

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Exploración de las propiedades del helecho *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl: actividad antibacteriana y establecimiento de su cultivo *in vitro*

Trabajo de graduación presentado por

José Miguel Morales Santiago

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2014

Exploración de las propiedades del helecho *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl: actividad antibacteriana y establecimiento de su cultivo *in vitro*

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Exploración de las propiedades del helecho *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl: actividad antibacteriana y establecimiento de su cultivo *in vitro*

Trabajo de graduación presentado por

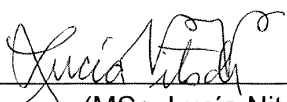
José Miguel Morales Santiago

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología


Guatemala

2014

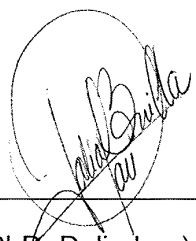
Vo.Bo.:

(f)  _____
(MSc. Lucía Nitsch)

Tribunal Examinador:

(f)  _____
(MSc. Lucía Nitsch)

(f)  _____
(Lic. María Renée Álvarez)

(f)  _____
(PhD. Dalia Lau)

Fecha de aprobación: Guatemala, 23 de Junio del 2014

PREFACIO

La idea de este proyecto comenzó a generarse en el año 2012 cuando realizaba mis prácticas profesionales en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala. En esa oportunidad tenía la tarea de establecer un protocolo para el cultivo *in vitro* de helechos.

La primera propuesta de investigación consistía en determinar si el estadio del ciclo de vida influía en la presencia de diferentes familias de metabolitos secundarios con el fin de proponer una etapa del cultivo *in vitro* que fuera ideal para la extracción de dichos metabolitos. Sin embargo por razones económicas y de tiempo, la idea fue modificada.

El siguiente paso consistió en la búsqueda activa de literatura con el fin de encontrar especies de helechos candidatas para un estudio de actividad antibacteriana. Se propusieron tres géneros ampliamente distribuidos en Guatemala (*Adiantum*, *Phlebodium* y *Nephrolepis*).

Se seleccionó la especie *Nephrolepis cordifolia* debido a que existen reportes de su uso como planta medicinal en países asiáticos y era un buen candidato para estudiar posibles efectos antibacterianos. Al mismo tiempo se quería establecer el cultivo *in vitro* de esta especie debido a que al combinar estas dos características se podría proponer que la especie fuera utilizada como una fuente para elaborar productos naturales.

Por último quiero agradecer a todas aquellas personas que me ayudaron durante la realización de esta investigación:

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria.

A Diane Avalos, Cecilia Barrios, Mariana Morales y Pablo Salazar por su valiosa ayuda en la colecta de helechos y por su dedicación, esfuerzo y perseverancia durante toda la etapa inicial de esta investigación.

A Mónica Villatoro, David Archila y José Sánchez por su apoyo, sabios consejos, compañía en el laboratorio y por compartir esta etapa de nuestro desarrollo profesional conmigo.

A Isabella García Caffaro por su apoyo todas las semanas en el trabajo de laboratorio.

A Marie, Erick, Alina, Diego, Regina, Marielos, Varinia e Ignacio por siempre apoyarme en todo lo que hago.

A la licenciada María Renée Álvarez por todo el tiempo que me dedico durante mis prácticas profesionales y por haberme guiado en la parte de cultivo *in vitro* de esta investigación.

A la licenciada Lucía Nitsch por su orientación en esta investigación y su apoyo durante los últimos años de mi carrera.

A la Doctora Dalia Lau por apoyarme y aconsejarme durante los problemas experimentales de esta investigación.

A la licenciada Margarita Palmieri por su apoyo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y por todo el conocimiento que me transmitió.

A la licenciada Gabriela Palomo por su apoyo y guía durante en el diseño experimental y análisis de datos.

Al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la dirección de protección vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Forestales de la Universidad del Valle de Guatemala.

Al laboratorio de microbiología del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

A Colecciones Biológicas del Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala.

CONTENIDO

PREFACIO.....	iv
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
A. GENERAL	2
B. ESPECÍFICOS	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
A. HELECHOS	4
B. <i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) Presl.....	7
C. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	10
D. IMPORTANCIA DEL PANEL DE BACTERIAS	11
E. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES <i>IN VITRO</i>	13
V. MÉTODOS	17
A. HIPÓTESIS.....	17
B. PROCEDIMIENTO.....	17
C. CRONOGRAMA.....	20
D. PRESUPUESTO	20
VI. RESULTADOS	22
A. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	22
B. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	27
VII. DISCUSIÓN	30
A. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	30

B.	ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	32
VIII.	CONCLUSIONES	35
IX.	RECOMENDACIONES	36
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	37
XI.	ANEXOS.....	43
A.	CLAVES DICOTÓMICAS UTILIZADAS.....	43
B.	VALORES DE INHIBICIÓN ESTANDAR.....	44
C.	IMÁGENES BIOENSAYOS.....	45
D.	COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Bioensayos de actividad antibacteriana.....	18
Cuadro 2. Tratamientos de desinfección de esporas.....	19
Cuadro 3. Cronograma de investigación.....	20
Cuadro 4. Presupuesto general de la investigación.....	20
Cuadro 5. Diámetro de inhibición obtenido en bioensayo con extracto acuoso fresco.....	22
Cuadro 6. Resultados de solubilidad del precipitado extraído.....	23
Cuadro 7. Diámetros de inhibición de la segunda etapa de bioensayo.....	25
Cuadro 8. Lugares de origen y microclima de los especímenes de <i>N. cordifolia</i> colectados.....	26
Cuadro 9. Porcentaje de contaminación con diferentes protocolos de desinfección de esporas	29
Cuadro 10. Diámetros de inhibición estándar de Gentamicina.....	44
Cuadro 11. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).....	50
Cuadro 12. Composición del medio de cultivo Knudson (K).....	51
Cuadro 13. Composición del medio Mueller-Hinton.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de helechos y sus partes	5
Figura 2. Tipos de frondes en helechos.....	5
Figura 3. Ciclo de vida de helechos.....	6
Figura 4. Pina e indusio de <i>Nephrolepis cordifolia</i>	8
Figura 5. Fronde de <i>Nephrolepis cordifolia</i>	8
Figura 6. <i>Nephrolepis cordifolia</i> en colecciones biológicas UVG	9
Figura 7. Mapa de la distribución natural de <i>Nephrolepis cordifolia</i> en Guatemala	9
Figura 8. Esquema de la metodología realizada en la investigación	21
Figura 9. Ensayo cualitativo de solubilidad	23
Figura 10. Esquema de bioensayos realizados y almacenamiento de extractos.....	24
Figura 11. Ensayo de desinfección de esporas	27
Figura 12. Ensayo de germinación de esporas	28
Figura 13. Esporofito de <i>Nephrolepis cordifolia</i> desarrollándose en medio MS	29
Figura 14. Clave dicotómica del género <i>Nephrolepis</i>	43
Figura 15. Clave dicotómica del género <i>Nephrolepis</i>	44
Figura 16. Ejemplo de los resultados obtenidos con <i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
Figura 17. Ejemplo de los resultados obtenidos con <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
Figura 18. Ejemplo de los resultados obtenidos con <i>Xanthomonas campestris</i>	47
Figura 19. Ejemplo de los resultados obtenidos con <i>Erwinia carotovora</i>	48
Figura 20. Ejemplo de los resultados obtenidos con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49

RESUMEN

El helecho *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl, cola de quetzal, es considerado como planta medicinal en países asiáticos y está ampliamente distribuido en Guatemala pero sólo es utilizado como planta ornamental. En este estudio se exploró la factibilidad de desarrollar un producto natural derivado de *Nephrolepis cordifolia* a través de la presencia de actividad antibacteriana en sus infusiones, y su capacidad de propagarse en cultivo *in vitro* a partir de esporas. Se utilizó una infusión debido a que es la técnica más utilizada para trabajar con plantas medicinales y el método de Kirby-Bauer (difusión en disco) porque es un método semicuantitativo para determinar el efecto de nuevos compuestos contra bacterias. Se determinó que las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris* presentan halos de inhibición hacia compuestos presentes en el precipitado de las infusiones realizadas y que estas poseen un posible efecto bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; sin embargo, no se puede concluir que las bacterias sean susceptibles a estos compuestos. El cultivo *in vitro* a partir de esporas fue establecido utilizando un protocolo de desinfección diseñado en este estudio y medio Murashige & Skoog (MS) para germinar e inducir apogamia; además, basado en estos resultados se puede decir que el desarrollo de un producto natural derivado de este helecho es factible.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el uso desmedido de antibióticos ha originado bacterias con múltiples resistencias (mecanismos de defensa) hacia estos fármacos, por lo tanto, la tendencia a buscar productos naturales que posean algún efecto antibacteriano ha regresado. Los helechos son un grupo de plantas vasculares que se han investigado poco a pesar de estar ampliamente distribuidos en regiones tropicales. *Nephrolepis cordifolia* es un helecho ornamental conocido en Guatemala como cola de quetzal. Este helecho se reproduce naturalmente en varios departamentos del país.

