

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Efecto de extractos de citro geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y bacterias promotoras de crecimiento del género *Azospirillum* y *Bacillus*.

Sebastián Sánchez Pérez

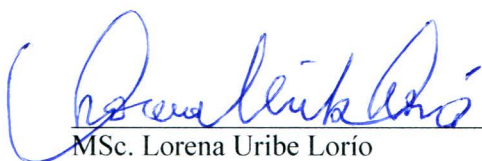
TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA.

2022

Efecto de extractos de citro geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y bacterias promotoras de crecimiento del género *Azospirillum* y *Bacillus*.


Sebastián Sánchez Pérez

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA



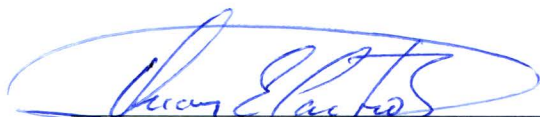
MSc. Lorena Uribe Lorío

DIRECTOR DE TESIS PRÁCTICA



PhD. Gerardina Umaña Rojas

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



MSc. Oscar Castro Zúñiga

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



PhD. Lidieth Uribe Lorío

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



PhD. Luis Gómez Alpízar

DIRECTOR DE ESCUELA



Bach. Sebastián Sánchez Pérez

SUSTENTANTE

2022

Resumen

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública por año la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que mueren alrededor de 700 mil personas por infecciones provocadas por microorganismos resistentes. En el sector productor agrícola se cuentan con pocas herramientas para el control de bacterias y en la actualidad se buscan diferentes opciones para el control de estos microorganismos entre ellos los extractos botánicos. Los extractos botánicos son productos compuestos por diferentes moléculas orgánicas químicas sintetizadas por las plantas para la protección contra diferentes plagas o enfermedades, estos son obtenidos de las plantas mediante el uso de solventes orgánicos. En búsqueda de estas nuevas herramientas de control se buscó Determinar el efecto de los extractos crudos de citro-geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y bacterias promotoras de crecimiento del género *Azospirillum* y *Bacillus*. Se recolectó tejido vegetal fresco (hojas jóvenes y cogollos) de citro-geranio, fosforillo, ruda y tomillo en la finca del Instituto Nacional de Aprendizaje ubicado en la provincia de Cartago, cantón de Oreamuno (9°52'55 N 83°53'49 W). En el Centro de Investigación de Productos Naturales (CIPRONA) se secó el material vegetal y se realizó la extracción con etanol absoluto (Merck®) mediante el método de ondas ultrasónicas y se separó el extracto mediante un rota vapor (Buchi®), se realizaron separaciones de acuerdo a la polaridad de las moléculas utilizando agua (H₂O), Hexano(C₆H₁₄) y diclorometano (C₂H₂Cl₂). Se evaluó el efecto de inhibición de crecimiento sobre las bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium* (*Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium brasilense* y *Pectobacterium chrysanthemi* ahora *Dickeya chrysanthemi*), *Pseudomonas* (*Pseudomonas syringae*) y bacterias promotoras de crecimiento del género *Azospirillum* (*Azospirillum brasilense*) y *Bacillus* (*Bacillus subtilis*) utilizando las pruebas de difusión de disco en medio de crecimiento LB agar, para las bacterias que fueron inhibidas se evaluó el efecto de inhibición de crecimiento de los diferentes perfiles de polaridad del extracto (polar-polar aprotico-no polar) y se cuantificó la concentración mínima inhibitoria del extracto. Los resultados obtenidos determinaron que los extractos obtenidos de tomillo (*Thymus vulgaris*), fosforillo (*Hamelia patens*) y citro-geranio (*Pelargonium graveolens*) no presentaron actividad inhibitoria sobre las bacterias fitopatógenas y tampoco generó inhibición sobre las bacterias promotoras de crecimiento. Por su parte el extracto de ruda (*Ruta graveolens*) generó inhibición de crecimiento sobre las bacterias promotoras *Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense* en un 66% y 60% respectivamente de acuerdo a la tabla de clasificación de sensibilidad de Duraffourd y no generó inhibición de crecimiento en microorganismos fitopatógenos. En cuanto a la capacidad inhibitoria de cada fase de polaridad se obtuvo que la fracción polar protica (H₂O) generó un 0% de inhibición de crecimiento, la fracción polar aprótica y la fracción no polar tuvo un 100% de frecuencia de inhibición sobre las bacterias promotoras de crecimiento. La concentración mínima inhibitoria del extracto de *Ruta graveolens* sobre *Bacillus subtilis* fue de 12mg/ml y de *Azospirillum brasilense* fue de 5mg/ml.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado mi padre y madre que tanto se han esforzado por ver forjado mi camino profesional. Gracias por el apoyo mostrado durante mi carrera profesional y el apoyo en mis proyectos personales. Gracias nuevamente mis padres y hermanos por hacer de mi lo que soy hasta el día de hoy. A mi amada sobrina Valentina y mi sobrino David de los cuales espero algún día llegue a estas instancias en las que me encuentro.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas esas personas que participaron directa o indirectamente de este trabajo y que me abrieron las puertas a tres grandes centros de investigación en los cuales aprendí enormemente.

Gracias al Centro de Agricultura Orgánica del Instituto Nacional de Aprendizaje (INA), agradecer al profesor de extractos naturales Eduardo Agüero por sus consejos y disponibilidad.

Gracias al Centro de Investigaciones en Productos Químicos y Naturales, agradecer a la directora del centro Dra. Giselle Tamayo Castillo por aceptar mi proyecto y permitirme trabajar en este gran centro. Un enorme agradecimiento a mi mentora en este tema de extractos la profesora María Isabel Ríos, la profesora Lorena, Juan Carlos y todos los que me mostraron su apoyo.

Gracias al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollar mi investigación profesional.

Un agradecimiento enorme a mi profesora tutora M.Sc. Lorena Uribe Lorío por creer en mi idea y permitirme desarrollar mi investigación con su equipo de trabajo. Igualmente, a la profesora Dra. Lidieth Uribe Lorío por mostrarme su apoyo y formar parte de este trabajo y al gran equipo de trabajo del laboratorio de microbiología ambiental Daniela Vidaurre, Laura Brenes, Diego Cubero, Fiorella Galiano, Ronald Arias. También agradecer enormemente al profesor M. Sc. Oscar Castro por la paciencia y la dedicación al momento de revisar y aportar ideas en la mejora de este trabajo

Agradecimiento especial a mi novia Claret Rodríguez por toda la retroalimentación, ayuda, paciencia y acompañamiento que me brindó en esta aventura llamada Tesis. Gracias a todos

ÍNDICE

1.Introducción	12
2.Objetivos	13
2.1 Objetivo general	13
2.2 Objetivos específicos	13
3.Antecedentes	14
3.1 Características generales de las bacterias	14
3.2 Extractos botánicos	16
3.2.1. Selección del material vegetal	17
3.2.2 Secado del material vegetal	17
3.2.3 Selección del solvente	17
3.2.4 Métodos de extracción	18
3.2.5 Concentración del extracto	18
3.3 Plantas medicinales	18
3.3.1 <i>Pelargonium graveolens</i>	19
3.3.2 <i>Hamelia patens</i>	20
3.3.3 <i>Ruta graveolens</i>	21
3.3.4 <i>Thymus vulgaris</i>	22
3.4 Pruebas microbiológicas	23
4.Metodología	24
4.1 Sitio experimental	24
4.2 Material Experimental	24
4.2.1 Recolección de plantas medicinales	24
4.2.2 Secado y molienda de plantas	24
4.3 Elaboración de extractos botánicos	24
4.3.1. Obtención de extractos botánicos	24
4.3.2. Evaporación del solvente	25
4.3.3 Cribado de los extractos	25
4.3.4. Disolución de los extractos botánicos	25
4.4. Ensayos microbiológicos	26

4.5 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)	28
4.6 Diseño experimental y análisis de datos	29
5.Resultados y discusión	31
5.1. Rendimiento de extracción sólido líquido de los extractos crudos	31
5.2. Porcentaje de composición por fase polar, polar aprotico y no polar.	32
5.3. Prueba de difusión de disco	35
5.4 Evaluación de actividad inhibitoria de crecimiento por fracción química	38
5.5 Concentración mínima inhibitoria	40
6.Conclusiones	44
7.Literatura citada	45
8. ANEXOS	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas de bacterias utilizadas para las pruebas de inhibición de disco	27
Cuadro 2. Escala cualitativa de sensibilidad de Duraffourd (1987) con base en la medición cuantitativa del halo de inhibición obtenido en las pruebas de difusión de disco.	27
Cuadro 3. Identificación y concentración (mg/ml) de tubos de ensayo utilizados en prueba de Concentración Mínima Inhibitoria.....	28
Cuadro 4. Detalle de diseño experimental y análisis de datos del experimento.....	30
Cuadro 5. Rendimiento de extracción de los extractos crudos obtenidos tras la extracción sólido-líquido.	32
Cuadro 6. Porcentaje de composición (polar/polar aprótico / no polar) de los extractos de <i>P. graveolens</i> , <i>H. patens</i> , <i>R. graveolens</i> y <i>T. vulgaris</i> de 2 g de extracto crudo depurado.	34
Cuadro 7. Medición de halo de inhibición (mm) a las 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de <i>R. graveolens</i> , en medio agar LB con sobre capa de agar LB al 0,7% con bacterias a una concentración de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml.....	36
Cuadro 8. Tabla de distribución de frecuencias relativas de la sensibilidad de <i>A. brasiliense</i> y <i>B. subtilis</i> al extracto crudo de <i>R. graveolens</i>	36
Cuadro 9. Medición promedio de halo de inhibición (mm) a las 48h de incubación, de las fracciones, polar, polar aprótico y no polar del extracto de <i>R. graveolens</i> contra <i>B. subtilis</i> $1,5 \times 10^8$ ufc/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.	39
Cuadro 10. Tabla de distribución de frecuencias relativas sobre la sensibilidad de <i>A. brasiliense</i> contra las diferentes fracciones por polaridad del extracto crudo de <i>R. graveolens</i>	40
Cuadro 11. Tabla de distribución de frecuencias relativas sobre la sensibilidad de <i>B. subtilis</i> contra las diferentes fracciones por polaridad del extracto crudo de <i>R. graveolens</i>	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía e ilustración de <i>Pelargonium graveolens</i> . Recuperada de https://alchetron.com/Pelargonium-graveolens	20
Figura 2. Taxonomía e Ilustración de <i>Hamelia patens</i> . Recuperada de http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/hamelia-patens/fichas/pagina1.htm	21
Figura 3. Taxonomía e ilustración de <i>Ruta graveolens</i> . Recuperada de: https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=733	22
Figura 4. Taxonomía e ilustración de <i>Thymus vulgaris</i> . Recuperado de: https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=1769	23
Figura 5. Concentración mínima inhibitoria de extracto de <i>R. graveolens</i> contra <i>A. brasilense</i> 0.5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) en medio de crecimiento Luria Bertani Agar.....	42
Figura 6. Concentración mínima inhibitoria de extracto de <i>R. graveolens</i> contra <i>B. subtilis</i> 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) en medio de crecimiento Luria Bertani Agar.	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Proceso inicial de preparación de muestras. A) Secado del material vegetal. B) Molino Thomas Willy Mill®. C) Empaque al vacío del material seco y molido.....	58
Anexo 2. Proceso elaboración del extracto. A) Baño ultrasónico Cole-Palmer. B) Extracción sólido-líquido asistido en baño ultrasónico. C) Filtrado de extracto líquido.....	58
Anexo 3. Proceso de secado del extracto crudo y proceso de depuración.	59
Anexo 4. Prueba de difusión de disco.	60
Anexo 5. Medición de halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de <i>P.graveolens</i> a concentración de 20mg/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.....	60
Anexo 6. Medición de halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de <i>T. vulgaris</i> a concentración de 20mg/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.....	61
Anexo 7. Medición de halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de <i>H.patens</i> a concentración de 20mg/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.....	61
Anexo 8. Prueba de concentración mínima inhibitorio, observación de turbidez causada por el extracto.....	62

1.Introducción

La aparición de bacterias resistentes a los antibióticos es clasificado como un problema grave por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estiman que por año mueren alrededor de 700 000 personas a causa de infecciones provocadas por estos microorganismos (FAO 2021). Esta amenaza global ha sido provocada por el constante, creciente y desmedido uso de antibióticos en las principales actividades humanas, entre ellas el uso de antibióticos en la producción agropecuaria. Sí bien es cierto, su utilización es más frecuente en sistemas pecuarios, la producción vegetal también contribuye al mal uso de antibióticos y con ello a la generación de resistencia (FAO 2021). Debido a esta amenaza la FAO insiste en disminuir la aplicación de antibióticos en la agricultura, no obstante, actualmente son pocas las alternativas para el remplazo de esta herramienta de control. Se debe considerar que un brote bacteriano no controlado puede generar grandes pérdidas económicas, por lo cual su disminución debe ser acompañada de un plan de acción con diferentes y nuevas soluciones. Las infecciones causadas por bacterias provocan pérdidas de hasta un 80% del rendimiento en la producción si estos brotes no son controlados a tiempo (Agrios 2005).

El uso de antibióticos en la producción vegetal genera grandes amenazas para la sostenibilidad del ambiente ejemplo de esto la contaminación de los suelos. La constante aplicación de antibióticos favorece la selección de bacterias resistentes, lo puede causar que el suelo actúe como un reservorio de microorganismos resistentes a la aplicación de antibióticos (Muñoz 2017). La presión de selección generada por la constante aplicación de antibióticos y la poca rotación de ingredientes activos, ha provocado que las bacterias pierdan sensibilidad y logren sobrevivir a mayores concentraciones de ingrediente activo, esto es conocido como resistencia a antibióticos (Alós 2014). Se calcula que a nivel global en la agricultura se utilizan aproximadamente 2500 toneladas de antibióticos al año y se estima que en el futuro su uso irá en aumento (Jyoti *et al.* 2018). En Costa Rica no se cuenta con datos actualizados de consumo anual de antibióticos en agricultura, no obstante, en el “Plan de Acción Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos Costa Rica 2018-2025” (MSP 2018) se reportó que los antibióticos se utilizan en cultivos de arroz, papa, manzana, aguacate, banano, cacao, café, cebolla, frijol, plátano, tabaco, chile dulce, repollo, tomate, melón y sandía, lo cual refleja su amplio uso en diferentes cultivos. En este reporte se recalca el uso mayoritario de cuatro ingredientes activos, Gentamicina, Estreptomina, Kasugamicina y Oxitetraciclina. Para mitigar este problema de dependencia y poca variabilidad de ingredientes activos, es necesario buscar herramientas alternativas de combate para el control de las poblaciones bacterianas.

