frente a 3 hongos (*Phytophthora citrophthora*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria*).

En cuanto a los controles, se utilizó nistatina como control positivo, y etanol + Clor acetona, DMSO y etanol puro como controles negativos. Se dispusieron 3 repeticiones por tratamiento.

El proceso se realiza con todo el material esterilizado (discos de 6 mm de diámetro, agua, puntas de pipeta, placas Petri vacías y placas con medio PDA, pinzas, hisopos, pinzas, bisturís, etc), en condiciones estériles en la cabina de flujo descendente. Tanto los extractos como los controles negativos se esterilizaron por filtración.

Para la preparación de los inóculos, se siguió el protocolo M38 A del CLSI (Cantón et al., 2007) para hongos filamentosos, modificado. Para ellos, se utilizan cultivos de 7 días crecidos a una temperatura de unos 25°C. Con la ayuda de un asa de Kolle, se toman pequeñas muestras del cultivo del hongo y se introdujeron en un tubo de cristal con 5 ml de agua estéril, el cual se agitó

durante unos 10-15 segundos en un agitador tipo vortex marca Heidolph Reax, y posteriormente se ajustó la turbidez en un densímetro Biosan DEN-1 a 0,5 unidades McFarland. 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.

Previamente a la siembra, se organizaron las placas en tandas de 12 y se rotularon. Para realizar la siembra, se impregnó un hisopo estéril en el inóculo previamente preparado, eliminando el exceso contra la pared del tubo. A continuación, se inoculó cada placa en tres direcciones, y se dejaron abiertas durante unos minutos para dejarlas secar.

Se utilizaron filtros de papel Whatman tipo AA, de 6 mm de diámetro para aplicar los extractos de los diferentes tratamientos y de los controles negativos etanol + Clor, etanol, acetona y DMSO. a razón de 25 μ l por disco. Además, se usaron discos de 6,5 mm de diámetro estériles impregnados con 100 IU de producto, de la marca Biorad[®], para el control con nistatina.

Con pinzas estériles, se colocaron los discos (4 por placa de forma equidistante) en la superficie del medio de cultivo.

Una vez sembradas las placas y colocados los discos, se sometieron a un choque de frío durante 1-2 horas para favorecer la difusión de los compuestos. Posteriormente se incubaron las placas en oscuridad, a unos 28°C, realizando observaciones sobre distintos fondos (negro y blanco), y a los tres días se realizó la medida de las zonas de inhibición con una regla milimetrada.

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

En este ensayo se evaluó la capacidad antifúngica de los extractos vegetales sobre el crecimiento de micelio fúngico mediante contacto directo.

Se evaluaron los extractos de 4 plantas (*Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii*, *Carpobrotus edulis*, y *Mirabilis jalapa*) con 4 extractantes (etanol+ Clor, acetona, metanol y etanol puro), frente a 3 hongos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. y *Phytophthora citrophthora*).

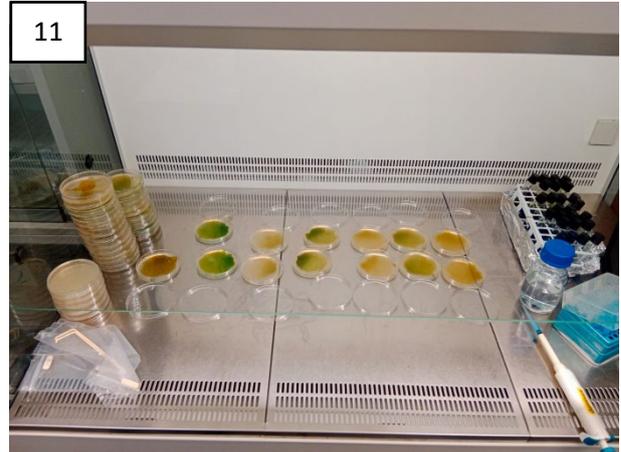
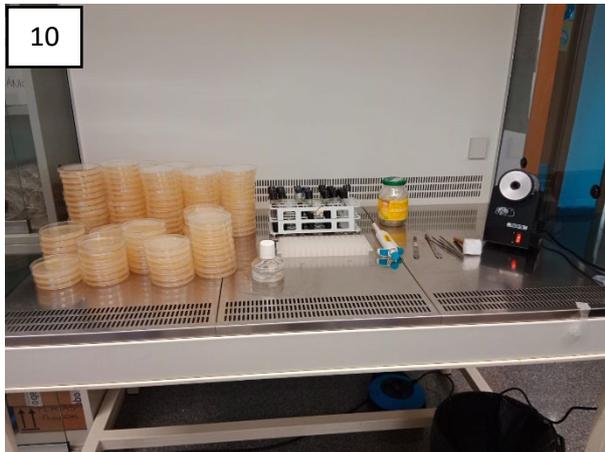
Como controles negativos, se utilizó etanol + Clor, acetona, DMSO y etanol puro, como control positivo, se utilizó el hongo sembrado en la placa sin ningún tipo de aditivo. El ensayo se realizó por duplicado.

Se prepararon placas de Petri con medio PDA. En cada una de las placas de Petri se añadieron 600 μ l de los extractos correspondientes o de los controles, extendiéndolos desde el centro de la placa hacia los bordes con ayuda de un asa de Drigalski.

Las placas se dejaron abiertas hasta que se secaron los extractos, y a continuación, se colocó una porción de cada hongo de 8 mm de diámetro, obtenido de un cultivo de mínimo 7 días, gracias a un sacabocados y un bisturí. Una vez colocadas las porciones de hongo, se cerraron las placas.

El ensayo se realizó en condiciones estériles en una cabina de flujo descendente (Figuras 10 y 11).

Posteriormente, se incubaron en oscuridad a 28°C y se evaluó el crecimiento con una regla milimetrada cada 2-3 días sobre un fondo claro y otro fondo oscuro, hasta que la colonia alcanzó su tamaño máximo.



Figuras 10 y 11. Disposición del material en la cabina de flujo descendente (11), y placas Petri con extracto y hongo sembrado (12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos

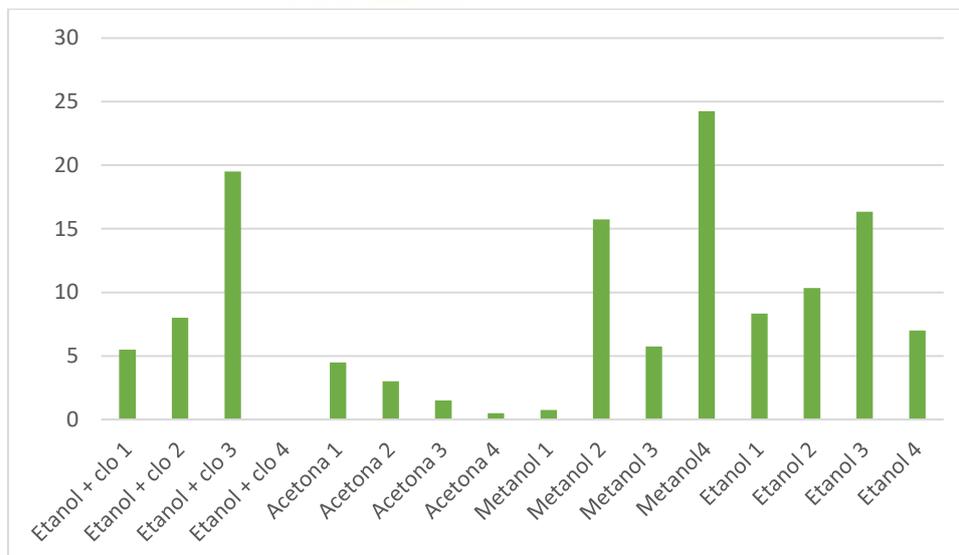


Figura 12. Rendimiento de los extractos obtenidos, expresado en porcentaje respecto del material original. La especie vegetal se corresponde con el número: 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*.