En países asiáticos este helecho se utiliza como planta medicinal y como fuente de alimento y se ha reportado que puede poseer efectos antibacterianos pero no se han estudiado estas propiedades en sus extractos acuosos (infusiones). Debido a esto, uno de los objetivos de este estudio fue explorar la factibilidad de desarrollar un producto natural derivado del helecho *Nephrolepis cordifolia* a través de la presencia de actividad antibacteriana en sus infusiones, y su capacidad de propagarse en cultivo *in vitro* a partir de esporas.

Los frondes del helecho fueron colectados en la Universidad del Valle de Guatemala y en Colecciones Biológicas de la Universidad del Valle de Guatemala, con estos se realizó una infusión que fue utilizada para llevar a cabo los bioensayos de actividad antibacteriana. El bioensayo consiste en impregnar un disco de papel filtro con el extracto y evaluar su efecto en el crecimiento de una bacteria en medio de cultivo sólido. El cultivo *in vitro* se realizó a partir de las esporas de estos helechos y se evaluaron distintos medios para establecer un protocolo ideal para la propagación de esta especie.

Las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris* presentan halos de inhibición completos hacia compuestos presentes en el precipitado de las infusiones de *Nephrolepis cordifolia* y las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* presentan disminución del crecimiento lo cual indica que hay compuestos bioactivos pero no se puede concluir que las bacterias sean susceptibles a estos. El cultivo *in vitro* fue establecido utilizando un protocolo de desinfección propuesto en esta investigación y medios Murashige & Skoog (MS) para inducir la germinación y apogamia; basado en estos aspectos se puede decir que el desarrollo de un producto natural basado en el helecho *Nephrolepis cordifolia* es factible.

II. OBJETIVOS

A. GENERAL

Explorar la factibilidad de desarrollar un producto natural derivado del helecho *Nephrolepis cordifolia* a través de la presencia de actividad antibacteriana en sus infusiones, y su capacidad de propagarse en cultivo *in vitro* a partir de esporas.

B. ESPECÍFICOS

- Detectar presencia de actividad antibacteriana en infusiones del helecho *Nephrolepis cordifolia* mediante la técnica de susceptibilidad por difusión en disco, utilizando un panel de doce bacterias.
- Establecer un método de cultivo *in vitro* a partir de esporas para el helecho *Nephrolepis cordifolia*
- Generar información acerca de la factibilidad de utilizar el helecho *Nephrolepis cordifolia* para desarrollar un producto natural

III.JUSTIFICACIÓN

Guatemala posee una gran diversidad de helechos con al menos 700 especies diferentes, muchas de estas poseen importancia etnobotánica ya que son utilizadas como alimento, plantas medicinales, plantas ornamentales y como materia prima para artesanías (Jiménez 2010; Hernández 2011). *Nephrolepis cordifolia*, conocido como cola de quetzal es un helecho con distribución pantropical que se utiliza como planta ornamental; sin embargo, en países asiáticos como India y Nepal es una importante fuente de alimento y se le atribuyen usos medicinales para el hígado, riñones y piel, además de actividad anticonceptiva y antibacteriana (Rani *et al.* 2010).

Los helechos suelen poseer metabolitos secundarios de las familias terpenoides, flavonoides, alcaloides y antraquinonas que son comúnmente asociados con actividad antibacteriana (Rasmussen *et al.* 2003; Aceret 2011; Morais-Braga 2012). A pesar de esto, existe poca información sobre la actividad antibacteriana en extractos acuosos realizados mediante infusiones. La infusión es el método más común en el que se utilizan las plantas medicinales por lo tanto es importante saber si esta técnica conserva las propiedades que una planta pueda tener.

Un estudio que explore la presencia de actividad antibacteriana en infusiones de *Nephrolepis cordifolia* es importante debido a que este helecho se encuentra ampliamente distribuido en Guatemala, y por lo tanto podría ser candidato para que sus infusiones sean utilizadas como un producto natural con efectos benéficos.

Adicionalmente, establecer el cultivo *in vitro* de este helecho permitiría una mayor producción en menor tiempo y espacio lo cual lo puede convertir en un producto natural con alto impacto económico en el país. Además, la comercialización de los productos derivados de helechos en Guatemala tendría la ventaja de ser auto sostenible gracias a que no habría explotación por parte de industrias ni depredación de las poblaciones naturales.

IV. MARCO TEÓRICO

A. HELECHOS

1. **Evolución:** Los helechos son el segundo grupo más diverso de plantas vasculares existentes, comprendiendo alrededor de 10,000 especies (Nelson 2000), estos evolucionaron entre los período devónico y carbonífero de la era paleozoica y se continúan diversificando (Lehtonen 2011). En la actualidad existe debate sobre el origen filogenético de este grupo de plantas; sin embargo, al considerar nuevos enfoques moleculares, se plantea un origen monofilético (Hasebe *et al* 1994; Pryer *et al.* 2004; Vasco *et al.* 2013) que no se puede comprobar debido a la ausencia de fósiles de helechos extintos y a la gran diversidad morfológica de algunas familias, especialmente al considerar la estructura de las hojas (Lehtonen 2011).

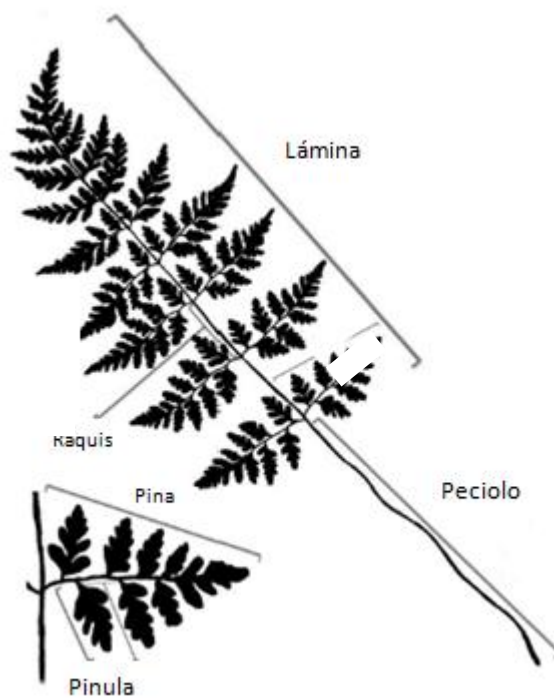
En el periodo cretácico este grupo de plantas comenzó una etapa de radiación adaptativa del cual surgió la extensa diversidad de especies existentes actualmente. Se cree que esto fue consecuencia de la evolución de plantas angiospermas ya que se crearon nuevos nichos ecológicos que rápidamente fueron ocupados por los helechos (Schneider *et al.* 2004). No obstante, estudios recientes han propuesto que los helechos tuvieron un nuevo periodo de radiación en la era cenozoica debido a la adaptación de este grupo para ser epífitos (Schuettpelz & Pryer 2009).

2. **Morfología:** Los helechos son plantas vasculares que se caracterizan por no producir flores ni semillas, por poseer estructuras análogas a hojas llamadas frondes y por experimentar un ciclo de vida con alternancia entre un estadio sexual y uno asexual que son independientes y morfológicamente diferentes (Nelson 200).

La mayoría de helechos genera brotes que se desenrollan, este proceso se denomina vernación circinada y es utilizado como una forma de protección para los meristemas y puntas de crecimiento, adicionalmente estas estructuras poseen largos vellos que dan mayor protección (Nelson 200).