Una de las opciones de interés a nivel mundial es el uso de extractos botánicos y aceites esenciales. Este interés surge porque las plantas han sido capaces de protegerse ante microorganismos patógenos sin la aplicación exógena de productos fitosanitarios, lo que sugiere la presencia de sustancias endógenas que les proporcionan protección (Borboa *et al.* 2010). Basado en este supuesto se despertó el interés en los científicos de entender los sistemas de defensa de las plantas y se determinó la existencia de sistemas metabólicos secundarios en los cuales las plantas sintetizan sustancias de defensa como terpenos, alcaloides, fenoles y

glucósidos, que han mostrado poseer actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida, antiviral, antiparásita y anti oxidativa, entre otras (Hyldgaard *et al.* 2012). La selección de las plantas estudiadas se basa en el uso cultural que se ha hecho de ciertas plantas en diferentes civilizaciones alrededor del mundo, las cuales han encontrado en las plantas la cura para ciertas enfermedades. Esta capacidad de las plantas para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos hizo que los científicos se interesaran en detallar cual es la sustancia involucrada y en qué forma actúan los extractos que poseen efectos bio controladores. Se debe resaltar que en la actualidad es cada vez mayor la producción de nuevos fungicidas, insecticidas y bactericidas a nivel agrícola para el control de plagas y enfermedades a base de aceites y extractos de plantas (Al-Shuneigat *et al.* 2015).

La declaración de emergencia de la OMS (2018) sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos ha impulsado la búsqueda de nuevas herramientas de combate que permitan mitigar esta problemática. Pandey *et al.* (2012), recalcan el uso de los extractos botánicos como una herramienta de control alternativa, ya que al ser moléculas diferentes y presentar mecanismos de acción distintos a los antibióticos logran mitigar la aparición bacterias resistentes. Los investigadores destacan el efecto multisitio y la alta biodegradabilidad de los extractos como una de las principales características de sostenibilidad. Esta investigación tiene como enfoque investigar la capacidad inhibitoria de plantas de uso medicinal para proveer información inicial para el desarrollo de nuevos métodos de control en los sistemas de producción de agrícola del país, el cual , actualmente cuenta con pocas opciones para control de bacterias y escasa información sobre la eficacia de los extractos botánicos . Para ello se pretende estudiar el efecto de los extractos de citro-geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y bacterias promotoras de crecimiento como *Azospirillum brasilense* y *Bacillus subtilis*.

2.Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los extractos crudos de citro-geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y bacterias promotoras de crecimiento del género *Azospirillum* y *Bacillus*.

2.2 Objetivos específicos

1) Evaluar el efecto de inhibición de crecimiento de los extractos crudos de citro-geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre bacterias fitopatógenas de los géneros *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y bacterias promotoras de crecimiento de los géneros *Azospirillum* y *Bacillus* mediante pruebas de difusión de disco.

- 2) Relacionar el efecto de las fracciones polar, polar aprotico y no polar del extracto crudo con la capacidad inhibitoria del mismo mediante las pruebas de difusión de disco.
- 3) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos crudos que logren inhibir el crecimiento de las bacterias en las pruebas de difusión de disco.

3. Antecedentes

3.1 Características generales de las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares pertenecientes al reino procariota, su material genético se encuentra libre dentro del citoplasma debido a que carecen de núcleo. Un factor importante en este reino es la presencia de estructuras extra cromosómicas conocidas como plásmidos, los cuales tienen la capacidad de replicarse de forma autónoma y con ello contribuir a la diversidad genética de los microorganismos (Bruin y Van der Geest 2008). Estos plásmidos proveen numerosos beneficios genéticos a las bacterias, entre ellas, la codificación de factores de virulencia, presencia y transferencia de genes de resistencia, se debe mencionar que no todas las bacterias cuentan con estas estructuras adaptativas (Carroll *et al.* 2016). Estos genes de resistencia les permiten a las bacterias metabolizar sustancias tóxicas provocadas por radiación, metales pesados y antibióticos lo cual favorece su sobrevivencia en los diferentes ambientes (Drlica y Gennaro 2001).

Las bacterias se clasifican de acuerdo a la conformación estructural de su pared celular en Gram positivas y Gram negativas, estas diferencias estructurales permiten identificar y clasificar bajo métodos tintoriales un grupo u otro. La pared celular de las bacterias Gram positivas está conformada principalmente por peptidoglicano, ácido teicoico y ácido teicurónico unidos por enlaces peptídicos. Esta compleja conformación hace que las bacterias absorban el violeta de genciana y este quede capturado en su pared adquiriendo una coloración morada al finalizar el proceso de tinción. En la pared celular de estas bacterias existen aproximadamente 40 capas de peptidoglicano, lo cual representa cerca de 50% de la composición de la pared celular (Carroll *et al.* 2016). Las bacterias Gram positivas generalmente presentan mayor susceptibilidad a sustancias tóxicas como antibióticos o compuestos orgánicos, a pesar del grosor de la pared, ya que carecen de estructuras protectoras complejas como membrana externa, lipopolisacáridos y periplasma en su pared celular las cuales están presentes únicamente en las bacterias Gram negativas (Nazzaro *et al.* 2013).

Las bacterias Gram negativas poseen una estructura celular más compleja, al igual que las Gram positivas cuentan con capas de peptidoglicano, sin embargo, no es tan gruesa, no obstante estas bacterias cuentan con otras tres capas protectoras las lipoproteínas, lipopolisacáridos, membrana celular interna y la membrana externa, elemento diferenciador entre ambos tipos de bacterias (Carroll *et al.* 2016). Silhavy *et al.* (2010) mencionan que la membrana externa posee una importante función de protección, esta estructura les ha conferido a estas bacterias una mayor adaptabilidad en el ambiente al protegerlas de sustancias nocivas

para su desarrollo. La membrana externa y la capa de lipopolisacáridos por su hidrofobicidad evitan la difusión de sustancias nocivas, lo cual favorece que estas bacterias sean menos afectadas por antibióticos o compuestos orgánicos, razón por la cual la búsqueda de nuevas opciones de control para este grupo resulta más compleja (Nazzaro *et al.* 2013, Kon *et al.* 2016).

En las ciencias agrícolas se han diferenciado dos importantes grupos para comprender la epidemiología y ecología de las bacterias a nivel productivo fueron clasificadas como bacterias fitopatógenas y promotoras de crecimiento. Las bacterias fitopatógenas, en su gran mayoría son saprófitos facultativos la mayor parte de su ciclo de vida lo desarrollan en plantas hospederas; cabe mencionar que algunas pueden sobrevivir como saprófitas y desarrollar su ciclo de vida en el suelo de ahí su clasificación (Rivera 2007). Debido a su crecimiento acelerado pueden provocar grandes pérdidas económicas en los sistemas productivos agrícolas en un periodo corto de tiempo (Rivera 2007). Se calcula que algunas de estas bacterias en condiciones óptimas pueden duplicar el número de individuos en aproximadamente 20-30 min, por esta razón, se ha definido que la mejor manera de realizar el control es mediante métodos preventivos (Agrios 2005). Los principales síntomas provocados en las plantas son pudrición de los tejidos, manchas foliares y marchitamiento, siendo estas capaces de afectar todos los órganos de las plantas, desde las raíces hasta los frutos (Arauz 1998).

Respecto a las bacterias fitopatógenas destacan los géneros *Pectobacterium* y *Pseudomonas* debido a su amplia gama de hospederos, entre los cultivos económicamente afectados por estas bacterias se encuentran la cebolla, zanahoria, lechuga, repollo, papa, chile, tomate y pepino, afectados durante el desarrollo y post-cosecha. Agrios (2005) y Rivera (2007) los clasifican como unos de los principales agentes causales de enfermedades en cultivos. Las bacterias del género *Pectobacterium* se caracterizan por ser microorganismos necrotrofos los cuales causan grandes pérdidas económicas debido a sus devastadores daños en los diferentes órganos de las plantas principalmente tallo y frutos (Okendi y Moleleki, 2014). En este género se destacan dos subespecies filogenéticamente distintas: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilense*, siendo estas las más estudiadas debido a su amplio rango de hospederos y a sus importantes daños en los cultivos (Nabhan *et al.* 2012; Xiaoying *et al.* 2020). El género *Pseudomonas* está formado por dos principales linajes filogenéticos *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, el linaje *P. aeruginosa* contiene en su gran mayoría los grupos filogenéticos identificados como patógenos, entre ellos *P. syringae*. De esta bacteria se han descubierto más de 60 patovares que afectan un amplio espectro de plantas y provocan una gran variedad de síntomas entre ellos manchas bacterianas y llagas (Khezri y Mohammadi, 2018; Gutiérrez *et al.* 2019).

Las bacterias promotoras de crecimiento se encuentran principalmente en la rizosfera o en forma vida libre en el suelo y establecen interacciones planta-bacteria, en donde la planta alimenta con sustancias orgánicas, carbohidratos y azúcares a las bacterias y estas le proporcionan protección a la planta contra fitopatógenos, solubilizan nutrientes del suelo y producen hormonas estimuladoras para el desarrollo radical (Osorio 2009). Algunos de los

principales géneros que se conocen hasta el día de hoy son *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

Parra y Cuevas (2001) describen al género *Azospirillum* como bacterias Gram negativas fijadoras de nitrógeno, ampliamente distribuidos en zonas templadas, tropicales y subtropicales; se destacan *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*. Richardson (2009), menciona que aparte de la fijación de nitrógeno, esta bacteria de vida libre promueve el crecimiento radicular mediante la liberación de fitohormonas principalmente auxinas (IAA). Otros autores destacan la capacidad de producción de citoquininas y giberelinas en el género *Azospirillum*, lo cual junto con la fijación de nitrógeno ha hecho que esta bacteria se utilice como inóculo en cultivos de trigo, maíz, sorgo y arroz (Perrig *et al.* 2007; Pankievicz *et al.* 2015). Esta bacteria al colonizar la rizósfera, libera sustancias que alteran la membrana de fosfolípidos y el flujo de electrones provocando que las raíces exuden sustancias acidificantes que hacen disponibles los iones de PO₄, con estos mecanismos promotores de crecimiento se ha logrado reducir hasta un 30% del aporte de fertilizante nitrogenado (Kumar *et al.* 2017).

El género *Bacillus* es un género ampliamente distribuido a nivel de suelo el cual se caracteriza por la formación de endosporas, estructuras que le confieren resistencia y capacidad adaptativa. La especie *Bacillus subtilis* forma una delgada capa denominada biopelícula, esta capa consiste en una comunidad multicelular que genera una matriz creada por la liberación de sustancias, siendo estas mismas las responsables de promover y proteger la rizósfera (Vlamakis *et al.* 2013). *Bacillus subtilis* ha sido utilizada para el control de enfermedades a nivel radical, produce y libera antibióticos, enzimas líticas y toxinas, que perjudican el desarrollo de ciertos hongos como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* entre otros (Li *et al.* 2014). Entre otros beneficios de esta bacteria se conoce la capacidad de solubilizar el fósforo, la fijación de nitrógeno y la producción de sideróforos los cuales promueven el crecimiento de la raíz y suprimen el crecimiento de hongos fitopatógenos (Hashem *et al.* 2019)

3.2 Extractos botánicos

Los extractos botánicos están constituidos por compuestos orgánicos, formados generalmente por átomos de hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre unidos por anillos de carbono (Eslahi *et al.* 2017). Estos compuestos orgánicos son producidos por diferentes organismos en la naturaleza, pero en particular las plantas son capaces de sintetizar una gran diversidad de moléculas orgánicas. Hasta el año 2003, se habían aislado aproximadamente más de 12000 compuestos naturales conocidos como metabolitos secundarios (Domingo y López 2003), sin embargo, en la actualización realizada por Sorokina y Steinbeck (2020) se registran un total de 200.000 compuestos sintetizados por las plantas. Los compuestos secundarios no son metabólicamente indispensables para el desarrollo de la planta, pero proveen defensas frente a otros organismos como insectos, bacterias y hongos. Esta variedad de compuestos se ha clasificado en grupos químicos siendo los alcaloides, cumarinas, fenoles, flavonoides, taninos y quinonas, los que destacan por su actividad antibacteriana (Zaynab *et al.* 2018). Para la elaboración de extractos a partir de plantas generalmente se debe realizar una serie de pasos entre

ellos la selección del material, secado, molienda, extracción de compuestos químicos vegetales, evaporación del solvente y concentración del extracto (Gupta *et al.* 2012).

3.2.1. Selección del material vegetal

La selección de una especie vegetal para la extracción de compuestos orgánicos debe tomar en cuenta los usos tradicionales que las civilizaciones le han otorgado a la planta, literatura científica que respalde las propiedades de la planta y la información químico taxonómica como los perfiles químicos de la planta. En caso de estudios exploratorios las especies se pueden seleccionar al azar, sin embargo, generalmente se inicia la selección por la información etnobotánica de la planta (Sharapin *et al.* 2000).

3.2.2 Secado del material vegetal

El secado del material es considerado un paso crítico, si no se realiza de forma correcta se pueden desnaturalizar sustancias químicas de interés (Lapornik *et al.* 2005). Para el secado en horno la temperatura utilizada no debe ser mayor de 40°C, temperaturas mayores a esta provocan la pérdida de compuestos termolábiles. El secado en horno de aire resulta el método de más bajo costo energético, por lo cual es el más utilizado en procesos industriales (Azwaninda 2015).

3.2.3 Selección del solvente.

La selección del solvente es fundamental para un proceso de extracción eficiente. Uno de los solventes más utilizados es el etanol a diferentes concentraciones con un rango de 70 a 100%, a concentraciones más bajas de alcohol mayor contenido de agua lo cual en ocasiones mejora la extracción de los componentes químicos contenidos en las plantas. Se debe tener en cuenta que el proceso de extracción debe ser del menor costo posible y de mayor rendimiento, en términos de tiempo y porcentaje de sustancias extraídas (Candori *et al.* 2008). El metanol es otro alcohol utilizado para la extracción de estos compuestos, que, si bien presenta una alta eficiencia de extracción, el riesgo de manipulación y las regulaciones legales lo hacen menos utilizado que el etanol, el cual es de bajo riesgo de manipulación y de fácil adquisición (Sultana *et al.* 2009; Azwaninda 2015).

El etanol se considera como un solvente polar, las extracciones realizadas con este solvente se caracterizan por estar constituidas mayormente por polifenoles (Dai y Mumper 2010). Igualmente, Ballesteros *et al.* (2014) en su estudio comparativo de extracción concluyeron que el etanol y el metanol son los dos solventes polares más eficientes para la extracción de polifenoles y antioxidantes, señalando al etanol como un solvente más práctico por su baja toxicidad. Daglia (2012) recalca la actividad antibacteriana de los polifenoles y describe algunos de los modos de acción entre ellos la inhibición de los factores de virulencia, supresión de la formación de biopelículas y la neutralización de las toxinas bacterianas.

