



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LAS ESPECIES  
MACRÓFITAS *Eichhornia crassipes* Y *Lemna gibba* FRENTE A BACTERIAS Y  
HONGOS PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN SALUD VEGETAL**

**IVONNE NATHALY HURTADO TRIANA**

**NELSON FABIÁN MUÑOZ SUESCUN**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTA D.C. 2019**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LAS ESPECIES  
MACRÓFITAS *Eichhornia crassipes* Y *Lemna gibba* FRENTE A BACTERIAS Y  
HONGOS PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN SALUD VEGETAL**

**LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL M.SC.**

**Asesor interno**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTA D.C. 2019**

## **DEDICATORIA**

Dedicamos este trabajo a Dios y a todas las personas que hicieron parte de nuestro proceso académico.

A nuestros padres quienes siempre nos dieron su apoyo incondicional en lo recorrido durante todo este proceso, a nuestra demás familia por confiar en nuestro desarrollo formativo, por su constante apoyo y aporte en el cumplimiento de nuestro proyecto de vida

A nuestros amigos quienes nos brindaron todo su apoyo a lo largo de la carrera, gracias por siempre estar presentes en todo momento y brindarnos su amistad incondicional y momentos inolvidables.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al profesor Edison Tello y al laboratorio de bioprospección de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana porque gracias a su asesoría incondicional, su conocimiento, su disponibilidad y sus relaciones pudimos contar con el espacio y profesionales para realizar la extracción de las muestras y así llevar a cabo nuestro proyecto.

Agradecemos a la Universidad Jorge Tadeo Lozano y el laboratorio de microbiología por habernos brindado un espacio adecuado y los equipos e implementos necesarios para el procesamiento de nuestro proyecto.

Agradecemos a la institución que nos ha visto crecer académicamente, nos ha apoyado y fortalecido en este proceso. Al grupo de investigación CEPARIUM que abrió sus brazos para recibirnos, especialmente a nuestra asesora por su compromiso y dedicación con nosotros.

## Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
1. ANTECEDENTES .....	17
2. MARCO TEORICO.....	20
2.1 Resistencia antibacteriana .....	20
2.2 Fitopatógenos en Colombia.....	20
2.3 Generalidades de los grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas .....	21
2.4 <i>Eichhornia crassipes</i> .....	22
2.5 <i>Lemna</i> sp .....	24
2.6 Microorganismos fitopatogenos .....	25
2.7 <i>Xanthomonas</i> sp.....	26
2.8 <i>Lelliottia</i> spp.....	27
2.9 <i>Ralstonia</i> sp.....	28
2.10 <i>Botrytis</i> sp.....	29
2.11 <i>Fusarium</i> sp.....	29
3 DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
3.1 Tipo de investigación.....	31
3.2 Hipótesis.....	31
3.3 Variables e indicadores. ....	32
3.4 Fase 1: Técnica y procedimientos.....	32
3.4.1 Recolección del material vegetal.....	32
3.4.2 Aspectos importantes en la recolección de las muestras. ....	33
3.4.3 Transporte de las muestras. ....	34
3.5 Procesamientos del material vegetal .....	34
3.5.1 Separación y lavado del material vegetal. ....	34

3.5.2	Secado de las muestras. ....	36
3.5.3	Almacenamiento de las muestras. ....	37
3.6	FASE 2: Obtención de los extractos. ....	37
3.7	FASE 3: Obtención y conservación de los microorganismos fitopatógenos.....	43
3.8	FASE 4: Medición de la actividad antimicrobiana.....	43
3.8.1	Difusión en Agar .....	43
3.8.2	Concentración mínima inhibitoria CMI.....	45
4	RESULTADOS .....	46
4.1	Pesos finales.....	46
4.2	DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR (Bacterias).....	46
4.2.1	<i>Xanthomonas</i> sp.....	47
4.2.2	<i>Ralstonia</i> sp. ....	49
4.2.3	<i>Lelliottia</i> sp. ....	52
4.2.4	Crecimiento de la cepas control ATCC.....	54
4.2.5	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705.....	54
4.2.6	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706.....	56
4.3	DIFUSION RADIAL EN AGAR (hongos).....	59
4.4	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA EN MICROPLACA (bacterias) .....	59
4.4.1	<i>Lelliottia</i> sp. ....	59
4.4.2	<i>Xanthomonas</i> sp.....	61
4.4.3	<i>Ralstonia</i> sp. ....	62
4.5	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA EN MICROPLACA (Hongos).....	63
4.5.1	<i>Botrytis</i> sp. C- bios .....	63
4.5.2	<i>Botrytis</i> sp. Ucmc.....	64
4.5.3	<i>Fusarium</i> sp. ....	66
5	DISCUSIÓN .....	67
6	CONCLUSIONES .....	71
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	72
7.	ANEXOS.....	78

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Grupos Químicos más importantes con actividad antimicrobiana Obtenidos de plantas.....	23
<b>Figura 2.</b> Canales anexos al humedal Tierra blanca ( <i>Eichhornia crassipes</i> ).....	34
<b>Figura 3.</b> Canales anexos al humedal Tierra blanca ( <i>Lemna gibba</i> ).....	34
<b>Figura 4.</b> Proceso de lavado y separación de ( <i>Lemna gibba</i> ).....	35
<b>Figura 5.</b> Proceso de lavado y separación de Hojas de <i>Eichhornia crassipes</i> ....	36
<b>Figura 6.</b> Proceso de lavado y separación de Tallo de <i>Eichhornia crassipes</i> ....	36
<b>Figura 7.</b> Proceso de lavado y separación de Raíz de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> Secado y almacenamiento de muestra.....	37
<b>Figura 9.</b> <i>Lemna gibba</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Raíz de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	39
<b>Figura 11.</b> Hojas de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	39
<b>Figura 12.</b> Tallo de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Proceso de Filtrado del extracto obtenido con Diclorometano.....	40
<b>Figura 14.</b> Balones listos para pasar por el rotaevaporador.....	40
<b>Figura 15.</b> Proceso de Rota evaporación.....	41
<b>Figura 16.</b> Viales ambar con extracto seco por dentro.....	41
<b>Figura 17.</b> Cromatografía 8:2, donde se evidencian los compuestos apolares....	42
<b>Figura 18.</b> Cromatografía 1:1, donde se evidencian más los compuestos	

polares.....	43
<b>Figura 19.</b> Cromatografía 100% en Acetato de etilo.....	43
<b>Figura 20.</b> Difusión radial en agar de <i>Xanthomonas</i> sp.....	48
<b>Figura 21.</b> Halo de inhibicion de extractos vs <i>Xanthomonas</i> sp. leído bajo estereoscopio.....	49
<b>Figura 22.</b> Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de <i>Xanthomonas</i> sp.....	50
<b>Figura 23.</b> Difusión radial en agar de <i>Ralstonia</i> sp.....	51
<b>Figura 24.</b> Halo de inhibicion de extractos vs <i>Ralstonia</i> sp. leído bajo estereoscopio.....	51
<b>Figura 25.</b> Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de <i>Ralstonia</i> sp.....	52
<b>Figura 26.</b> Difusión radial en agar de <i>Lelliottia</i> sp.....	53
<b>Figura 27.</b> Halo de inhibicion de extractos vs <i>Lelliottia</i> sp. leído bajo estereoscopio.....	53
<b>Figura 28.</b> Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de <i>Lelliottia</i> sp.....	54
<b>Figura 29.</b> Difusión radial en agar de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705.....	55
<b>Figura 30.</b> Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705.....	56
<b>Figura 31.</b> Difusión radial en agar de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706 .....	57
<b>Figura 32.</b> Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706.....	58
<b>Figura 33.</b> Extracto con mejor actividad antimicrobiana en técnica de difusión radial en agar.....	59

<b>Figura 34.</b> Microdilución en placa de extractos vs <i>Lelliottia</i> sp.....	60
<b>Figura 35.</b> Microdilucion en placa de extractos vs <i>Xanthomonas</i> sp.....	62
<b>Figura 36.</b> Microdilucion en placa de extractos vs <i>Ralstonia</i> sp.....	63
<b>Figura 37.</b> Microdilucion en placa de extractos vs <i>Brotrytis</i> sp. C-bios.....	64
<b>Figura 38.</b> Microdilucion en placa de extractos vs <i>Bortytis</i> sp. Ucmc.....	65
<b>Figura 39.</b> Microdilucion en placa de extractos vs <i>Fusarium</i> sp. ....	67

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Objetivos, variables, indicadores y resultados esperados.....	33
<b>Tabla 2.</b> Peso seco final del material vegetal.....	47
<b>Tabla 3.</b> Peso de extracto de cada material vegetal.....	47
<b>Tabla 4.</b> Actividad antimicrobiana de Extractos de <i>Lemna gibba</i> y <i>Eichhornia crassipes</i> frente a <i>Xanthomonas</i> sp.....	49
<b>Tabla 5.</b> Actividad antimicrobiana de Extractos de <i>Lemna gibba</i> y <i>Eichhornia crassipes</i> frente a <i>Ralstonia</i> sp.....	52
<b>Tabla 6.</b> Actividad antimicrobiana de Extractos de <i>Lemna gibba</i> y <i>Eichhornia crassipes</i> frente a <i>Lelliotia</i> sp.....	54
<b>Tabla 7.</b> Actividad antimicrobiana de Extractos de <i>Lemna gibba</i> y <i>Eichhornia crassipes</i> frente a <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705.....	56
<b>Tabla 8.</b> Actividad antimicrobiana de Extractos de <i>Lemna gibba</i> y <i>Eichhornia crassipes</i> frente a <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706.....	57

## INDICE DE ANEXO

<b>Anexo 1.</b> Hoja de vida de la <i>Xanthomonas sp</i> .....	79
<b>Anexo 2.</b> Hoja de vida de la <i>Lelliottia sp</i> .....	81
<b>Anexo 3.</b> Hoja de vida de <i>Ralstonia sp</i> .....	83
<b>Anexo 4.</b> Hoja de vida de <i>Botrytis sp</i> .....	85
<b>Anexo 5.</b> Hoja de vida de <i>Botrytis sp</i> .....	87
<b>Anexo 6.</b> Hoja de vida de <i>Fusarium sp</i> .....	89



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LAS ESPECIES  
MACRÓFITAS *Eichhornia crassipes* Y *Lemna gibba* FRENTE A BACTERIAS Y  
HONGOS PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN SALUD VEGETAL.**

**RESUMEN**

El uso excesivo de productos químicos como biocidas y plaguicidas en la agroindustria, se ha convertido en un problema, que requiere soluciones alternativas como el uso de productos naturales para el control de los microorganismos patógenos. Plantas como *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* que son consideradas como maleza acuática y podrían ser evaluadas para determinar si sus metabolitos tienen alguna actividad biológica. El objetivo de este proyecto fue evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas macrófitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, frente a microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedad en cultivos comerciales colombianos. La metodología incluyó, la recolección, secado y obtención de extractos crudos a partir de las plantas, evaluación de los extractos frente a 3 bacterias y 3 hongos fitopatógenos utilizando pruebas de sensibilidad antimicrobiana que fueron concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca y pruebas de difusión radial en agar. Los resultados permitieron evidenciar que los extractos evaluados tienen una capacidad de inhibición frente a los microorganismos evaluados en este trabajo, sin embargo el extracto que mostro mayor capacidad de

inhibición frente a las bacterias fitopatógenas fue *Lemna gibba* en técnica de difusión radial en agar y concentración mínima inhibitoria, y frente a hongos todos los extractos evaluados tuvieron una capacidad de inhibición en la técnica de concentración mínima inhibitoria.

A futuro se espera avanzar en la identificación del compuesto o compuestos responsables de la actividad antibacteriana, evidenciada en este trabajo. Se propone, después de realizar esta identificación, la síntesis de este compuesto, y así dar respuesta a la problemática planteada anteriormente.

**Palabras claves:** Actividad antimicrobiana, extractos vegetales, fitopatogenos.

Estudiantes: Ivonne Nathaly Hurtado Triana

Nelson Fabian Muñoz Suecun

Docente: Ligia Consuelo Sanchez Leal MSc

Fecha: Noviembre de 2018

## INTRODUCCIÓN

Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE, en Colombia se siembran aproximadamente, 7.1 millones de hectáreas en el territorio nacional<sup>1</sup>. En Colombia, un país donde una de las principales actividades económicas es la agricultura, existe la necesidad de trabajar en los microorganismos que pueden tener un efecto nocivo y causen enfermedad a las plantas. La agricultura desempeña un papel de importancia en la economía del país y se ve afectada por amplia variedad de patógenos que atacan los cultivos, causando de esta forma, grandes pérdidas económicas porque incide en la calidad de los productos agrícolas directamente afectados. Además, una enfermedad puede tener acción directa en el suministro del mercado aumentando los precios, un menor volumen del suministro nacional, menor producción, deficiencia en la demanda del mercado por la caída de los precios nacionales y reducción de las exportaciones<sup>1</sup>.

Adicionalmente, el uso constante de agroquímicos, causa un deterioro significativo en los ecosistemas y aumenta la tasa de resistencia microbiana, que han ido presentando estos patógenos a lo largo del tiempo. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento de fitopatogenos, que además de ser amigable con el ambiente, no representen riesgo para los agricultores.

El uso de extractos de origen vegetal puede ser una alternativa viable en el tratamiento antimicrobiano en plantas. Gracias al conocimiento ancestral, el uso de las plantas en tratamientos antimicrobianos ha tenido gran importancia debido a las propiedades químicas que estas poseen. El uso de extractos de origen vegetal puede ayudar a la reducir la presencia de microorganismos causantes de enfermedades en la etapa productiva y sin afectar la salud del agricultor y el consumidor<sup>2</sup>. Estos extractos vegetales tienen como ventaja la rápida degradación en el suelo, no producen efectos nocivos en la salud de mamíferos y pueden ser empleados en sistemas de riego orgánico y sostenible<sup>3</sup>.

Por esta razón, hay mucho interés en su estudio, como una alternativa para

combatir la creciente tasa de resistencia microbiana, que presentan algunos fitopatógenos. Es por estas razones, que con este trabajo se busca evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas macrófitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, frente a microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedad en cultivos comerciales colombianos como alternativa para favorecer el aprovechamiento de recursos biológicos y, de esta forma, beneficiar a los agricultores y fortalecer la economía del país.