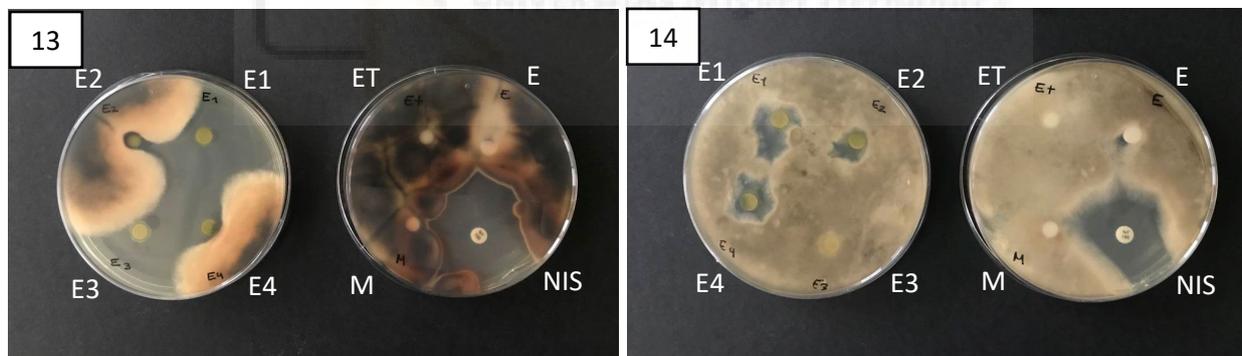
Los rendimientos obtenidos abarcan un rango de entre 1 a 25 %, según la especie vegetal y el solvente utilizado. Estos datos están dentro de los valores de cosecha de extracto obtenidos por Mdee et al. (2009), Díaz et al. (2011), Mostafa et al. (2018).

Como se observa en la figura 12, el metanol es el solvente que ha producido los mayores rendimientos, lo que coincide con datos previos de experimentos realizados en similares condiciones (García, 2019; Pérez, 2019). De hecho, a pesar de su toxicidad, el metanol es uno de los extractantes más utilizados para hacer extractos vegetales debido a su gran eficiencia para extraer metabolitos como fenoles y flavonoides (Kothari et al., 2012). Dicha toxicidad puede solventarse con el uso de compuestos como dimetilsulfóxido para diluir los extractos

También se obtuvieron rendimientos altos con etanol (tanto puro como con cloruro de benzalconio) en *Carpobrotus edulis*, lo cual era esperable debido a la biomasa producida por esta especie.

Actividad antifúngica de los extractos de plantas

Analizando los resultados obtenidos (Figuras 13 y 14 y tabla 4), se observa que *Alternaria* presentó inhibición por parte de todos los extractos. En cuanto a *Botrytis cinerea*, tuvo lugar inhibición con todos los extractos exceptuando los extractos de acetona, y en el extracto de *Mirabilis jalapa* de metanol. *Phytophthora* no creció de forma homogénea, incluso en algunos casos no presentó crecimiento, por lo que los datos no son válidos. Esto puede atribuirse a alguna deficiencia en la preparación del inóculo, lo cual parece ser uno de los problemas habituales de este tipo de ensayos con hongos filamentosos (Cantón et al., 2007).



Figuras 13 y 14. Cultivos de *Alternaria sp.* (13) y *Botrytis cinerea* (14) con extractos de etanol con cloruro de benzalconio y controles.

Tabla 4. Diámetro de inhibición a las 72 horas del inicio del cultivo. Los datos son la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. La letra de los extractos corresponde con el extractante utilizado: etanol con cloruro de benzalconio (E + Clor), acetona (A), metanol (M) y etanol puro (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 1-*Acacia farnesiana*, 2-*Caesalpinia gilliesii*, 3-*Carpobrotus edulis*, 4-*Mirabilis jalapa*.

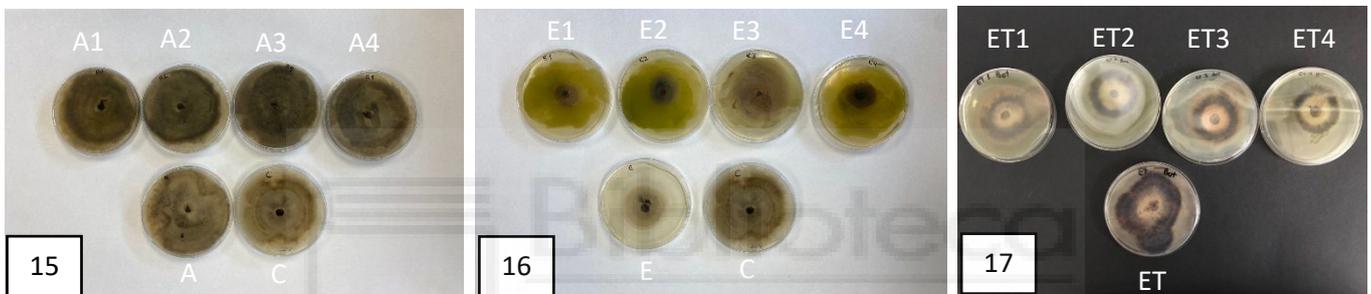
Planta	Num regist	Extractante	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora</i>
<i>Acacia farnesiana</i>	1	Etanol+clor	2,3 \pm 1,53	0,96 \pm 0,90	-
		Acetona	2 \pm 1,80	0 \pm 0	-
		Metanol	0,83 \pm 0,76	0 \pm 0	-
		Etanol	0,93 \pm 0,81	0,63 \pm 0,55	-
<i>Caesalpinia gilliesii</i>	2	Etanol+clor	1,53 \pm 0,25	0,73 \pm 0,40	-
		Acetona	2,23 \pm 0,40	0 \pm 0	-
		Metanol	0,33 \pm 0,57	0 \pm 0	-
		Etanol	0,27 \pm 0,46	0,87 \pm 0,11	-
<i>Carpobrotus edulis</i>	3	Etanol+clor	2,83 \pm 1,01	0 \pm 0	-
		Acetona	2,5 \pm 0,5	0 \pm 0	-
		Metanol	0,37 \pm 0,63	1,37 \pm 0,056	-
		Etanol	0,7 \pm 0,88	1,13 \pm 0,21	-
<i>Mirabilis jalapa</i>	4	Etanol+clor	1,33 \pm 1,15	1,57 \pm 0,06	-
		Acetona	1,63 \pm 1,41	0 \pm 0	-
		Metanol	0,83 \pm 1,19	0 \pm 0	-
		Etanol	1,13 \pm 1,02	0,56 \pm 0,5	-
Control E+Clor			0 \pm 0	0 \pm 0	-
Control A			0 \pm 0	0 \pm 0	-
Control M			0 \pm 0	0 \pm 0	-
Control ET			0 \pm 0	0 \pm 0	-
NISTATINA			3,4 \pm 0	3,1 \pm 0	-

Los halos de inhibición de mayor tamaño en *Alternaria* aparecen con los extractos de etanol con cloruro de benzalconio, destacando especialmente los extractos de *Acacia farnesiana* y *Carpobrotus edulis* (2,3 y 2,83 cm respectivamente). Los halos de inhibición de los extractos de acetona también son de buen tamaño, siendo mayores en los extractos de *Carpobrotus*, *Caesalpinia gilliesii* y *Acacia farnesiana* (2,5, 2,23 y 2 cm). Es de resaltar que estos valores son próximos a los producidos por el control nistatina. Los halos formados por los extractos de metanol y de etanol puro son de menor tamaño, siendo los más pequeños los formados por los extractos de *Caesalpinia gilliesii* y *Carpobrotus* con metanol, con 0,33 y 0,37 cm de diámetro, y los formados por los extractos de *Caesalpinia gilliesii* y *Carpobrotus* con etanol puro, los fueron de 0,27 y 0,7 cm de diámetro. Los extractantes no produjeron zona de inhibición en ningún caso, mientras que el control nistatina produjo zonas de inhibición patentes, de algo más de 3 cm de diámetro, lo que valida el ensayo.