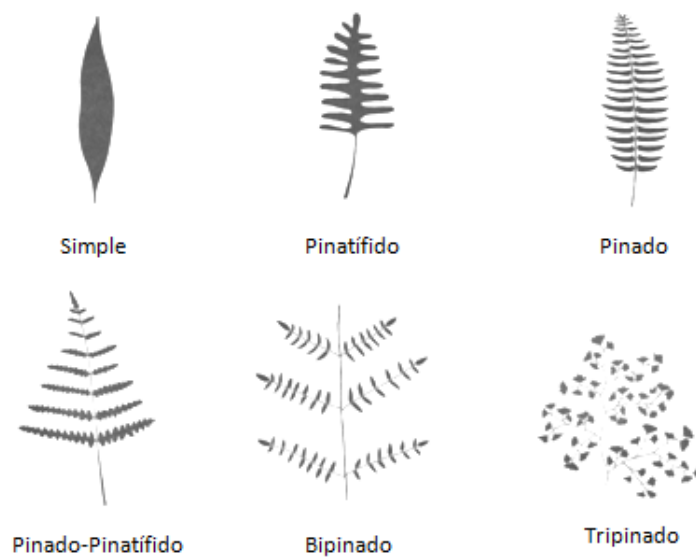
Los frondes se dividen en un peciolo y una lámina; el peciolo une a la lámina con el ráquis y puede presentar diferentes características como vellos, escamas o espinas. La lámina puede ser no dividida, dividida (pinada) o dividida múltiples veces (bipinada, tripinada, y así sucesivamente) esto da lugar a que generalmente cada pina se divida a su vez en pínulas (Figura 1) (Nelson 2000).

Figura 1. Morfología de helechos y sus partes



(Adaptada de Vasco *et al.* 2013)

Figura 2. Tipos de frondes en helechos



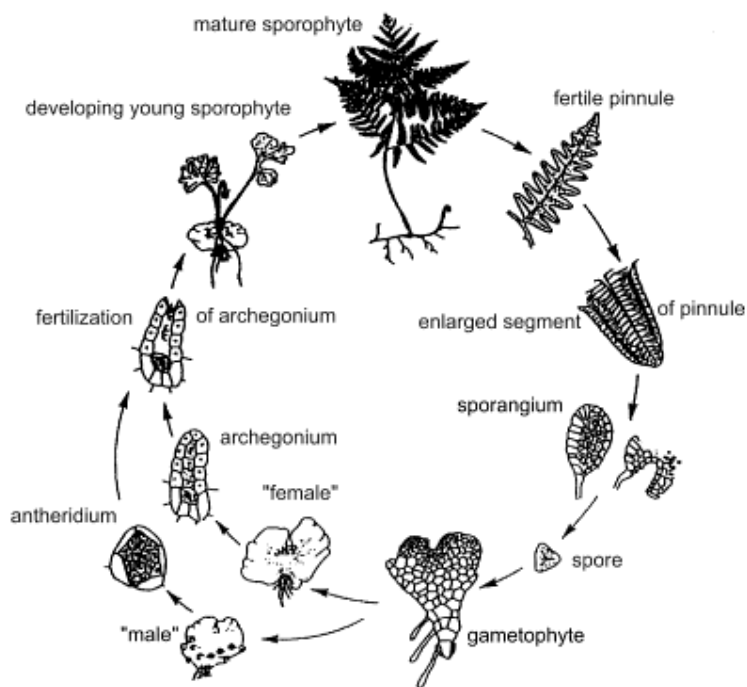
(Adaptada de Nelson 2000)

Los frondes pueden ser pinatífidos si tienen hoja simple y las pínulas forman lóbulos que llegan casi a la nervadura o pinados si las pínulas son paralelas; sin embargo, si el fronde es más complejo se combinan estos términos para describir la posición de la pina y la pínula. Los frondes también pueden ser bipinados o tripinados dependiendo del número de pinas por fronde (Figura 2) (Nelson 2000).

Debido a la ausencia de semillas, los helechos se reproducen por medio de esporas estas se originan en esporangios que en muchas especies se encuentran agrupados formando una estructura llamada soro en el envés de las pinas o pínulas, estos pueden estar protegidos por una capa de tejido llamada indusio (Nelson 2000). Los soros se utilizan para la clasificación de estas plantas tomando en cuenta la forma, la posición y la presencia o ausencia de indusio. La clasificación más reciente de Christenhusz *et al.* (2011) combina datos morfológicos con datos moleculares para hacer una clasificación lineal de familias y géneros de helechos.

3. Ciclo de vida: Este ciclo de vida se caracteriza por una alternancia de generaciones muy marcada y se diferencia del de otras plantas debido a que los dos estadios (esporofito y gametofito) son independientes entre sí (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de vida de helechos



(Adaptada de Sharpe *et al.* 2010)

El esporofito (diploide) produce las esporas por meiosis y éstas son protegidas por el esporangio y el indusio, en condiciones de baja humedad se activa un mecanismo de respuesta a estrés hídrico en el que la capa exterior del esporangio se rompe ocasionando la liberación de las esporas. Las esporas son esparcidas por viento o agua y dependen de condiciones húmedas para germinar, si las condiciones son adecuadas se desarrolla un tejido celular llamado prótalo (haploide) que es comúnmente llamado gametofito y produce los gametangios masculino (anteridio) y femenino (arquegonio). El arquegonio libera moléculas señalizadoras que orientan al espermatozoide para lograr la fecundación, estos son dependientes del agua para nadar hacia el arquegonio. Una vez ocurre la fecundación se comienza a desarrollar un nuevo esporofito por mitosis, completando el ciclo de vida (Sharpe *et al.* 20110).

4. **Uso etnobotánico:** Los helechos han sido parte importante de la cultura humana en muchos aspectos. En la actualidad el principal uso que se les da es el ornamental ya que en muchos países son utilizados tanto en interiores como exteriores debido a que son plantas exóticas generalmente distribuidas en los trópicos, además su uso en arreglos florales es común. En algunos países asiáticos los helechos son utilizados como alimento principalmente en ensaladas; los helechos arborescentes además de ser utilizados como alimento sirven a varias comunidades como material de construcción y de elaboración de artesanías. Un uso importante de los helechos es el medicinal ya que se ha reportado que las infusiones de muchas especies poseen actividad antiespasmódica, antipirético, laxante, astringente, antifúngica, antibacterial, diurética, sirven como coagulantes y como tratamiento para asma, úlceras, afecciones urinarias y respiratorias (Muñiz *et al.* 2007).

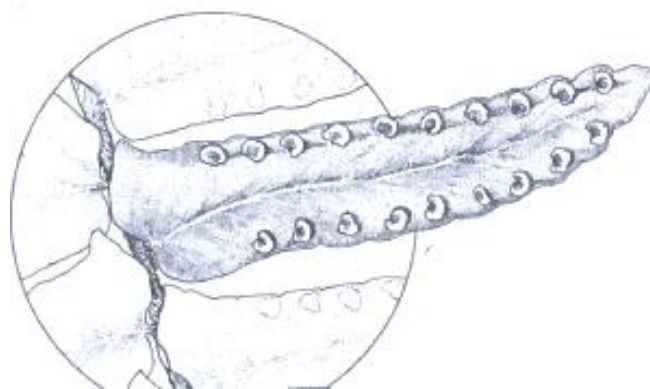
5. **Distribución en Guatemala:** Existen alrededor de 687 taxones de helechos en Guatemala lo cual convierte al país en uno de los más diversos de Centro y Norte América con respecto a este grupo de plantas (Jiménez 2010). Los helechos habitan bosques nubosos de regiones montañosas sobre todo entre 1200 y 2600 msnm y están ampliamente distribuidos en todo el territorio nacional siendo el corredor del bosque nuboso de Baja Verapaz uno de los que mayor diversidad posee (Jiménez 2010).

B. *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl

1. **Características generales:** *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl es un helecho con distribución pantropical perteneciente a la familia Nephrolepidaceae, antes llamada Davillaceae (Christenhusz *et al.* 2011). En Guatemala es conocido como Cola de Quetzal, es común encontrarlo en bosques como un helecho terrestre, epífita y epipétrico entre alturas

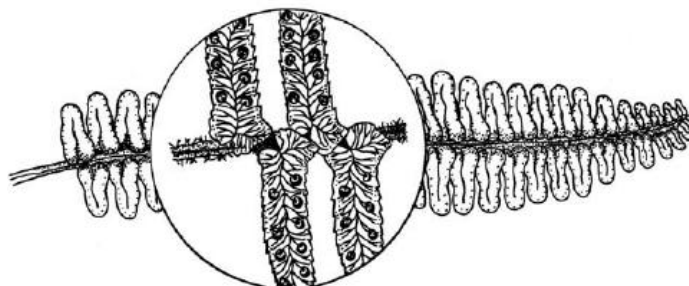
cercanas al nivel del mar y 1500 msnm. Los departamentos en los que se encuentran de forma nativa son: Guatemala, Alta Verapaz, Escuintla, Izabal, Peten, Retalhuleu, Sololá y Zacapa pero es cultivado en muchos otros. Es la única especie del género en la que se ha registrado la presencia de pequeños tubérculos como parte del rizoma. Los frondes son pinados y pueden ser erectos, arqueados o colgantes con un raquis cubierto de escamas naranjas o rojizas que han sido reducidas a pequeños tricomas; el tamaño del fronde depende del hábitat siendo más largo (3 m) en aquellos individuos epífitos o epipétricos y mucho más corto en los terrestres (menos de 1 m). Las pinas u hojas son subcoriáceas en las que no se pueden distinguir las venas y poseen esporangios con indusio lunado o reniforme (Figura 4) (Stolze 1981).