Las plantas seleccionadas para el presente proyecto llamadas comúnmente buchón de agua y lenteja de agua respectivamente, están clasificadas como “indeseadas” o “maleza de agua”, pues invaden los cuerpos hídricos por su rápida reproducción, disminuyendo el nivel de oxígeno del agua, alterando la calidad del agua y composición microbiana de las reservas acuáticas<sup>4</sup>, por lo tanto, además de buscar una utilidad a un problema ambiental, también se está presentando una solución al problema de resistencia microbiana que se ha generalizado a nivel mundial con patógenos que atacan a plantas, animales y humanos. El aporte que hace este trabajo complementa el presentado por otro grupo de estudiantes que realizó esta misma evaluación, pero con patógenos animal.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas macrófitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente a bacterias y hongos patógenos de plantas

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos a partir de las plantas macrófitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*.
- Establecer la actividad antimicrobiana del extracto frente a patógenos seleccionados para el estudio
- Comparar la efectividad de los extractos obtenidos de las dos plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*

## 1. ANTECEDENTES

Desde los años cuarenta, el uso de productos agroquímicos como plaguicidas y fertilizantes ha ido aumentando continuamente, llegando a 5 millones de toneladas en 1995, a escala mundial. Desde hace más de 70 años, iniciaron las investigaciones con fines comerciales de productos naturales, provenientes de plantas, con una posible actividad antimicrobiana. En el año de 1949, el grupo médico de Oxford, publicó en su libro "Antibiotics" algunas de las plantas con potencial antimicrobiano<sup>9</sup>

En 1998, según la investigación de Carvalho, se estableció que solamente el 0,1 por ciento de los plaguicidas usados llega directamente a la plaga, mientras el porcentaje restante significa una clara fuente de contaminación en suelos, aguas y biota relacionado directamente con la salud humana<sup>5</sup>. Otro trabajo realizado entre 1993 y 1994, en Nueva Zelanda, demostró la relación entre el uso constante de pesticidas organoclorados, y los niveles de contaminación hallados en estuario de la región de Mapua<sup>6</sup>. De la misma manera Waliszewski et al, señalaron en 1996, los altos niveles de contaminantes provenientes de productos químicos como el DDT, que oscilaban entre 9 y 20 ppm, en la ciudad de Veracruz, en México<sup>7</sup>. Estas investigaciones previas son una clara señal del daño que causa el uso de estos productos al medio ambiente y también a la salud de los seres humanos.

En estudio realizado por Chávez, en los llanos orientales de Colombia, se muestra el efecto de la aplicación de agroquímicos sobre los microorganismos presentes en un cultivo de arroz, dando como resultado un efecto para la reproducción de algunas bacterias Gram negativas y Gram positivas, según el agroquímico utilizado<sup>8</sup>. Esto infiere directamente en la generación de resistencia microbiana y adaptación de los microorganismos, mediante el uso de los productos.

Un artículo publicado en 2009, por Effiong BN, donde se desarrollaron extractos acuosos y etanólicos de la Lenteja de agua, para observar la capacidad anti fungicida de la misma, se hicieron ensayos con *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*,

*Rhizopus oryzae*. En este estudio, se concluyó que los extractos etanólicos tienen una mayor inhibición fungicida que el extracto acuoso en comparación con el extracto etanólicos <sup>10</sup>.

En el estudio realizado por Qudsia K. y Cols., en el año 2009, se evaluó la actividad antimicrobiana de un compuesto de tipo flavonoide, extraído a partir de hojas de mango. Los compuestos obtenidos se enfrentaron a un panel de 4 bacterias, dando como resultado una reducción en la concentración bacteriana hasta en un 96% <sup>11</sup>.

La lenteja de agua, es una planta macrófita acuática de libre flotación, crece rápidamente y se reproduce más rápido que otras plantas vasculares. İlhami Gülçin determinaron en su estudio, las actividades antioxidantes, anti radicales, antimicrobianas y anticandidales de la lenteja de agua utilizando diferentes metodologías *in vitro*. Un objetivo importante de este estudio fue determinar los efectos inhibitorios de WELM y EELM (extractos de la lenteja de agua) contra 21 bacterias y 4 hongos y varias especies de levaduras, mediante el método de difusión de disco. “En nuestros resultados se observó que WELM y EELM tuvieron un efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sicca*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae*, Y un efecto anticandidal contra *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*” concluyó İlhami Gülçin en este artículo publicado en 2010<sup>12</sup>.

En 2015, Valderrama Et al, evaluaron el efecto de tres plantas macrófitas, entre ellas *Eichhornia crassipes*, y *Lemna* sp. , en la remoción de indicadores de contaminación fecal en aguas residuales domésticas. Los indicadores removieron hasta un 99% de coliformes Fecales en 6 días y *Eichhornia crassipes*, fue la especie más eficiente en la remoción. Esto revela la posible acción antimicrobiana de *Eichhornia crassipes* <sup>13</sup>.

Recientemente, en 2016, se dio a conocer un trabajo de grado realizado por estudiantes del grupo Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, donde se evaluaron las capacidades antibacterianas del extracto de Lenteja de Agua (*Lemna gibba*) y fueron analizadas mediante los métodos: Kirby Bauer y Micro

dilución, frente a bacterias resistentes y de referencia: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos del método de Kirby Bauer demuestran la capacidad antibacteriana gracias al diámetro de los halos de inhibición para cada bacteria, *E. coli* entre 5.0 mm y 7.0 mm, *S. aureus* entre 3.0mm y 7.0mm, *K. pneumoniae* entre 2mm y 6mm en concentraciones desde 226 ug/ml a 28.2 ug/ml. La técnica de micro dilución determino la MIC del extracto de lenteja de agua para cada uno de los microorganismos obteniéndose así para *E. coli* entre 28.2 a 14.1 ug/ml, para *S. aureus* entre 28.2 a 7.06 ug/ml y para *K. pneumoniae* entre 28.2 a 14.1 ug/ml. Este trabajo concluyó que el extracto de lenteja de agua es capaz de inhibir el crecimiento de los diferentes microorganismos en estudio y se confirma la capacidad antibacteriana que posee *Lemna gibba* frente a los patógenos evaluados<sup>14</sup>.

En el 2018 se dio a conocer el trabajo de grado titulado actividad antibacteriana del extracto de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente a bacterias patógenas en animales de producción realizado por dos estudiantes de Bacteriología<sup>15</sup> y laboratorio clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, pertenecientes al grupo CEPARIUM, en este trabajo concluyen que todos los extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes* evaluados presentaron cierto grado de actividad antimicrobiana, que varió dentro del grupo de cepas usadas en ese estudio, *Staphylococcus aureus* y el grupo de cepas de Enterobacterias, pero se evidenció mayor sensibilidad en las pruebas realizadas con *Staphylococcus* por los dos métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana que fueron Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca y pruebas de difusión radial en agar.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 Resistencia antibacteriana**

Con el descubrimiento de los antibióticos en el año 1928, por Fleming, hubo una creciente industria y un nuevo campo de investigación en especial por los países desarrollados. Con un interés económico de fondo, la industria de los antibióticos se ha encargado de la lucha contra los agentes microbianos y el control de las infecciones que estos causan. Simultáneamente a esto, se identificó también, la forma en la que los microorganismos, generan mecanismos capaces de evadir la acción nociva de los antibióticos sobre ellos, La resistencia<sup>16</sup>.

La preocupación por el mal y excesivo uso, de los antibióticos, ha aumentado a nivel mundial. En la década de 1980, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) comenzó a tomar medidas para combatir la resistencia a los antimicrobianos con una encuesta sobre las actividades llevadas a cabo en los países de América para monitorear la evolución del problema. Esto condujo a mejoras en la infraestructura de los laboratorios que trabajan en este campo y capacitación para sus recursos humanos. En 1995, dado el creciente problema de las enfermedades emergentes y reemergentes en la región, incluida la resistencia a antibióticos y los nuevos mandatos de sus Órganos Rectores, la OPS intensificó sus esfuerzos en este sentido. El sistema de vigilancia ahora se ha expandido a otros países y actualmente está monitoreando la resistencia<sup>17</sup>.

### **2.2 Fitopatógenos en Colombia**

En Colombia existe una considerable riqueza de especies forestales nativas y cultivos distribuidas por todo el territorio nacional, además Colombia cuenta con una amplia diversidad vegetal debido a sus condiciones climáticas y geográficas que permiten ser potencial para el sector forestal, cuyas zonas óptimas abarcan desde

áreas montañosas hasta tropicales, dispuestas principalmente en plantaciones para uso comercial y reforestación, sin embargo todos los cultivos y especies forestales se ven muy amenazados por el ataque de plagas y enfermedades, en donde los hongos fitopatógenos son el principal agente causal de muchas de las enfermedades en los cultivos<sup>18</sup>.

Los hongos fitopatógenos son los principales limitantes en el desarrollo y productividad de las plantas durante muchos años, y actualmente siguen siendo un factor que genera pérdidas económicas en el país, ya que poseen alta variabilidad genética y resistencia a fungicidas, Los reportes que hay sobre hongos fitopatógenos en especies forestales nativas de Colombia solo se encuentran en algunas de ellas, por lo que el estudio de las enfermedades presentes en este tipo de forestales sigue siendo poco<sup>19</sup>.

### **2.3 Generalidades de los grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas**

Se estima que, en la parte aérea de las plantas, la filosfera, y especialmente en las hojas, existen alrededor de  $10^6$ - $10^7$  células/cm<sup>2</sup> ( $10^8$  células/g) de microorganismos, principalmente bacterias. Gran parte de estos microorganismos forman parte de la ecología vegetal, estableciéndose un equilibrio que se fragmenta por diversos motivos, por ejemplo con la colonización de un microorganismo patógeno. Globalmente las plantas producen más de 100.000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios<sup>19</sup>.

Estas sustancias se pueden dividir, básicamente, en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas, y fitoalexinas, cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana. Un ejemplo de esto es el estudio realizado con los sesquiterpenos producidos en las hojas del algodón en respuesta al patógeno bacteriano *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, donde se encontró que la

cantidad del compuesto dentro y alrededor de las células infectadas era significativamente mayor que la requerida para inhibir el crecimiento del patógeno in vitro <sup>20</sup>.

Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos, Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados, Los principales grupos de compuestos generados por plantas se observan en la figura 1<sup>21</sup>.

Tabla 1. Grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.			
Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

**Figura 1.** Grupos Químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas <sup>21</sup>.

## 2.4 *Eichhornia crassipes*

*Eichhornia crassipes* también conocida como buchón de agua, lirio acuático, Jacinto de agua, lechuguilla, lila de agua, es una de las principales malezas de agua dulce a nivel mundial debido a su rápido crecimiento y reproducción, alta competitividad, movimiento por el viento y corrientes de agua y propagación por el

hombre con fines ornamentales. Además, está considerada entre las 100 especies más invasoras del mundo por la Unión Mundial para la Naturaleza. Ha sido ampliamente cultivada como especie ornamental debido a sus flores tan llamativas<sup>22</sup>.

Es una especie acuática flotante, de raíces sumergidas de libre flotación cuya altura puede llegar a 50 cm e incluso 1 m en condiciones tropicales muy favorables. Origina un rizoma ramificado que puede llegar a 30 cm de longitud, con varios entrenudos cortos los cuales producen una hoja y una raíz. Los brotes axilares desarrollan hojas que son gruesas, brillantes y con aspecto ceroso que sobresalen por encima de la superficie del agua. Tienen forma ovoidea, oval o elíptica que llegan a medir de 2 a 15 cm de longitud y de 2 a 10 cm de anchura, con los bordes ligeramente curvados y con numerosas venas finas y longitudinales<sup>23</sup>. Se disponen espiralmente, dando un aspecto de roseta. Originario de la cuenca del Amazonas y los extensos lagos y pantanos de la región del Pantanal del occidente de Brasil<sup>24</sup>.

*Eichhornia crassipes* una mala hierba acuática invasora ha sido utilizado para diversas actividades de investigación debido a la capacidad de biosorción en la minimización de contaminantes presentes en las aguas residuales industriales, la reducción de la concentración de colorantes, metales pesados y la minimización de TSS (sólidos suspendidos totales), TDS (sólidos totales disueltos), DQO (demanda química de oxígeno) y DBO (demanda biológica de oxígeno) en aguas residuales textiles<sup>25</sup>.

## Información taxonómica

**Reino:** Plantae

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Orden:** Pontederiales

**Familia:** Pontederiaceae

**Género:** *Eichhornia*

**Especie:** *Eichhornia crassipes*

### 2.5 *Lemna* sp

Las especies de *Lemna* son plantas angiospermas (plantas con flores), monocotiledónea, perteneciente a la familia Lemnaceae. Su cuerpo vegetativo corresponde a una forma taloide, es decir, en la que no se diferencian el tallo y las hojas. Consiste en una estructura plana y verde y una sola raíz delgada de color blanco. El tallo ha sido interpretado de diversas maneras: un tallo modificado, una hoja o como parcialmente tallo y hoja. Otros autores consideran que el tallo corresponde a una hoja modificada que cumple las funciones del tallo, la hoja y el eje florífero<sup>26</sup>.

Su tamaño es muy reducido, alcanzando de 2 a 4 mm de longitud y 2 mm de ancho. Es una de las especies de angiospermas más pequeñas que existen en el reino de las plantas. En la misma familia de la lenteja de agua se encuentra *Wolffia*, reportada como la planta con flores de tamaño más reducido que existe en la Tierra; su cuerpo mide sólo 0,6 mm de largo y 0,2 mm de ancho, y su fruto, que es el más pequeño del planeta, mide sólo 0,3 mm de largo y pesa 70 mg<sup>27</sup>.

La lenteja de agua es una planta monoica, con flores unisexuales. Las flores masculinas están constituidas por un solo estambre y las flores femeninas consisten en un pistilo formado por un solo carpelo. El periantio está ausente. Las flores nacen

de una hendidura ubicada en el borde de la hoja, dentro de una bráctea denominada espata, muy común en las especies del orden arales. El fruto contiene de 1 a 4 semillas<sup>28</sup>. La especie más conocida de *Lemna* es *Lemna gibba*, que es la planta que se va analizar en este proyecto.

### **Información taxonómica**

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Orden:** Alismatales

**Familia:** Araceae

**Subfamilia:** Lemnoideae

**Tribu:** Lemneae

**Género:** *Lemna*

**Especie:** *Lemna gibba*

### **2.6 Microorganismos fitopatógenos**

La pérdida de productos agrícolas ocurre debido al ataque de fitopatógenos (principalmente hongos) pueden alcanzar hasta el 50 % de la producción nacional. Debido a la importancia crucial que tiene la agricultura dedicada a productos de exportación en nuestro país, es importante desarrollar tecnologías para la producción, formulación y aplicación de agentes de control biológico (ACB) de fitopatógenos. Antes de que un agente de control biológico sea introducido con éxito en el mercado, es indispensable llevar a cabo una serie de evaluaciones. Después de la selección inicial de un aislado microbiano eficaz, es importante estudiar su ecología, fisiología y modo de acción. De manera paralela, debe desarrollarse un sistema de producción y formulación del ACB para obtener un producto con una vida de anaquel suficientemente alta y que provea al producto ventajas competitivas en el ambiente en el cual será aplicado. Posteriormente, se debe escalar el proceso a nivel

piloto para la obtención de cantidades de producto suficientes para llevar a cabo su evaluación en invernadero y campo. La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por hongos, insectos y virus, quienes colonizan diversas partes de la planta, provocando desde la disminución de la calidad del producto y hasta la pérdida total de la planta. El control de plagas y enfermedades depende, en gran parte, de la aplicación de productos químicos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos, ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental y generada la selección de organismos altamente resistentes. Es por estas dos razones que se requieren nuevas estrategias para el control de plagas y enfermedades. La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y de enfermedades es una alternativa atractiva <sup>29</sup>.

## **2.7 *Xanthomonas* sp.**

El género *Xanthomonas* comprende un grupo de bacterias fitopatógenas Gram negativas dentro de la clase III Gammaproteobacteria. Sus especies son típicamente de forma de bacilo con un solo flagelo polar, son aerobios obligados y requieren una temperatura óptima para su crecimiento de 28 °C. Las colonias bacterianas crecidas en medio artificial son usualmente amarillas debido a la presencia de pigmento en las membranas conocido como xanthomonadina, el cual las protege del daño oxidativo. Dentro de este género, la especie *X. axonopodis* afecta a un amplio rango de hospedantes, encontrándose especies cultivadas de importancia económica, entre ellos el frijol ocasionando la enfermedad del tizón común bacteriano causado por el patovar *phaseoli* <sup>30</sup>.