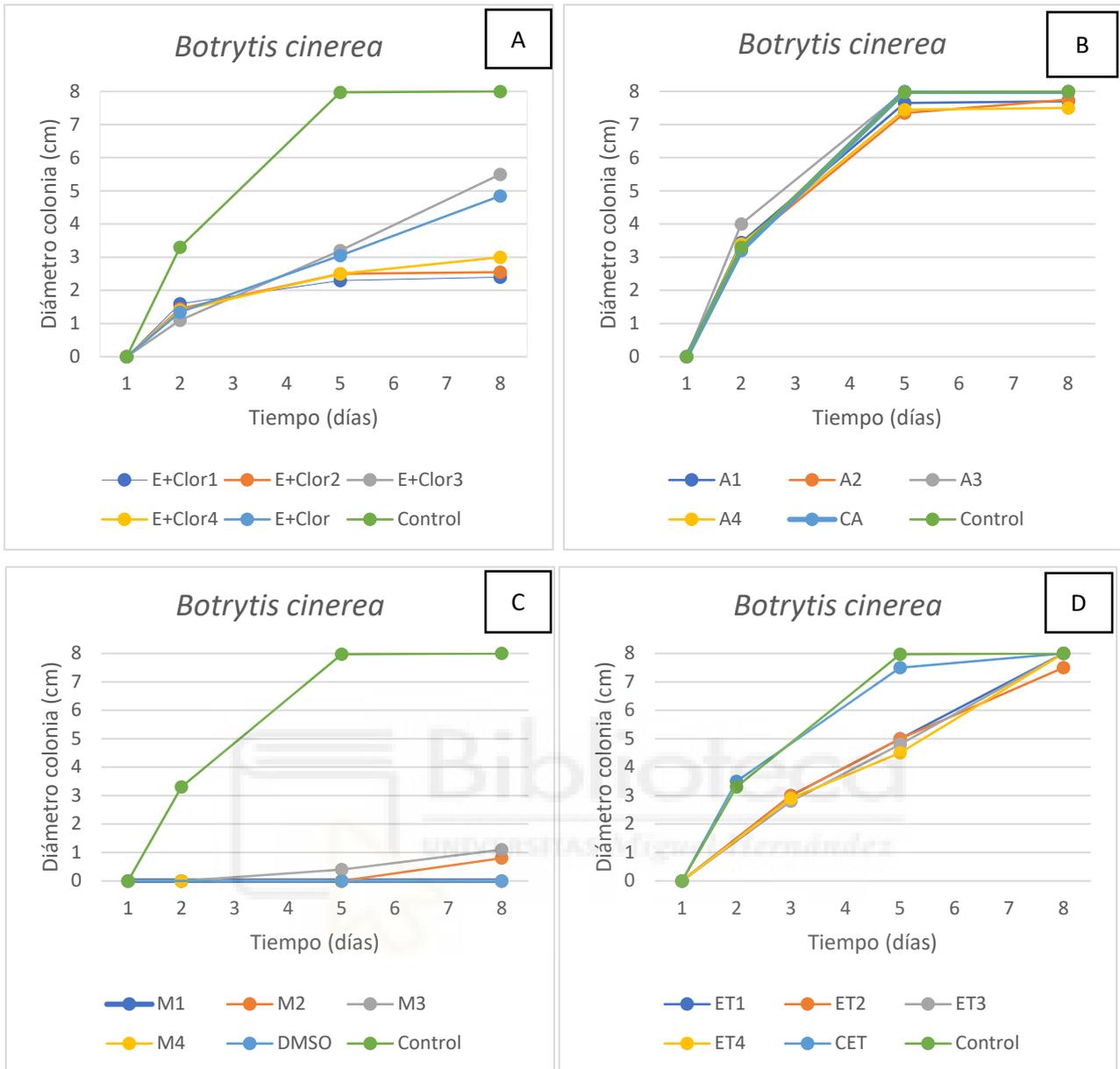
Si observamos los resultados obtenidos, parece que *Alternaria* es algo más sensible a los compuestos antimicrobianos presentes en las plantas que *Botrytis cinerea*, donde se observaron zonas de inhibición de menor tamaño

Inhibición del crecimiento del micelio por contacto directo con los extractos

Como se puede observar en las figuras 15-18, correspondientes al crecimiento de *Botrytis cinerea*, con los extractos de etanol + Clor se produjo una inhibición bastante clara por parte de *Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii* y *Mirabilis jalapa*; en cambio, no hubo inhibición con *Carpobrotus edulis*, donde se obtuvieron valores similares al del control de etanol + Clor. No podemos descartar cierta actividad inhibitoria de este extractante. En los extractos de acetona no hubo inhibición ninguna, prácticamente igualando todos los resultados al control. Con los extractos metanólicos, disueltos en DMSO, se obtuvo una inhibición completa del crecimiento del micelio. Por último, en los extractos de etanol puro, se produjo una pequeña inhibición al principio del crecimiento con todas las plantas.



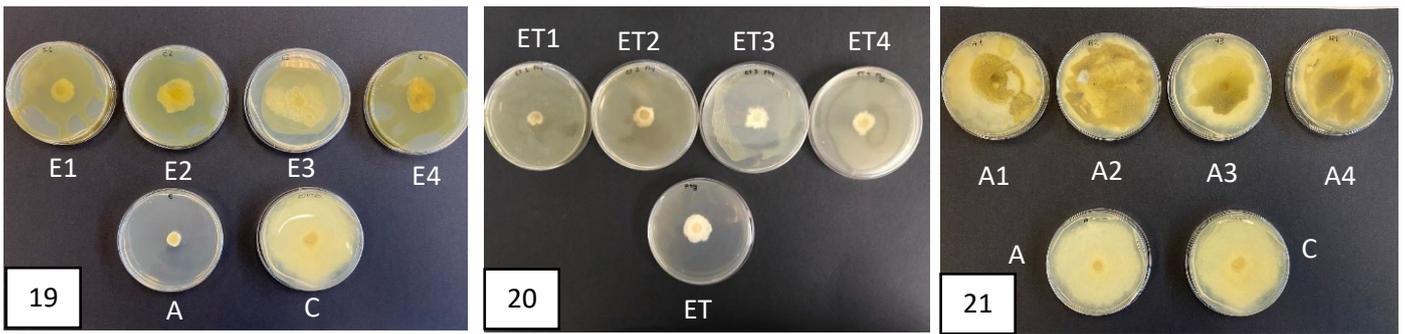
Figuras 15, 16 y 17. Crecimiento del micelio del hongo *Botrytis cinerea* con diferentes extractantes y extractos de plantas. A-acetona (15), E-etanol+clor (16) y Et-etanol puro (17). La especie vegetal se corresponde con el número: 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*, C-control sin extracto.