3.2.4 Métodos de extracción.

La maceración es el método tradicional de extracción más utilizado debido su bajo costo y facilidad de ejecución. Existen otros métodos más eficientes como el baño ultrasónico, Trusheva *et al.* (2007) realizaron un estudio en el cual comparan la eficiencia de extracción del método de maceración y baño ultrasónico, tomando como parámetros de eficiencia la calidad del extracto y el tiempo de extracción. El autor recalca que la maceración requiere un tiempo de extracción de aproximadamente 48 a 92 h, para obtener el mismo porcentaje de extracción que se obtiene en 1,5 h con el baño ultrasónico. Al comparar los métodos se observa que la maceración obtuvo un porcentaje de recuperación de 55% de extracto, mientras que con el baño ultrasónico se obtuvo un 53% de extracto, demostrando así que el baño ultrasónico en un menor tiempo logra extraer un porcentaje muy similar al método de maceración.

El baño ultrasónico se basa en el uso de ondas de sonido de alta intensidad y frecuencia, las cuales provocan la contracción y expansión de la pared celular. Esta constante contracción genera mayor ruptura de las paredes celulares, lo cual sumado al poder oxidativo del solvente causa una mayor penetración y extracción del solvente en las células vegetales (Altemimi *et al.* 2016; Lezoul *et al.* 2020). Este método requiere de cantidades bajas de solvente y con ello menor cantidad de energía lo que permite disminuir los costos de producción del extracto (Yingngam *et al.* 2014; Dhanani *et al.* 2017). Diferentes autores han demostrado la efectividad del método de extracción de ondas ultrasónicas con solventes polares, concluyendo en sí que mediante el uso de esta técnica se obtiene una mayor cantidad de compuestos bioactivos (Adilah y Ziad 2017; Giacometti *et al.* 2018; Azimi *et al.* 2020).

3.2.5 Concentración del extracto

La concentración de los compuestos extraídos se lleva a cabo por medio del proceso de evaporación, el cual consiste en separar el solvente de los compuestos extraídos de la planta. Para ello se utiliza el método de evaporación rotativa con el uso de un rotavapor, este equipo diseñado para la evaporación de solventes, el cual mediante la generación del vacío modifica la presión de vapor de los compuestos, disminuyendo su punto de evaporación. Al disminuir el punto de evaporación se logra separar el solvente con una menor temperatura asegurando así que los compuestos no sean desnaturalizados por la temperatura (BUCHI 2019).

3.3 Plantas medicinales

Las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas de forma empírica y más recientemente de forma científica, este uso constante ha llevado a la identificación de familias de plantas que poseen compuestos científicamente identificados como antagonistas de hongos y bacterias. Un ejemplo de una familia de plantas con propiedades controladoras es la familia Lamiaceae, conformada por especies como el romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), lavanda (*Lavandula officinalis*), menta (*Mentha x piperita*) y orégano (*Origanum*

vulgare) (Saad *et al.* 2013). Se destacan también las familias Alliaceae, Asteraceae, Rutaceae, Geraniaceae y Myrtaceae como familias con propiedades controladoras con efectos anti fúngicos, antiparasitarios y antibacterianos (Niño *et al.* 2006). Se ha descrito el modo de acción de los compuestos de ciertos extractos y aceites esenciales, estos actúan sobre las membranas celulares causando la ruptura, permeabilización y lisis de la membrana lo cual provoca la muerte de las bacterias. Igualmente, se ha observado que algunos extractos generan cambios en la composición y síntesis de los ácidos grasos, así como la afectación del flujo de electrones, transporte activo y daños a través de la coagulación del contenido citoplasmático (Silva y Fernández 2010; Hyldgaard *et al.* 2012).

3.3.1 *Pelargonium graveolens*.

El citro-geranio (*Pelargonium graveolens*) pertenece a la familia Geraniaceae, es un arbusto perenne de aproximadamente 60–90 cm de altura, con hojas que se caracterizan por ser aromáticas (figura 1). Esta planta originaria de la India y Malasia, se desarrolla bien en climas tropicales y subtropicales (Yvette 2005). Diversos estudios han mostrado que los principales compuestos del citro-geranio son el citronelol y geraniol, identificados como los responsables de la actividad biológica de esta planta (Badawy y Abdelgaleil 2013; Hamidpour *et al.* 2017).

Karbera y colaboradores (2013), realizaron un trabajo para determinar la actividad antimicrobiana con el método de difusión de disco, obteniendo la inhibición de seis cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella* serotipo B y D *Shigella flexnerie* y *Shigella sonne*) de un total de doce bacterias, demostrando así la capacidad de inhibición sobre bacterias Gram negativas. Bayoub *et al.* (2010), en su estudio de controló *Listeria monocytogenes* mediante el uso de extractos botánicos y demostró el efecto inhibitorio de *P. graveolens* sobre bacterias Gram positivas al obtener valores de inhibición de crecimiento de 16 mm en la prueba de difusión de disco, adicionalmente reportó como concentración mínima inhibitoria 6,15 mg/l. Pullagummi *et al.* (2014), en su estudio comparativo de la eficiencia de control del extracto de patchouli y citro-geranio demostró que el extracto crudo de citro-geranio logró inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes* al utilizar concentraciones de 60 y 80 mg/ml.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Geraniales
Familia	Geraniaceae
Género	<i>Pelargonium</i>
Especie	<i>Graveolens</i>



Figura 1. Taxonomía e ilustración de *Pelargonium graveolens*. Recuperada de <https://alchetron.com/Pelargonium-graveolens>.

3.3.2 *Hamelia patens*

El fosforillo (*Hamelia patens*) es una planta endémica de Centro América, se caracteriza por ser un arbusto de 1 a 2 m de altura, muy ramificado, produce inflorescencias anaranjadas de tipo terminal, esta planta pertenece a la familia de las Rubiaceas (figura 2) (Chacón *et al.* 2004). En cuanto a su composición química se caracteriza por sintetizar palmirina, rumberina, hamelina, pterodina, isopteropodina y uncarina, todos alcaloides (Maamoun *et al.* 2019). Okoye y Ezeogo (2016) realizaron un estudio para observar la actividad antibacteriana de esta planta, para ello elaboraron extractos con cuatro solventes metanol, éter de petróleo, agua y etanol. Los resultados mostraron que los extractos con etanol presentaron los mejores resultados de inhibición contra las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Igualmente, Rubio *et al.* (2018) demostró que el extracto etanólico de esta planta presenta actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, concluyendo que esto se debe al diverso contenido de terpenos, flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas y polifenoles.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Hamelia</i>
Especie	<i>Patens</i>



Figura 2. Taxonomía e Ilustración de *Hamelia patens*. Recuperada de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/hamelia-patens/fichas/pagina1.htm>

3.3.3 *Ruta graveolens*

Kumar *et al.* (2014) describe la ruda (*Ruta graveolens*) como una planta de tallos herbáceos y ramificados, que alcanzan una altura entre 60 a 90 cm. Sus hojas compuestas son pequeñas, oblongas, carnosas y lisas (figura 3). Su origen se ubica en los países mediterráneos orientales y Asia, se cultiva entre los 1500 y los 2400 m.s.n.m, en zonas con rangos de temperaturas entre los 5 y los 28°C. Saldaña y Torres (2012) describieron la composición de la ruda, siendo la mayoría de sus componentes alcaloides, flavonoides, cetonas y alcoholes. Nagarjuna y Jabbar (2016) describieron la composición química de la planta obteniendo que aproximadamente trece compuestos constituyen el cien por ciento del perfil químico, siendo 2-undecanona (43,6%), 2- nonanona (16,09), 2- acetoxo tetradecanona (14,49%) y nonil ciclipropano carboxilato (9,22%) los compuestos con mayor presencia. Respecto a su actividad antibacteriana Pandey *et al.* (2011), demostró que el extracto crudo etanólico de ruda tuvo efectos sobre el crecimiento de siete diferentes géneros de bacterias de importancia agrícola. Igualmente, Pavlovic (2014) encontró que el extracto crudo de *R. graveolens* posee efecto antibacteriano en diversos géneros de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Briceño *et al.* (2011) evaluaron el efecto del extracto de ruda en bacterias del género *Pectobacterium*, sin embargo, no se observó efecto inhibitorio sobre este género.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	<i>Ruta</i>
Especie	<i>Graveolens</i>



Figura 3. Taxonomía e ilustración de *Ruta graveolens*. Recuperada de: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=733>

3.3.4 *Thymus vulgaris*.

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una hierba erecta perteneciente a la familia Lamiaceae, de aproximadamente 40 cm de alto, muy ramificada, siendo estas ramificaciones de composición leñosa y algo pubescentes. Posee hojas opuestas de forma variada y frecuentemente lanceoladas cuyo tamaño va de los 3 a los 6 mm de largo y de 1 a 3 mm de ancho (figura 4) (Dauqan *et al.* 2017). El origen de esta planta se ubica en la región mediterránea y es cultivada en el resto del continente europeo, también en Asia y América. Medicinalmente ha sido utilizada de manera tradicional para la asepsia de úlceras y heridas (Castro *et al.* 2013).

Los aceites esenciales y extractos botánicos de esta planta han sido ampliamente estudiados y descritos siendo el timol y el carvacrol los principales compuestos de acción biológica. Boruga *et al.* (2014) realizaron el estudio fitoquímico del tomillo demostrando que aproximadamente quince componentes representan el 99% de los compuestos de la planta, entre estos se destaca p-cymene, γ -terpinene (precursores del timol y carvacrol), el carvacrol y el timol, mencionados en orden de presencia de menor a mayor. Los investigadores realizaron pruebas para determinar la capacidad antibacteriana del aceite de tomillo, en el cual destacó una fuerte actividad inhibitoria contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Rueda y colaboradores (2018) compararon el efecto inhibitorio del tomillo con los antibióticos comerciales para control de bacterias fitopatógenas. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición generada por *T. vulgaris* en *R. solanacearum* vs los antibióticos no tuvo diferencia significativa entre el grado de inhibición de los antibióticos y los extractos ya que ambos presentaron valores de inhibición similares.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Thymus
Especie	Vulgaris



Figura 4. Taxonomía e ilustración de *Thymus vulgaris*. Recuperado de: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=1769>.

3.4 Pruebas microbiológicas

Para determinar si una sustancia tiene influencia sobre el crecimiento de las poblaciones bacterianas, se utiliza la prueba de difusión de disco conocida como prueba de Kirby-bauer (1966), y la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El fundamento de la prueba de difusión de disco se basa en medir de forma cuantitativa el efecto que posee una sustancia de interés sobre el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas. Para esto se coloca un papel filtro impregnado con la sustancia a evaluar, este filtro se coloca en un medio de cultivo el cual se encuentra inoculado con la bacteria de interés. Sí la sustancia posee capacidad inhibitoria bacteriana provocará que alrededor del disco de papel se forme un halo de inhibición en donde la bacteria no fue capaz de crecer (Hombach *et al.* 2013). Por su parte, la prueba de CMI, consiste en determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* que logra inhibir el crecimiento de una población bacteriana luego de un periodo de incubación de 24 o 48 horas (Ramírez y Marín 2009).

4. Metodología

4.1 Sitio experimental

El trabajo inició en el Centro de Agricultura Orgánica del Instituto Nacional de Aprendizaje (INA) ubicado en la provincia de Cartago en el cantón de Oreamuno donde se obtuvo el material vegetal (9°52'55 N 83°53'49'W). Posteriormente en la Universidad de Costa Rica (UCR) se realizó la fase de obtención de los extractos, pruebas de antibiosis y concentración mínima inhibitoria. El proceso de obtención del extracto se realizó en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), las pruebas de inhibición y concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Celular (CIBCM), ambas ubicadas en la Ciudad de la Investigación de la UCR, provincia de San José, cantón de Montes de Oca, distrito de San Pedro.

4.2 Material Experimental

4.2.1 Recolección de plantas medicinales

En los meses de enero y febrero del año 2020 se realizó la recolección del material vegetal de tomillo (*Thymus vulgaris*), citro-geranio (*Pelargonium graveolens*), fosforillo (*Hamelia patens*) y ruda (*Ruta graveolens*) para la elaboración de los extractos botánicos. La recolección fue realizada en horas de la mañana entre las 7am a 10am, de acuerdo a Lebovla *et al.* (2000) las concentraciones de los componentes químicos son mayores en estas primeras horas de la mañana. Con la ayuda de tijeras de podar se recolectaron los ápices y las hojas más jóvenes, hasta obtener aproximadamente un kilogramo de material vegetal fresco.

4.2.2 Secado y molienda de plantas

Para el secado, las muestras se colocaron en un secador de flujo de aire (Anexo 1) a una temperatura de 40°C. El periodo de exposición de las muestras fue de 24h para materiales poco turgentes como *T. vulgaris*, *R. graveolens* de 48h para los materiales más turgentes como *H. patens* y *P. graveolens*. Finalizado el proceso de secado, los materiales fueron molidos a un tamaño de partícula de 10 mm de grosor, en un molino pulverizador Willy Mill (marca Thomas and Arthur Mill®). Posterior al proceso de molienda se determinó el peso seco del material vegetal molido y este fue conservado en bolsas plásticas selladas al vacío para evitar su deterioro. Las muestras fueron conservadas en la oscuridad hasta el momento de su utilización para prevenir reacciones de fotólisis (Altemimi *et al.* 2017) (Anexo 1).

4.3 Elaboración de extractos botánicos

4.3.1. Obtención de extractos botánicos

El proceso de extracción se realizó de manera individual para cada una de las plantas. Primero, se determinó la masa de la planta seca, se colocó el material en cristalería de vidrio con

capacidad volumétrica de aproximadamente diez litros en el cual se vertió Etanol (C_2H_5OH) absoluto marca Merck® en una relación 1:7 p/v. El recipiente fue llevado al limpiador ultrasónico EW-08895-39 (marca Cole Palmer®) por 30 min. Concluido el tiempo, el alcohol contenido en el frasco fue decantado y filtrado en un Erlenmeyer de 1l, este proceso se realizó por triplicado para cada muestra (Anexo 2).

4.3.2. Evaporación del solvente

Los extractos obtenidos fueron vertidos individualmente en un matraz de evaporación y llevados a un rotavapor Vaccum controller V-850 (marca Buchi®). Este equipo fue programado de acuerdo con las especificaciones dadas por el fabricante para la evaporación de etanol con excepción de la temperatura, para la cual se utilizó 40°C en lugar de 79°C, para evitar la desnaturalización de los compuestos de interés. Finalizado el proceso de destilación se trasvasaron los extractos a viales de 30 ml, los cuales se encontraban previamente pesados en una balanza analítica HR-120 (marca A&D®).

4.3.3 Cribado de los extractos

Para el cribado de los extractos estos fueron depurados de acuerdo con la polaridad de sus compuestos. Según la metodología propuesta Peredo *et al.* (2009) para la separación de compuestos no polares se utilizó hexano (C_6H_{14}) y para la separación de los compuestos polares aproticos se utilizó diclorometano (CH_2Cl_2). De acuerdo con la metodología se colocaron 2g del extracto botánico en un Erlenmeyer de 100 ml, cada muestra se disolvió en agua destilada con ayuda del baño ultrasónico. Los extractos fueron trasvasados a un embudo separador de fases en la cámara de extracción de gases. Se realizó un total de cuatro lavados con hexano de 10 ml en cada lavado y cuatro lavados con diclorometano cada uno con 10 ml respectivamente (Anexo 3). Las diferentes fases fueron separadas en viales previamente pesados en la balanza analítica. Estos viales fueron llevados a rotavapor Vaccum controller V-850 (marca Buchi®) hasta lograr destilar por completo el disolvente, lo que tomó un tiempo aproximado de seis horas por vial. Luego se determinó la masa total contenida en cada uno de los viales para calcular el porcentaje de composición correspondiente de cada fase.