Esta enfermedad, aún con el daño que provoca en los campos de cultivo, como la reducción en el rendimiento de hasta un 47 %, no se encuentra en status regulado. Los síntomas del tizón común bacteriano son manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por un delgado halo amarillo. Estas manchas pueden desarrollarse en el borde o en diferentes áreas de las hojas. Esta bacteria se encuentra presente en un

83 % de las áreas de producción de semilla y hasta un 79 % en campos comerciales del cultivo, reduciendo los rendimientos hasta en un 55 %, siendo mayores a temperaturas de 27 °C y alta humedad relativa. En las vainas y semillas ocasiona manchas rojizas irregulares con presencia de exudados amarillos cuando la humedad relativa es superior al 80 %. También pueden afectar las semillas, las cuales se tornan arrugadas, o pueden permanecer asintomáticas y manifestarse en las plantas desarrolladas<sup>31</sup>

### **Información taxonómica**

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gamma Proteobacteria

**Orden:** Xanthomonadales

**Familia:** Xanthomonadaceae

**Género:** Xanthomonas

### **2.8 *Lelliottia* spp.**

*Lelliottia* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo. Actualmente, *Lelliottia* es un género de nueva construcción que incluye solo dos especies, que son *L. nimipressuralis* y *L. amnigena*, que anteriormente se consideraban para los géneros *Erwinia* y *Enterobacter*, *lelliottia* fue clave al infectar a un paciente de trasplante de corazón, causando septicemia, además, un aislamiento de *L. amnigena* del suelo agrícola podría reducir efectivamente el nitrato a amoníaco y se informó que tenía un buen potencial para su uso como agente de control biológico antifúngico. las cepas de *Lelliottia* tienen una alta producción de quitinasa y producían proteasas, inhibiendo el crecimiento de *Fusarium sp* y *Macrophomina phaseolina*. *L. nimipressuralis* infectan naturalmente los olmos y muestran síntomas de la enfermedad de la madera húmeda en las plantas y pueden causar

marchitez de la piraca este es el primer informe de *L. amnigena* que causa naturalmente enfermedad de pudrición blanda en la planta<sup>32</sup>.

### **Información taxonómica**

**Reino:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Lelliottia*

### **2.9 *Ralstonia* sp.**

*Ralstonia* spp es una bacteria de suelo bacilo Gram-negativo patógena de las plantas causante de La enfermedad del “Moko” que es la enfermedad bacterial más limitante en la producción de banano y plátano en Colombia. Uno de los problemas fitopatológicos más limitantes en la producción de plátano y banano en las regiones productoras. La bacteria cuenta con un amplio rango de hospederos, cerca de 50 familias botánicas y más de 200 especies. En plantaciones de banano y plátano de Colombia la bacteria se asocia con arvenses que se encuentran en altas poblaciones contribuyendo a su sobrevivencia y permanencia en el campo. las colonias de *ralstonia* son de color vino tinto con presencia de un halo dorado, ligeramente fluido y centro rosado presenta tolerancia al KOH al 3%, es oxidasa y catalasa positiva ,presenta reducción de nitratos, una prueba clave es el crecimiento a 41 °C y tolerancia a sales.<sup>33</sup>

## Información taxonómica

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Betaproteobacteria

**Orden:** Burkholderiales

**Familia:** Ralstoniaceae

**Género:** *Ralstonia*

### 2.10 *Botrytis* sp.

*Botrytis* sp. Es un hongo fitopatógeno causante de la pudrición gris en muchas especies utilizando diferentes mecanismos de infección, este patógeno puede atacar a un cultivo en cualquier estado de desarrollo y a cualquier parte de la planta. En los frutos causa ablandamiento, liberación de jugo, desprendimiento de epidermis y forma micelio blanquecino que posteriormente se vuelve de color plomizo, debido a la proliferación de estructuras reproductivas como conidióforos y conidias<sup>34</sup>.

## Información taxonómica

**Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Subfilo:** Pezizomycotina

**Clase:** Leotiomycetes

**Orden:** Helotiales

**Familia:** Sclerotiniaceae

**Género:** *Botryotinia*

### 2.11 *Fusarium* sp.

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su ocurrencia es

cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Muchas especies del género *Fusarium* tienen una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas. Algunas especies pueden causar infecciones oportunistas en el hombre y en los animales y algunas pocas producen toxinas que pueden afectar al hombre y a los animales. Algunas especies del género *Fusarium* son benéficas en la agricultura y se han utilizado en el control biológico de ciertas enfermedades causadas por especies patogénicas, principalmente de aquellas pertenecientes a la especie *Fusarium oxysporum*. Algunas especies se han utilizado como mico herbicidas, por su potencial para destruir algunas malezas. Las enfermedades de las plantas causadas por especies del género *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y de tallos, pudrición de frutos, granos y semillas. En el género *Fusarium* se han reconocido entre nueve y 78 especies, dependiendo del sistema taxonómico utilizado, el cual se basa principalmente en las características culturales de las colonias y de las esporas del hongo. La clasificación taxonómica del género es bastante controvertida según diversos taxónomos. Snyder y Hansen y Messian y Cassini reconocen nueve especies, Gordon considera 26 especies, Booth 44 especies, Wollenweber y Reinking 65 especies y Gerlach reconoce 78 especie. Esto muestra la complejidad taxonómica del género *Fusarium*; por tal razón, la identificación de las especies debe ser hecha por expertos para evitar errores <sup>35</sup>.

### **Información taxonómica**

**Reino:**Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Nectriaceae

**Género:** *Fusarium*

### 3 DISEÑO METODOLÓGICO.

#### 3.1 Tipo de investigación

Cuantitativo descriptivo.

##### **Universo**

Plantas, microorganismos fitopatogenos

##### **Población**

Extractos vegetales de plantas y microorganismos fitopatogenos

##### **Muestra**

Extractos vegetales de las plantas macrófitas, 3 bacterias y 3 hongos fitopatogenos.

#### 3.2 Hipótesis

Los extractos de las plantas macrófitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, presentan actividad antimicrobiana frente a un panel de 3 bacterias y 3 hongos fitopatogenos.

### 3.3 Variables e indicadores.

**Tabla 1.** Objetivos, variables, indicadores y resultados esperados.

OBJETIVOS	Variable independiente	Variable dependiente	Indicador	Resultado esperado
Obtener extractos orgánicos en las plantas macrófitas ( <i>Eichhornia crassipes</i> y <i>Lemna gibba</i> ).	Especímenes de plantas <i>E. crassipes</i> y <i>L. gibba</i> en condiciones aceptables según criterios de escogencia. Según época de recolección y localización del material vegetal.	Actividad biológica de extractos de las plantas macrófitas ( <i>Eichhornia crassipes</i> y <i>Lemna gibba</i> ) frente a los microorganismos fitopatogenos escogidos.	Obtención de extractos homogéneos y con características idénticas de las plantas macrófitas.	Extractos de las plantas macrófitas ( <i>Eichhornia crassipes</i> y <i>Lemna gibba</i> ).
Comparar la actividad antibacteriana de los extractos frente a los patógenos aislados.	Tipo, naturaleza y comportamiento de los microorganismo elegidos. Interferencia de los solventes utilizados en la obtención de los extractos	Actividad antibacteriana, Sensibilidad o resistencia de los patógenos a los extractos obtenidos Medios de cultivo utilizados en el desarrollo de los ensayos. Conservación de los microorganismos utilizados	Sensibilidad, resistencia y CMI de los extractos obtenidos frente a microorganismos fitopatogenos	Actividad antibacteriana de los extractos y fitoquímicos de <i>E. crassipes</i> y <i>L. gibba</i> en los fitopatogenos. CMI de cada extracto según patógeno

### 3.4 Fase 1: Técnica y procedimientos

#### 3.4.1 Recolección del material vegetal

Las plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, se recolectaron en canales anexos del humedal tierra blanca (figura 2, 3), el cual se encuentra localizado al nororiente del casco urbano del municipio de Soacha. La recolección la realizaron los estudiantes del grupo de investigación CEPARIUM, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.



**Figura 2.** Canales anexos al humedal Tierra blanca (*Eichornnia crassipes*)

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura3.** Canales anexos al humedal tierra blanca (*Lemmna gibba*)

**Fuente:** Autores 2018.

### **3.4.2 Aspectos importantes en la recolección de las muestras.**

Los aspectos tenidos en cuenta para la recolección de las muestras fueron los siguientes: ausencia de sintomatología de invasión de hongos o bacterias, ausencias de manchas o cortes superficiales, ausencias de elementos extraños en raíz, tallo u hoja.

### 3.4.3 Transporte de las muestras.

Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas, debidamente rotuladas y puestas a su vez en recipientes de icopor.

## 3.5 Procesamientos del material vegetal

### 3.5.1 Separación y lavado del material vegetal.

Para el procesamiento de la muestra de *Eichhornia crassipes* o Buchón de agua, fue necesario separar sus partes en: raíz, tallo y hojas, (figura 5, 6, 7) su lavado se realizó de esta misma forma, se procesaron y se evaluó su actividad antimicrobiana por separado. Por otra parte, la lenteja de agua (*Lemna gibba*) no se separó debido a su tamaño. (Figura 4)



**Figura 4.** Proceso de lavado y separación de (*Lemna gibba*)

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 5.** Proceso de lavado y separación de Hojas de *Eichhornia crassipes*

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 6.** Proceso de lavado y separación de Tallo de *Eichhornia crassipes*.

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 7.** Proceso de lavado y separación de Raíz de *Eichhornia crassipes*

**Fuente:** Autores 2018.

### 3.5.2 Secado de las muestras.

Las muestras se envolvieron en papel kraft por separado y se dejaron en invernadero a una temperatura promedio de 27°C, durante 15 días. (Figura 8)



**Figura 8.** Secado y almacenamiento de muestra. **Fuente:** Autores 2018.

### **3.5.3 Almacenamiento de las muestras.**

Las muestras fueron almacenadas en bolsas de papel, debidamente marcadas hasta su procesamiento. (Figura 8)

### **3.6 FASE 2: Obtención de los extractos.**

Para la obtención de los extractos del material vegetal se realizó el siguiente procedimiento.

Seguido a la limpieza y secado del materia vegetal, se procedió a reducir su tamaño, cortando todas la muestras por separado en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 cm.

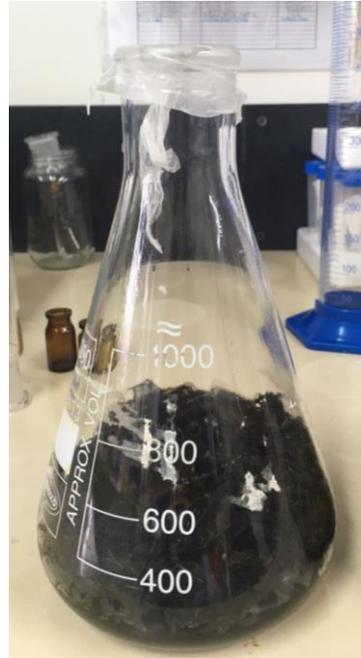
Se pesó en gramos el material obtenido (Tabla 2) y se depositó en los frascos dispuestos para la extracción. (Figura 9, 10, 11, 12)

Se adiciono el solvente, en este caso se utilizó Diclorometano, hasta cubrir completamente el material vegetal dentro del recipiente. Se tapó y se dejó reposar durante 24 horas.



**Figura 9.** *Lemna gibba*

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 10.** Raíz de *Eichhornia crassipes*

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 11.** Hojas de *Eichhornia Crassipes*

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 12.** Tallo de *Eichhornia crassipes*

**Fuente:** Autores 2018.

A las 24 horas de reposo, se filtró el material vegetal, dándole paso por un papel filtro. (Figura 13) Se recuperó el solvente con ayuda de un rota evaporador. Este proceso se repitió 3 veces. (Figura 14, 15)



**Figura 13.** Proceso de Filtrado del extracto obtenido con Dicloromentano

**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 14.** Balones listos para pasar por el rotaevaporador **Fuente:** Autores 2018.



**Figura 15.** Proceso de Rota evaporación

**Fuente:** Autores 2018.

El producto final se pesó (Tabla 3), se envaso en viales ámbar (Figura16), y se almacenó en refrigeración.

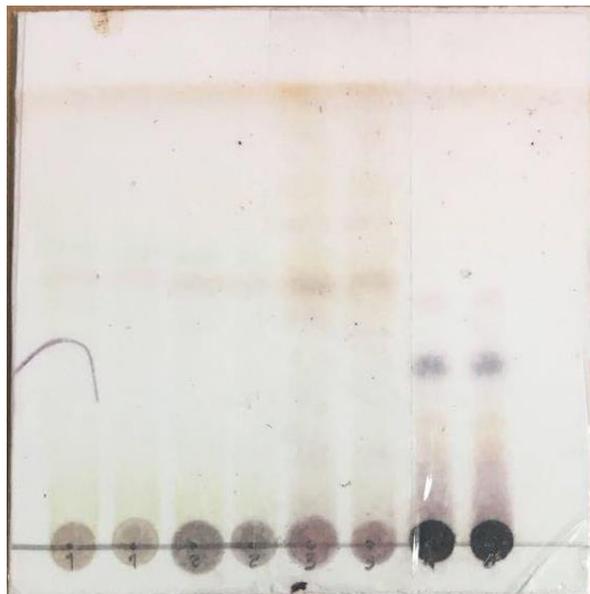


**Figura 16.** Viales ambar con extracto.

**Fuente:** Autores 2018.

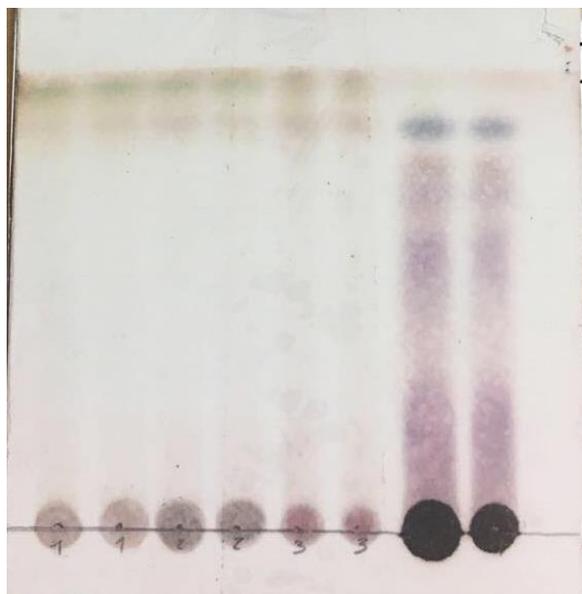
Se procede a realizar cromatografía en capa fina para determinar el tipo de polaridad que tienen cada extracto obtenido, para realizar la cromatografía se usan dos tipos de solventes con diferente polaridad cada uno, Acetato de etilo con un índice de polaridad de 4.4 lo cual lo hace un compuesto polar y Hexano con un índice de polaridad de 0.1 lo cual lo hace un compuesto apolar.