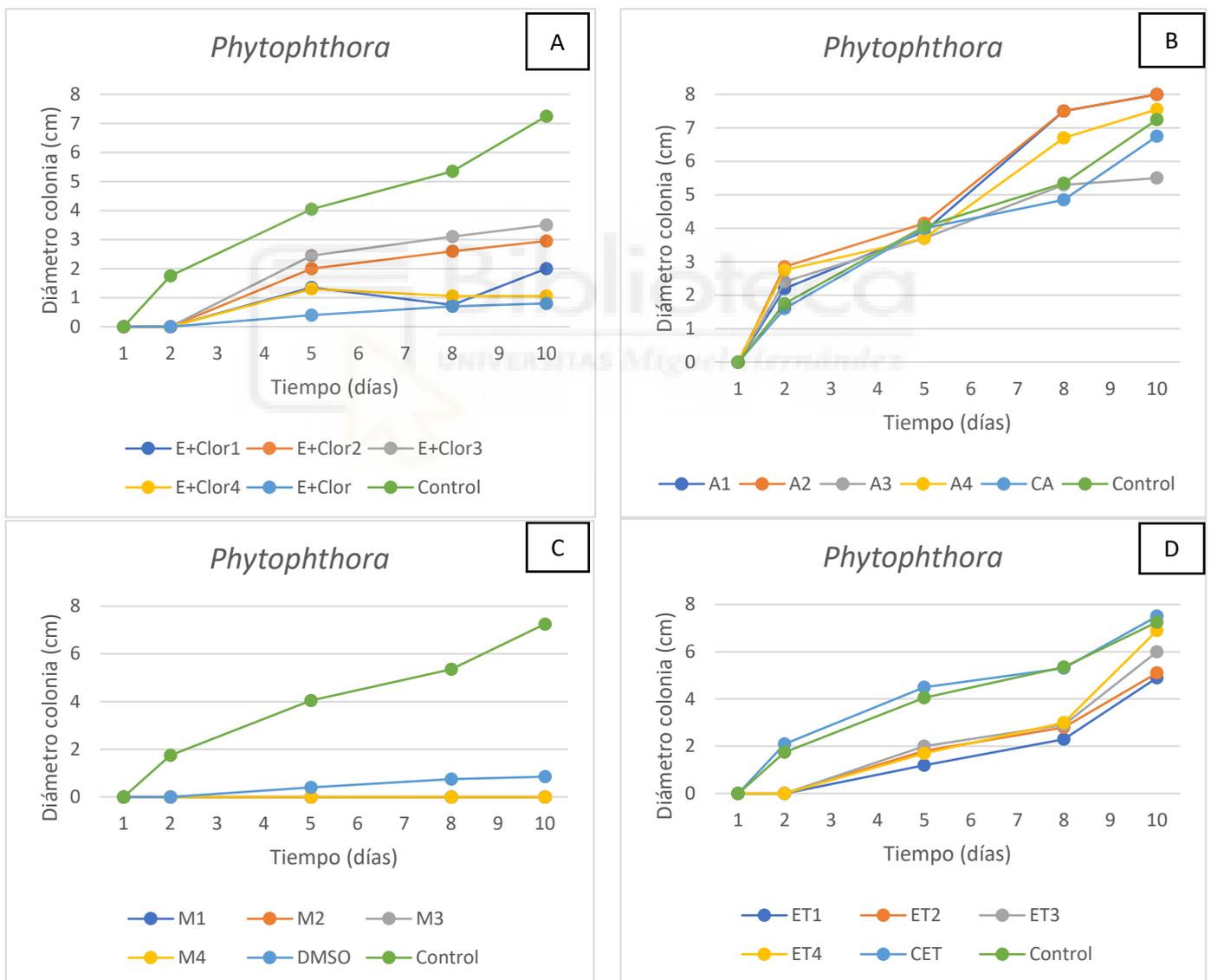
Figuras 18 A, B, C y D. Crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* en medio PDA con extractos de plantas a lo largo del tiempo. El extractante utilizado se corresponde con la letra: etanol con cloruro de benzalconio (E + Clor), acetona (A), metanol (M), etanol puro (ET). 1-*Acacia farnesiana*, 2-*Caesalpinia gilliesii*, 3-*Carpobrotus edulis*, 4-*Mirabilis jalapa*.

En cuanto a *Phytophthora citrophthora* (figuras 19-22) en los extractos con metanol no se observó crecimiento del micelio; sin embargo, en la placa control sin aditivo si se produjo crecimiento, por lo que la inhibición se puede atribuir al propio DMSO utilizado como solvente. El etanol + Clor parece que también inhibe el crecimiento de *Phytophthora*. En los extractos de acetona, el crecimiento de las colonias llega a igualar e incluso a superar al crecimiento de la placa control, siendo los extractos de *Acacia farnesiana* y *Carpobrotus edulis* los únicos con un crecimiento inferior al de la placa control.

Con los extractos etanólicos si se detectó inhibición del crecimiento, sobre todo con *Caesalpinia gilliesii* y *Acacia farnesiana*.



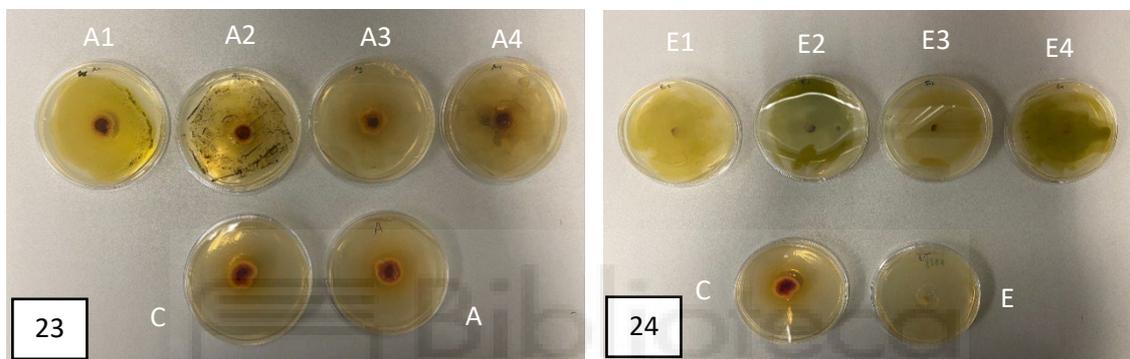
Figuras 19, 20 y 21. Crecimiento del hongo *Phytophthora citrophthora* en PDA con diferentes extractos de plantas y diferentes extractantes. E- Etanol+clor (19), ET- Etanol puro (20), A-Acetona (21). El número corresponde con la especie vegetal: 1-*Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*.



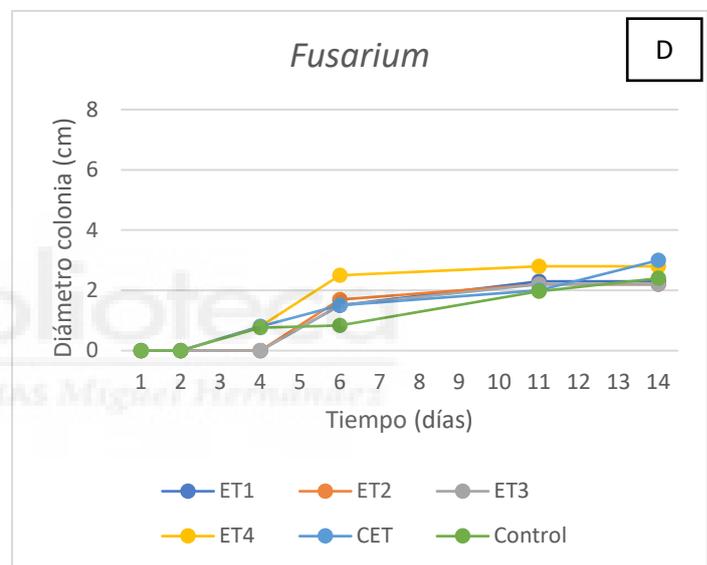
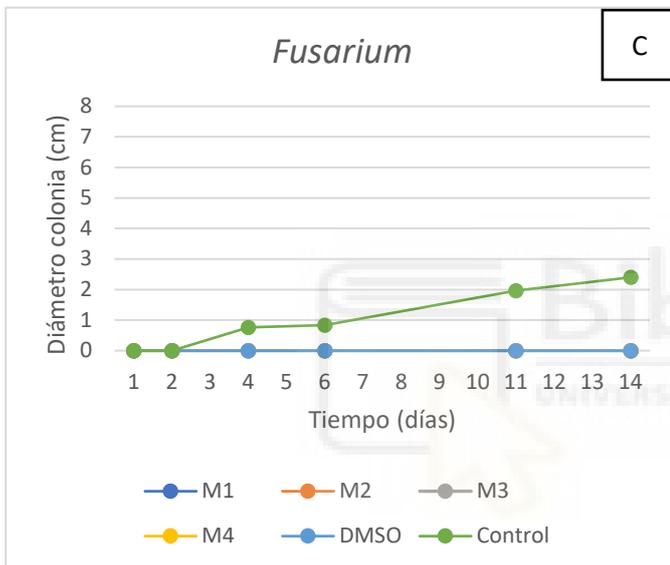
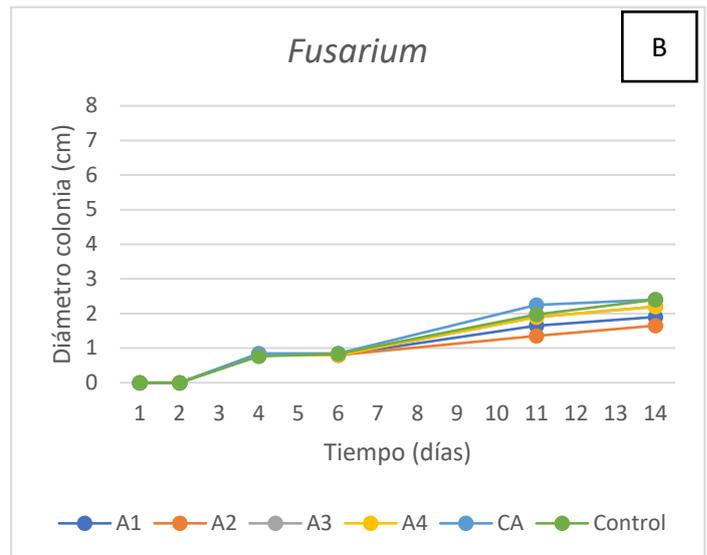
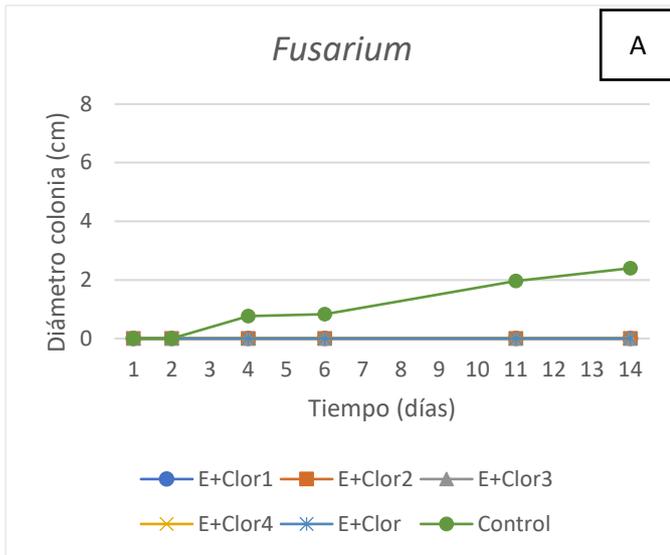
Figuras 22 A, B, C y D. Crecimiento del micelio de *Phytophthora citrophthora* en medio PDA adicionado con extractos de plantas a lo largo del tiempo. La letra de los extractos corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro de benzalconio (E + Clor), acetona (A), metanol (M) y etanol puro (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 1-*Acacia farnesiana*, 2-*Caesalpinia gilliesii*, 3-*Carpobrotus edulis*, 4-*Mirabilis jalapa*.