4.3.4. Disolución de los extractos botánicos

Los viales fueron llevados a la cámara de pesaje del CIPRONA y con la balanza analítica HR-120 se tomó una muestra 10mg, los cuales fueron colocados en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml previamente pesado. Para disolver el extracto, se calculó el volumen requerido del disolvente orgánico dimetil sulfóxido (DMSO) respecto a la masa en gramos de extracto para obtener una concentración final de 20 mg/ml, los extractos se disolvieron hasta el momento de su uso.

4.4. Ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos se realizaron con bacterias de la bacterioteca del laboratorio del Área de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones de Biología Celular y Molecular, Facultad de Microbiología UCR y del laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro investigación Agronómicas (Cia) (cuadro 1), el proceso se llevó a cabo en cámara de flujo laminar. Antes de iniciar las pruebas se prepararon placas Petri con 20 ml de medio Luria Bertani Agar (LB) estéril, paralelamente se cultivaron las bacterias en medio Agar nutritivo, incubándolas por 48h a 30°C (Gajdács y Spengler, 2017). Pasadas las 48h y con un crecimiento activo de las bacterias, se iniciaron las pruebas microbiológicas. Primeramente, se colocaron 5 ml medio Luria Bertani semi sólido con 0,7% agar en tubos de ensayo estériles; se inocularon los tubos individualmente con las diferentes bacterias hasta alcanzar una concentración de inóculo de 1×10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias). La determinación de las UFC se realizó por el método de turbidez utilizando el estándar de McFarland 0,5 (CMI, 1996). El contenido inoculado de los tubos de ensayo fue vertido sobre las placas petri con agar Luria Bertani, formando así una sobre capa con el microorganismo de aproximadamente 5mm de espesor.

Luego del proceso de solidificación de la sobre capa, se procedió a colocar los discos de papel absorbente sobre una placa Petri estéril, donde se impregnó tres filtros con 20 μ l del extracto a evaluar, un filtro con 20 μ l de Gentamicina (1%) como control positivo y un filtro de 20 μ l de DMSO como blanco, en total fueron colocados cinco filtros por placa Petri colocados equidistantemente, este proceso se repitió en cada bacteria los platos Petri fueron sellados con papel parafilm y llevados a una incubadora a 30°C por un periodo de 48h (Anexo 4). Las mediciones de los halos de inhibición se realizaron con una regla graduada en milímetros y adicionalmente se realizó una captura fotográfica de las placas utilizando una pantalla de luz para la correcta iluminación de la placa Petri.

Los resultados obtenidos al utilizar esta prueba permiten medir cuantitativamente la inhibición de las bacterias y con ello clasificar cualitativamente su sensibilidad hacia una sustancia específica en términos de susceptible, medio susceptible o resistente (Jorgensen y Ferraro, 2009). Esta clasificación fue realizada por Durafford y colaboradores (1983) basados en la estadística aplicada elaboraron una tabla de interpretación y clasificación de la sensibilidad de las bacterias frente a los extractos botánicos y aceites esenciales (cuadro 2).

Cuadro 1. Cepas de bacterias utilizadas para las pruebas de inhibición de disco

Código	Hospedero	Nombre	Gram	Bacterioteca
AZ.BM1	N.A*	<i>Azospirillum brasilense</i>	-	Colección Área de Microbiología Agrícola CIA
BC.M1	N.A*	<i>Bacillus subtilis</i>	+	Colección Área de Microbiología Agrícola CIA
E. c 495	N.A*	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	Colección de Bacterias de la Facultad de Microbiología (cepa tipo)
1.3.A	Lechuga	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	Colección Fitopatógenos Área de Microbiología Ambiental CIBCM
CfspA	Chile	<i>Pectobacterium brasilense</i>	-	Colección Fitopatógenos Área de Microbiología Ambiental CIBCM
xF-1	Frijol	<i>Pseudomonas syringae</i>	-	Colección Fitopatógenos Área de Microbiología Ambiental CIBCM

* Bacterias procedentes de colecciones bacteriológicas

Cuadro 2. Escala cualitativa de sensibilidad de Duraffourd (1987) con base en la medición cuantitativa del halo de inhibición obtenido en las pruebas de difusión de disco.

Escala	Medición del halo (mm)
Nula	0 a 8
Sensible	9 a 14
Muy sensible	15 a 19
Sumamente sensible	20 \geq

4.5 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizó el método de macro dilución. Se preparó tubos de ensayo con una concentración igual al estándar de McFarland de 0,5 (1×10^8 UFC/ml). Paralelamente se prepararon tres tubos de ensayo en los cuales se pesó 20mg de extracto y se disolvió con 1 ml del solvente dimetil sulfóxido (DMSO) y se inocularon con 50 μ L de inóculo. En otros 6 tubos se agregó 1ml de caldo Lb para realizar las diferentes diluciones seriadas (cuadro 3), se inocularon con 50 μ l de inóculo bacteriano. Se trabajó con medio Lb inoculado como control positivo y extracto sin inocular como control negativo para determinar la existencia de contaminación en el extracto. Los tubos fueron llevados a la incubadora por un periodo de 48h a una temperatura de 30°C.

Luego de 48h, los tubos se retiraron de la incubadora y fueron llevados a la cámara de flujo laminar. De manera visual se observó la presencia de turbidez (indicador de crecimiento bacteriano), sin embargo, debido a la coloración de los extractos en la mayoría de los tubos hubo presencia de turbidez. Por esta razón, se cultivó el caldo de todos los tubos de ensayo en agar nutritivo para comprobar el crecimiento de las bacterias (Anexo 8). Se tomaron 100 μ l de caldo con ayuda de una micropipeta (marca BOECO) graduada y se colocaron en placas Petri con medio LB. Las gotas fueron distribuidas sobre la superficie del medio utilizando un asa Grigalsky los platos se incubaron por 48h a 30°C. Finalizado el periodo de incubación, las placas se evaluaron visualmente, se definió la concentración mínima inhibitoria, como la concentración más baja en la cual no hubo crecimiento de la bacteria (CLSI,2012). Esta metodología es válida siempre y cuando, la bacteria crezca en el blanco (medio de crecimiento sin extracto) y que no crezcan bacterias en el control negativo (medio sin inocular).

Cuadro 3. Identificación y concentración (mg/ml) de tubos de ensayo utilizados en prueba de Concentración Mínima Inhibitoria.

Identificación	Concentración(mg/ml)
Concentración inicial	20
$\frac{1}{2}$	10
$\frac{1}{4}$	5
$\frac{1}{8}$	2,5
$\frac{1}{16}$	1,25
$\frac{1}{32}$	0,62
$\frac{1}{64}$	0,31
Control positivo	0
Control negativo	0

4.6 Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, los tratamientos corresponden a los extractos crudos de *T. vulgaris*, *R. graveolens*, *H. patens* y *P. graveolens*, con un total 5 repeticiones por bacteria. La unidad experimental corresponde a las placas Petri con la bacteria en la cual se colocan tres filtros de papel absorbente con el extracto, un disco con DMSO como blanco y un control positivo con antibiótico Gentamicina (cuadro 4) Para el análisis de datos se utilizó tablas de frecuencias para clasificar el efecto del extracto sobre la bacteria.

Cuadro 4. Detalle de diseño experimental y análisis de datos del experimento.

Bacterias	Tratamientos	Unidad experimental	Repetición	Variable evaluada	Control positivo	Blanco
<i>Azospirillum brasilense</i>	Extracto <i>Thymus vulgaris</i> Extracto <i>Hamelia patens</i> Extracto <i>Pelargonium graveolens</i> Extracto <i>Ruta graveolens</i>	5 por cada extracto	15 de cada extracto	Halo de inhibición	Gentamicina	DMSO
<i>Pseudomonas syringae</i>	Extracto <i>Thymus vulgaris</i> Extracto <i>Hamelia patens</i> Extracto <i>Pelargonium graveolens</i> Extracto <i>Ruta graveolens</i>	5 por cada extracto	15 de cada extracto	Halo de inhibición	Gentamicina	DMSO
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Extracto <i>Thymus vulgaris</i> Extracto <i>Hamelia patens</i> Extracto <i>Pelargonium graveolens</i> Extracto <i>Ruta graveolens</i>	5 por cada extracto	15 de cada extracto	Halo de inhibición	Gentamicina	DMSO
<i>Pectobacterium brasilense</i>	Extracto <i>Thymus vulgaris</i> Extracto <i>Hamelia patens</i> Extracto <i>Pelargonium graveolens</i> Extracto <i>Ruta graveolens</i>	5 por cada extracto	15 de cada extracto	Halo de inhibición	Gentamicina	DMSO
<i>Bacillus subtilis</i>	Extracto <i>Thymus vulgaris</i> Extracto <i>Hamelia patens</i> Extracto <i>Pelargonium graveolens</i> Extracto <i>Ruta graveolens</i>	5 por cada extracto	15 de cada extracto	Halo de inhibición	Gentamicina	DMSO

5.Resultados y discusión

5.1. Rendimiento de extracción sólido líquido de los extractos crudos

El rendimiento de la extracción obtenida fue afectada por las pérdidas de masa en los diferentes procesos, el mayor porcentaje de pérdida se debe al proceso de secado, representando un 75-80% de la masa total de los tejidos vegetales. El porcentaje de eficiencia de recuperación para los cuatro extractos presentó valores menores a un 10% (cuadro 5).

Respecto al uso de material seco o fresco, los materiales secos poseen ventajas físicas como el manejo postcosecha y ventajas químicas como el aumento en la calidad y rendimiento de los compuestos obtenidos. Sulaiman *et al.* (2011), menciona que el uso de plantas secas facilita la extracción y la ejecución de los experimentos, ya que el material seco al contener una cantidad mínima de agua no es afectado por acción de los microorganismos descomponedores. De igual manera Pham *et al.* (2015) menciona que los materiales secos pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo y con ello reducir los costos de transporte y conservación. Respecto al aumento en eficiencia química Lim y Murtijaya (2007) mencionan que al secar el material vegetal se inactiva la enzima polifenol oxidasa y la enzima lipoxigenasa. Yi y Wetzstein (2011) mencionan que estas enzimas degradan fenoles, polifenoles y antioxidantes en presencia de pequeñas cantidades de agua, y al inactivar estas enzimas la cantidad y calidad de polifenoles totales y antioxidantes es mayor en comparación si se utiliza material fresco.

Cuadro 5. Rendimiento de extracción de los extractos crudos obtenidos tras la extracción sólido-líquido.

<i>Planta</i>	<i>Peso húmedo (g)</i>	<i>Peso seco (g)</i>	<i>% Peso seco</i>	<i>Volumen solvente (ml)</i>	<i>Peso de vial (g)</i>	<i>Peso vial+ muestra (g)</i>	<i>Peso extracto (g)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
<i>Pelargonium graveolens</i>	1000	161	16,1	2450	27,6714	41,3707	13,6993	8,5089
<i>Hamelia patens</i>	1000	250	25	2125	25,0796	39,4613	14,3817	5,7527
<i>Ruta graveolens</i>	1000	370	37	2125	24,9275	38,7276	13,8001	3,7298
<i>Thymus vulgaris</i>	1000	350	35	2275	27,6667	50,3008	22,6341	6,4669

5.2. Porcentaje de composición por fase polar, polar aprotico y no polar.

Se cuantificó el porcentaje de composición de cada fase (polar/ polar aprótico / no polar) de cada extracto, mediante la masa obtenida al final del proceso de depuración. Los resultados obtenidos muestran diferencias en la polaridad dominante de los extractos de cada planta. Para el extracto de *P. graveolens* se obtuvo una composición mayoritariamente polar (56,49%), el extracto de *H. patens* presentó una composición principalmente de moléculas polares apróticas (51,26%) y para los extractos *R. graveolens* y *T. vulgaris* predominaron los compuestos no polares 34,08% y 44,79% respectivamente (cuadro 6). Se debe mencionar que en algunos extractos el porcentaje es inferior al cien por ciento, lo cual es ocasionado por pérdidas durante el proceso de depuración y en algunos otros casos el porcentaje supera el cien por ciento. Castro (2020) explica que al realizar separaciones con disolventes los extractos pueden perder peso debido a procesos como el trasvase y a una incompleta separación de la fase con el embudo de agitación, mientras que el proceso de ganancia de masa ocurre principalmente por una incompleta volatilización del solvente.

Los porcentajes de composición proveen información sobre la polaridad dominante de los compuestos sintetizados por las plantas, lo que permite la identificación y facilita una mejor selección del solvente con el cual realizar la extracción. En cuanto al *P. graveolens* predominaron los compuestos polares (cuadro 6), coincidiendo con la investigación desarrollada por Hsouna y Hamdi (2012). Estos autores realizaron extracciones con *P. graveolens* utilizando diferentes solventes polares y no polares en busca de compuestos con actividad antibacteriana. Concluyeron que los solventes polares logran extraer con mayor rendimiento los compuestos de esta planta, destacando el agua (H₂O) como el solvente con mayor rendimiento de extracción, sin embargo, otros autores han observado que con los alcoholes se obtiene una extracción de menor rendimiento en cantidad, pero de mayor calidad (Boukhris *et al.* 2012).

En el caso de *H. patens* se puede observar una alta composición de compuestos polares, lo cual refleja una afinidad de los solventes polares con las moléculas constituyentes. Okoye y Ezeogo (2016), analizaron los rendimientos y la calidad de extracción a partir de hojas de *H. patens* utilizando diferentes solventes de acuerdo a su polaridad. Estos autores mostraron que al realizar la extracción con etanol se obtienen alcaloides, taninos, saponinas, glicósidos, flavonoides y terpenoides, demostrando así la afinidad del solvente al compararlo con el solvente no polar éter de petróleo, el cual no logró extraer ninguna de estas moléculas. Noor *et al.* (2020) menciona que los extractos de *H. patens* con solventes polares como etanol y metanol contienen gran cantidad de metabolitos secundarios a diferencia de los solventes no polares, coincidiendo con los resultados obtenidos por Pérez *et al.* (2016), los cuales obtuvieron altos rendimientos de extracción utilizando solventes polares como etanol, metanol y bajos rendimientos al utilizar hexano solvente no polar (cuadro 6), lo cual demuestra la naturaleza mayoritariamente polar de sus compuestos y los resultados coincidentes con este estudio.