Se realizan dos cromatografías en capa fina con diferentes tipos de concentraciones de cada solvente para garantizar que allí aparezcan los compuestos polares y apolares, en la primera cromatografía se mezcla Hexano + Acetato de etilo 8:2 en 10 ml lo cual quiere decir que ponemos 8 ml de Hexano y 2ml de Acetato de etilo, (Figura 17) y en la segunda cromatografía se mezclan los mismos componentes pero con diferente concentración en este caso sería 1:1 en 10 ml (Figura 18) lo cual quiere decir que se agregó 5ml de Hexano y 5ml de Acetato de etilo, en las dos cromatografías se realiza por duplicado cada muestra es decir dos puntos de *Lemna gibba* siendo la muestra 1, dos de tallo de *Eichhornia crassipes* siendo la muestra 2, dos de raíz de *Eichhornia crassipes* siendo la muestra 3 y dos de hoja de *Eichhornia crassipes* siendo la muestra 4.



**Figura 17.** Cromatografía 8:2, donde se evidencian los compuestos apolares.

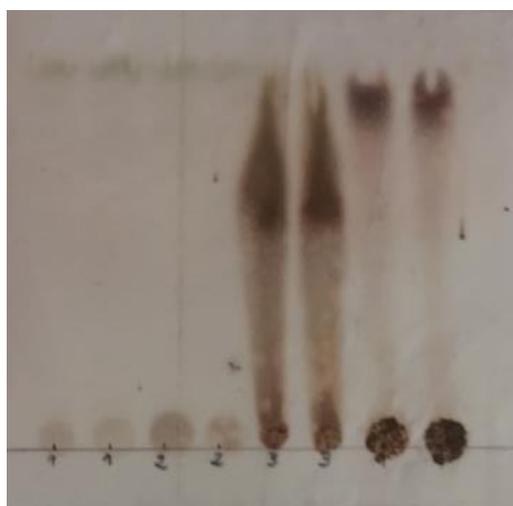
**Fuente:** Autores 2018.



**Figura 18.** Cromatografía 1:1, donde se evidencian más los compuestos polares.

**Fuente:** Autores 2018.

Posterior a estas cromatografías se tomó la decisión de realizar una tercera cromatografía en Acetato de etilo al 100% (Figura 19) para ver mejor la totalidad de compuestos polares, en esta cromatografía se tuvo en cuenta el mismo patrón de muestras.



**Figura 19.** Cromatografía 100% en Acetato de etilo. **Fuente:** Autores 2018.

Se evidencia la totalidad de compuestos polares como la raíz de *Eichhornia*

*crassipes* y la hoja de *Eichhornia crassipes*.

### **3.7 FASE 3: Obtención y conservación de los microorganismos fitopatógenos.**

Se escogieron 6 microorganismos para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana, 3 bacterias: *Lelliottia* sp, *Xanthomonas* sp, *Ralstonia* sp, y 3 hongos: *Fusarium* sp y 2 cepas de *Botrytis* sp. Aisladas de lugares diferentes.

Las cepas de los hongos se recuperaron en Agar PDA (agar papa dextrosa) realizando tres pases con el fin de estabilizar cada cultivo. Por otro lado, las cepas de las bacterias se recuperaron en agar nutritivo, y agar selectivo para cada una.

Se confirmó la identificación de microorganismos, valorando sus características microscópicas y macroscópicas. A las bacterias se les realizaron pruebas bioquímicas para confirmar la pureza de los aislamientos.

Las cepas de *Fusarium* sp, *Ralstonia* sp, y una de las cepas de *Botrytis* sp, fueron donadas por el centro de Biosistemas de la universidad Jorge Tadeo Lozano, las cepas restantes fueron tomadas del grupo de investigación CEPARIUM de la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Todas las cepas fueron aisladas de procesos patógenos sistémicos o superficiales de plantas. Y todas cuentan con información de origen suficiente para establecer las hojas de vida respectivas (Anexos).

### **3.8 FASE 4: Medición de la actividad antimicrobiana.**

#### **3.8.1 Difusión en Agar**

Las pruebas de actividad antifúngica y antibacteriana se realizaron para cada microorganismo por triplicado.

Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetros de papel Whatman N° 1 previamente esterilizados, los cuales fueron impregnados con 15 µl de cada extracto, diluido con

acetato de Etilo, a una concentración de 20 µg/µl.

#### Actividad antibacteriana

Se utilizaron como cepas control, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 que tienen como característica principal su resistencia y sensibilidad a los antibióticos carbapenémicos, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 resistente a ellos y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 sensible.

Los sensibilizadores se colocan sobre cajas de Petri con 25 ml de agar Mueller Hinton e inoculadas con un hisopo de algodón estéril, con una suspensión bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ mL, esta concentración fue obtenida comparando la suspensión bacteriana con el patrón comercial de la escala Mc Farland 0.5.

Posteriormente, ya con los sensibilizadores en la caja, se incubaron a una temperatura de 29°C durante 48 horas. Como control negativo se utilizaron sensibilizadores impregnados con la misma cantidad del solvente utilizado para reconstituir los extractos (Acetato de etilo) y como control positivo se utilizaron sensibilizadores de Doripenem.

#### Actividad anti fúngica

Como cepas control se utilizaron *Aspergillus brasiliensis*. ATCC 16404, y *Candida albicans*. ATCC 10231 cepas recomendadas por ATCC para ser usadas en métodos para la evaluación de agentes antimicrobianos. Este ensayo se desarrolló basado en la técnica descrita por Madubunyi 1995, en la cual, a partir de un microorganismo incubado en agar PDA, se le añaden 10 mL, de caldo Mueller Hinton, se agita y se filtra utilizando gasa estéril. A esta solución que contiene los conidios se inocula sobre una caja de Petri con 25 ml agar Mueller Hinton en una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL.

Se prepararon los inóculos de los hongos, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, basados en la técnica de recuento en cámara New Bauer.

La actividad anti fúngica se evaluó midiendo el halo de inhibición generado por cada

sensidisco, al igual que en la evaluación antibacteriana, en este ensayo también se utilizaron como control negativo, sensidiscos impregnados con acetato de etilo en la misma cantidad en la que se utilizó para reconstruir los extractos y como control positivo se usó fungicida Captan 80 GW.

### **3.8.2 Concentración mínima inhibitoria CMI**

Es método de referencia para el estudio de actividad antimicrobiana así como CMI según protocolos de CLSI <sup>36</sup>.

En microplacas de Elisa de 96 pozos, Se agregó caldo Mueller Hinton, concentración de los extractos e inóculo de cada microorganismo. En la En la primera columna de pocillos, se agregó 100 ul de los extractos a una concentración de 40 mg/ml y 100 ul de caldo Mueller Hinton, y según protocolo se realizaron diluciones 1:2 hasta la columna 8 de cada extracto <sup>41</sup>. El inóculo en el caso de las bacterias, se tomó del colonias con 24 horas de crecimiento y garantizando su pureza, en tubos estandarizados con solución diluyente obteniéndose una suspensión bacteriana de 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml). Para el ensayo con hongos se tomó el inóculo de una solución estandarizada que contenía aproximadamente  $1 \times 10^6$  conidios/ml de cada cepa. Se agregó 10 ul del inóculo del microorganismo a cada columna. Las dos primeras columnas se tomaron como controles. La columna 1 se tomó como control negativo al cual se le agrego solo caldo sin ningún inóculo. La columna 2 se tomó como control positivo, allí se agregó caldo Mueller Hinton en conjunto con el inóculo de la bacteria. Se incubaron las microplacas durante 24 horas a 37 °C para las bacterias y durante 7 siete días a temperatura ambiente para los hongos. La lectura de las microplacas se realizó por mínima concentración en la cual se observa crecimiento y comparando con los controles positivo y negativo, validando de esta manera la prueba.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pesos finales

Los pesos finales se relacionan en la tabla a continuación.

MATERIAL VEGETAL	PESO SECO
Hoja de <i>Eichhornia crassipes</i>	38.66g
Tallo de <i>Eichhornia crassipes</i>	53.66g
Raíz de <i>Eichhornia crassipes</i>	89.17g
<i>Lemna gibba</i>	21.18g

**Tabla 2.** Peso seco final del material vegetal

MATERIAL VEGETAL	PESO FINAL DEL EXTRACTO.
Hoja de <i>Eichhornia crassipes</i>	1.597g
Tallo de <i>Eichhornia crassipes</i>	1.490g
Raíz de <i>Eichhornia crassipes</i>	1.446g
<i>Lemna gibba</i>	3.283g

**Tabla 3.** Peso de extracto de cada material vegetal

### 4.2 DIFUSIÓN RADIAL EN AGAR (Bacterias)

La actividad antibacteriana se evaluó midiendo el halo de inhibición generado por cada sensidisco. A continuación se presentan las tablas de resultados obtenidas por las bacterias, en las columnas de cada tabla se observan 3 repeticiones de cada montaje que se denominan de la siguiente manera R1: repetición 1, R2: repetición 2, R3: repetición 3, y promedio: que es la media promediada de las tres repeticiones, posterior a esto se

observan en las filas de cada tabla los extractos que se usaron para cada montaje siendo L: *Lemna gibba* , H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

La lectura de cada halo de inhibición se midió en estereoscopio (Figura 21,24, 27) con una regla pie de rey para ser más exactos en las medidas de los halos.

#### 4.2.1 *Xanthomonas* sp.



**Figura 20.** Difusión radial en agar de *Xanthomonas* sp. **Fuente:** Autores 2018.



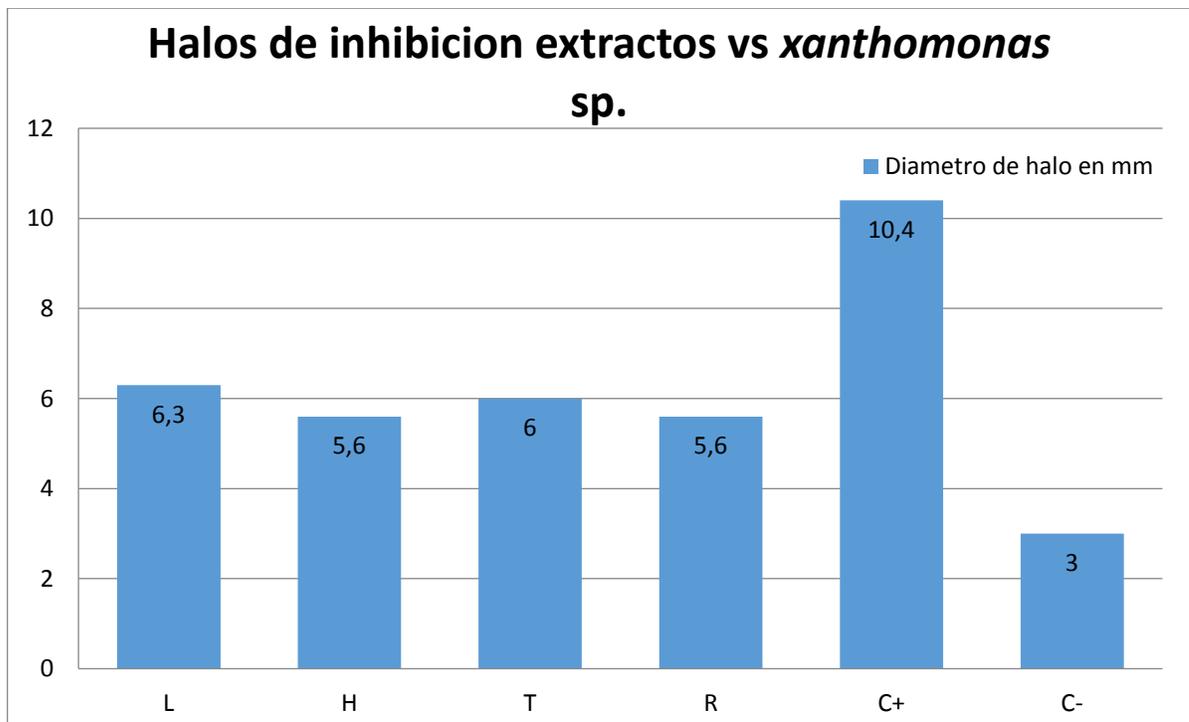
**Figura 21.** Halo de inhibición de extractos vs *Xanthomonas* sp. leído bajo

**Tabla de halos extractos vs *Xanthomonas* sp.**

R1: repetición 1, R2: repetición 2, R3: repetición 3, y promedio: media promediada de las tres repeticiones, L: *Lemna gibba* , H: Hoja de *Eichhornia crassipes*, T: tallo de *Eichhornia crassipes*, R: raíz de *Eichhornia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

	L	H	T	R	C+	C-
R1	6mm	7mm	6mm	6mm	10,1mm	3mm
R2	6mm	5mm	6mm	5mm	10,2mm	3mm
R3	7mm	5mm	6mm	6mm	20,1mm	3mm
PROMEDIO	6,3mm	5,6mm	6mm	5,6mm	10,4mm	3mm

**Tabla 4.** Actividad antimicrobiana de Extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes* frente a *Xanthomonas* sp.



L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichhornia crassipes*, T: tallo de *Eichhornia crassipes*, R:

raíz de *Eichhornia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

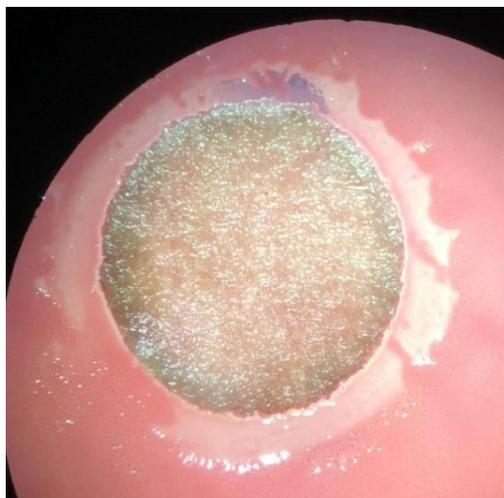
**Figura 22.** Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de *Xanthomonas* sp.

La actividad antibacteriana del extracto de las plantas macrófitas vs *Xanthomonas* sp. Oscilo entre 6,3 y 5,3mm el diámetro de halo de inhibición, siendo el extracto de *Lemna gibba* el que mejor actividad tuvo con un halo de inhibición de 6,3mm frente al Fitopatógeno, seguido del Tallo de *Eichhornia crassipes* con 6,0 mm de diámetro, en tercer lugar está la raíz de *Eichhornia crassipes* con 5,6mm de diámetro y por último la hoja de *Eichhornia crassipes* con 5,3 mm de diámetro.