Figura 4. Pina e indusio de *Nephrolepis cordifolia*



(Adaptada de Stolze 1981)

Figura 5. Fronde de *Nephrolepis cordifolia*.

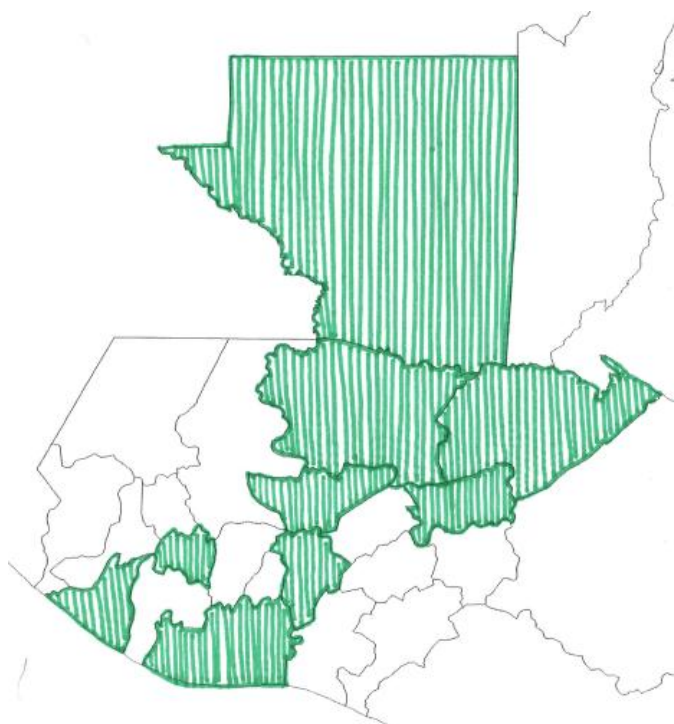


(Adaptada de Coile 1996)

Figura 6. *Nephrolepis cordifolia* en colecciones biológicas UVG



Figura 7. Mapa de la distribución natural de *Nephrolepis cordifolia* en Guatemala



2. **Uso etnobotánico:** *Nephrolepis cordifolia* es un helecho de uso ornamental en Guatemala, es común encontrarlo como cerco vivo, ornamento de interiores y exteriores y como parte de arreglos florales de todo tipo (Jiménez 2010). Sin embargo en países asiáticos como Nepal e India posee usos más diversos; los tubérculos que posee son utilizados como una importante fuente alimenticia y sus infusiones se utilizan con fines medicinales para tratar asma, afecciones renales y hepáticas y como anticonceptivo, además existen reportes que indican que es efectivo contra infecciones bacterianas (Muñiz *et al.* 2005; Rani *et al.* 2010; Uprety *et al.* 2012).

C. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

1. **Ensayo de susceptibilidad por difusión en disco:** Su propósito es determinar la susceptibilidad o resistencia de una bacteria hacia un compuesto con propiedades antibacterianas. Se siembra un inóculo inicial de la bacteria deseada en una placa de agar Mueller-Hinton, generalmente se utiliza una concentración estándar de bacteria para esto lo más común es utilizar el estándar McFarland 0.5. El inóculo es esparcido por toda la placa y se deja secar por unos minutos, posteriormente se colocan discos impregnados con el compuesto que se quiere ensayar y se incuba la placa por 24 horas. Este test genera halos de inhibición del crecimiento de acuerdo a la susceptibilidad de la bacteria, se miden los diámetros de estos halos y se comparan con patrones estándar (Hudzicki 2009).

Se han realizado varias modificaciones a este método para acortar el tiempo de lectura y para estandarizar factores como la medición de halos pero sobre todo se utiliza para comprobar la actividad antibacteriana de productos derivados de plantas que pueden ser extractos crudos o purificados. En esta modificación los discos se preparan con el extracto y son ensayados contra un antibiótico conocido (control positivo), es importante mantener estandarizados el inóculo de bacteria, la concentración del extracto y la actividad que el solvente del mismo pueda tener (Boyle *et al.* 1973; Liberman & Robertson 1975; Barry *et al.* 1979; Cowan 1999).

2. **Ensayo de concentración mínima inhibitoria:** Consiste en encontrar la concentración más baja de un compuesto antibacteriano a la cual se inhibe el crecimiento visible

de una bacteria. Es utilizado para comprobar la actividad de nuevos compuestos con posible actividad antibacteriana (Andrews 2001).

Las ventajas de este ensayo son que el ensayo se puede realizar en microescala y permite el uso de surfactante pero requiere mayor estandarización del inóculo y el tiempo de incubación, además de subcultivos para determinar el efecto del agente antibacteriano (Cowan 1999; Andrews 2001).

D. IMPORTANCIA DEL PANEL DE BACTERIAS

1. *Klebsiella pneumoniae*: Su uso en paneles de actividad antibacteriana es amplio debido a que es una bacteria patógena oportunista con distribución ubicua, frecuente en infecciones nosocomiales. Es responsable de brotes de neumonía y es común en lugares concurridos como escuelas, gimnasios y hospitales (Podschun & Ullmann 1998; Keynan & Rubinstein 2007).

2. *Enterobacter cloacae*: Esta bacteria puede causar infecciones nosocomiales en pacientes inmunosuprimidos y se ha reportado en pacientes de urología y pacientes quemados. La bacteria puede tener múltiples plásmidos de resistencia contra antibióticos; sin embargo no se ha encontrado ninguna contra aminoglucósidos (John & Sharbaugh 1982; Juanjuan 2007).

3. *Acinetobacter baumannii*: La importancia de esta bacteria radica en que es un patógeno oportunista con resistencias múltiples a antibióticos y desinfectantes. Esta bacteria puede sobrevivir por periodos prolongados de tiempo en cualquier ambiente y puede causar distintas infecciones que van desde neumonía hasta meningitis. Una vez ha infectado es muy difícil de tratar (Wisplinghoff *et al.* 2007; Maragakis & Perl 2008; Peleg *et al.* 2008).

4. *Escherichia coli*: Esta bacteria es muy común en los paneles de actividad antibacteriana; es parte del microbioma humano y generalmente no es patógena; sin embargo, es muy importante debido a que es una bacteria modelo y se ha estudiado ampliamente. La especie posee muchas variaciones que pueden llegar a ser patógenas y presentar resistencia a antibióticos (Kraker *et al.* 2011; Toval *et al.* 2014).

5. *Staphylococcus aureus*: Esta bacteria es parte del microbioma humano, comúnmente se encuentra en la piel y mucosas. Sin embargo, es causante de una alta tasa de infecciones nosocomiales en pacientes post operatorios. Si la cepa es resistente a meticilina el tratamiento es complicado y puede causar la muerte (Klutymans *et al* 1997; Klein *et al.* 2007; Kraker *et al.* 2011).

6. *Pseudomonas aeruginosa*: Es una bacteria patógena oportunista con múltiples resistencias a antibióticos, es común en infecciones nosocomiales y debido a la ausencia de tratamientos efectivos sus infecciones poseen una elevada tasa de mortalidad. Es común en infecciones del tracto respiratorio y urinario y en pacientes con quemaduras. (Obritsch *et al.* 2005; Wiehlmann *et al.* 2007; Breidenstein *et al.* 2011).

7. *Bacillus cereus*: Es una bacteria ampliamente distribuida comúnmente encontrada en la tierra. Esta bacteria está adaptada a crecer en los intestinos de mamíferos y muchas veces es contaminante de alimentos; cuando coloniza el tracto intestinal produce una enfermedad diarreica o con vómitos. Es sumamente importante debido a las toxinas que produce, a su capacidad para crear biofilms y la resistencia contra algunos antibióticos como betalactámicos (Kotiranta *et al.* 2000; Stenfors *et al.* 2008).

8. *Xanthomonas campestris*: Es una bacteria fitopatógena que posee diversos patovars (variedades de acuerdo a su patogénesis) causa severas enfermedades en una gran variedad de plantas generando pérdidas económicas, sobre todo en las crucíferas (Vicente *et al.* 2001; He & Zhang 2008; Ryan *et al.* 2011).