Observando los resultados del ensayo con *Fusarium*, (figuras 23-25) podemos deducir que tanto el etanol + Clor y el DMSO como extractantes, inhiben completamente el crecimiento de este hongo, ya que no existe crecimiento en las placas control con estos extractantes. Conviene resaltar además 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, a pesar de que anteriormente había mostrado un crecimiento más rápido. Esto puede deberse a la pérdida de vitalidad como saprófito tras repetidos subcultivos en medio axénico, y que sea necesario activarlo pasando por planta, ya que se trata de un patógeno vascular. Este comportamiento dificulta la interpretación de resultados. Sin embargo, se puede apuntar que con acetona como extractante, se observó un crecimiento similar en la placa control y en el resto hasta el sexto día, siendo el extracto que más inhibición ha producido el de *Caesalpinia gilliesii*.

Con etanol puro no se observó tampoco efecto inhibitorio.



Figuras 23 y 24. Crecimiento del hongo *Fusarium sp.* en medio PDA con diferentes extractantes y extractos de plantas. Las letras corresponden con los extractantes utilizados: E-Etanol con cloruro de benzalconio (24), A-Acetona (23). El número corresponde con la especie vegetal utilizada: 1-*Acacia farnesiana*, 2-*Caesalpinia gilliesii*, 3-*Carpobrotus edulis*, 4-*Mirabilis jalapa*.



Figuras 25 A, B, C y D. Crecimiento del micelio de *Fusarium* 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 de benzalconio (E+Clor), acetona (A), metanol (M) y etanol puro (ET). El número corresponde con la especie vegetal: 1-*Acacia farnesiana*, 2-*Caesalpinia gilliesii*, 3-*Carpobrotus edulis*, 4-*Mirabilis jalapa*.

Con los datos obtenidos en estos ensayos, se calculó el porcentaje de inhibición, que se muestra en la tabla 5.

Para calcular dicho porcentaje de inhibición, se utilizó la siguiente fórmula:

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

En el caso de *Fusarium* se observaron porcentajes de inhibición elevados, aunque debido a que la colonia no llegó a ocupar toda la placa, los resultados deben interpretarse con precaución. Los extractos de etanol + Clor, así como los de metanol con DMSO produjeron, en su totalidad, incluyendo el control, un 100 % de inhibición, por lo que se puede afirmar que son estos compuestos los que inhiben el crecimiento de *Fusarium*. Con los extractos de acetona, la especie vegetal que presenta mayor capacidad de inhibición frente a *Fusarium* es *Caesalpinia gilliesii*, seguido de *Acacia farnesiana*. Con etanol puro como extractante, se observa que la placa control

supera levemente el crecimiento de la placa control sin extractante. Las especies vegetales que inhiben el crecimiento de este hongo son *Caesalpinia gilliesii* y *Carpobrotus edulis*.

El hongo más sensible a los extractos de plantas parece ser *Phytophthora citrophthora*. En este caso, también los solventes el etanol + Clor y metanol con DMSO produjeron una inhibición casi total en todos los casos. Hay que puntualizar que los valores de inhibición del 88 % se deben a un crecimiento muy incipiente del micelio sobre la porción original del cultivo stock, no llegando en ningún caso a colonizar el medio, por lo que lo consideramos inhibición total. En cuanto a los extractos acetónicos, el de *Carpobrotus edulis* fue el único que produjo una pequeña inhibición, del 24,13 %. En las placas con etanol puro como extractante, la especie vegetal que mayor porcentaje de inhibición produjo, fue *Acacia farnesiana*, seguido de *Caesalpinia gilliesii*.

Esta mayor sensibilidad de *Phytophthora citrophthora* se ha observado previamente en experimentos similares por García (2019) y podría deberse a su naturaleza como hongo Oomiceto, con hifas de paredes delgadas, a diferencia de *Botrytis* o *Fusarium*, que son especies anamórfas de hongos Ascomicetos, con paredes gruesas y/o pigmentadas que podrían posiblemente conferir mayor resistencia a los compuestos tóxicos.

Botrytis parece ser el hongo más resistente, ya que presentó los menores porcentajes de inhibición. A pesar de que el control etanol + Clor produjo también inhibición, ésta fue menor que en los otros hongos ensayados. Además, con las especies *Acacia farnesiana*, *Caesalpinia gilliesii* y *Mirabilis jalapa* se observaron mayores reducciones del diámetro de la colonia que las debidas al solvente (entre 60-70 %). Los extractos de acetona produjeron una inhibición casi imperceptible, siendo *Mirabilis jalapa* la especie más inhibitoria. El DMSO inhibió completamente el crecimiento de *Botrytis*. En los extractos con etanol puro, no se observó prácticamente inhibición, siendo *Mirabilis jalapa* la única especie vegetal que ocasionó algo de inhibición

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente utilizado habitualmente en la preparación de extractos metanólicos de plantas (Khan y Yadav, 2011; Mostafa et al., 2018; Bajpai et al., 2012). Aunque en la mayoría de los estudios no se aporta información de su posible efecto fungitóxico, algunos autores apuntan cierto efecto inhibitorio sobre algunos hongos filamentosos (Randhawa, 2006; Petrucelli et al., 2020), lo que confirmaría nuestros resultados. En cambio, al ser poco difusible en el medio de cultivo, no parece presentar este efecto fungitóxico en los ensayos de difusión en disco.

El test de difusión en disco es más sencillo de ejecutar y permite evaluar mayor número de tratamientos que los ensayos por contacto con el extracto, con menos costo y esfuerzo. Sin embargo, en el caso de los hongos filamentosos habría que solventar ciertos problemas metodológicos como la preparación de inóculos ajustados, para cada especie o cepa fúngica, como apuntan también otros autores (Cantón et al., 2007; Durand et al., 2021).