#### 4.2.2 *Ralstonia* sp.



**Figura 23.** Difusion radial en agar de *Ralstonia* sp. Fuente: Autores 2018.



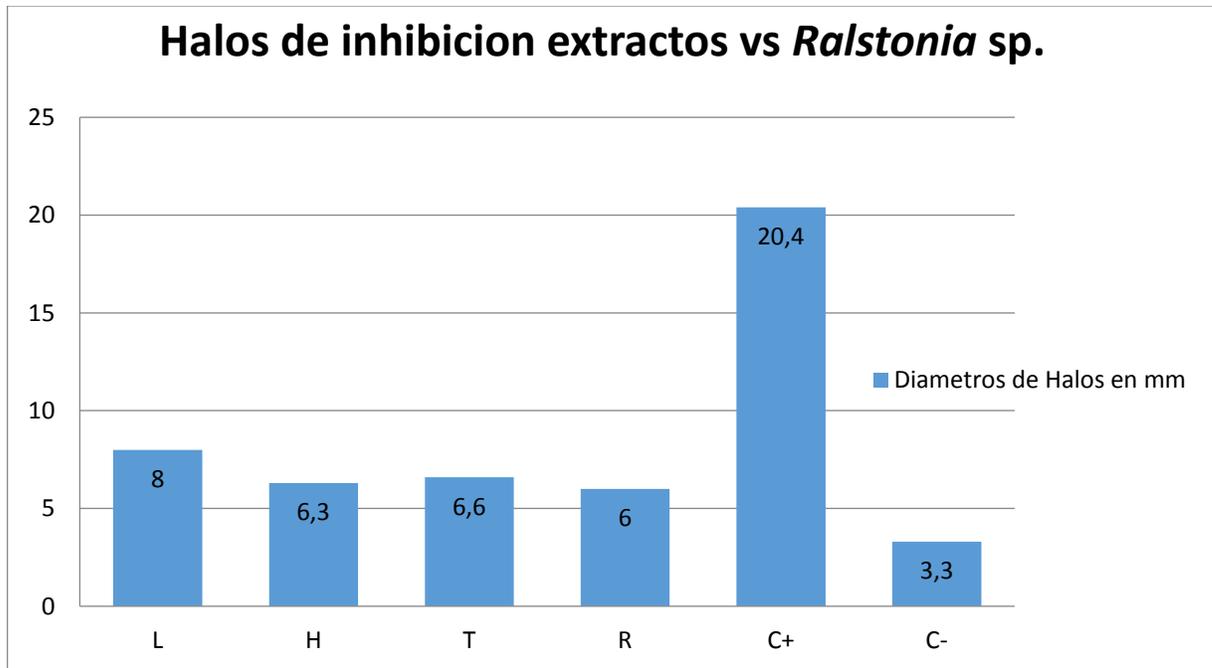
**Figura 24** Halo de inhibición de extractos vs *Ralstonia* sp. leído bajo estereoscopio **Fuente:** Autores 2018

### **Tabla de halos extractos vs *Ralstonia* sp.**

R1: repetición 1, R2: repetición 2, R3: repetición 3, y promedio: media promediada de las tres repeticiones, L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

	L	H	T	R	C+	C-
R1	7mm	7mm	8mm	6mm	20,3mm	3mm
R2	10,0mm	5mm	5mm	5mm	20mm	3mm
R3	7mm	7mm	7mm	7mm	30,1mm	4mm
PROMEDIO	8mm	6,3mm	6,6mm	6mm	20,4mm	3,3mm

**Tabla 5.** Actividad antimicrobiana de Extractos de *Lemna gibba* y *Eichornnia crassipes* frente a *Ralstonia* sp.

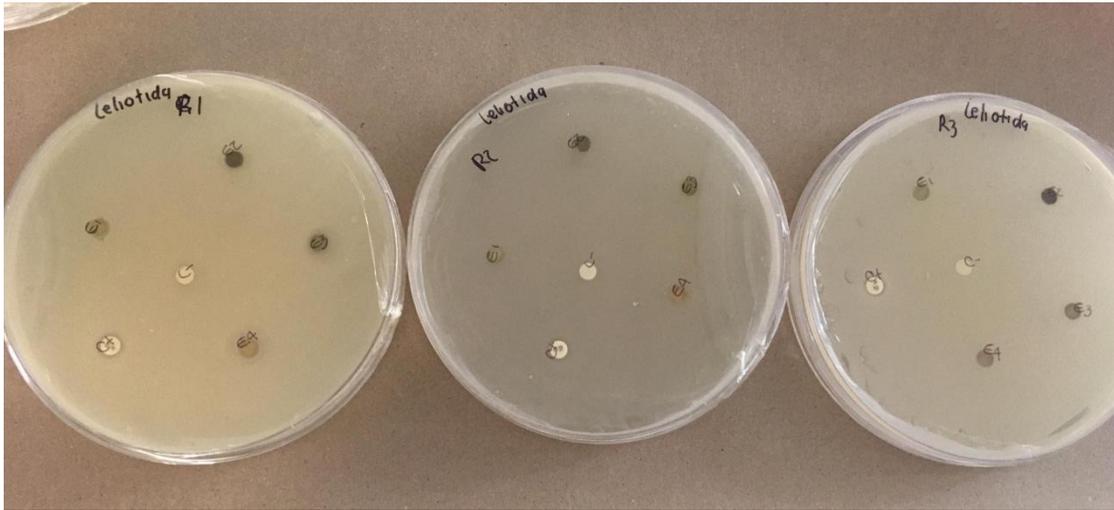


L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

**Figura 25.** Grafica de diámetro de halos de inhibición en mm de *Ralstonia* sp.

La actividad antibacteriana del extracto de las plantas macrófitas vs *Ralstonia* sp. Oscilo entre 8,0 y 6,0 mm el diámetro de halo de inhibición, siendo el extracto de *Lemna gibba* el que mejor actividad tuvo con un halo de inhibición de 8,0 mm frente al fitopatógeno, seguido del tallo de *Eichornnia crassipes* con 6,6mm de diámetro en tercer lugar está la hoja de *Eichornnia crassipes* con 6,3mm de diámetro y por último la raíz de *Eichornnia crassipes* con 6,0mm de diámetro.

### 4.2.3 *Lelliottia* sp.



**Figura 26.** Difusión radial en agar de *Lelliottia* sp. **Fuente:** Autores 2018.



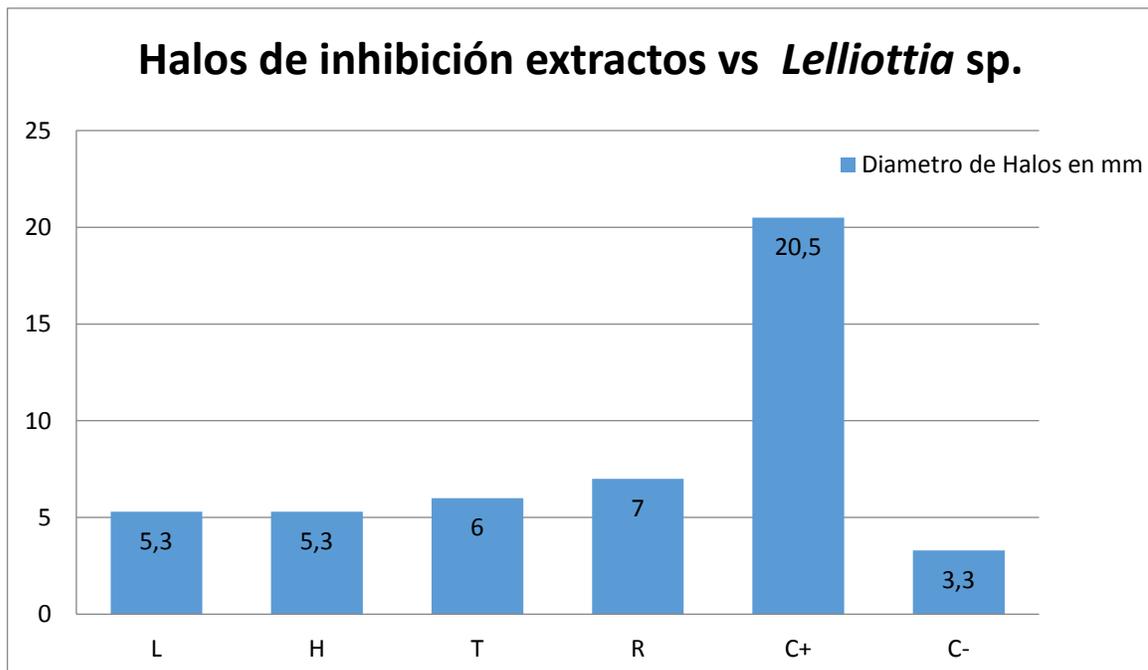
**Figura 27.** Halo de inhibición de extractos vs *Lelliottia* sp. leído bajo estereoscopio **Fuente:** Autores 2018.

### Tabla de halos extractos vs *Lelliottia* sp.

R1: repetición 1, R2: repetición 2, R3: repetición 3, y promedio: media promediada de las tres repeticiones, L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

	L	H	T	R	C+	C-
R1	5mm	7mm	8mm	9mm	20,6mm	4mm
R2	6mm	4mm	5mm	6mm	20,5mm	3mm
R3	5mm	5mm	5mm	6mm	20,5mm	3mm
PROMEDIO	5,3mm	5,3mm	6mm	7mm	20,5mm	3,3mm

**Tabla 6.** Actividad antimicrobiana de Extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes* frente a *Lelliottia* sp.



L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

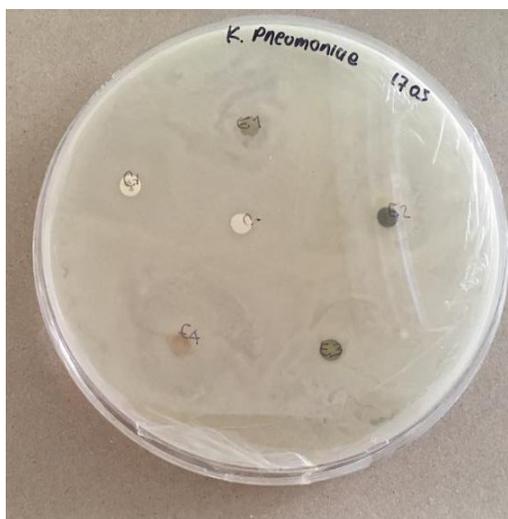
**Figura 28.** Grafica de diametro de halos de inhibicion en mm de *Lelliottia* sp.

La actividad antibacteriana del extracto de las plantas macrófitas vs *Lelliottia* sp. Oscilo entre 7,0 y 5,3mm el diámetro de halo de inhibición, donde el extracto de Raíz de *Eichhornnia crassipes* el que mejor actividad tuvo con un halo de inhibición de 7,0mm frente al fitopatógeno, seguido del Tallo de *Eichhornnia crassipes* con 6,0mm de diámetro y por ultimo *Lemna gibba* y la hoja de *Eichhornnia crassipes* con 5,3 mm de diámetro.

#### 4.2.4 Crecimiento de la cepas control ATCC

Las cepas usadas como control para la validación de las pruebas fueron cepas de *K. pneumoniae* ATCC 1705 y 1706, se realizó el montaje al mismo tiempo que las bacterias y se dejaron con las mismas condiciones de incubación.

#### 4.2.5 *K. pneumoniae* ATCC 1705



**Figura 29.** Difusión radial en agar de *K. pneumoniae* ATCC 1705

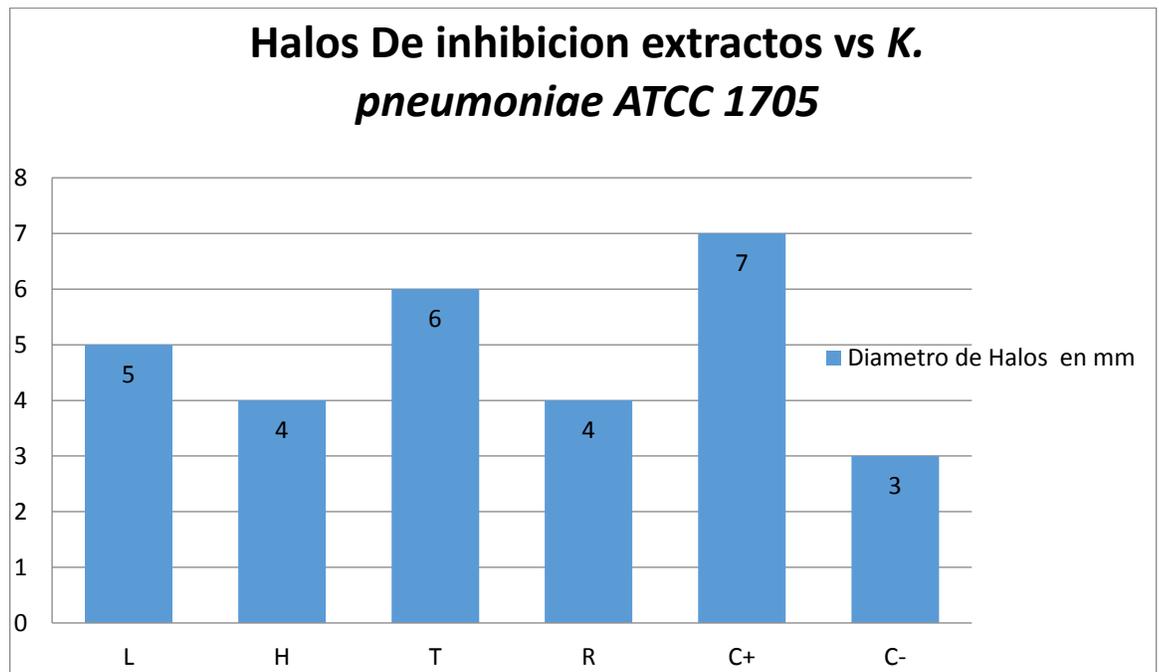
**Fuente:** Autores 2018.

## Tabla de halos extractos vs *k. pneumoniae* ATCC 1705

R1: repetición 1, L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

	L	H	T	R	C+	C-
R1	5,0mm	4,0mm	6,0mm	4,0mm	7,0mm	3,0mm

**Tabla 7.** Actividad antimicrobiana de Extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes* frente a *K. pneumoniae* ATCC 1705.



L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

**Figura 30.** Grafica de diametro de halos de inhibicion en mm de *K. pneumoniae* ATCC 1705

La actividad antibacteriana del extracto de las plantas macrófitas vs *K. pneumoniae* ATCC 1705 oscilo entre 6,0 y 4,0mm el diámetro de halo de inhibición, siendo el

extracto de tallo de *Eichhornia crassipes* el que mejor actividad tuvo con un halo de inhibición de 6,0mm frente al fitopatógeno, seguido de *Lemna gibba* con 5,0mm de diámetro y por último la hoja de *Eichhornia crassipes* y la raíz de *Eichhornia crassipes* con 4,0 mm de diámetro.

#### 4.2.6 *K. pneumoniae* ATCC 1706



**Figura 31.** Difusión radial en agar de *K. pneumoniae* ATCC 1706

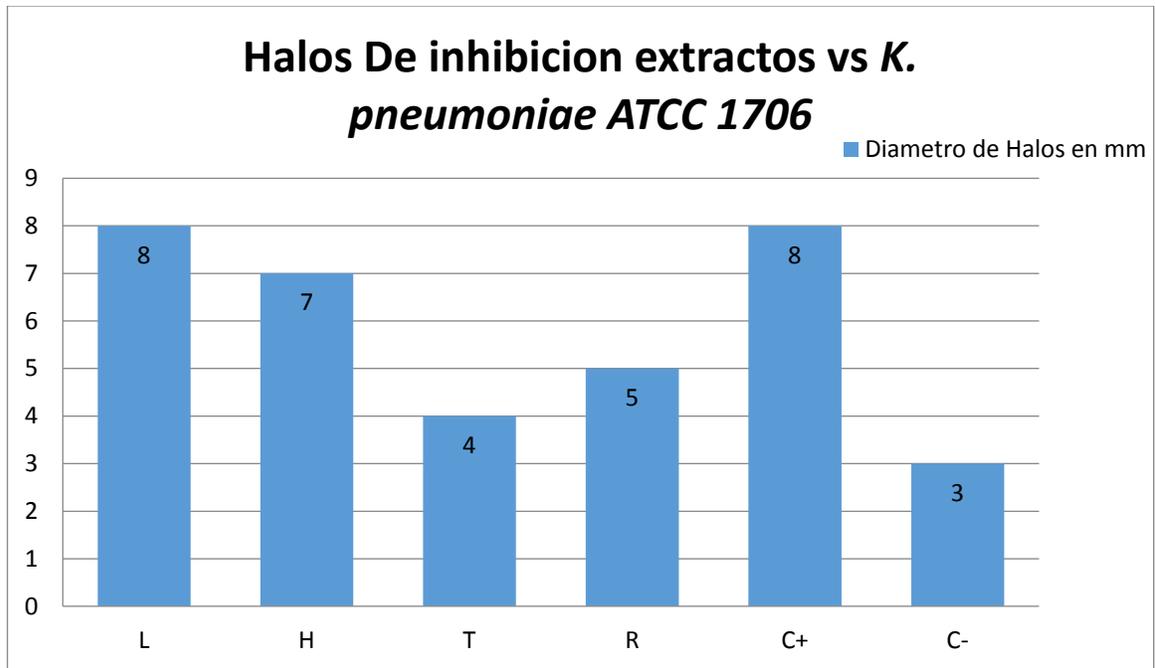
**Fuente:** Autores 2018.