9. *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*: Es una bacteria fitopatogena que infecta al tomate causando la enfermedad del chancro del tomate, las infecciones de esta bacteria generar pérdidas económicas al sector agrícola (Gartemann *et al.* 2003).

10. *Erwinia carotovora*: Es una bacteria patógena de plantas que causa muerte celular debido a la degradación de la pared, usualmente infecta papa y es de interés debido a la capacidad de percepción de quórum y de secretar enzimas extracelulares que degradan células vegetales (Yap *et al.* 2004; Hasegawa *et al.* 2005).

E. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*

1. **Plasticidad y totipotencia:** Las plantas tienen la capacidad de adaptar sus procesos metabólicos, de desarrollo y crecimiento para responder a estímulos ambientales (plasticidad) lo cual permite que haya división celular de cualquier tipo de tejido y que se pueda regenerar otro tejido perdido. Estos procesos aprovechan la totipotencia de las células vegetales que se define como la utilización de todo el potencial genético en respuesta a un estímulo dado, haciendo posible la regeneración total de un organismo a partir de una sola célula (Slater *et al.* 2008).

2. **Requerimientos para el cultivo *in vitro*:** El cultivo de plantas *in vitro* debe cumplir con los requerimientos nutricionales y ambientales que las células vegetales necesitan por lo tanto la composición del medio en el que se cultiva (minerales, vitaminas, aminoácidos, fuentes de carbono) y las condiciones de luz, temperatura, pH, presión osmótica y otros deben estar controladas (Slater *et al.* 2008).

3. **Composición de los medios de cultivo:**

a. **Macroelementos:** Son elementos que las células vegetales necesitan en grandes cantidades para completar su crecimiento y desarrollo, entre estos se encuentran: las fuentes de nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio, calcio y azufre. El nitrógeno generalmente se añade como una mezcla de iones provenientes entre nitratos y amonios para garantizar la absorción. El calcio generalmente se prepara como un stock separado para evitar la precipitación en la solución (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

b. **Microelementos:** A pesar de que los microelementos son requeridos en concentraciones trazas cumplen diversas funciones en el crecimiento y desarrollo de la planta. Entre estos compuestos se encuentran: El manganeso, yodo, cobre, cobalto, boro, molibdeno, hierro y zinc. El hierro comúnmente se añade como sulfato de hierro quelado con EDTA para evitar la oxidación del hierro (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

c. **Compuestos orgánicos:** Estos incluyen vitaminas y fuentes de aminoácidos que son esenciales para el cultivo *in vitro* de células vegetales. Las vitaminas que se utilizan son la tiamina y el mioinositol y el aminoácido más común que se agrega es la glicina. Se pueden

agregar otras vitaminas y aminoácidos como la prolina, asparagina, alanina, arginina y ácido aspártico (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

d. Fuente de carbono: La mayoría de plantas en cultivo *in vitro* no están fotosintéticamente activas por lo tanto se agrega una fuente de carbono fijado que usualmente es sacarosa; sin embargo se pueden utilizar maltosa, glucosa o sorbitol en cultivos especiales como el de orquídeas (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

e. Agente gelificante: Si el cultivo es en medio sólido se debe agregar un agente gelificante para que el tejido vegetal crezca en la superficie del medio. El agar derivado de algas es el más común pero existen otros agentes más puros como la agarosa o las gomas gellan (Slater *et al.* 2008).

4. Reguladores de crecimiento: Estas moléculas determinan la ruta de desarrollo de las células vegetales que se tienen en el cultivo *in vitro*, generalmente se utilizan hormonas vegetales naturales y sintéticas para obtener los estímulos deseados (Slater *et al.* 2008).

a. Auxinas: Promueven la división celular y el crecimiento celular, la auxina natural que más se encuentra en las plantas es el ácido indol acético (AIA) pero es inestable en calor y luz. En cultivo *in vitro* se utiliza una hormona sintética análoga al AIA llamada ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sin embargo; esta molécula es cancerígena y debe utilizarse con las medidas de seguridad y descarte apropiadas (Slater *et al.* 2008).

b. Citoquininas: Promueven la división celular, son derivadas de purinas y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las más utilizadas en cultivo *in vitro* son las moléculas sintéticas 6-bencilaminopurina (BAP) y quinetina (Slater *et al.* 2008).

c. Giberelinas: Promueven y regulan la elongación celular son importantes en determinar el tamaño de la planta pero en cultivo *in vitro* se utiliza únicamente el ácido giberélico (GA3) (Slater *et al.* 2008).

d. Ácido abscísico: Inhibe la división celular, es utilizado en cultivo *in vitro* para promover rutas de desarrollo específicas (Slater *et al.* 2008).

e. Etileno: Funciona como un regulador del crecimiento vegetal, es una molécula gaseosa muy común en plantas climatéricas debido a que promueve la maduración de los frutos. No se utiliza como aditivo en el cultivo *in vitro* pero sus niveles pueden evitar el crecimiento si el contenedor no promueve el intercambio de gases (Slater *et al.* 2008).

5. Tipos de cultivo: Los cultivos vegetales son iniciados a partir de explantes (porciones o partes estériles de tejido de una planta original) y prosiguen una etapa de regeneración en la que se obtiene una nueva planta o tejido. Los tipos más comunes de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son:

a. Callos: Surge cuando los explantes se cultivan en un medio con equilibrio entre la concentración de auxinas y citoquininas, es una masa de células no diferenciadas en división que suele almacenarse en oscuridad para evitar la diferenciación. Este tipo de cultivo es ampliamente utilizado ya que puede ser subcultivado al cambiarlo a un medio fresco conservando la posibilidad de regenerar una planta o un tejido deseado si se cambian las condiciones de cultivo (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

b. Suspensiones celulares: Se generan a partir de callos en los cuales las células se adhieren débilmente unas a las otras y por lo tanto la masa celular es frágil y separable, estos callos son transferidos a un medio líquido con agitación y se deja que las células continúen dividiéndose (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

c. Protoplastos: Son células vegetales a las cuales se les ha quitado la pared celular por medios mecánicos o enzimáticos. Este tipo de cultivo es delicado ya que las células son fácilmente dañadas, se debe mantener un alto potencial osmótico y ausencia de agitación en la suspensión celular. Este tipo de cultivo es utilizado para transformación genética y puede originar un callo al ser subcultivado en medio sólido (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

d. Raíces: Se utilizan explantes de puntas de raíz debido a que estas son órganos indeterminados y por lo tanto fácilmente se pueden cultivar en medios sencillos (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

e. Meristemos y tallos: Los meristemos apicales (punta de tallos) o laterales están en constante división celular ya que son los órganos responsables del crecimiento de la planta por lo que son propicios para formar explantes y cultivarlos *in vitro*. Son ampliamente utilizados

para la propagación clonal ya que se puede regenerar una planta idéntica a la original rápidamente (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

f. Embriones: Los embriones de algunas plantas pueden utilizarse como explantes para generar un callo. Esta técnica es ampliamente utilizada para regenerar plantas monocotiledoneas (Slater *et al.* 2008).

g. Esporas: Prácticamente todas las plantas tienen esporas de algún tipo (células haploides con fines reproductivos) a partir de las cuales se pueden generar callos o embriones. El contenido de cromosomas se puede duplicar por medios artificiales para regenerar una planta con dos sets del mismo cromosoma. En plantas como los helechos el proceso de cultivo de esporas involucra la germinación de estas ya que el ciclo de vida de estas plantas involucra un estadio haploide en el que se desarrolla una planta independiente (Slater *et al.* 2008).

6. **Regeneración del tejido vegetal:** Una vez establecido el cultivo *in vitro* se pueden regenerar plantas completas, los métodos más utilizados son:

a. **Organogénesis:** Es el proceso por el cual se desarrollan órganos de los cuales se puede regenerar la planta completa, depende del balance entre citoquininas y auxinas. Generalmente se induce el crecimiento de brotes a los cuales se les puede inducir la formación de raíces una vez hayan crecido. Un balance mayor de auxinas genera crecimiento de raíces mientras que uno mayor de citoquininas genera brotes o tallos (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

b. **Embriogénesis somática:** Consiste en generar embriones o estructuras análogas a estos a partir de tejido somático, estos se utilizan para regenerar plantas completas. La embriogénesis puede ser directa a partir de una sola célula o indirecta a partir de un callo. La etapa inicial involucra el uso de 2,4-D el cual es removido en la etapa de desarrollo del embrión (Doods & Roberts 1990; Slater *et al.* 2008).