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de los hongos en contacto directo con los extractos de 1-*Acacia farnesiana*, 2-*Caesalpinia gilliesii*, 3-*Carpobrotus edulis* y 4-*Mirabilis jalapa*, calculado a partir de los datos del último día de medición. La letra corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro de benzalconio (E+Clor), acetona (A), metanol (M) y etanol puro (ET). Los guiones indican que dicho cultivo ha crecido más que en la placa control.

Extracto	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>
E+Clor 1	70	100	72,41
E+Clor 2	68,125	100	59,31
E+Clor 3	31,25	100	51,72
E+Clor 4	62,5	100	85,51
Control E+Clor	39,37	100	88,96
A1	3,75	20,83	-
A2	3,12	37,5	-
A3	0	8,33	24,13
A4	6,25	8,33	-
Control Acetona	0	0	6,89
M1	100	100	100
M2	90	100	100
M3	86,25	100	100
M4	100	100	100
Control DMSO	100	100	88,27
ET1	0	4,16	32,41
ET2	6,25	8,33	29,65
ET3	0	8,33	17,24
ET4	0	-	4,82
Control ETANOL	0	-	-

Actividad antibacteriana de los extractos de plantas

En general, el efecto antibacteriano de los extractos ensayados fue algo más generalizado que el efecto antifúngico.

Si analizamos los resultados obtenidos en los ensayos con *Escherichia coli* (Figuras 26-28) se observa que *Mirabilis jalapa* fue la única especie vegetal que produjo inhibición en, al menos, dos extractantes (etanol + Clor, Etanol puro y en menor medida metanol), aunque atribuible, al menos en parte, a los extractantes utilizados a base de etanol, que también produjeron zonas de inhibición.

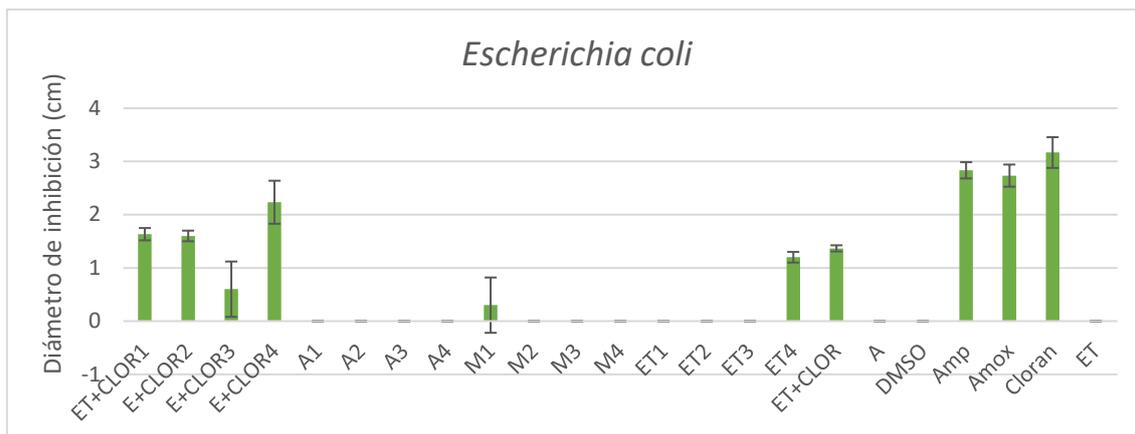


Figura 26. Diámetro del halo de inhibición producido en *Escherichia coli* a las 24 horas del inicio del cultivo. El número se corresponde con la especie vegetal utilizada: 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*. La letra corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro de benzalconio (E+clor), acetona (A), metanol (M), etanol puro (ET). Controles positivos: ampicilina (Amp), amoxicilina (Amox), cloranfenicol (Cloran).

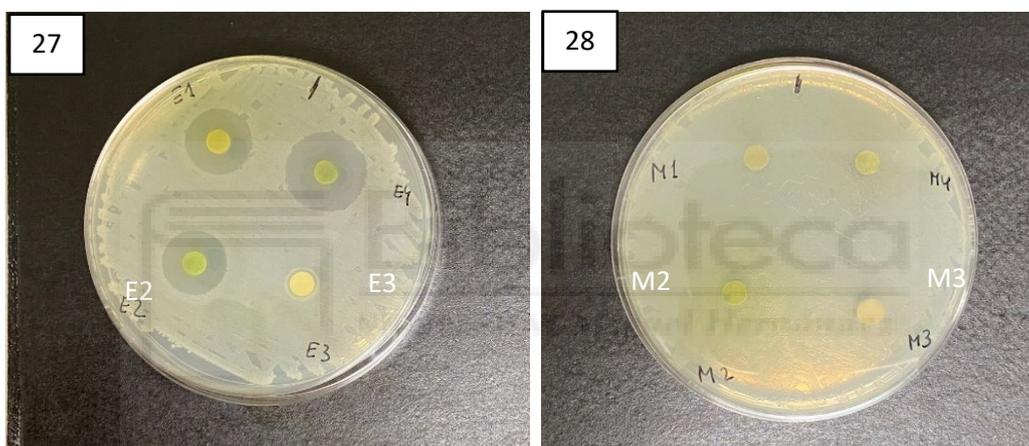


Figura 27 y 28. Ejemplos de *Escherichia coli* en medio de cultivo AN a las 24 horas de la siembra, con los extractos en etanol con cloruro de benzalconio (E), y metanol (M) de 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*.

Para *Micrococcus luteus*, (figuras 29-32) las cuatro especies vegetales produjeron la mayor inhibición en los extractos de etanol + Clor.

En cuanto a los demás extractantes, *Caesalpinia gilliesii* produjo halos de inhibición con acetona y etanol puro como extractantes, *Acacia farnesiana* con metanol y etanol puro, y *Mirabilis jalapa* con acetona y etanol puro.

Los controles positivos de antibióticos originaron zonas de inhibición patentes, lo que pone de manifiesto la sensibilidad de esta especie.: Cloranfenicol fue el control positivo que menos diámetro de inhibición produjo (4 cm), en cambio, amoxicilina y ampicilina produjeron una inhibición mayor (7 cm).

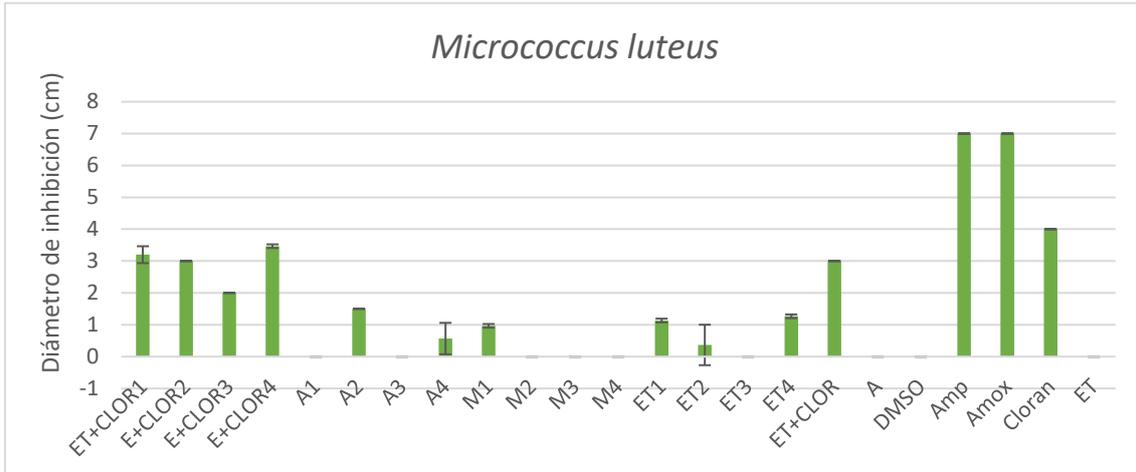
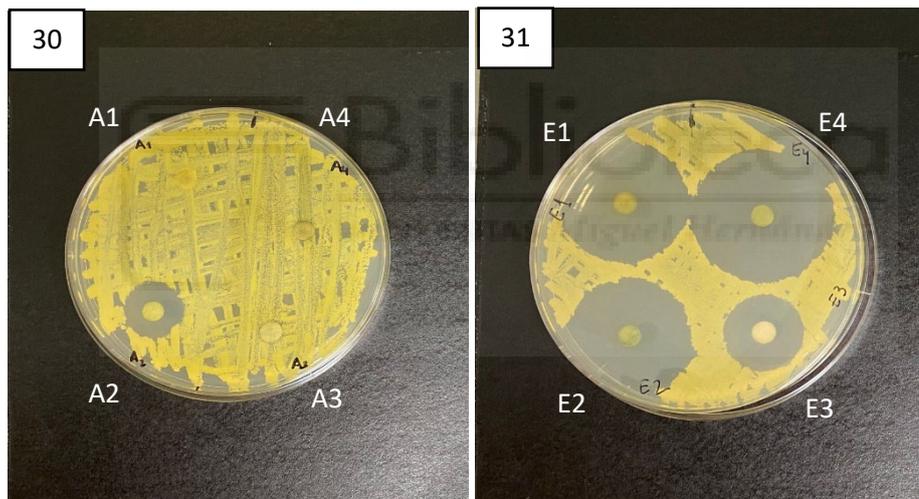