En cuanto a los porcentajes de composición de *Ruta graveolens*, se observa un contenido similar entre las fracciones polar y no polar (cuadro 6). De acuerdo con Gebregiorgis y Mahamadall (2015) al realizar extracciones con compuestos polares se logran extraer principalmente glicósidos, fenoles y glicolípidos los cuales los califican como los principales compuestos controladores de bacterias. Giresha *et al.* (2015) compararon la eficiencia de extracción de diferentes solventes, entre ellos solventes polares como etanol y compuestos no polares como hexano. Obtuvieron como resultado que los solventes de naturaleza polar logran extraer mayor cantidad de compuestos fitoquímicos que los compuestos no polares, además detallaron que al utilizar etanol como solvente el contenido químico del extracto está compuesto principalmente por fenoles, flavonoides, saponinas y alcaloides estos son mencionados en orden de la mayor a menor concentración encontradas. Saeidinia *et al.* (2016) y Cunha *et al.* (2015) mencionan el efecto inhibitor de los extractos de ruda obtenidos con solvente polares y no polares debido a una alta presencia de compuestos como flavonoides (rutina), alcaloides (furacumarinas, piranocumarinas) y aceites esenciales como el 2-nonanona presentes en ambos tipos de extractos.

Respecto al *Thymus vulgaris* el perfil químico obtenido (cuadro 6) comparado con el de otras investigaciones confirman la naturaleza no polar de los compuestos sintetizados por esta planta. Mnayer *et al.* (2017) realizó un análisis comparativo entre la extracción con solventes no polares y solventes polares. Los autores determinaron que la extracción con hexano (no polar) mostró el mejor rendimiento siendo este de 8,34g/100g comparada con rendimientos de 5,93g/100g y 4,03g/100g de los otros solventes polares, lo anterior valida los resultados obtenidos (cuadro 6) en donde un 44% de los componentes son no polares. Ares *et al.* (2020) realizaron la determinación de Timol y Carvacrol, las dos principales moléculas producidas por esta planta, en el polen de abejas, obteniendo rendimientos del 85% de extracción con el hexano, siendo este mucho mayor comparado al 75% de rendimiento obtenido al utilizar etanol como solvente.

Cuadro 6. Porcentaje de composición (polar/polar aprótico / no polar) de los extractos de *P. graveolens*, *H. patens*, *R. graveolens* y *T. vulgaris* de 2 g de extracto crudo depurado.

Planta	Compuesto	Polaridad	Peso vial (g)	Vial + muestra(g)	Peso muestra(g)	Composición %
<i>P. graveolens</i>	H ₂ O	Polar	27,62	28,75	1,13	56,49
<i>P. graveolens</i>	Hex	No Polar	18,55	19,29	0,74	37,16
<i>P. graveolens</i>	CH ₂ Cl ₂	Polar aprótico	18,44	18,75	0,31	15,62
<i>H. patens</i>	H ₂ O	Polar	23,16	23,47	0,31	15,49
<i>H. patens</i>	Hex	No polar	18,41	18,57	0,16	7,94
<i>H. patens</i>	CH ₂ Cl ₂	Polar aprótico	18,39	19,42	1,03	51,27
<i>R. graveolens</i>	H ₂ O	Polar	27,62	28,23	0,61	30,66
<i>R. graveolens</i>	Hex	No polar	18,41	19,10	0,68	34,09
<i>R. graveolens</i>	CH ₂ Cl ₂	Polar aprótico	18,57	18,91	0,34	17,04
<i>T. vulgaris</i>	H ₂ O	Polar	27,54	27,76	0,21	10,70
<i>T. vulgaris</i>	Hex	No polar	18,49	19,39	0,90	44,79
<i>T. vulgaris</i>	CH ₂ Cl ₂	Polar aprótico	18,50	18,60	0,11	5,36

5.3. Prueba de difusión de disco

Se evaluaron las pruebas de difusión de disco de los extractos de *R. graveolens*, *P. graveolens*, *T. vulgaris* y *H. patens* a una concentración de 20mg/ml, Gentamicina 1mg/ml como control positivo y dimetil sulfóxido como blanco, a las 48 horas. Se determinó que el extracto de ruda (*R. graveolens*) tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias promotoras de crecimiento *B. subtilis* (Gram positiva) y *A. brasilense* (Gram negativa) y no mostró efecto inhibitorio sobre las bacterias fitopatógenas en estudio (cuadro 7).

Los datos de halos inhibitorios obtenidos se analizaron mediante la tabla de clasificación de Duraffourd (cuadro 2) para lo cual se estimaron las frecuencias relativas (cuadro 8). Se observa que *A. brasilense* vs *R. graveolens* presenta una frecuencia 60,00% de inhibición categorizada como sensible y un 40,00% de inhibición categorizada como nula, en cuanto al control negativo la frecuencia fue 100% sensibilidad nula y para el caso del control positivo (Gentamicina) presentó un 100% de frecuencia de inhibición muy sensible. Para la bacteria *B. subtilis* de acuerdo a la clasificación se obtuvo una frecuencia de 66,67% de comportamiento sensible y 33,33% de sensibilidad nula con respecto al extracto de *R. graveolens*. El control negativo presentó un 100% de frecuencia de sensibilidad nula y un 100% de frecuencia de carácter muy sensible con el control positivo.

Cuadro 7. Medición de halo de inhibición (mm) a las 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de *R. graveolens*, en medio agar LB con sobre capa de agar LB al 0,7% con bacterias a una concentración de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml.

Bacterias	Extracto	Promedio inhibición**	Control positivo	Blanco
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ruta graveolens</i>	9,2±1,24	18 ± 2,65	0
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Ruta graveolens</i>	8,60±0,43	17,6 ± 2,05	0
<i>Pectobacterium brasilense</i>	<i>Ruta graveolens</i>	0	16,6± 0,99	0
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Ruta graveolens</i>	0	18,4± 2,01	0
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	<i>Ruta graveolens</i>	0	12± 0,61	0
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Ruta graveolens</i>	0	17,2± 1.14	0

* Concentración 20mg/ml, promedio de un total de 15 repeticiones.

**Para control positivo Gentamicina 1mg/ml.

***Se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) como blanco al ser el disolvente de los extractos

Cuadro 8. Tabla de distribución de frecuencias relativas de la sensibilidad de *A. brasilense* y *B.subtilis* al extracto crudo de *R. graveolens*.

Bacterias	Nula	Sensible	Muy sensible	Total
<i>A. brasilense</i> vs DMSO	100	0	0	100
<i>A. brasilense</i> vs Gentamicina	0	0	100	100
<i>A. brasilense</i> vs <i>R. graveolens</i>	40	60	0	100
<i>B. subtilis</i> vs DMSO	100	0	0	100
<i>B. subtilis</i> vs Gentamicina	0	0	100	100
<i>B. subtilis</i> vs <i>R. graveolens</i>	33	66	0	100

Los resultados muestran que el extracto crudo de *R. graveolens* logró inhibir el crecimiento de dos microorganismos promotores de crecimiento, lo cual revela que los extractos botánicos pueden afectar comunidades de bacterias benéficas. Igualmente, se determinó que el

extracto de *R. graveolens* logró inhibir el crecimiento de una bacteria Gram positiva (*B. subtilis*) y de una bacteria Gram negativa (*A. brasilense*) por lo cual es importante evaluar este extracto en otras bacterias benéficas y fitopatógenos para explorar sus efectos inhibitorios. Se debe considerar lo mencionado por Al-Shuneigat *et al.* (2015) los cuales recalcan que los compuestos activos de esta planta actúan mayormente en bacterias Gram positivas, debido a que carecen de una membrana externa, lo cual las hace más susceptible en comparación con las bacterias Gram negativas (Angienda *et al.* 2010; Gilles *et al.* 2010).

La evaluación del efecto inhibitorio de *R. graveolens* contra las bacterias fitopatógenas fue nula con una frecuencia 100%. Uno de los principales factores a considerar es que estas bacterias fueron aisladas de cultivos agrícolas en los cuales utilizaban el control químico como principal forma de manejo de enfermedades, situación que fomenta la generación de resistencia. Es importante observar que un 50% de las bacterias evaluadas, no inhibidas, pertenecen al género *Pectobacterium*; mismo género de bacterias evaluado por Briceño *et al.* (2011) en el cual tampoco obtuvo datos inhibitorios. Sundin y Wang (2018) mencionan que las bacterias poseen genes con diferentes mecanismos de resistencia como la producción de enzimas degradadoras, absorción celular mediante el mecanismo de bombas de eflujo lo que reduce y elimina la absorción de sustancias extrañas.

Los mecanismos de resistencia mencionados, logran disminuir el efecto de los antibióticos y de otras sustancias de control microbiano como las sustancias fitoquímicas. El mecanismo de bombas de eflujo es uno de los más complejos, Webber y Piddock (2003) mencionan que este mecanismo está compuesto por cinco tipos de sistemas entre ellos, el "eflujo de toxicidad multidrogas"(MATE), la división de resistencia nodular" (RND) y la "bomba de resistencia multidrogas"(SMR), todos por sus siglas en inglés. Estos sistemas de desintoxicación se encuentran presentes tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas. En las bacterias Gram negativas destaca el RND como un sistema de bombas de eflujo tripartito que evitan que sustancias tóxicas ingresen al material intracelular de la bacteria. La degradación mediante enzimas es otro mecanismo de resistencia, de acuerdo a Walsh (2000) estas enzimas pueden hidrolizar aproximadamente 10^3 moléculas de la sustancia nociva por segundo, lo cual genera modificaciones en las moléculas químicas provocando que su estructura química sea alterada y con ello se pierdan sus propiedades tóxicas. Respecto a posibles soluciones al problema de resistencia a los antibióticos algunos autores como Santiago *et al.* (2015) y Touani *et al.* (2014) han demostrado que al combinar extractos vegetales con menores dosis antibióticos se logra obtener control en bacterias con genes de resistencia a antibióticos.

Respecto a los extractos de *T. vulgaris* (Anexo 7), *P. graveolens* (Anexo 8) y *H. patens* (Anexo 9) no mostraron actividad inhibitoria contra las bacterias evaluadas. Al no generar inhibición en las pruebas de difusión de disco los extractos no fueron evaluados en las pruebas de capacidad inhibitoria por perfil de polaridad y tampoco en pruebas de concentración mínima inhibitoria.

Debe mencionarse que otras investigaciones han demostrado la capacidad inhibitoria de estas plantas, entre ellas la de Aulton y Taylor (2018) que demostraron que el tomillo afecta un mecanismo conocido como percepción de quorum el cual disminuye la capacidad de colonización de las bacterias y el carvacrol, afecta la producción de enzimas que logran degradar

sustancias de desecho, lo cual por acumulación intracelular afecta el desarrollo de las bacterias (Joshi *et al.* (2016); Pollumaa *et al.* (2012). Así mismo, Paz *et al.* (2017) demostraron la capacidad inhibitoria del extracto de tomillo en bacterias Gram positivas y Gram negativas siendo asociado a la presencia del compuesto conocido como epicatequina el cual Cervantes y Gonzales (2007) demostraron que es extraído al utilizar etanol como solvente. En cuanto a los resultados obtenidos con el extracto de *Pelargonium graveolens* Singh *et al.* (2012) y Hsouna y Hamdi (2012) demostraron la capacidad inhibitoria del extracto etanólico de *P. graveolens*.

Al no obtener inhibición con *T. vulgaris*, *P. graveolens* y *H. patens* a pesar de que han sido demostrados sus efectos inhibitorios por otros autores, se considera que uno de los factores que pudieron influenciar estos resultados fueron las condiciones agroecológicas. Tiwari y Cummins (2013) mencionan que condiciones como la radiación solar, la variación de temperatura diurna/nocturna, así como la localización geográfica e incluso factores de manejo como nutrición, órgano cosechado, época y momento de cosecha generan variación en el contenido químico sintetizado por la planta provocando diferencias en la calidad y el rendimiento del extracto obtenido. Igualmente, Tsusaka *et al.* (2019) demostró que la genética influye sobre el perfil químico de las plantas, al demostrar una mayor calidad de compuestos en plantas mejoradas contra plantas silvestres. El factor genético no fue tomado en cuenta en la investigación por lo cual puede influir en los resultados.

5.4 Evaluación de actividad inhibitoria de crecimiento por fracción química

Se evaluaron las tres fases polares para determinar cuál de estas provoca el efecto inhibitorio de crecimiento en las bacterias *B. subtilis* y *A. brasilense*. Los resultados obtenidos al realizar la prueba de difusión de disco determinaron que las sustancias inhibitorias de crecimiento de las bacterias *B. subtilis* *A. brasilense* (cuadro 9) poseen un perfil polar aprotico y no polar, igualmente se determinó que el perfil polar acuoso del extracto de *R. graveolens* no posee actividad inhibitoria contra estas bacterias.

Mediante las pruebas de difusión de disco con los diferentes perfiles del extracto crudo (Polares / polar aprótico / No polares) de *R. graveolens* se logró de definir la polaridad de los compuestos activos de esta planta. Esta prueba otorga información general ya que únicamente se logra identificar que los compuestos polares apróticos y no polares son los encargados de generar el efecto inhibitorio. Esta información facilita el enfoque para futuros estudios sobre la actividad del extracto de *R. graveolens* y permite identificar el tipo de solvente que se requiere para extraer únicamente los compuestos que poseen el efecto inhibitorio de esta planta. Thirumal y Laavu (2017) mencionan que primeramente en las investigaciones fitoquímicas, se evalúa la actividad biológica del extracto crudo y posteriormente se evalúan las diferentes fracciones con el objetivo de identificar la polaridad de las sustancias activas y con ello ir descartando las fases que no poseen actividad biológica. Ahuja, S y Jespersen (2006) recomiendan que una vez identificadas las fases activas el extracto sea analizado por métodos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Orlanda y Nascimento (2015) analizaron la composición y actividad bacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de ruda, determinando que la composición de este se caracteriza por la presencia de siete principales sustancias, no obstante, dos sustancias representan más del 90% de composición del extracto. El análisis de los autores mostró la

presencia de dos cetonas alifáticas las cuales se caracterizan por estar generalmente en mayor volumen que otras sustancias, una de ellas la 2-Undecanona en un porcentaje de 47,21% y la 2-nonanona en un 39,17%. Estos mismos resultados los obtuvieron Gina y colaboradores (2008) los cuales analizaron el extracto por medio de cromatografía de gases, obteniendo como composición un 43,0% de 2-undecanona y un 33,5% de 2-nonanona. Attia *et al.* (2018) en su estudio determinan que entre mayor sea la concentración 2-Undecanona y 2-nonanona, mayor será la actividad inhibitoria del extracto. Se debe mencionar que estas dos moléculas son solubles en solventes como el etanol, diclorometano y hexano e insoluble en agua (BPR, 2011).

Para conocer el espectro de inhibición, se analizó la distribución de frecuencia del efecto inhibitorio de crecimiento, producido por las diferentes fracciones sobre el crecimiento de *A. brasilense* y *B. subtilis* (cuadro 9). De acuerdo al análisis, para ambas bacterias la fracciones polar aprótico y no polar presentaron una frecuencia del 100% de efecto sensible (cuadro 10), mientras que la fracción polar presentó un 100% de frecuencia de inhibición nula (cuadro 11). Una posible razón de que el extracto polar no inhibiera es que por baja solubilidad las moléculas en el agua, de estas moléculas se conoce que tiene mejor solubilidad en alcoholes (Büettner, 2017).