V. MÉTODOS

A. HIPÓTESIS

1. Hipótesis de trabajo: Existe presencia de actividad antibacteriana en las infusiones del helecho *Nephrolepis cordifolia*.

2. Hipótesis nula: No existe presencia de actividad antibacteriana en las infusiones del helecho *Nephrolepis cordifolia*.

B. PROCEDIMIENTO

1. Colecta y secado de material vegetal: Se colectaron 5 individuos del helecho *Nephrolepis cordifolia* en el campus de la Universidad del Valle de Guatemala (3) y Colecciones Biológicas UVG (2). Los individuos colectados en Colecciones Biológicas UVG fueron identificados por la Dra. Pöll y los demás de acuerdo a claves dicotómicas (Ver anexo A). Se cortaron únicamente frondes de cada individuo y se lavaron con agua del grifo para quitar partículas de tierra, posteriormente se secaron y colocaron sobre toallas de papel. Para la colecta de esporas se utilizaron guantes y un pincel con el cual se frotaron los soros, liberando las esporas sobre un papel filtro, estas fueron transferidas a frascos de vidrio donde se almacenaron para el ensayo de establecimiento de cultivo *in vitro*. Los frondes ya preparados se colocaron en bolsas de papel encerado y se dejaron por una semana en una desecadora de plantas (estructura de madera con lámparas de baja intensidad). Por último se trituraron los frondes con ayuda de tijeras estériles y guantes y se registró el peso de material vegetal seco.

2. Extractos acuosos por infusión: Todos los extractos se realizaron en proporciones de 50 g de material vegetal por 1000 mL de agua estéril. Se colocó el material vegetal en un beaker estéril y se adicionó el volumen necesario de agua estéril, se procedió a calentar hasta ebullición. Inmediatamente se filtró el extracto en gasa estéril dos veces para remover material vegetal y una tercera vez en papel whatman No. 1. Se repitió todo el proceso de extracción modificando el último filtrado con filtro 0.2 µL. Cada set de extractos se alicuotó en tubos cónicos de 50 mL y se almacenó en diferentes condiciones. El primer set se congeló a 0 °C, el segundo a -20 °C y el tercero se refrigeró a 4 °C.

3. Bioensayos de actividad antibacteriana: Todas las pruebas se realizaron en Agar Mueller-Hinton, la primera etapa se realizó únicamente con las bacterias *Pseudomonas*

aeruginosa y *Bacillus cereus*. Primero se preparó un cultivo líquido de cada bacteria en 3 mL de caldo infusión cerebro corazón picando una única colonia con asa estéril y transfiriéndola al tubo con caldo. Este tubo se dejó en incubadora a 37 °C con agitación a 230 rpm durante una noche o 16 horas. Utilizando un estándar McFarland 0.5 (equivalente a 10⁸ UFC/mL) se diluyó la bacteria en un nuevo tubo con caldo, una vez diluida se sembraron 100 µL en una caja petri con agar MH y se utilizó un esparcidor de vidrio para que el crecimiento fuera confluyente en toda la caja. Se utilizaron discos estériles de 6 mm de papel filtro Whatman No. 1 a los cuales se les agregó 10 µL de la solución que se quería ensayar, los discos se colocaron sobre la caja petri recién sembrada utilizando una pinza estéril. Se utilizó Gentamicina 3µg/µL como control positivo y 10 µL del agua con la que se realizó el extracto como control negativo. En la fase 1 se probaron los tratamientos descritos en el Cuadro 1. Se utilizaron tres replicas por bacteria para cada ensayo.

Los tratamiento que obtuvieron un resultado positivo se repitieron con un panel de 10 bacterias encontradas en el cepario del departamento de bioquímica y microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala (*Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Eneterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Staphylococcus epidermidis*). Todas las pruebas se realizaron en triplicado.

Cuadro 1. Bioensayos de actividad antibacteriana

Condición de Extracto	Condición de filtrado	Ensayo
Fresco	Filtro Whatman No. 1	1
	Filtro 0.2 µL	2
Refrigeración 8 °C	Filtro Whatman No. 1	3
	Filtro 0.2 µL	4
Congelamiento -4 °C	Filtro Whatman No. 1	5
	Filtro 0.2 µL	6
Congelamiento -20°C	Filtro Whatman No. 1	7
	Filtro 0.2 µL	8

4. Ensayos de establecimiento de cultivo *in vitro* a partir de esporas:

Todos los ensayos de cultivo *in vitro* se realizaron en campana de flujo laminar utilizando técnicas para propiciar la asepsia. El primer ensayo es el de desinfección de esporas para el cual se utilizaron tres tratamientos diferentes descritos en el Cuadro 2. Se pesaron 0.0120 g de esporas para cada prueba, las esporas son transferidas a un beaker donde se agregó la primera

solución desinfectante y posteriormente se filtraron al vacío utilizando papel filtro Whatman No. 1 estéril, el papel filtro se retiró y se transfirió a un beaker donde se vierte la segunda solución desinfectante, este procedimiento se repitió hasta terminar el tratamiento, el último papel filtro se colocó sobre servilleta estéril y posteriormente con una espátula analítica se esparcieron las esporas en 5 cajas petri conteniendo medio de cultivo sólido MS, se esperó una semana para reportar porcentajes de contaminación. El segundo ensayo que se realizó fue el de germinación en el cual se desinfectaron las esporas de acuerdo a los resultados del primer ensayo y se sembraron en dos medios diferentes: MS y Knudson (Ver anexo C). Las cajas petri se vieron periódicamente bajo estereoscopio para detectar germinación de esporas y desarrollo de prótalos. Los prótalos que comenzaron a germinar se propagaron utilizando pinzas estériles para seccionar la masa de tejido vegetal. Se seleccionaron agrupaciones de prótalos completamente desarrollados para realizar el tercer ensayo que fue el de apogamia en el cual se transfirió asépticamente el grupo de prótalos a un nuevo medio para registrar la inducción de esporofitos. Los medios que se utilizaron en este ensayo fueron MS, MS+BAP 4.4 μ M, 1/2MS Y MS sin fuente de carbono. Se contó el número de esporofitos para decidir qué medio se utilizaría para la propagación del resto de gametofitos.

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección de esporas

Tratamiento	Soluciones	Tiempo (min)
1	Cloro 10 % + Tween20 2%	10
	Agua estéril	1
	Agua estéril	1
	Agua estéril	1
	Etanol 70 %	1
2	Cloro 10 % + Tween20 2%	10
	Cloro 10 % + Tween20 2%	5
	Agua estéril	1
	Agua estéril	1
	Agua estéril	1
3	Etanol 95 %	1
	Cloro 10 % + Tween20 2%	5
	Agua estéril	1
	Agua estéril	1
	Agua estéril	1