Figura 29. Diámetro del halo de inhibición producido en *Micrococcus luteus* a las 24 horas del inicio del cultivo. El número se corresponde con la especie vegetal utilizada: 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*. La letra corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro de benzalconio (E+clor), acetona (A), metanol (M), etanol puro (ET). Controles positivos: ampicilina (Amp), amoxicilina (Amox), cloranfenicol (Cloran).



Figuras 30 y 31. Ejemplos de *Micrococcus luteus* en medio de cultivo AN a las 24 horas de la siembra, con los extractos en acetona (A) y etanol+clor(E) de 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*.

En el caso de *Staphylococcus epidermidis* (Figuras 33-36), todos los extractos en etanol + Clor produjeron zonas de inhibición, aunque debidas en gran parte al extractante. *Caesalpinia gilliesii* produjo halos de inhibición con acetona como extractante; *Acacia farnesiana* produjo halos de inhibición con metanol y etanol puro como extractante, *Carpobrotus edulis* solamente produjo halos de inhibición con metanol, y *Mirabilis jalapa* con el extractante etanol puro.

Los tres controles positivos produjeron halos de inhibición de hasta 3,3 cm, lo que señala también la sensibilidad de esta especie.

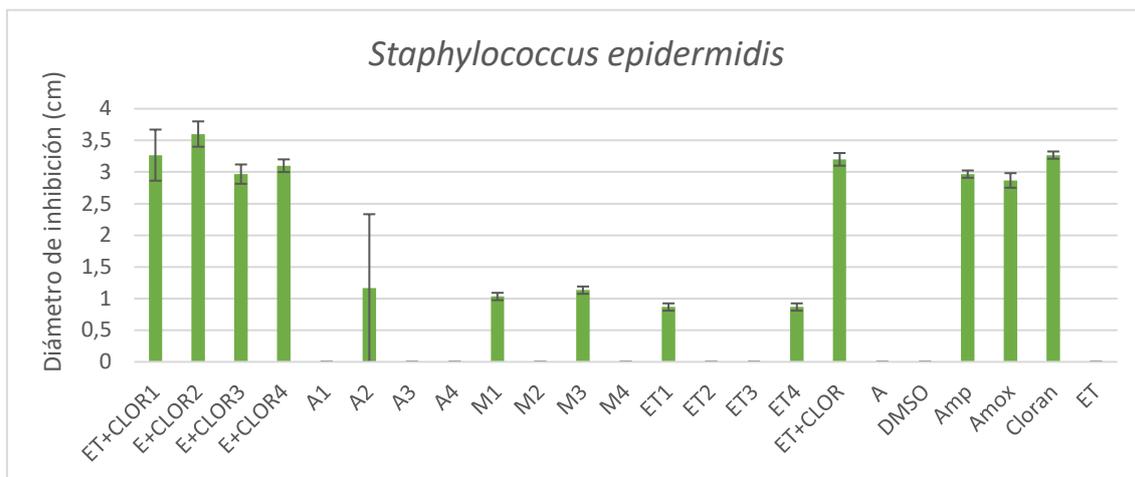


Figura 32. Diámetro del halo de inhibición producido en *Staphylococcus epidermidis* a las 48 horas del inicio del cultivo. El número se corresponde con la especie vegetal utilizada: 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*. La letra corresponde al extractante utilizado: etanol con cloruro de benzalconio (E+clor), acetona (A), metanol (M), etanol puro (ET). Controles positivos: ampicilina (Amp), amoxicilina (Amox), cloranfenicol (Cloran).



Figuras 33, 34 y 35. Ejemplos de *Staphylococcus epidermidis* en medio de cultivo AN a las 48 horas de la siembra, con los extractos en etanol con cloruro de benzalconio (E), acetona (A) y metanol (M) de 1- *Acacia farnesiana*, 2- *Caesalpinia gilliesii*, 3- *Carpobrotus edulis*, 4- *Mirabilis jalapa*.

En este estudio hemos observado que las especies *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus* son más sensibles que *Escherichia coli* a los extractos de las plantas invasoras ensayadas, con 9-10 tratamientos que mostraron actividad antibacteriana en las primeras frente a los 6, y de menor extensión, de la segunda. Estos resultados confirman datos similares de anteriores trabajos con estas especies de bacterias (Mostafa et al., 2018), lo que puede atribuirse a que se trata de bacterias Gram +, con una pared más simple (Wong et al., 2015).

Aunque los resultados han sido muy variables, dependiendo de la planta, el extractante utilizado, el método de evaluación y el organismo diana, se puede afirmar que las plantas invasoras ensayadas presentan cierta actividad antimicrobiana.

Acacia farnesiana ha mostrado actividad antimicrobiana en un gran número de casos. Se trata de una especie abundante, de distribución pantropical y distintas partes de la planta, mayoritariamente los frutos, se han usado ampliamente en medicina tradicional como broncodilatador, contra venenos de serpientes, contra la indigestión, como antiinflamatorio, destacando además su utilización en el tratamiento de enfermedades como la tuberculosis, la disentería o el cólera (Hernández-García et al., 2019). Se han identificado compuestos bioactivos del grupo de los fenoles (ácido gálico, metil-galato, desoxyhexósido de quercetina), flavonoides (glicósidos y galoglicósidos), taninos, terpenos y saponinas entre otros, que podrían explicar su efecto antimicrobiano. Además, se ha comprobado previamente la actividad antimicrobiana frente a bacterias causantes de las enfermedades mencionadas (Reddy et al., 2008; Ramli et al., 2011; Sánchez et al., 2013; Hernández-García et al., 2019), lo que justifica su uso etnofarmacéutico. Aunque son mucho más escasos los estudios sobre su potencial acción contra hongos en general y organismos fitopatógenos en particular, algunos autores han comprobado actividad antifúngica de extractos hidroalcohólicos frente a *Fusarium oxysporum f. lycopersici* in vitro (Rodríguez et al., 2012), aunque adicionados al medio de cultivo en una cantidad mucho mayor que la utilizada en nuestro estudio.

Caesalpinia gilliesii ha presentado también actividad antimicrobiana en muchos casos, lo cual es novedoso, ya que no conocemos datos previos sobre esta especie.

Mirabilis jalapa se ha usado tradicionalmente para el tratamiento de la disentería, diarrea, dolores musculares, para tratar afecciones dermatológicas, como cicatrizante y como antiinflamatorio en los lugares de donde es originaria (Poovendran et al., 2011), por lo que cabría esperar actividad antiséptica. Es de destacar el efecto observado con los extractos etanólicos, superando el efecto antibacteriano influido por el extractante, además de actividad antifúngica de algunos extractos etanólicos y acetónicos. Nuestros resultados están en línea con los obtenidos por otros autores relativos a la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de esta especie frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* (Oska y Sari, 2007; Poovendran et al., 2011; Castillo et al., 2012; Naveed et al., 2010;) atribuible a la presencia de metabolitos secundarios como quinonas, cumarinas y flavonoides (Castillo et al., 2012), aunque se afirma que la intensidad de la actividad antibacteriana puede estar influenciada por factores ambientales o genéticos (Naveed et al., 2010).