#### **Tabla de halos extractos vs *k. pneumoniae* ATCC 1706**

R1: repetición 1, L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichhornia crassipes*, T: tallo de *Eichhornia crassipes*, R: raíz de *Eichhornia crassipes*, C+: control positivo y C- : control negativo.

	L	H	T	R	C+	C-
R1	8,0mm	7,0mm	4,0mm	5,0mm	8,0mm	3,0mm

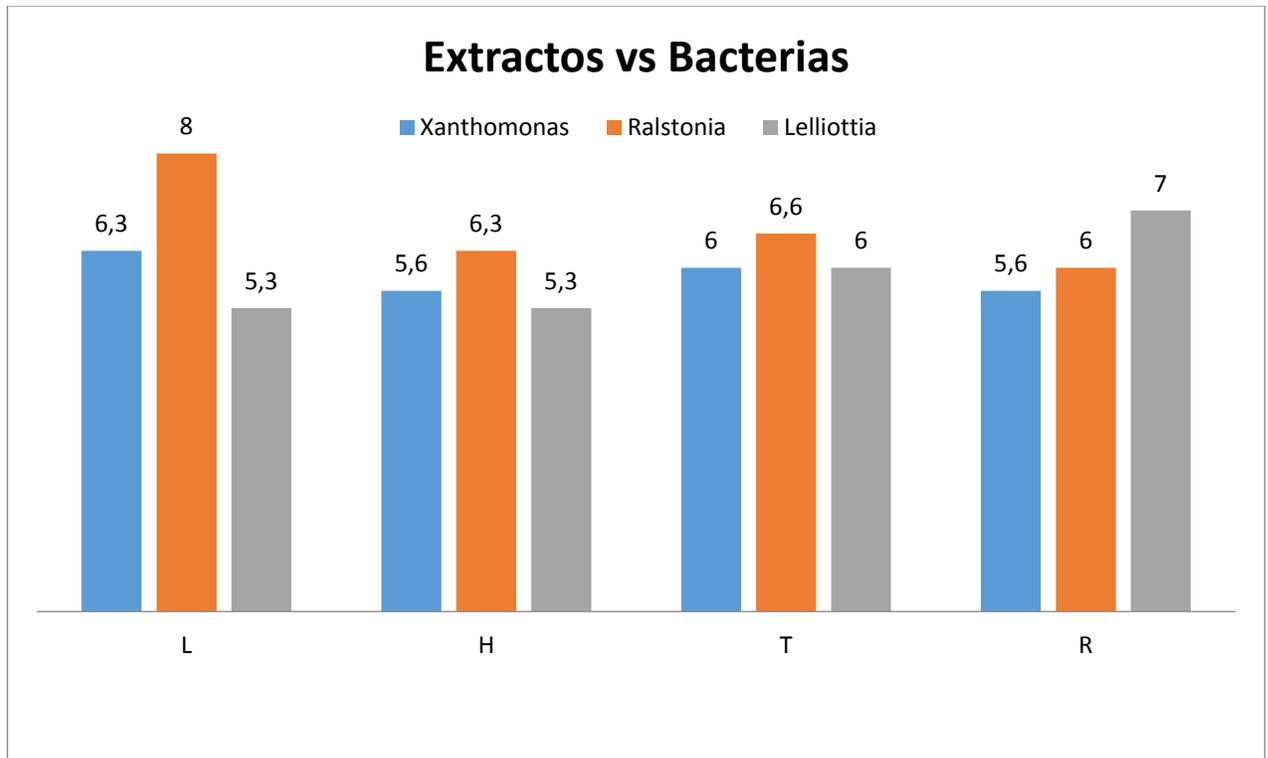
**Tabla 8.** Actividad antimicrobiana de Extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes* frente a *K. pneumoniae* ATCC 1706



L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichhornnia crassipes*, T: tallo de *Eichhornnia crassipes*, R: raíz de *Eichhornnia crassipes*, C+: control positivo y C-: control negativo.

**Figura 32.** Grafica de diametro de halos de inhibicion en mm de *K. pneumoniae* ATCC 1706

La actividad antibacteriana del extracto de las plantas macrófitas vs *K. pneumoniae* ATCC 1706. Oscilo entre 8,0 y 4,0mm el diámetro de halo de inhibición, siendo el extracto de *Lemna gibba* el que mejor actividad tuvo con un halo de inhibición de 8,0mm frente al fitopatógeno, seguido del Hoja de *Eichhornnia crassipes* con 7,0mm de diámetro, en tercer lugar está la raíz de *Eichhornnia crassipes* con 5,0mm de diámetro y por último el tallo de *Eichhornnia crassipes* con 4,0 mm de diámetro



L: *Lemna gibba*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*.

**Figura 33.** Extracto con mejor actividad antimicrobiana en técnica de difusión radial en agar.

La actividad antibacteriana de los extractos fue muy similar en cada bacteria fitopatogena, sin embargo con los datos obtenidos se puede identificar cual fue el extracto que mejor actividad antibacteriana tuvo en estos ensayos, en el caso de *Xanthomonas* sp. Se ve que el extracto con mejor actividad fue (L) *Lemna gibba* con un halo de inhibición de 6,3mm de diámetro, lo mismo se puede observar en *Ralstonia* sp. El extracto con mejor actividad también fue (L) *Lemna gibba* con un halo de inhibición de 8,0mm de diámetro, y para *Lelliottia* sp. El extracto con mejor actividad fue (R) raíz de *Eichornnia crassipes* con un halo de inhibición de 7.0mm de diámetro. Así se puede afirmar que con un 66.6% *Lemna gibba* tiene una mayor

actividad antibacteriana en el ensayo de difusión radial en agar.

### 4.3 DIFUSION RADIAL EN AGAR (hongos)

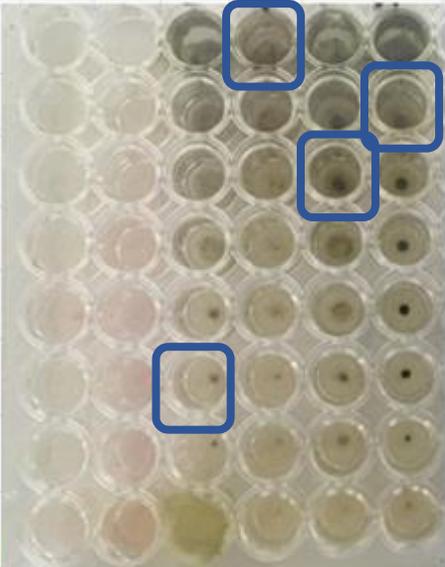
En la actividad anti fúngica no se pudieron interpretar los halos de inhibición debido a que no hubo un crecimiento homogéneo en los medios de cultivo.

### 4.4 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA EN MICROPLACA (bacterias)

A continuación se muestran las imágenes de los ensayos en microplacas de cada una de las bacterias (*Lelliottia sp*, *Xanthomonas sp* y *Ralstonia sp*). Se debe tener en cuenta que en cada imagen se señala la dilución en la que esta cada pozo de la microplaca y el tipo de extracto que está en cada fila, (C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna Gibba*, R: Raíz de *Eichhornia crassipes*, T: tallo de *Eichhornia crassipes*, H: Hoja de *Eichhornia crassipes*).

#### 4.4.1 *Lelliottia sp.*

Dilución	C-	C+	L	R	T	H
1:2 40mg/ml						
1:4 20 mg/ml						
1:8 10mg/ml						
1:16 5mg/ml						
1:32 2.5mg/ml						
1:64 1.25mg/ml						
1:128 0.625mg/ml						
1:256 0.3125mg/ml						



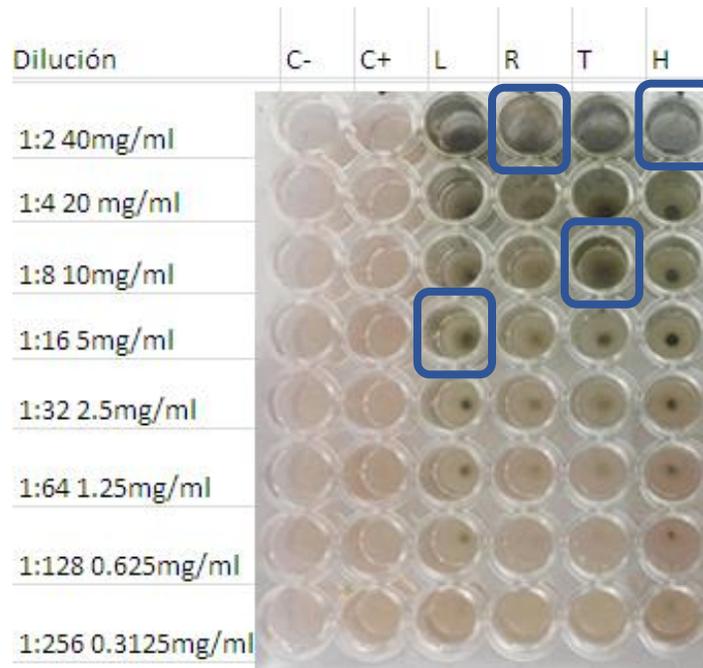
C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna gibba*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*.

**Figura 34.** Microdilucion en placa de extractos vs *Lelliottia* sp

**.Fuente:** Autores 2018.

La actividad antibacteriana que presenta el extracto L (*Lemna gibba*) frente a *Lelliottia* sp. se ve reflejada en la dilucion 1:64 que corresponde a la concentracion 1,25mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto R ( raiz de *Eichornnia crassipes*) frente a *Lelliottia* sp. se observa en la dilucion 1:2 que corresponde a la concentracion 40mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria. La actividad antibacteriana de T (tallo de *Eichornnia crassipes*) frente a *Lelliottia* sp. se ve reflejada en la dilucion 1:8 que corresponde a la concentracion 10mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto H (hoja de *Eichornnia crassipes*) frente a *Lelliottia* sp. se ve reflejada en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto

#### 4.4.2 *Xanthomonas* sp.



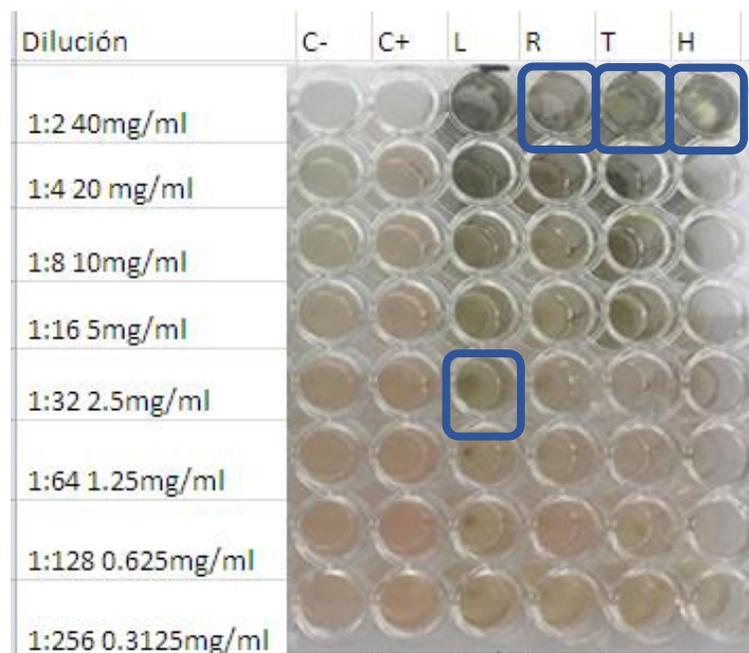
C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna gibba*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*.

**Figura 35.** Microdilución en placa de extractos vs *Xanthomonas* sp.

**Fuente:** Autores 2018.

La actividad antibacteriana que presenta el extracto L (*Lemna gibba*) frente a *xanthomonas* sp se ve reflejada en la dilución 1:16 que corresponde a la concentración 5mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto R ( raíz de *Eichornnia crassipes*) y H (hoja de *eichornnia crassipes*) frente a *xanthomonas* sp. se observa en la dilución 1:2 que corresponde a la concentración 40mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria. La actividad antibacteriana de T (tallo de *Eichornnia crassipes*) frente a *xanthomonas* sp se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de este extracto.

#### 4.4.3 *Ralstonia* sp.



C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna gibba*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*.

**Figura 36.** Microdilución en placa de extractos vs *Ralstonia* sp.

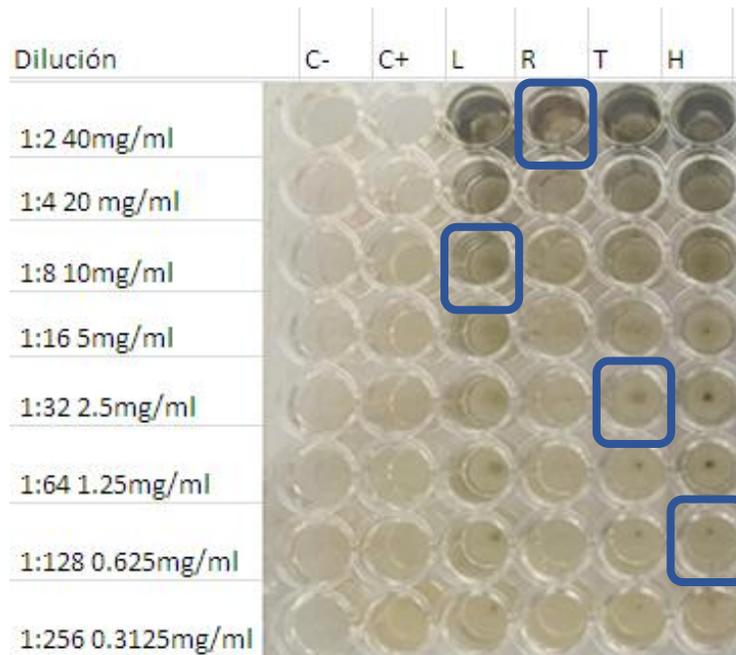
**Fuente:** Autores 2018.

La actividad antibacteriana que presenta el extracto L (*lemna gibba*) frente a *Ralstonia* sp. se ve reflejada en la dilución 1:32 que corresponde a la concentración 2,5mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto R ( raíz de *Eichornnia crassipes*), T (tallo de *Eichornnia crassipes*) y H (hoja de *Eichornnia crassipes*) frente a *Ralstonia* sp. se observa en la dilución 1:2 que corresponde a la concentración 40mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria.