C. CRONOGRAMA

Cuadro 3. Cronograma de investigación

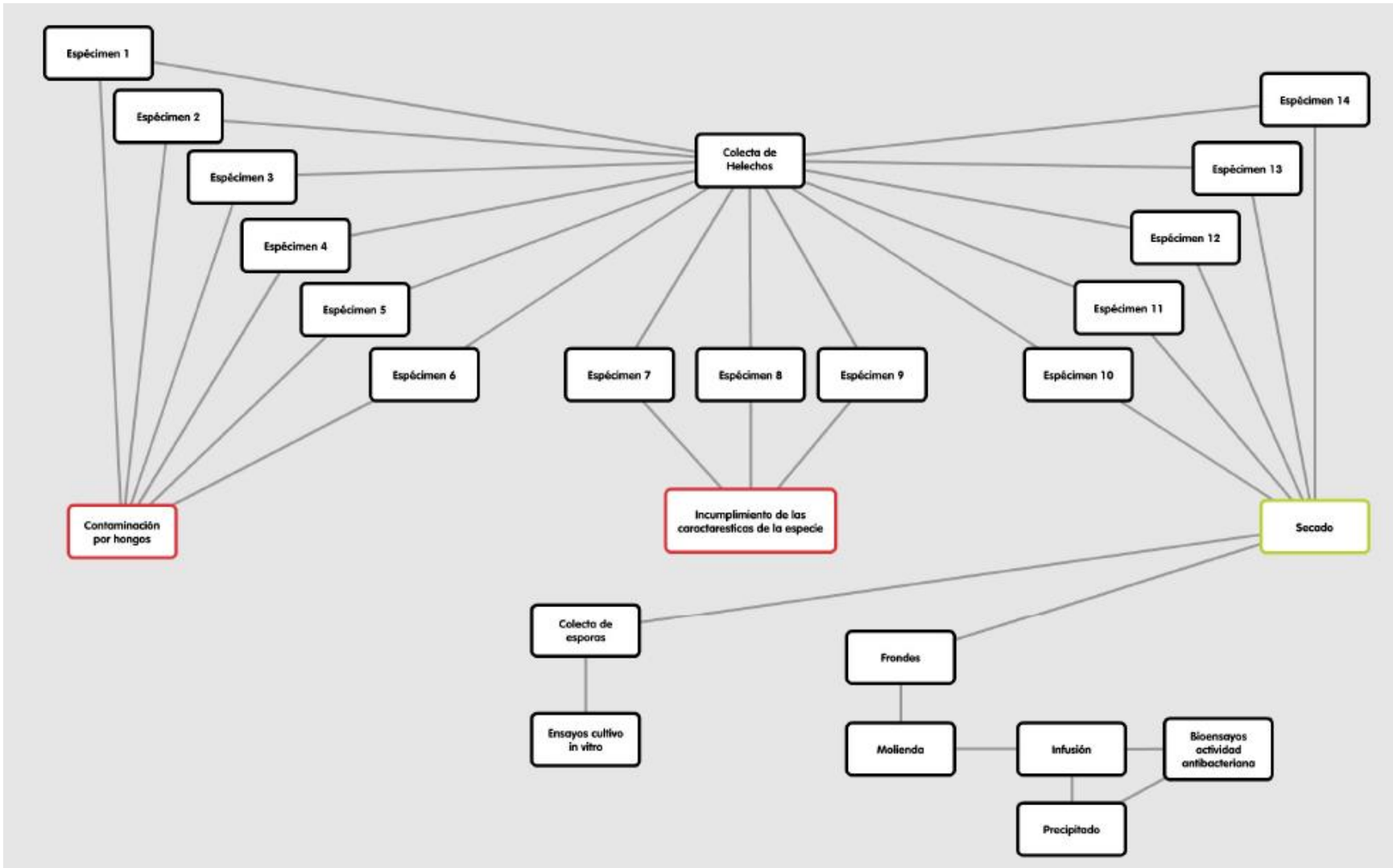
Aspecto	Mes 1				Mes 2				Mes 3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Ensayo de cultivo <i>in vitro</i>												
Colecta de material vegetal	■											
Secado		■										
Colecta de esporas			■									
Ensayo de desinfección				■	■	■	■					
Ensayo de germinación					■	■	■	■				
Ensayo de apogamia								■	■	■		
Extractos acuosos por infusión												
Extracto y almacenamiento			■									
Bioensayo actividad antibacteriana												
Primera fase				■	■	■						
Segunda fase							■	■	■	■		
Redacción de informe												
												■

D. PRESUPUESTO

Cuadro 4. Presupuesto general de la investigación

Descripción	Monto	Contrapartida	Monto Total
PUBLICIDAD, IMPRESIÓN			
Impresión, encuadernación y reproducción	Q. 700.00		Q. 700.00
PRODUCTOS DE PAPEL, CARTON IMPRESOS			
Papel de escritorio	Q. 300.00		Q. 300.00
PRODUCTOS QUÍMICOS Y CONEXOS			
Elementos y compuestos químicos		Q. 20,000.00	Q. 20,000.00
OTROS MATERIALES Y SUMINISTROS			
Útiles de oficina	Q. 100.00		Q.100.00
Útiles de limpieza y productos sanitarios		Q. 100.00	Q.100.00
Útiles menores médico-quirúrgicos y de laboratorio		Q. 25,000.00	Q. 25,000.00
TOTAL		Q. 45,100.00	Q. 46,700.00

Figura 8. Esquema de la metodología realizada en la investigación



VI. RESULTADOS

A. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

No hay evidencia de actividad antibacteriana en todos los extractos filtrados en poro de 0.2 μm durante la primera etapa de los bioensayos. En todos los extractos filtrados con papel Whatman No. 1 se presentó un precipitado fino color café, minutos después de la filtración.

El primer tratamiento que se probó fue el extracto acuoso fresco, para impregnar los discos en este bioensayo se homogeneizó el sobrenadante y el precipitado. Únicamente se obtuvo resultados con tres de las cinco réplicas (Especímenes 10, 12 y 14 Ver Figura 8) de *Pseudomonas aeruginosa* (Ver Cuadro 5).

Cuadro 5. Diámetro de inhibición obtenido en bioensayo con extracto acuoso fresco

Bacteria	Diámetro de Inhibición (mm)	
	Gentamicina	Helecho
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.8 \pm 1.3	8 \pm 5.3

Los valores son medias de cinco replicas \pm desviación estándar

Al descongelarse cada alícuota de los tratamientos almacenados a -20°C y -4°C , el precipitado cambió de aspecto, formando un conglomerado opaco y gelatinoso en el fondo del recipiente. En el bioensayo con el extracto congelado a -20°C se obtuvo únicamente un halo de inhibición (13 mm de diámetro) en uno de los triplicados del espécimen 12 con la bacteria *Bacillus cereus*.

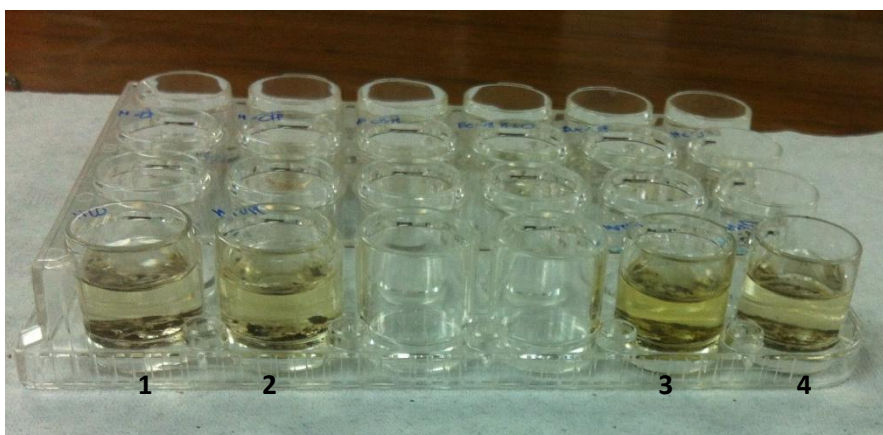
En el bioensayo con el extracto congelado a -4°C únicamente se obtuvo medio halo de inhibición (4 mm de radio) en uno de los triplicados del espécimen 12 con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Una de las alícuotas del extracto fue calentada en baño maría para determinar si el precipitado era soluble; sin embargo no se obtuvo cambio y no hubo resultado en el bioensayo realizado posteriormente. No se obtuvo ningún halo de inhibición en el bioensayo realizado con el extracto refrigerado a 8°C .

El espécimen 12 fue seleccionado para la segunda fase de bioensayos debido a los resultados previos, el precipitado de este extracto se separó por centrifugación y decantación, se evaporó el remanente de solvente y se secó en horno. Se mantuvo la diferenciación entre precipitados

provenientes de extractos congelados a -20°C y -4°C . El volumen de extracto fresco y refrigerado no fue suficiente para separar el precipitado por lo cual fue eliminado del estudio.

Se realizó una prueba cualitativa de solubilidad con el precipitado obtenido para determinar el solvente ideal para realizar el ensayo (Ver Figura 9). Se seleccionó metanol y agua para resuspender el extracto (Ver Cuadro 6) utilizando 0.01 g de precipitado y 500 μL de solvente en cada caso.