Carpobrotus edulis mostró sin embargo una actividad antimicrobiana más limitada. Hasta nuestro conocimiento, no existen apenas datos previos de actividad antimicrobiana de esta especie, a excepción de cierta actividad de extractos metanólicos, variable según concentración sobre *Staphylococcus aureus* o *Mycobacterium tuberculosis* (Martins et al., 2005). A pesar de que esta especie debe su capacidad de invasión en gran medida a los efectos alelopáticos que producen sus hojas secas sobre la flora circundante, esto parece explicarse por causas diferentes a la presencia de metabolitos secundarios con actividad antifúngica o antibacteriana, como cambios en el pH y la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Sanz-Elorza et al., 2004).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos propuestos, se puede concluir que:

- El extractante metanol, seguido de etanol produjeron los mayores rendimientos en los extractos.
- Los solventes alcohol con cloruro de benzalconio y dimetilsulfóxido manifestaron actividad antifúngica cuando se aplicaron directamente a los hongos, mientras que alcohol con cloruro de benzalconio presentó además actividad antibacteriana, por lo que no resultan adecuados.
- Los extractos de *Acacia farnesiana* produjeron excelentes resultados mediante el método de difusión en disco frente a *Alternaria* y en menor medida, *Botrytis cinerea*. En los ensayos por contacto directo, se observaron resultados inhibitorios para *Fusarium sp.*, *Phytophthora citrophthora* y *Botrytis cinerea*. Además, se produjo inhibición de *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- Con los extractos de *Caesalpinia gilliesii* se observaron resultados notorios en *Alternaria* y *Botrytis* mediante el método de difusión en disco, y para *Fusarium sp.* y *Botrytis cinerea* mediante contacto directo. También actividad antibacteriana para *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- Los extractos de *Carpobrotus edulis* mostraron actividad antifúngica con el método de difusión en disco para *Alternaria* y *Botrytis cinerea*, y con el método de contacto directo para *Phytophthora citrophthora*. Esta especie vegetal solamente produjo actividad antibacteriana en *Staphylococcus epidermidis* con los extractos preparados con metanol.
- Los extractos de *Mirabilis jalapa* mostraron actividad inhibitoria mediante el método de difusión en disco para *Alternaria* y *Botrytis cinerea* y mediante el método por contacto para *Botrytis cinerea*. También se observó actividad antibacteriana para *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus epidermidis*

Como perspectivas futuras planteamos:

- Mejorar los métodos para determinar la actividad antimicrobiana (basados en la pureza e idoneidad del extractante y preparación de los inóculos).
- Profundizar en el conocimiento y caracterización de los componentes bioactivos de las plantas invasoras con actividad antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreu J., Vilà M. 2007. Análisis de la gestión de las plantas exóticas en los espacios naturales españoles. *Ecosistemas*, 2007 (3).
- Ascencio, M., Canela, A., Domínguez, E. 2021. Identificación de hongos oportunistas de interés clínico. México: Laboratorio de micología.
- 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.
- Benito, E., Arranz, M., Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Bortyitis cinerea*. Salamanca. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: 43-46.
- 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.
- Castillo, A., Pascual, Y.M., Cañete, F.A., Lorente, C.P. 2012. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Mirabilis jalapa* L. *Multimed*, 16 (1): 1-15.
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M., Vargas, N. 2012. *Biología de los hongos*. Bogotá: Universidad de los Andes.
- 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 Brandow W. Gamble (Eds.). South Florida Natural Resources Center.
- Dana, E., García de Lomas, J., Sánchez, 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*. University of Almería. 170-175.
- Díaz, 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: 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, O. 2019. Evaluación de la capacidad antifúngica y antibacteriana de extractos de plantas invasoras (*Acacia saligna*, *Lantana cámara*, *Nicotiana glauca* y *Ricinus communis*). Área de Botánica. Elche.

Hernández-García, E., García, A., Garza-González E., Avalos-Alanís F.G., Rivas-Galindo, V.M., Rodríguez-Rodríguez, J., Alcantar-Rosales, V.M., Delgadillo-Puga, C., Del Rayo Camacho-Corona, M. Chemical composition of *Acacia farnesiana* (L) wild fruits and its activity against *Mycobacterium tuberculosis* and dysentery bacteria. 2019. Journal of Ethnopharmacology, 230:74-80.

Hierro, J.L., Callaway R.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. Plant and Soil, 256: 29-39.

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 22 June 2022].

Kettunen, M., Genovesi, P., Gollash, S., Pagad, S., Starfinger, U., Ten, Brink P., Shine, C. 2008. Technical support to eu strategy on invasive species (ias) – assessment of the impacts of ias in europe and the eu (final module report for the european commission). Pp Page, Brussels (Belgium), Institute for European Environmental policy (IEEP).

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, 155pp.

Lemos, M. (2020). *Staphylococcus epidermidis*: qué es, síntomas y tratamiento. Tuasaúde. <https://www.tuasaude.com/es/staphylococcus-epidermidis/>

Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet-flora-vasc-aloc-t-invas.aspx>

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): 53-56.

Martins, M., Ordway, D., Kristiansen, M., Viveiros, M., Leandro, C., Molnar, J., Amaral, L. 2005. Inhibition of the *Carpobrotus edulis* methanol extract on the growth of phagocytosed multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia 76. 96-99.

Máximo, P., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Lourenço, A. 2020. 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.

Mirabilis jalapa. (14 de junio de 2022). En *Wikipedia*. https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Mirabilis_jalapa&oldid=144194909

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.

Naveed, U., Habib, A., Haq, A.A., Khan, A.Q., Rabia, A. 2010. Antibacterial activities of genetic variants of *Mirabilis jalapa*. *Pharmacognosy Journal*, 2 (7): 181-184

Oska, M., Sari, D. 2007. Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 45: 176-181.

Pérez, M. 2019. Evaluación de la capacidad antifúngica y antibacteriana de extractos de plantas invasoras (*Eucalyptus globulus*, *Schinus molle*, *Schinus terebenthifolius*, *Zygophyllum fabago*). Área de botánica. 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.

Poovendran, P., Vidhya, N., Murugan, S. 2011. Antimicrobial activity of *Mirabilis jalapa* and *Dichotachys cinerea* against biofilm and extended spectrum of beta lactamase (ESBL) producing uropathogenic *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5(22): 3620-3623.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 1996. *Microbiology* (3rd edition). Wm. C. Brown Publishers.

Randhawa, M.A. 2006. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 47(4): 313-318.

Ramli, S., Harada, K., Ruangrungsi, N. 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Leaves Ethanolic Extract. *Pharmacognosy Journal*, 3 (23): 50-58

Reddy, T., BobbaRala, V., Moulali, D.A. 2008. Antimicrobial screening of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. *Indian Journal of Botanical Research*, 4 (2): 249 – 251.

Rodríguez, A.T., Ramírez, M.A., Bautista, S., Cruz, A., Riveiro, D. 2012. Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola* 12 (1): 91-96.

Rodríguez, A. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de la *Escherichia coli*. *Salud pública*. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México. Vol. 44. 464-475.

Sánchez, E., Heredia, N., Camacho-Corona, M.R., García, S. 2013. Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*, 115: 1307-1316

Sanz-Elorza, M., Dana, E., Sobrino, E. 2004. *Atlas de las plantas alóctonas invasoras en España*. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.

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.

Strange, R.N., Scott, P.R. 2005. Plant diseases a threat to global food security. *Annu. Rev Phytopathol.* 43: 83-116.

Vicent, A., Tuset, J. 2013. Enfermedades causadas por *Phytophthora* en cítricos. Descripción y bases para su gestión integrada. Valencia. Unidad de Micología.

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.