#### 4.5 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA EN MICROPLACA (Hongos)

A continuación se muestran las imágenes de los ensayos en microplacas de cada una de los Hongos (*Botrytis sp* UCMC, *Botrytis sp* C-bios y *Fusarium sp*). Se debe tener en cuenta que en cada imagen se señala la dilución en la que esta cada pozo de la microplaca y el tipo de extracto que está en cada fila, (C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna Gibba*, R: Raíz de *Eichhornia crassipes*, T: tallo de *Eichhornia crassipes*, H: Hoja de *Eichhornia crassipes*).

##### 4.5.1 *Botrytis sp.* C- bios



C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna gibba*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*.

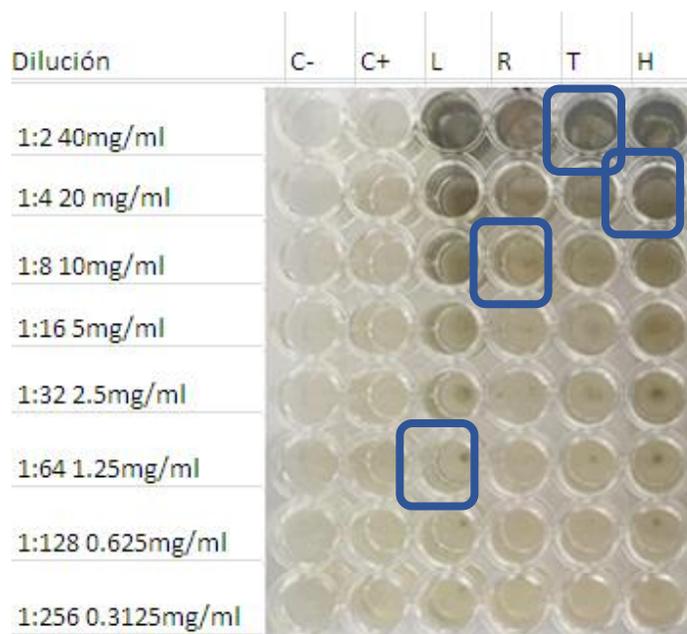
**Figura 37.**Microdilucion en placa de extractos vs *Brotrytis sp.* C-bios

**Fuente:** Autores 2018.

La actividad antifungica que presenta el extracto L (*lemna gibba*)frente a *Botrytis sp.*

C-bios se ve reflejada en la dilucion 1:8 que corresponde a la concentracion 10mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto R ( raiz de *Eichornnia crassipes*) frente a *Botrytis sp.* C-bios se observa en la dilucion 1:2 que corresponde a la concentracion 40mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria. La actividad antibacteriana de T (tallo de *Eichornnia crassipes*) frente a *Botrytis sp.* C-bios. se ve reflejada en la dilucion 1:32 que corresponde a la concentracion 2,5mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto H (hoja de *Eichornnia crassipes*) frente a *Botrytis sp.* C-bios se ve reflejada en la dilucion 1:128 que corresponde a la concentracion 0.625mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto.

#### 4.5.2 *Botrytis sp.* Ucmc

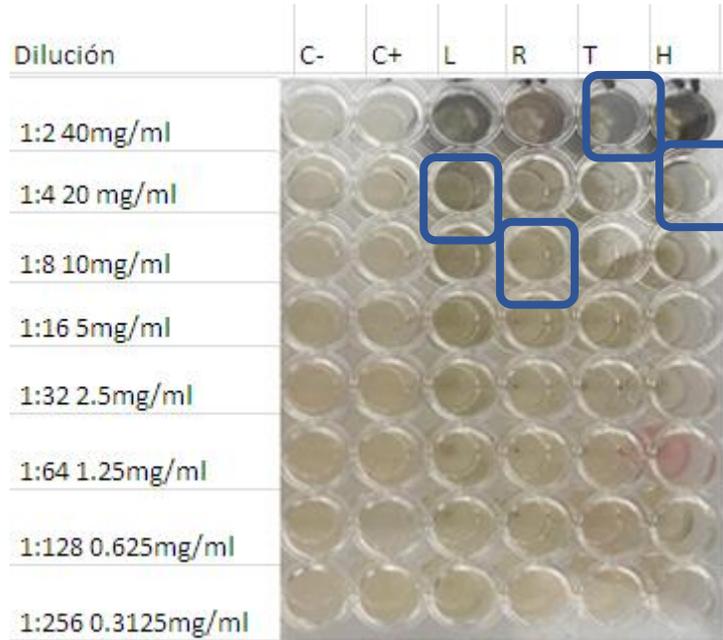


C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna gibba*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*. **Figura 38.** Microdilucion en placa de extractos vs *Botrytis sp.* Ucmc **Fuente:** Autores 2018.

La actividad antifungica que presenta el extracto L (*lemna gibba*)frente a *Botrytis sp.*

ucmc se ve reflejada en la dilucion 1:64 que corresponde a la concentracion 1,25mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto R ( raiz de *Eichornnia crassipes*) frente a *Botrytis sp.* ucmc se observa en la dilucion 1:8 que corresponde a la concentracion 10mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria. La actividad antibacteriana de T (tallo de *Eichornnia crassipes*) frente a *Botrytis sp.* ucmc. se ve reflejada en la dilucion 1:2 que corresponde a la concentracion 40mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto H (hoja de *Eichornnia crassipes*) frente a *Botrytis sp.* ucmc se ve reflejada en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml siendo esta la concentracion minima inhibitoria de este extracto

### 4.5.3 *Fusarium* sp.



C-: control negativo, C+: control positivo, L: *Lemna gibba*, R: raíz de *Eichornnia crassipes*, T: tallo de *Eichornnia crassipes*, H: Hoja de *Eichornnia crassipes*.

**Figura 39.** Microdilución en placa de extractos vs *Fusarium* sp.

**Fuente:** Autores 2018.

La actividad antifúngica que presenta el extracto L (*lemna gibba*) y H (hoja de *Eichornnia crassipes*) frente a *Fusarium* sp se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de este extracto. La actividad antibacteriana que presenta el extracto R (raíz de *Eichornnia crassipes*) frente a *Fusarium* sp se observa en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria. La actividad antibacteriana de T (tallo de *Eichornnia crassipes*) frente a *Fusarium* sp. se ve reflejada en la dilución 1:2 que corresponde a la concentración 40mg/mlsiendo esta la concentración mínima inhibitoria de este extracto.

## 5 DISCUSIÓN

En función de responder a la problemática y creciente tasa de resistencia de microorganismos a antimicrobianos, se han generado el empleo de plantas y sus extractos, buscando así una salida sostenible y natural a este problema <sup>32</sup>.

Además de ser consideradas como maleza acuática, las plantas estudiadas en el presente trabajo, han demostrado acción biológica en algunas ramas de la medicina, claro ejemplo de ello es mencionado por Kumar<sup>38</sup> quien indica que *Eichhornia crassipes* presentan acción citotóxica en células asociadas a cáncer de pulmón.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos, de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* utilizando dos técnicas difusión radial e agar y concentración mínima inhibitoria en microplaca, la primera de ella, difusión radial en agar, allí la capacidad antimicrobiana es medida a través de un halo de inhibición, en esta técnica se identificaron dos factores limitantes: el microorganismo y la concentración del extracto utilizado. La naturaleza de los microorganismos presenta la primera característica que dificulta la objetividad del experimento. Por ejemplo en el caso de los hongos, es necesario mencionar que ninguno presentó un crecimiento radial en agar, su crecimiento es asimétrico y poco uniforme, esto puede distorsionar la claridad y objetividad de los resultados correspondientes a la medición de los halos, por otro lado los controles de calidad *Aspergillus brasiliensis*. ATCC 16404 y *Candida albicans*. ATCC 10231 quienes dan validez a los montajes de difusión radial en agar de hongos también presentan limitantes que afecta la interpretación de resultados. El poco crecimiento de los hongos y controles se atribuye a posibles factores como incubación inadecuada de la muestra en tanto a temperatura o tiempo ideal, no se puede determinar a ciencia cierta qué tipo de factor alteró el crecimiento de los microorganismos y la interpretación de los resultados pero esto es causa de invalidez del ensayo ya que según Bernal Maye y Guzmán Miguel<sup>39</sup> en su artículo el antibiograma de discos, normalización de la técnica kirby-bauer los microorganismos de crecimiento lento

revelan unos resultados que no son confiables y también dice La Dra. Johana Méndez y Dr. Marco L. Herrera<sup>37</sup> en su artículo Métodos de susceptibilidad antifúngica, que la aplicación de los métodos de difusión radial en agar para probar agentes antifúngicos es limitada, sin embargo este método tiene buena correlación con los métodos de referencia de la NCCLS<sup>37</sup>.

En el caso de las bacterias con la técnica de difusión radial en agar se pudo determinar cuál fue el extracto que tuvo un mayor halo de inhibición frente a los microorganismos fitopatogenos estudiados, *Lemna gibba* presenta una mayor actividad frente a *Xanthomonas* sp. y *Ralstonia* sp. ya que fue el extracto que mayor halo de inhibición tuvo con un diámetro de 6,3mm y 8,0mm, como lo menciona María del Pilar Arroyave en su artículo del 2004 dijo que las especies de plantas pertenecientes al género *Lemna* presentan un gran interés desde el punto de vista evolutivo, ecológico y ambiental. Effiong BN en el 2009 concluye que los extractos etanólicos de *Lemna gibba* tienen una mayor inhibición frente a microorganismos, y se observó en este proyecto que con un 50% *Lemna gibba* tuvo acción antimicrobiana y mayor inhibición frente a las bacterias fitopatógenas que los otros extractos de *Eichhornia crassipes*.

En el trabajo realizado por Cruz y Caviedes (2018) La actividad antimicrobiana de una planta dependió de los principios activos de sus extractos, y en ocasiones no solamente de uno de sus compuestos, esto indica que existe una alta probabilidad que esta acción antimicrobiana se debe al ejercicio en conjunto de todos sus componentes y no solamente de un compuesto determinado<sup>15</sup>

De acuerdo a los resultados de concentración mínima inhibitoria se buscó la mínima cantidad de extracto que es capaz de impedir el crecimiento de los microorganismos en óptimas condiciones y compararla con los resultados obtenidos en difusión radial en agar para así afirmar o no, si los extractos tienen actividad antimicrobiana y antifúngica, de acuerdo a el montaje de CMI en bacterias se observó que, en los tres microorganismos fitopatogenos el extracto que inhibió más el crecimiento fue *Lemna gibba*, en cada una con una concentración diferente, en

*Lelliottia* sp. La concentración mínima inhibitoria fue de 1.25mg/ml como se puede observar en la figura 34, en *Xanthomonas* sp. La concentración mínima inhibitoria fue de 5mg/ml como se puede observar en la figura 35 y en *Ralstonia* sp. La concentración mínima inhibitoria fue de 2.5mg/ml como se puede observar en la figura 36; Se realizó la comparación de los resultados obtenidos en difusión radial en disco y se determinó que el extracto con mayor actividad antimicrobiana en ambas técnicas para bacterias fue *Lemna gibba*, ya que en CMI fue el 100% efectivo y en difusión radial en disco el 66.6%. Para hongos solo se tiene resultados de CMI ya que difusión radial en disco fue invalidado, por lo tanto no se pudo realizar una comparación de ambos resultados para garantizar la efectividad de la capacidad de inhibición de los extractos, en el ensayo con hongos la raíz de *Eichhornia crassipes*, la hoja de *Eichhornia crassipes*, y *Lemna gibba* fueron los extractos con capacidad de inhibición, en *Botrytis* sp. C-bios la Hoja de *Eichhornia crassipes*, inhibió el microorganismo con una concentración mínima inhibitoria de 0.625mg/ml como se puede observar en la figura 37, en *Botrytis* sp. Acmé *Lemna gibba* tuvo una capacidad de inhibición mínima de 1.25mg/ml como se puede observar en la figura 38 y *Fusarium* sp. La raíz de *Eichhornia crassipes*, tuvo una concentración mínima inhibitoria de 10mg/ml como se puede observar en la figura 39, por lo tanto en este ensayo se determinó que los extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes* tuvieron capacidad antifúngica frente a los microorganismos.

Se evidenció que tipo de polaridad tiene cada extracto según las cromatografías realizadas en las instalaciones del laboratorio de bioprospección en la Universidad de la Sabana ya que se realizó con dos tipos de solventes con diferente polaridad Acetato de etilo con un índice de polaridad de 4.4 lo cual lo hace un compuesto polar y Hexano con un índice de polaridad de 0.1 lo cual lo hace un compuesto apolar en la figura 17 se puede ver como se evidencian los compuestos apolares, en este caso se evidencia una corrida de la muestra 4 que pertenece a la hoja de *Eichhornia crassipes* pero su corrida no es tan evidente como en la figura 18 que allí se evidencian los compuestos polares y se puede ver la diferencia de la corrida de cada uno de los extractos concluyendo que todos los extractos son compuestos polares,

sin embargo en la figura 19, se evidencia la corrida de la raíz y la hoja de *Eichhornia crassipes* en 100% acetato de etilo que es un compuesto polar, por lo tanto la raíz y la hoja de *Eichhornia crassipes* son extractos compuestos de una polaridad alta mientras *Lemna gibba* y el tallo de *Eichhornia crassipes* son compuestos que se evidencian mejor en una polaridad baja.

El reto que propone este trabajo a futuro es realizar la identificación de los compuestos o el compuesto responsable de la acción antimicrobiana evidenciada en el mismo. Se plantea el siguiente paso a partir del fraccionamiento e identificación de los compuestos de los extractos.

## 6 CONCLUSIONES

- Se concluye que todos los extractos evaluados presentan capacidad de inhibición frente a los microorganismos, siendo *Lemna gibba* el extracto que mostro mayor capacidad de inhibición en técnica de difusión radial en agar y concentración mínima inhibitoria.
- Se estableció la polaridad de los extractos, obteniendo como resultado mayor polaridad en hoja y raíz de *Eichhornia crassipes* y polaridad baja en *Lemna gibba* y el tallo de *Eichhornia crassipes*.
- El método de difusión radial en disco para hongos se debe estandarizar y mejorar para así evitar contaminaciones en los ensayos, y obtener resultados completamente coherentes y sin interferencias.
- Se deben seguir haciendo estudios similares a este trabajo para determinar cuáles son los agentes responsables de la inhibición frente a microorganismos de importancia en salud vegetal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Elespectador.com. Colombia, con 7,1 millones de hectáreas cultivadas. [internet] 2015[citado en Marzo 22 del 2018]. Disponible en: <https://www.elespectador.com/noticias/economia/colombia-71-millones-de-hectareas-cultivadas-articulo-583467>
- (2) Rodriguez, A. Broncos, R. Antifungal effect of phenolic and carotenoids extracts from chiltepin (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC), Ejido Nuevo León, Baja California, México. 2015
- (3) D.E. Okwu, F.U. Nnamdi. Evaluation of the chemical composition of *Dacryodes edulis* and *Raphia hookeri* Mann and Wendl exudates used in herbal medicine in South Eastern Nigeria Afr J Trad Comp Alt Med., 5 (2008), pp. 194-200
- (4) Capítulo 6. Malezas acuáticas [Internet]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017 [cited 2 August 2017]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s0a.ht>
- (5) El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001 [Internet]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2001 [cited 4 August 2017]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s16.htm>
- (6) Capítulo 6. Malezas acuáticas [Internet]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017 [cited 2 August 2017]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s0a.ht>
- (7) Fao.org. (2018). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s16.htm> [citado 10 abril. 2018].