Cuadro 9. Medición promedio de halo de inhibición (mm) a las 48h de incubación, de las fracciones, polar, polar aprótico y no polar del extracto de *R. graveolens* contra *B. subtilis* $1,5 \times 10^8$ ufc/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.

Bacterias	Extracto	Promedio inhibición	Control positivo	Blanco
<i>B. subtilis</i>	Polar	0	22,91±2,31	0
<i>B. subtilis</i>	Polar aprótico	11,83±0,47	22,91±2,31	0
<i>B. subtilis</i>	No polar	11,58±0,81	22,91±2,31	0
<i>A. brasilense</i>	Polar	0	23,16±1,95	0
<i>A. brasilense</i>	Polar aprótico	11,91±0,37	23,16±1,95	0
<i>A. bbrasilense</i>	No polar	11,33±60,55	23,16±1,95	0

*Concentración del extracto 20mg/ml.

Cuadro 10. Tabla de distribución de frecuencias relativas sobre la sensibilidad de *A. brasilense* contra las diferentes fracciones por polaridad del extracto crudo de *R. graveolens*.

Bacteria	Inhibición			Total
	Nula	Sensible	Muy sensible	
<i>A. brasilense</i> vs Polar	100	0	0	100
<i>A. brasilense</i> vs Polar aprótico	0	100	0	100
<i>A. brasilense</i> vs No polar	0	100	0	100
<i>A. brasilense</i> vs DMSO	100	0	0	100
<i>A. brasilense</i> vs positivo	0	0	100	100

Cuadro 11. Tabla de distribución de frecuencias relativas sobre la sensibilidad de *B. subtilis* contra las diferentes fracciones por polaridad del extracto crudo de *R. graveolens*.

Bacteria	Nula	Sensible	Muy sensible	Total
<i>B. subtilis</i> vs Polar	100	0	0	100
<i>B. subtilis</i> vs Polar aprótico	0	100	0	100
<i>B. subtilis</i> vs No polar	0	100	0	100
<i>B. subtilis</i> vs DMSO	100	0	0	100
<i>B. subtilis</i> vs positivo	0	0	100	100

*Representa el porcentaje de datos respecto al total de datos categorizado.

5.5 Concentración mínima inhibitoria

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de extracto crudo de *R. graveolens* para *A. brasilense* y *B. subtilis* a partir de los datos obtenidos en la sección 5.3. Para *A. brasilense* se evaluaron diluciones seriadas en base dos, con concentraciones comprendidas de 20 mg a 0,625 mg/ml se trabajó con inóculo bacteriano de concentración $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. El inóculo de *A. brasilense* resultó inhibido por el extracto de *R. graveolens* a una concentración mínima de 5mg/ml, determinando con ello la CMI de extracto de *R. graveolens* sobre *A. brasilense* (figura 5).

Para la bacteria *B. subtilis* se midió inicialmente la CMI utilizando diluciones 20 mg a 0,625 mg/ml en diluciones seriadas base dos, obteniendo un valor de CMI de 20mg/ml, sin embargo, para obtener un valor de CMI más específica se incluyeron las diluciones de 16mg/ml, 12 mg/ml y 10mg/ml. Con estas concentraciones evaluadas se obtuvo un valor de CMI de 12 mg/ml de extracto *R. graveolens* para inhibir el crecimiento de *B. subtilis* (figura 6).

Soliman (2015), en su estudio de sinergia de antibióticos con extractos vegetales determinó que utilizando el extracto etanólico de *R. graveolens* junto con antibióticos se obtuvo una mejora en el control de crecimiento de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*, la CMI para el control de cuatro bacterias de interés médico se encuentra entre 1,56 a 3,25 mg/ml. Lo observado por Soliman (2015) junto a los datos obtenidos en este estudio demuestran la capacidad antibacteriana del extracto de ruda, sin embargo, se observan diferencias en los valores de CMI lo cual va a depender directamente de la calidad del material vegetal con el que se realice el extracto, los métodos utilizados y su manejo posterior a su elaboración y las bacterias en evaluación. En otro estudio, Karouei *et al.* (2014) con el extracto de *R. graveolens* obtuvo el valor de CMI de 3,1mg/ml para control de *B. subtilis*, lo que indica una menor actividad inhibitoria del extracto obtenido en este estudio (12 mg/ml), no obstante, también puede mediar el factor de resistencia de la bacteria utilizada en uno u otro estudio y las condiciones experimentales como tipo de solvente utilizado, la calidad de los extractos y la resistencia de las bacterias. Portilla *et al.* 2015, reporta otro valor obtenido al evaluar la CMI del extracto etanólico de *R. graveolens* siendo este de 6,25mg/mL contra *E.coli* y *Streptococcus agalactiae*, que se asemeja al obtenido para el control de *A. brasilense* de 5mg/ml.

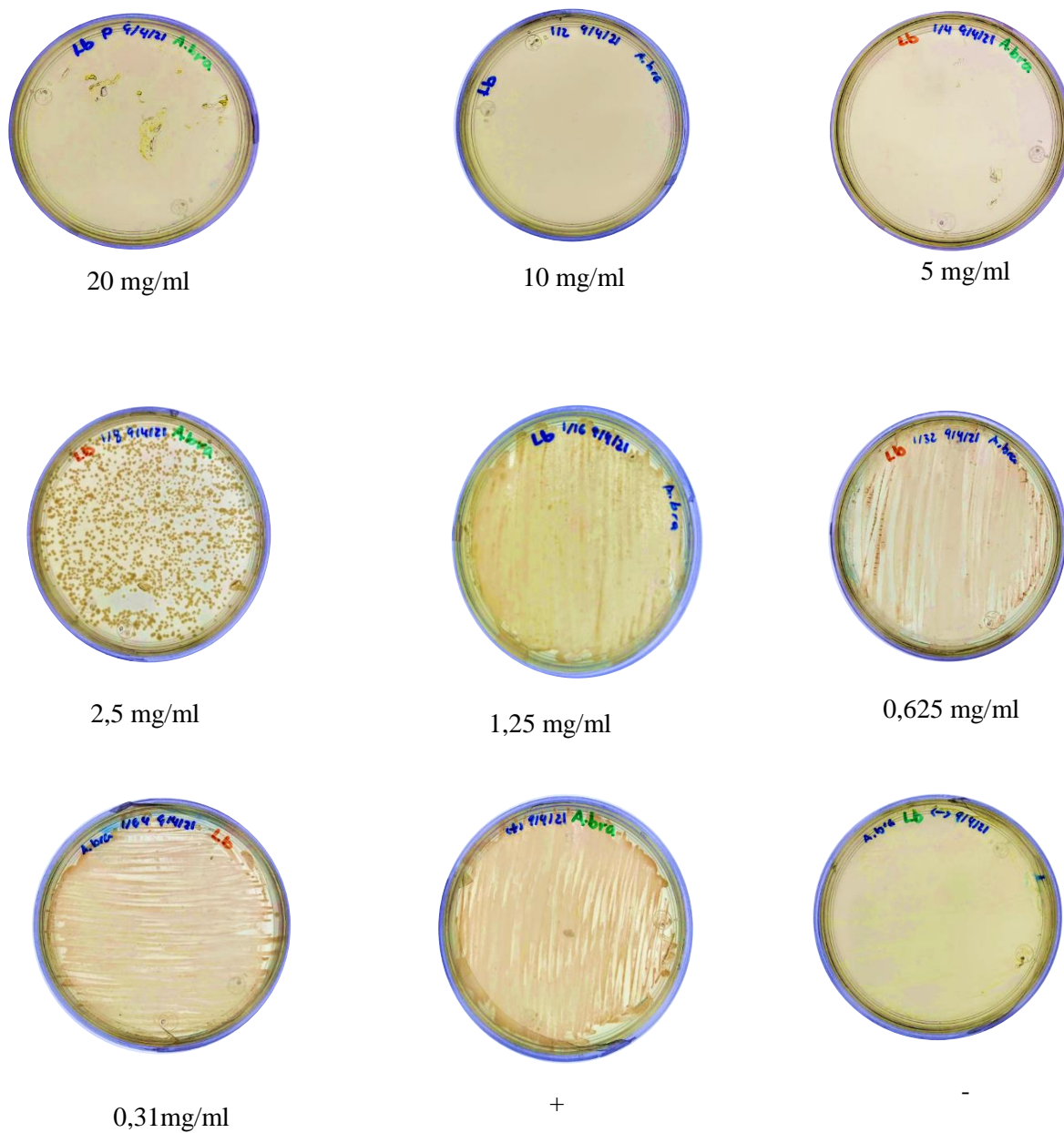


Figura 5. Concentración mínima inhibitoria de extracto de *R. graveolens* contra *A. brasilense* 0.5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) en medio de crecimiento Luria Bertani Agar.

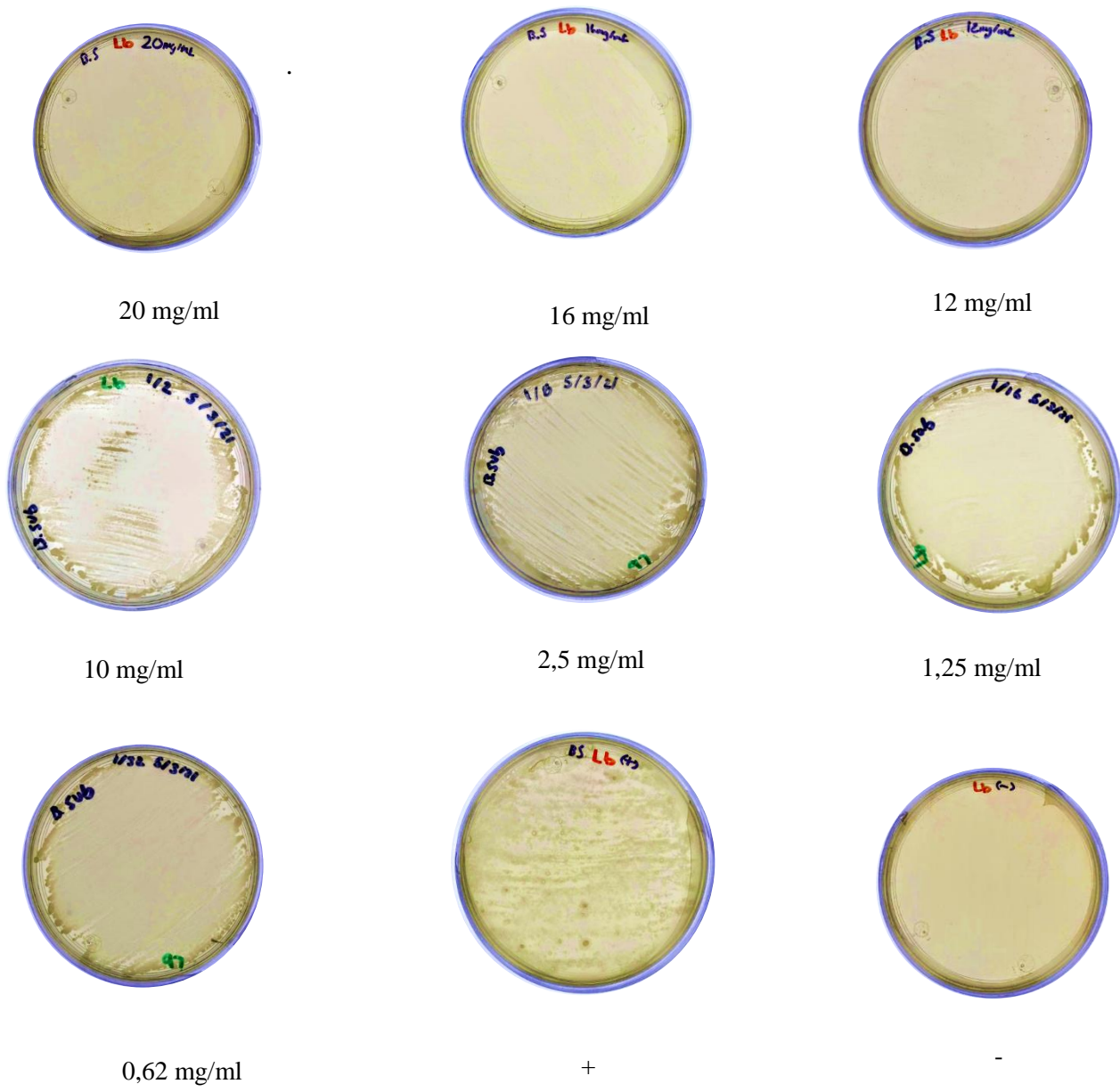


Figura 6. Concentración mínima inhibitoria de extracto de *R. graveolens* contra *B. subtilis* 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) en medio de crecimiento Luria Bertani Agar.

6. Conclusiones

1. La composición principal de las plantas del sector de La Chinchilla, de Oreamuno de Cartago fue para *P. graveolens* perfil polar (56,49%), *R. graveolens* moléculas no polares (34,09%), *T. vulgaris* compuesto no polares (44,79%) y *H. patens* polares apróticos (51,27%).
2. Los extractos de las plantas *P. graveolens*, *H. patens*, *T. vulgaris* del sector de La Chinchilla de Oreamuno no presentan actividad inhibitoria de crecimiento en bacterias del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus*.
3. El extracto de *R. graveolens* del sector de La Chinchilla de Oreamuno no presenta inhibición de crecimiento en bacterias del género *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, pero si tiene efecto de inhibición de crecimiento en bacterias del género *Bacillus* y *Azospirillum*.
4. Las bacterias *Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense* presentaron sensibilidad frente al extracto de *Ruta graveolens* de 66,67% y 60,00% respectivamente.
5. La fracción polar del extracto de *R. graveolens* presentó una frecuencia de sensibilidad de 0%, la fracción polar aprótico una frecuencia de 100% de sensibilidad al igual que la fracción no polar.
6. La concentración mínima inhibitoria del extracto de *R. graveolens* para *B. subtilis* es de 12mg/ml y la concentración mínima inhibitoria del extracto de *R. graveolens* para *A. brasilense* es de 5mg/ml.

Recomendaciones

1. Analizar la composición química de los extractos que presentaron capacidad inhibitoria de crecimiento.
2. Realizar pruebas preliminares de extracción con diferentes solventes polares y no polares para obtener el extracto más eficiente en rendimiento y calidad.
3. Recolectar material vegetal de diferentes zonas geográficas para comparar sus eficiencia y efecto inhibitorio.
4. Obtener el material vegetal en fincas dedicadas a la producción de plantas medicinales.

5. Realizar extracciones de *R. graveolens* con diferentes órganos de la planta para determinar cuál de estos posee la mayor concentración de ingrediente activo.
6. Evaluar otras bacterias para determinar el efecto sobre un rango de bacterias patógenas y benéficas más amplio.
7. Realizar la extracción de *R. graveolens* con diferentes métodos y solventes para analizar su posible efecto sobre fitopatógenos.