- (8) Hart CA. La resistencia a los antibióticos. ¿Un problema creciente? Br Med J (Ed Latinoam) 1998;6:147-8.
- (9) Pan American Health Organization. Antimicrobial resistance Bibliography. Washington DC: Division of Disease Prevention and Control Communicable Diseases Program, 2001.
- (10) Pareja Sánchez, j. y Betancourt Vásquez, m. (2018). Caracterización biológica y molecular de hongos fitopatógenos foliares asociados a forestales nativos en agro ecosistemas premontanos de Risaralda.
- (11) Lopez-brea, M. y Domingo, D. (2003). Plantas Con Acción Antimicrobiana. ResearchGate, [online] 16(4), pp.385-393. Disponible en : [https://www.researchgate.net/publication/28066457 Plantas con accion anti microbiana?enrichId=rgreq-d46f837d9c7511ebc24f24f6b91e177b-XX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI4MDY2NDU3O0FTOjEwMTEzNDE2OTU0MjY1OUAxNDAxMTIzNjc2NTYz&el=1\\_x\\_3&esc=publicationCoverPd](https://www.researchgate.net/publication/28066457_Plantas_con_accion_anti_microbiana?enrichId=rgreq-d46f837d9c7511ebc24f24f6b91e177b-XX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI4MDY2NDU3O0FTOjEwMTEzNDE2OTU0MjY1OUAxNDAxMTIzNjc2NTYz&el=1_x_3&esc=publicationCoverPd) [Accessed 11 Apr. 2018].
- (12) Solms, (. (2018). Eichhornia crassipes (Mart.) Solms, 1883. [pdf] [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/222545/Eichhornia\\_crassipes .pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/222545/Eichhornia_crassipes.pdf), Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México.
- (13) Sanmuga Priya, E. and Senthamil Selvan, P. (2017). Water hyacinth (Eichhornia crassipes) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment – A review. Arabian Journal of Chemistry, [online] 10, pp.S3548-S3558. Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.arabjc.2014.03.002> [Accessed 4 Apr. 2018].
- (14) Arroyave, M. (2004). la lenteja de agua (Lemna minor L.): una planta acuática promisorio. Revista EIA, ISSN 1794-1237, [online] pp.33-38. Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/eia/n1/n1a04.pdf> [Accessed 1 Apr. 2018].
- (15) Cruz d, Caviedes a, actividad antibacteriana del extracto de Eichhornia crassipes Y Lemna gibba frente a bacterias patógenas en animales de

- producción, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2018.
- (16) Ibarra, J., Del Rincón Castro, C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberón, M. and Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista latinoamericana de microbiología*, [online] 48(2), pp.113 - 120. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062k.pdf> [Accessed 5 Apr. 2018].
- (17) Francisco, N., Gallegos Morales, G., Ochoa Fuentes, Y., Hernández Castillo, F. and Benavides Mendoza, A. (2014). Fundamental aspects of Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Characteristic, Pathogenicity and Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, [online] 31(1). Available at: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092013000200006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200006) [Accessed 7 Apr. 2018]
- (18) Estupiñán-Torres, S., Ávila de Navia, S., López Orozco, Y., Martínez Méndez, S., Miranda Marín, Y. and Ortegón Puentes, A. (2016). Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas* sp. en aguas de piscinas públicas de Bogotá – Colombia. *Revista Nova*. [online] Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00025.pdf> [Accessed 6 Apr. 2018].
- (19) Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P. and De Vos, P. (2010). Análisis de *Pseudomonas* Fitopatógenas Usando Métodos Inteligentes de Aprendizaje: Un Enfoque General Sobre Taxonomía y Análisis de Ácidos Grasos Dentro del Género *Pseudomonas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, [online] 28(1). Available at: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100001) [Accessed 6 Apr. 2018].
- (20) Rodríguez Beraud, M., Wyss Valdés, A. and Hormazábal Vásquez, J. (2015). Evaluation of modified atmosphere bag and sulphur dioxide concentrations

- applied on highbush blueberries fruit (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Emerald. *Scientia agropecuaria*, [online] pp.259-270. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172015000400003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172015000400003) [7 Apr. 2018].
- (21) Domingo d, Lopez-brea m, Plantas con acción antimicrobiana, 2003
- (22) Arbeláez Torres, G. (2003). algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. revista universidad nacional, [online] 17, pp.11-22. Available at: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538/22543> [Accessed 14 Apr. 2018].
- (23) Carvalho, F. Zhong, N., Tavarez y Klaine S.1998. Rastreo de plaguicidas en los trópicos. Boletín del OEIA No 40.
- (24) Hendi, EJ y Peake, BM. 1996. Organochlorine pesticides in a dated sediment core from Mapua, Waiwea Inlet, New Zeland. *Marine Pollution Bulletin*. 32:10 751-754. New Zeland.
- (25) Waliszewski, SM., Pardio, S., Chantiri, P. y Aguirre, G. 1996. Organochlorine pesticide body burnen of young Mexican. *Freseniusenviromental Bulletin*. 5: 5-6 357-360. Veracruz. México.
- (26) Mejía de Tafur M, Burbano Diaz R, GarciaDavila M. Respuesta fotosintética del *Eucalyptusgrandis* a la disponibilidad de agua en el suelo. *ActaAgronómica* [Internet]. 2014 [cited 4 August 2017];63(4):311-317. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v63n4/v63n4a02.pdf>
- (27) FLOREY, H.W; "ANTIBIOTICS" Vol I, Oxford medical publications, London, 580- 581. 1949
- (28) BN E, A '. Antifungal Properties and Phytochemical Screening of Crude Extract of *Lemnapauciscostata* (Helgelm) Against Fish Feed Spoilage Fungi. *Life Science Journal* . 2009 [citado 5 August 2017];6(3): 19 – 22] (ISSN: 1097 – 8135). Disponible en: [http://www.lifesciencesite.com/ljsj/life0603/02\\_0646\\_effiong\\_life0603\\_19-22.pdf](http://www.lifesciencesite.com/ljsj/life0603/02_0646_effiong_life0603_19-22.pdf)
- (29) Kanwal Q., Hussain I., Latif H. and Javaid A. Flavonoids from mango leaves

- with antibacterial activity. 2009. *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (12) 1389–1399.
- (30) Gülçin I, Topal F, Hisar O. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: Duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). *tubitak* [Internet]. 2010 [cited 5 August 2017];. Disponible en : [https://www.researchgate.net/publication/285036697\\_antioxidant\\_antibacterial\\_and\\_anticandidal\\_activities\\_of\\_an\\_aquatic\\_plant\\_duckweed\\_lemna\\_minor\\_l\\_lemnaceae](https://www.researchgate.net/publication/285036697_antioxidant_antibacterial_and_anticandidal_activities_of_an_aquatic_plant_duckweed_lemna_minor_l_lemnaceae)
- (31) Valderrama,T. Rodriguez M, Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula* Original research article *Water Research*, Volume 36, Issue 17, October 2002, Pages 4185-4192,
- (32)Shiyin I, Yingxin t, Dechen w, Jianuan z, Identification and Characterization of a New Enterobacter Onion Bulb Decay Caused by *Lelliottia amnigena* in China. Integrative Microbiology Research Centre, South China Agricultural University. [Internet]. 2016 [cited 23 Abril 2018];. Disponible en : <https://www.omicsonline.org/open-access/identification-and-characterization-of-a-new-enterobacter-onion-bulb-decaycaused-by-lelliottia-amnigena-in-china-2471-9315-1000114.php?aid=73711>
- (33) Torres Rodriguez y, Yargas Lozano f, Zamora Lozano P. evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de lenteja de agua (*lemna gibba*) con tres microorganismos de importancia clínica [p]. Universidad colegio mayor de Cundinamarca; 2016.
- (34)Obregón Barrios m, Rodríguez Gaviria p, Morales Osorio j , Salazar Yepes m, Hospedantes de *ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano y plátano en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, Volumen 61, Número 2, p. 4518-4526, 2008. ISSN electrónico 2248-7026.
- (35)Gonzalez A. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANOLICOS DE PLANTAS DEL AMAZONAS [Internet]. Manizales: Universidad Nacional;2004 [citado 6 Mayo 2018]. Disponible en:<http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>

- (36) Aricapa Barrera d, Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
- (37) Mendez j, Herrera, m. Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) [online]. 2001, vol.36, n.1-2 [cited mayo 2018], pp. 37-44 . disponible en: <[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85462001000100005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100005&lng=en&nrm=iso)>.
- (38) Kumar S, Kumar, R A Dwivedi, Pandey A, In Vitro Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activity and In Vivo Effect of Syngonium podophyllum and Eichhornia crassipes Leaf Extracts on Isoniazid Induced Oxidative Stress and Hepatic Markers, Departamento de Bioquímica, Universidad de Allahabad, Allahabad India. [online]. 2014. [cited Agosto 2018]. disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/459452/abs/>.
- (39) Bernal M, Guzman M, EL ANTIBIOGRAMA DE DISCOS. NORMALIZACION DE LA TECNICA DE KIRBY-BAUER. Revista Bioedica Vol. 4 No. 3 y 4 . Unidad de Bacteriología Clínica. Grupo de Microbiología e Inmunología. Actualmente en el Grupo de Micobacterias. Instituto Nacional de Salud - Bogotá. 1984.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Hoja de vida de la *Xanthomonas sp.*



**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC  
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO  
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO**

### **SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**

#### FICHA DE IDENTIFICACIÓN

<b>DATOS DEL DEPOSITANTE</b>	
DEPOSITANTE	MUESTRA DIRECTA GRUPO CEPARIUM
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
DIRECCIÓN	Calle 28 #5B-02, Bogotá D.C, Bogotá
TELEFONO	2418800
FORMA DE ADQUISICIÓN	MUESTRA AISLADA POR EL GRUPO DE INVESTIGACION

### **IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO**

MICROORGANISMO	<i>Xanthomonas sp.</i>
GENERO	<i>Xanthomonas</i>
ORIGEN – HABITAT	CEPA CONFIRMADA POR GRUPO CEPARIUM
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Cundinamarca Colombia
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	2016
PROCEDIMIENTO INICIAL	Pruebas de patogenicidad
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido Caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Aislamiento primario en agar nutritivo, King B

FIRMA DE RESPONSABLES

---

**DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

---

**DOCENTE RESPONSABLE COLECCIÓN**

**Anexo 2.** Hoja de vida de la *Lelliottia* sp.



**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC  
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO  
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO**

**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS  
FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

<b>DATOS DEL DEPOSITANTE</b>	
DEPOSITANTE	GRUPO DE INVESTIGACION CEPARIUM
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
DIRECCIÓN	Calle 28 #5B-02, Bogotá D.C, Bogotá
TELEFONO	2418800
FORMA DE ADQUISICIÓN	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMO DE MATERIAL VEGETAL CONTAMINADO.

IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Lelliottia sp.</i>
GENERO	<i>Lelliottia</i>
ORIGEN – HABITAT	Cultivo de tuberculos de papa
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Zipaquira Cundinamarca
PROCEDIMIENTO INICIAL	Aislamiento en agar nutritivo.
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido Caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Pruebas de identificación por biología molecular

### **FIRMA DE RESPONSABLES**

---

DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

---

DOCENTE RESPONSABLE COLECCIÓN

Anexo 3. Hoja de vida de *Ralstonia sp.*



**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO**

**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

<b>DATOS DEL DEPOSITANTE</b>	
DEPOSITANTE	Grupo de investigación Ceparium
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad colegio mayor de Cundinamarca
DIRECCIÓN	Calle 28 #5B-02, Bogotá D.C, Bogotá
TELEFONO	2418800
FORMA DE ADQUISICIÓN	Microorganismo aislado de material vegetal contaminado

<b>IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
MICROORGANISMO	<i>Ralstonia sp.</i>
GENERO	<i>Ralstonia</i>
ORIGEN – HABITAT	Cultivo de tomate

LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Cundinamarca, Colombia
PROCEDIMIENTO INICIAL	Aislamiento en agar nutritivo y en agar específico TZC
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido Caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Pruebas bioquímicas de tubo.

**FIRMA DE RESPONSABLES**

---

**DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

---

**DOCENTE RESPONSABLE COLECCIÓN**

Anexo 4. Hoja de vida de *Botrytis* sp.



**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO**

**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

<b>DATOS DEL DEPOSITANTE</b>	
DEPOSITANTE	Centro de Biosistemas Universidad Jorge Tadeo Lozano
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad Jorge Tadeo Lozano
DIRECCIÓN	Calle 28 #5B-02, Bogotá D.C, Bogotá
TELEFONO	2418800
FORMA DE ADQUISICIÓN	

<b>IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
MICROORGANISMO	<i>Botrytis</i> sp.
GENERO	<i>Botrytis</i>
ORIGEN – HABITAT	Cultivo de rosas

LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Cundinamarca Colombia
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	Febrero 2017
PROCEDIMIENTO INICIAL	Aislamiento del hongo a partir de planta contaminada en Agar PDA . Pruebas de patogenicidad e identificación por características microscópicas macroscópicas.
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	Conservación del microorganismo a -15°C
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Identificación de características microscópicas macroscópicas.

**FIRMA RESPONSABLES**

\_\_\_\_\_

**DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

\_\_\_\_\_

**DOCENTE RESPONSABLE COLECCIÓN**

Anexo 5. Hoja de vida de *Botrytis sp*



**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO**  
**LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO**

**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS**  
**FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

<b>DATOS DEL DEPOSITANTE</b>	
DEPOSITANTE	GRUPO DE INVESTIGACION CEPARIUM
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
DIRECCIÓN	Calle 28 #5B-02, Bogotá D.C, Bogotá
TELEFONO	2418800
FORMA DE ADQUISICIÓN	

<b>IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
MICROORGANISMO	<i>Botrytis sp</i>
GENERO	<i>Botrytis</i>
ORIGEN – HABITAT	Cultivo de fresa

LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá, Cundinamarca.
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	14 de Octubre de 2017
PROCEDIMIENTO INICIAL	Aislamiento del hongo a partir de planta contaminada en Agar PDA . Pruebas de patogenicidad e identificación por características microscópicas macroscópicas.
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	Conservación del microorganismo a -15°C
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Identificación de características microscópicas macroscópicas.

**FIRMA RESPONSABLES**

\_\_\_\_\_

DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

\_\_\_\_\_

DOCENTE RESPONSABLE COLECCIÓN

**Anexo 6.** Hoja de vida de *Fusarium sp.*



**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC  
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO  
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO**

**SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS  
FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

<b>DATOS DEL DEPOSITANTE</b>	
DEPOSITANTE	Grupo de investigación Ceparium
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	Universidad colegio mayor de Cundinamarca
DIRECCIÓN	Calle 28 #5B-02, Bogotá D.C, Bogotá
TELEFONO	2418800
FORMA DE ADQUISICIÓN	Microorganismo aislado de material vegetal contaminado

<b>IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
MICROORGANISMO	<i>Fusarium sp.</i>
GENERO	<i>Fusarium</i>
ORIGEN – HABITAT	Cultivo de tomate ubicado en una

LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	una finca en Cajica, municipio de Cundinamarca
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	14 de Octubre de 2017
PROCEDIMIENTO INICIAL	Aislamiento del hongo a partir de planta contaminada en Agar PDA . Pruebas de patogenicidad e identificación por características microscópicas macroscópicas.
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	Conservación del microorganismo a -15°C
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Identificación de características microscópicas macroscópicas.

### **FIRMA DE RESPONSABLES**

---

DECANA FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

---

DOCENTE RESPONSABLE COLECCIÓN