7.Literatura citada

1. Adilah, N; Ziad, A.2017. Comparison between conventional extraction and ultrasound assisted extraction of *Labisia pumila* Sp. In 25-L mobile extractor using water as solvent of extraction. Chemical engineering transactions 56 (1): 781-786.
2. Agrios, G. 2005. Plant Pathology. San Diego, California, Elsevier Academic Press.903 p.
3. Ahuja, S; Jespersen, N. 2006. High pressure Liquid Chromatography. Elsevier. 849p
4. Al-Shuneigat, J; Al-Tarawneh, I; Al-Qudah, M; Al-Sarayreh, S; Al-Saraireh, Y; Alharaca, K. 2015. The chemical composition and the antibacterial properties of *Ruta graveolens* Essential Oil grown in Northern Jordan. Jordan Journal of Biological Sciences 8(1): 139-143.
5. Alós, J. 2014. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enferm Infecc Microbiol Clin 33 (10). Doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.004.
6. Altemimi, A; Lakhssassi, N; Baharlouei, A; Watson, D; Lightfood, D. 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation and identification of bioactive compounds form plant extracts. Plants 42 (6). Doi:10.3390/plants6040042.
7. Angienda, P; Miruka, D; Jack, D. 2010. Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research 4(16): 1678-1684p
8. Arauz, F.1998. Fitopatología un enfoque agroecológico. San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica.
9. Ares, A; Nozal, M; Bernal, J; Bernal J. 2020. Simultaneous determination of carvacrol and thymol in bee pollen by using a simple and efficient solvent extraction method and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 181 (1). Doi: doi.org/10.1016/j.jpba.2020. 113124.

10. Attia, E; El-Baky, R; Desoukey, S; Mohamed, M; Bishr, M; Kamel, M. 2018. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future Journal Pharmaceutical Sciences* 4 (1): 254-264.
11. Aulton, M; Taylor, K. 2018. *Aulton's Pharmaceutics*. London, United Kingdom, Elsevier. 886p
12. Azimi, A; Sharayei, P; Azarpazhooh, E. 2020. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from Nepeta (*Nepeta binaludensis* Jamzad). *Journal of Food Measurement and Characterization* 14 (1): 668-678. Doi:10.1007/s11694-019-00314-1.
13. Azwanida, N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength, and limitation. *Medicinal and Aromatic Plants* 4(3): 196 DOI: 10.4172/2167-0412.1000196.
14. Badawy, M; Abdelgaleil, S. 2013. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products* 52 (1): 776-782.
15. Ballesteros, L; Texeira, J; Mussatto, S. 2014. Selection of solvent and extraction conditions for maximum recovery of antioxidant phenolic compounds from Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Technology* 7 (1) : 1322-1332p. Doi: 10.1007/s11947-013-1115-7.
16. Bashan, Y; Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Journal of Microbiology* 36 (1): 591-608.
17. Bauer, A; Kirby, M; Sherris, J; Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology* 45 (4): 1956-1957.
18. Bayoub, K; Baibai, T; Mountassif, D; Retmane, A; Soukri, A. 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology* 9 (27): 4251-4258.
19. *Biocidal Products Regulation (BPR)*. 2011. Methyl nonyl ketone. España. 64p
20. Borboa, J; Rueda, E; Acedo, F; Ponce, J; Cruz, M; Garcia, J; Ortega, N. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12(3):539-547.

21. Boruga, O; Jianu, C; Misca, C; Gruia, A; Horhat, F. 2014. Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. Journal of Medicine and Life 7(3): 56-60.
22. Boukhris, M; Simmonds, M; Sayadi, S; Bouaziz, M. 2012. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*. Phytotherapy Research 27 (8): 1206-1213p.
23. Briceño, G; Garcia, J; Maselli, A; Rosales, L. 2011.Extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género Erwinia. Agronomía Trop 61 (2): 141-148.
24. Bruin, J; Van der Geest, L. 2008. Diseases of Mites and Ticks. Amsterdam, The Netherlands. Springer Science and Business Media. 347p.
25. . BUCHI (2019). Manual de instrucciones Rotavapor R-100. Consultado 14 de nov 2019.
Disponible: http://static2.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593360_R-220SE_OM_es_F_LR.pdf
26. Büettner, A. 2017. Springer Handbook of Odor. Freising, Alemania. Springer. 1137p
27. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved standard. CLSI document M07-A9 32(2).
28. Candori, S., Foglio, MA, Rosa, P; Meireles, M. 2008. Obtaining b-caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by super critical fluid extraction. J. Supercrit. Fluids 46 (1): 27–32.
29. Carroll, K; Hobden, J; Miller, S; Morse, S; Mietzner, T; Detrick, B; Mitchell, T; Mckerrow, J; Sakanari, J. 2016. Microbiología Médica. Ciudad de México, México. Mc Graw Hill. 809p.
30. Castro, D; Díaz, J; Serna, R; Martínez, M; Urrea, P; Muñoz, K; Osorio, E. 2013. Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. Fondo Editorial Universidad Católica de Oriente. 98p.
31. Castro, P. 2020. Fundamentos de las operaciones de separación de transferencia de masa. Sevilla, España, Editorial Universidad de Sevilla. 339p.
32. Cervantes, B; González, A. 2007.Efecto bactericida de *Hamelia patens* sobre *S.aureus* y *E.coli*. México.Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma San Luis Potosí.

33. Chacon, M; Soley, P; Garro, G.2004. Propiedades medicinales y colecta de germoplasma de la especie *Hamelia patens* en Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 17(1): 27-29.
34. Cunha, M; Melo, T; Magri, F; Delorenzi, J. 2015. Analgesic activity of *Ruta graveolens* Linn. (Rue) extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 9 (1): 1-5p
35. Daglia, M.2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23 (3):174-181. Doi:10.1016/j.copbio.2011.08.007.
36. Dai, J; Mumper, R.2010. Plant phenolics: Extraction, Analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15 (1):7313-7352p. Doi: 10.3390/molecules15107313.
37. Dauqan, E; Thamer, F; Naji, K; Alshaibi, Y. 2017. Different extraction methods and antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *International Journal of Chemical Science* 2 (1): 110-116.
38. Dean, J. 1992. *Lange's Handbook Chemistry* (14th edition). McGraw Hill. 1292p.
39. Dhanani, T; Shah, S; Gajbhiye, N; Kumar, S. 2017. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents, and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry* 10 (1): 1193-1199.
40. Domingo, D; López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16 (4): 385-393.
41. Drlica, K; Gennaro, M. 2001. Plasmids. In Brenner, S; Miller, S (eds). *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier Science Inc. 1485-1490p.
42. Duraffourd, C., Hervicourt, L ; Lapraz, J. C. (1987). *Cuadernos de fitoterapia clinica*. Barcelona: Masson.
43. Eslahi, H; Fahimi, N; Sardarian, A. 2017. Chemical composition of essential oils. *Essential oils in Food* 1 (1): 119-171.
44. FAO. 2021. El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2021-2025. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb5545es>.
45. Gajdács, M; Spengler, G; Urban, E. 2017. Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Rubik's Cube of clinical microbiology. *Antibiotics* 25 (6). Doi: 10.3390/antibiotics6040025.

46. Gebregiorgis, T; Mahamadall, T.2015. Phytochemical Screening and Evaluation of antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. A medicinal plant grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Natural Products Chemistry and Research* (3): 3-6p. Doi:10.4172/2329-6836.1000195.
47. Giacometti, J; Zauhar, G; Zuvic, M.2018. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of major phenolic compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.) using response surface methodology. *Foods* 7 (1): , doi:10.3390/foods7090149.
48. Giresha,A; Anitha, M; Dharmappa, K. 2015. Phytochemical composition, antioxidant and *in-vitro* anti-inflammatory activity of ethanol extracts of *Ruta graveolens* L. leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(10): 272-276.
49. Gilles, M; Zhao, J; An, M; Agboola, S.2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry* 119 (1): 731-737.
50. Gupta, A; Naraniwal, M; Kothari, V.2012. Modern Extraction Methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences* 1(1): 8-26.
51. Gutiérrez, J; Cazorla, F; De Vicente, A. 2019. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Associated with Mango trees, a particular pathogen within the ‘‘Hodgepodge’’ of the *Pseudomonas syringae* complex. *Frontiers in Plant Science* 10(1). Doi: 10.3389/fpls.2019.00570.
52. Hashem, A; Tabassum, B; Fathi, E. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal Biological Sciences* 26 (6): 1291 – 1297p
53. Hamidpour, R; Hamidpour, S; Hamidpour, M; Marshall, V; Hamidpour, R. 2017. *Pelargonium graveolens* (Rose Geranium). A novel therapeutic agent for antibacterial, antioxidant, antifungal, and diabetics. *Archives in Cancer Research* 5 (1): 1-5.
54. Hombach,M; Zbinden, R; Böttger, E. 2013. Standardisation of disc diffusion disk results for antibiotic susceptibility testing using the sirsca automated zone reader. *BMC Microbiology* 13 (1): 225
55. Hsouna, B; Hamdi, N. 2012. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids in health and disease* 11 (1): 167. Doi:10.1186/1476-511X-11-167

56. Hyldgaard, M; Mygind, T; Meyer, R. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interaction with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 12 (3): 1-24.
57. Hsouna, A; Hamdi, N.2012. Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oil and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids in Health and Disease* 11 (1): 167-174p.
58. Joshi, J; Burdman, S; Lipsky, A; Yariv, S; Yedidia, I. 2016. Plant phenolic acids affect the virulence of *Pectobacterium aroiderum* and *P. carotovorum* spp. *brasiliense* via quorum sensing regulation. *Molecular plant pathology* 17(4): 487-500. Doi: 10.1111/mpp.12295.
59. Jorgensen, J; Ferraro, M. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 49 (11): 1749-1755p
60. Jyoti, D; Mukherjee, I; Shakil, N; Rana, V; Kaushik, P; Debnath, S. 2018. Antibiotics in agriculture: Use and impact. *Indian Journal of Ethnophytochemicals* 4 (1): 4-19.
61. Karbera, J; Mugiraneza, J; Chalchat, J; Ugirinshuti, V. 2013. Chemical composition and antibacterial effect of the essential oil of *Pelargonium graveolens* (Geranium Rosat) grown butare (Rwanda) towards formulation of plant-based antibiotics. *Journal of Microbiology Research* 3 (2): 87-91.
62. Karouei, H; Haji, S; Azizi, G. 2012. Isolation of *Saprolegnia* and the influence of root ethanolic extract of *Ruta graveolens* on *Saprolegnia* spp. growth. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 2 (1): 64-67p.
63. Khezri, M; Mohammadi, M. 2018. Identification and characterization *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains form various plants and geographical regions. *Journal of Plant Protection Research* 58(4): 354-361p.
64. Kumar, P; Gupta, A; Sharma, L; Bakade, R. 2017. Mechanism of *Azospirillum* in plant growth promotion. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences* 4 (9): 338-343p.
65. Kon, K; Rai, M. 2016. Antibiotic Resistance, Mechanism, and new antimicrobial approaches. London, United Kingdom, Elsevier Inc. 397p.
66. Kumar, H; Shanmugavadivu, M; Ranjithkumar, R; Kuppsamy, S.2014. Antibacterial Activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Ruta graveolens*. *International Journal of Biosciences and Nanosciences* 1(1): 9-11

67. Lapornik, B; Prosek, M; Golc, A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71 (1): 214-222.
68. Lebovla, N; Vorobiev, E; Chemat, F. 2000. *Enhancing Extraction Processes in the food industry*. USA. CRC PRESS. 519p.
69. Lezoul, N; Belkadi, M; Habibi, F; Guillen, F. 2020. Extraction process with several solvents on total bioactive compound in different organs of three medicinal plants. *Molecules* 25 (1) Doi: 10.3390/molecules25204672.
70. Li, B; Li, Q; Xu, Z; Zhang, N; Shen, Q; Zhang, R.2014. Response of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology* 5(1):6-36.
71. Lim, Y; Murtijaya. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *Swiss Society of Food Science and Technology* 40(1):1664-1669. Doi:10.1016/j.lwt.2006.12.013.
72. Maamoun, M; El-Sawi, S; Motawae, H; Fekry, M; Kawy, M. 2019. Chemical Characterization of Constituents Isolated from *Hamelia patens* and Investigating its Cytotoxic Activity. *Egyptian Journal of Chemistry* 62(9): 1685-1697.
73. Mnayer, D; Sylvie, A; Peticolas, E; Ruiz, K; Hamieh, T; Chemat, F. 2017. Extraction of green absolute from thyme using ultrasound and sunflower oil. *Resource-Efficient Technologies*. Doi: 10.1016/j.reffit.2017.01.007.
74. Maamoun, M; El-Sawi, A; Motawae, H; Fekry, M; Abdel, M. Chemical characterization of constituents isolated from *Hamelia patens* and investigating its cytotoxic activity. *Egyptian Journal of Chemistry* 62 (9): 1685-1697p.
75. MSP (Ministerio de Salud Pública). 2018. Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos 2018-2025. s.p.
76. Muñoz, A. 2017. *Antibióticos en el suelo*. Tesis Lic. Madrid, España, Universidad Complutense.20p.
77. Nabhan, S; Wydrap, K; Linde, M; Debener, T. 2012. The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLPA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogenous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant. Pathol* 61 (1): 498-508.
78. Nagarjuna,D; Jabbar, A. 2016. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L, volatile oils. *Medical Chemistry*. Doi: <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1220055>.

79. Nazzaro, F; Fratianni, F; De Martino, L; Coppola, R; De Feo, V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 6 (1): 1451-1474.
80. Niño, J; Narváez, D; Mosquera, O; Correa, Y. 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology* 37(1): 566-568.
81. Noor, G; Ahmad, M; Ahsan, F; Mahmood, T; Arif, M; Khushtar, M. 2020. A phytochemical and ethnopharmacological recapitulation on *Hamelia patens*. *Drug Research* 20(1): 188-198p. Doi: 10.1055/a-1131-7856.
82. Okoye, E; Ezeogo, J. 2016. Antimicrobial activity of the crude extracts of *Hamelia patens* on some selected clinical samples. *Journal of complementary and alternative medical research* 1 (1): 1-7.
83. Okendi, E; Maluleke, L; Moleleki, L. 2014. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot and blackleg of potatoes in Kenya. *Plant disease* 98 (1). Doi: 10.1094/PDIS-09-13-0988-PDN.
84. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Resistencia a los antibióticos. Consultado el 14 de nov 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>.
85. Orlanda, F; Nascimento, A. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany* 99 (1): 103 – 106p.
86. Osorio, N. 2009. Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. En Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelos & Centro Nacional de Investigaciones de Café (Eds.), *Materia orgánica biología del suelo y productividad agrícola: Segundo seminario regional comité regional eje cafetero* (pp. 43–71). Cenicafé. Doi: https://doi.org/10.38141/10791/0003_3.
87. Pankiewicz, V; Amaral, F; Santos, K; Agtuca, B; Xu, Y; Schueller, M; Arisi, A; Steffens, M; Souza, E; Pedrosa, F; Stacey, G; Ferrieri, R. 2015. Robust biological nitrogen fixation in model grass bacterial association. *The Plant Journal* 81 (1): 907-919p.
88. Pandey, P; Mehta, A; Subhadip, H. 2011. Evaluation of antimicrobial activity of *Ruta graveolens* stem extracts by disc diffusion method. *Journal of Phytotherapy* 3 (3): 92-98.

89. Pandey, A; Singh, P; Palni, U; Tripathi, N. (2012). In-vitro antibacterial activity of essential oils of aromatic plants against *Erwinia herbicola* (Lohnis) and *Pseudomonas putida* (Krish Hamilton). *J. Serbian Chemical Society* 77 (1): 313–323.
90. Parra, Y; Cuevas, F.2001. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales* 23(3):31-41.
91. Pavlovic, D; Vukelić, M; Najman, S; Kostic, M; Zlatkovic, B; Mihajilov, T; Kitic, D. 2014. Assessment of polyphenol content, *in vitro* antioxidant, antimicrobial and toxic potentials of wild growing and cultures rue. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 87 (1): 175-181.
92. Paz, J; Rubio, C; Reyes, A; Noé, C; Carillo, M. 2017. Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. *Brazilian Journal of Microbiology*. Doi: 10.1016/j.bjm.2017.03.018.
93. Peredo, H; Palou, E ; Lopez, A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 3 (1): 24-32.
94. Pérez, J; Delgado, C; Ortiz, T; Salazar, R; Cordero, P; Waskman, N. 2016. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Hamelia patens* extracts. *Pak. J Pharm. Sci* 29 (1):363-368.
95. Perrigt, D; Boiero, ML; Masciarelli, OA; Penna, C; Ruiz, OA; Cassán, FD; Luna, MV. 2007 Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 1143–1150.
96. Pham, H; Tang, V; Van Voung, Q; Bowyer, M; Scarlett, C. 2015. Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsute* Lour. Leaves. *Technologies* 3 (1): 285-301. Doi: 10.3390/technologies3040285.
97. Pollumaa, L; Alamäe, T; Mäe, A. 2012. Quorum sensing and expression of virulence in *Pectobacteria*. *Sensors* 12 (1): 3327-3349. Doi:10.3390/s120303327.
98. Portilla, Y; Carro, M^a Dolores; Milian, G; Camacho, C; Valdivia, A; Díaz, A; Saro, C; Mateos, I; Ranilla, M. 2015. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of plant extracts from *Ruta graveolens* and *Anonna muricata*. *Journal of Animal Science* 93 (1).
99. Pullagummi, C; Babu, N; Sekharm, C; Jyothi, A; Kumar, P; Venkatesh, K; Roja, A. 2014. Comparative studies on antibacterial activity of Patchouli (*Pogostemon cablin*.

- Benth) and Geranium (*Pelargonium graveolens*) aromatic medicinal plants. African Journal of Biotechnology 23 (1): 2379-2384.
100. Ramírez, L; Marin, D.2009.Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica 42 (1): 263-268.
 101. Richardson, A; Barea, JM; McNeill, A; Prigent, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil 321 (1): 305-339p
 102. Rivera, G.2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. San José, Costa Rica, Editorial Universidad Estatal a Distancia.346p
 103. Rodríguez, H. 2000. La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica. Heredia, Heredia. Editorial Universidad Nacional. 213p.
 104. Rubio, Y; Valdivia, A; Camacho, C; Matos, T; Sosa, M; Pérez, Y. 2018. Composición fitoquímica y actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Hamelia patens* Jacq. Biotecnología Vegetal 18 (1): 37-45.
 105. Rueda, O; Juvera, J; Romo, G; Holguín, J.2018. Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 20 (1): 4251-4261.
 106. Saad, N; Muller, C; Lobsteim. 2013. Major bioactivities and mechanisms of action of essential oils and their components. Flavour and Frangance Journal 28 (1): 269-279.
 107. Saeidinia, A; Keihanian, F; Delavar, S; Keihanian, F; Ranjbar, A; Karkan, M. 2016. Lack of antibacterial activity of *Ruta graveolens* extracts against *Enterococcus faecalis*. Pak J Pharm Sci 29 (4):1371-1374p.
 108. Saldaña, J; Torres, M. 2012. Efecto analgésico de aceites esenciales de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Ruda (*Ruta graveolens*), formulados como conos nasales. Tesis Lic. Cuenca, Ecuador. Universidad de Cuenca. 72p.
 109. Santiago, C; Leen, E; Kuan-hon, L; Hwei-San, L; Kang Nee, T. 2015. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. Complementary and Alternative Medicine 15 (1). Doi:10.1186/s12906-015-0699-z.
 110. Sarawaneeyaruk, S; Krajangsang, S; Pringsulaka, O. 2015. The effects of neem extract and azadirachtin on soil microorganisms. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15 (4): 1071-1084.

111. SFE. 2003. Informe sobre la situación fitosanitaria de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 48p.
112. SFE, 2019. Sistema Fitosanitario del Estado de Costa Rica. Consulta en programa en línea de bactericidas registrados para cultivos en general. Disponible en: <https://www.sfe.go.cr/SitePages/ConsultasenLinea.aspx>.
113. Shankar, S; Rangarajan, R; Sarada, D; Sreenath, C. 2010. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical screening of *Wrightia tinctoria* L. *Pharmacognosy Journal* 2 (14): 19-23.
114. Sharapin, N.2000. Fundamentos de producto fitoterapeuticos. Bogotá, Colombia, Convenio Andres Bello.210p
115. Silhavy, T; Kahne, D; Walker, S. 2010. The Bacterial envelope. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 2 (5). Doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
116. Silva, N; Fernandes, J.2010. Biological properties of medicinal plantas: a review of the antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and toxins including tropical diseases* 16(3):402-413.
117. Singh, D; Kumar, T; Gupta, V; Chaturvedi, P. 2012. Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulation. *Indian Journal of Experimental Biology* 50 (1): 714-71pp.
118. Soliman, W. 2015. The Antibacterial potential and synergistic effect of some plant extracts against multidrug resistant clinical pathogens. Tesis MSc. Gaza, Palestina, Islamic University Gaza. 156p.
119. Sorokina,M; Steinbeck, C. 2020. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatic* 12 (1): Doi:10.1186/s13321-020-00424-9.
120. Sulaiman, S; Bakar, A; Leong, K; Meng, E. 2011. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of food composition* 24(4): 506-515. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.020>.
121. Sultana, B; Anwar, F; Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts.) *Molecules* 14 (1): 2167-2180. Doi: 10.3390/molecules14062167.
122. Sundin, G; Wang, N. 2018. Antibiotic resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathology* 56(1): 1-20 pp
123. Ramírez, L; Marín, D; 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica* 42 (1): 263 – 268.

124. Thirumal, Y; Laavu, S. 2017. HPLC Profile of Medicinal Plant Extracts and its application in Aquaculture. *Journal of Aquaculture Research and Development* 8 (4). Doi: 10.4172/2155-9546.1000484.
125. Tiwari, U; Cummins, E. 2013. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food research international* 50 (1): 497-506p
126. Touani, F; Seukep, A; Djeussi, D; Fankam, A; Noumedem, J; Kuete, V. 2014. Antibiotic-potential activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug -resistance Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. *Complementary and alternative medicine* 14(1). Doi: 10.1186/1472-6882-14-258.
127. Trusheva, B; Trunkova, D; Bankova, V. 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal* 1 (1):1-13 DOI: 10.1186/1752-153X-1-13.
128. Tsusaka, T; Makino, B; Ohsawa, R; Ezura, H. 2019. Genetic and environmental factors influencing the contents of essential oil compounds in *Atractylodes lancea*. *PLoS ONE* 14 (5). Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0217522.
129. Vlamakis, H; Chai, Y; Beaugregard, P; Losick, R; Kolter. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11 (3): 157-168.
130. Walsh, C. 2000. Molecular mechanism that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406 (6749): 775-781p.
131. Webber, M; Piddock, J. 2003. The importance of efflux pumps in antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(1): 9-11pp
132. Xiaoying, L; Lu, F; Changlong, C; Wangwang, S; Yu, T; Hua, X. 2020. Characteristics and rapid diagnosis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* associated with bacterial soft rot of vegetables in China. *Plant Disease* 104(1): 1158-1166.
133. Yi, W; Wetzstein, H. 2011. Effects of drying and extraction conditions of the biochemical activity of selected herbs. *HortScience* 46(1): 70-73.
134. Yingngam, B; Monschein, M; Brantner, A. 2014. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves using central composite design and evaluation of its proactive ability against H₂O₂ induced cell death. *Asian Pac J Trop Med* 7 (1): 5497-5505.

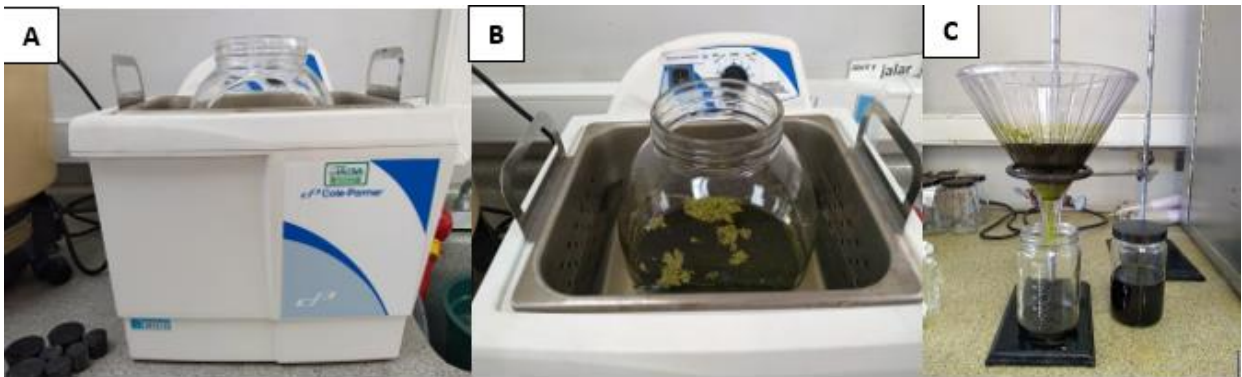
135. Yvette, Y.2005. In vitro pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous *Pelargonium* (Geraniaceae) species. Tesis Máster.Johannesburg, Sudáfrica. University of the Johannesburg. 226p.
136. Zaynab, M; Fatima, M; Abbas, S; Sharif, Y; Umair, M; Zafar, M; Bahadar, K.2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microbial Pathogenesis

8. ANEXOS

Anexo 1. Proceso inicial de preparación de muestras. A) Secado del material vegetal. B) Molino Thomas Willy Mill®. C) Empaque al vacío del material seco y molido.



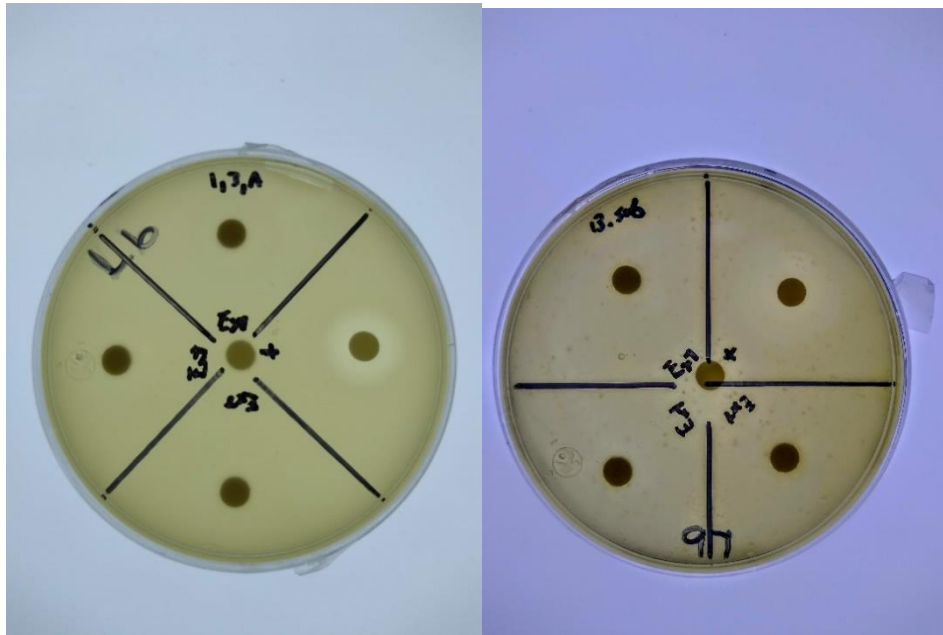
Anexo 2. Proceso elaboración del extracto. A) Baño ultrasónico Cole-Palmer. B) Extracción sólido-líquido asistida en baño ultrasónico. C) Filtrado de extracto líquido.



Anexo 3. Proceso de secado del extracto crudo y proceso de depuración.



Anexo 4. Prueba de difusión de disco.



Anexo 5. Medición de halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de *P. graveolens* a concentración de 20mg/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.

Bacteria	Extracto	Promedio inhibición	Control positivo
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	0	14,60±2,28
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	0	17±1,38
<i>Pectobacterium brasilense</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	0	16±1,07
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	0	15,6±0,78
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	0	13,80±0,73
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	0	16,40±0,78

Anexo 6. Medición de halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de *T. vulgaris* a concentración de 20mg/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.

Bacteria	Extracto	Promedio inhibición	Control positivo
<i>Azospirillum brasilense</i>	Thymus vulgaris	0	19.8±0,96
<i>Bacillus subtilis</i>	Thymus vulgaris	0	16±0,87
<i>Pectobacterium brasilense</i>	Thymus vulgaris	0	17.8±1,56
<i>Pectobacterium carotovora</i>	Thymus vulgaris	0	11.4±1,32
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	Thymus vulgaris	0	12±0,61
<i>Pseudomonas syringae</i>	Thymus vulgaris	0	16±0,61

Anexo 7. Medición de halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de realizada la prueba de difusión de disco, con el extracto de *H. patens* a concentración de 20mg/ml en medio LB agar con sobre capa de LB agar 0,7%.

Bacteria	Extracto	Promedio inhibición	Control positivo
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Hamelia patens</i>	0	18,8±1,14
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Hamelia patens</i>	0	17,6±1,32
<i>Pectobacterium brasilense</i>	<i>Hamelia patens</i>	0	18±1,38
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Hamelia patens</i>	0	14,4±1,17
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	<i>Hamelia patens</i>	0	11,6±0,99
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Hamelia patens</i>	0	17,8±1,30

Anexo 8. Prueba de concentración mínima inhibitorio, observación de turbidez causada por el extracto.