Figura 9. Ensayo cualitativo de solubilidad



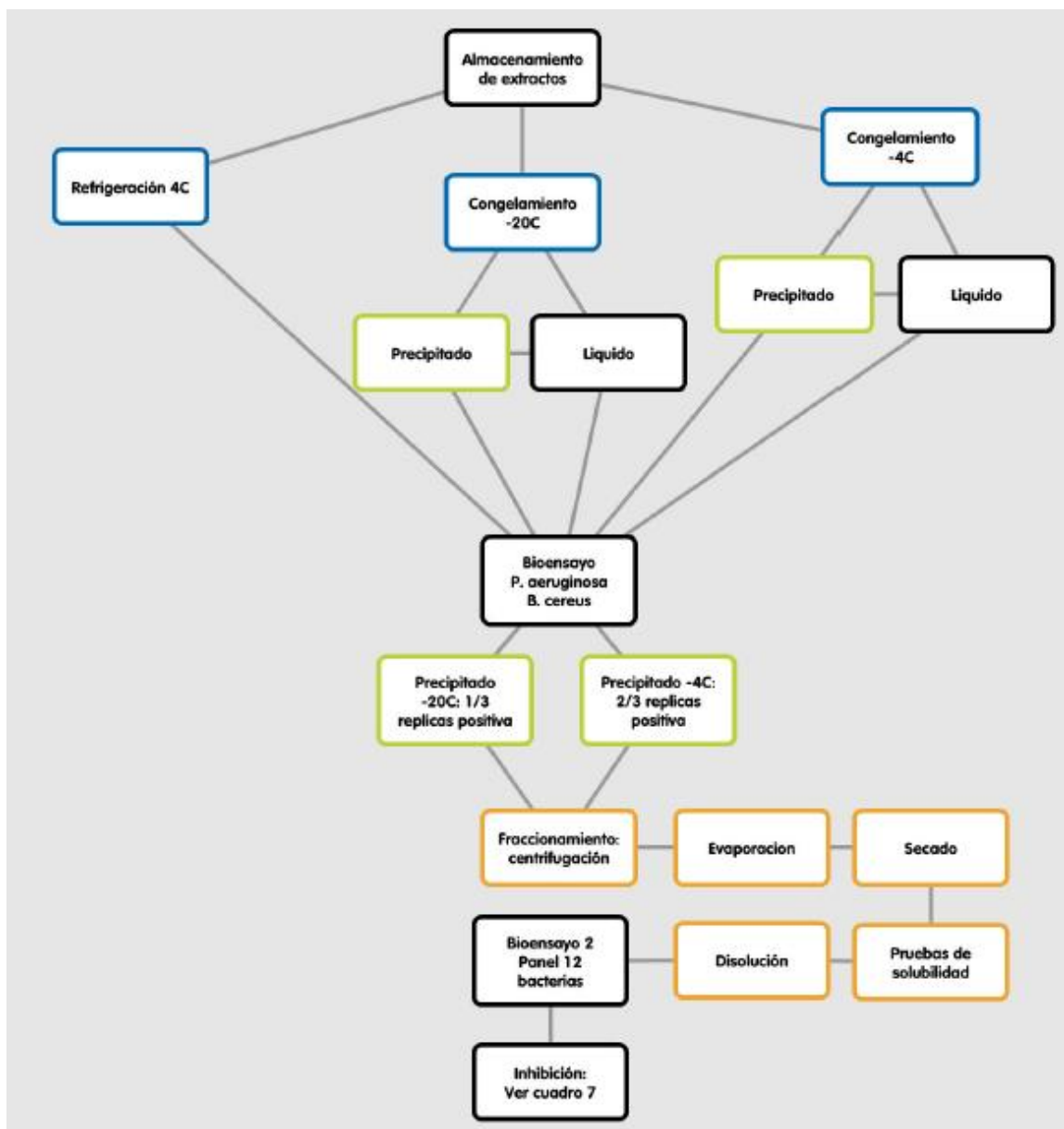
En el pozo 1 se utilizó agua como solvente con el precipitado proveniente del extracto congelado a -20°C , en el pozo 2 se utilizó metanol como solvente con el mismo precipitado. En el pozo 3 se utilizó metanol como solvente con el precipitado proveniente del extracto congelado a -4°C y en el pozo 4 se utilizó agua como solvente con el mismo precipitado.

Cuadro 6. Resultados de solubilidad del precipitado extraído.

Solvente	Solubilidad precipitado a -20°C	Solubilidad precipitado a -4°C
Agua desmineralizada	+++	++++
Etol	+	+
Etol- Agua 50:50	-	-
Metanol	+++++	+++++
Metanol-Agua 50:50	-	-
Butanol	+	+

Un signo + significa que el precipitado es muy poco soluble en el solvente y un signo – indica que no es nada soluble. El incremento en signos + significa un incremento en solubilidad.

Figura 10. Esquema de bioensayos realizados y almacenamiento de extractos.



En este esquema se resume el proceso realizado con los extractos y los bioensayos a los que fueron sometidos para obtener los resultados de esta investigación. Los datos cuantitativos del segundo bioensayo se pueden observar en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Diámetros de inhibición de la segunda etapa de bioensayo

Bacteria	Diámetro de inhibición (mm)						
	Gentamicina	Extracto congelado a -20°C			Extracto congelado a -4 °C		
		Precipitado/H ₂ O	Precipitado/MeOH	Sobrenadante	Precipitado/H ₂ O	Precipitado/MeOH	Sobrenadante
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23.5 ± 0.71	-	-	7±0*	-	-	8± 1.4*
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.66 ± 3.5	-	9.3 ± 2.1*	-	-	9 ± 1.4*	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13.5 ± 0.71	-	7.5 ±0.71*	-	-	10.5 ± 0.71*	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.3 ± 0.57	-	-	-	-	5.3 ± 4.5**	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8.8 ± 1.1	-	-	-	8 ±0.71**	10.3 ± 4.5**	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	8.66 ± 0.81	-	-	-	8.6 ± 2.08	9.33 ± 1.52	-
<i>Erwinia carotovora</i>	35.1 ± 2.74	-	-	-	14.33 ± 4.9	10.6 ± 1.51	12 ± 2.82
<i>Escherichia coli</i>	15 ± 0.51**	-	-	-	-	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	23 ± 0.71	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	19 ±1	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-

Los valores son medias de triplicados ± desviación estándar. Un signo – significa que no hubo inhibición, un signo * significa que la inhibición es difusa y ** significa que dentro del halo de inhibición existen colonias individuales.

Cuadro 8. Lugares de origen y microclima de los especímenes de *N. cordifolia* colectados

Espécimen	Lugar de origen	Observaciones	Estatus
1	Universidad del Valle de Guatemala	Lugar transitado	Eliminado
2	Universidad del Valle de Guatemala	Lugar transitado	Eliminado
3	Universidad del Valle de Guatemala	Lugar transitado	Eliminado
4	Universidad del Valle de Guatemala	Lugar poco transitado con varios individuos	Eliminado
5	Universidad del Valle de Guatemala	Lugar poco transitado con varios individuos	Eliminado
6	Universidad del Valle de Guatemala	Lugar poco transitado con varios individuos	Eliminado
7	Universidad del Valle de Guatemala	Helecho epifito	Eliminado
8	Villanueva	Helecho ornamental	Eliminado
9	Villanueva	Helecho ornamental	Eliminado
10	Colecciones Biológicas UVG	Barranco con senderos controlados	Utilizado en el estudio
11	Colecciones Biológicas UVG	Barranco con senderos controlados	Utilizado en el estudio
12	Zona 15 Guatemala	Lugar transitado, usualmente con basura y perturbación del sustrato	Utilizado en el estudio
13	Zona 15 Guatemala	Lugar transitado, usualmente con basura y perturbación del sustrato	Utilizado en el estudio
14	Zona 15 Guatemala	Lugar transitado, usualmente con basura y perturbación del sustrato	Utilizado en el estudio

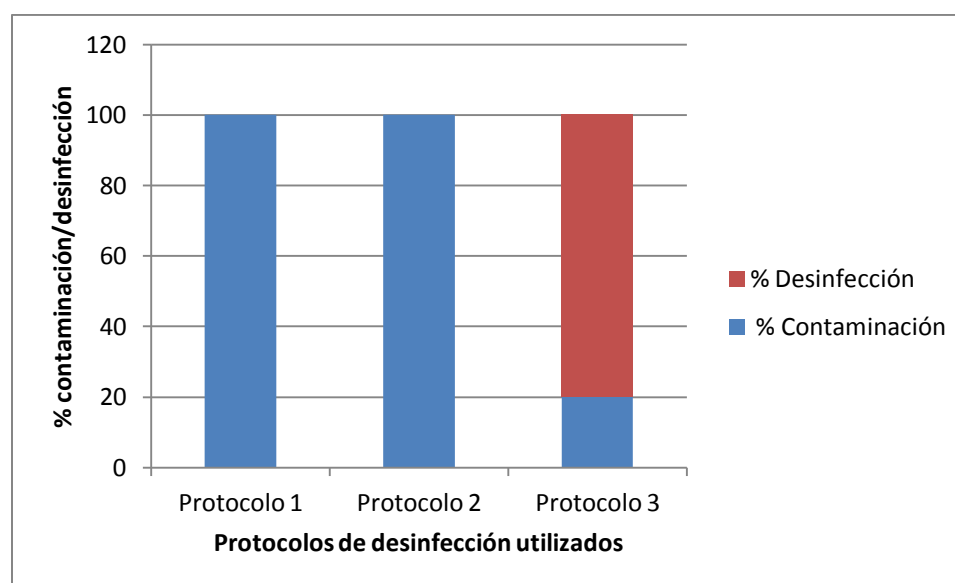
En la segunda etapa se tomó como modelo al hehecho denominado “parental 12” y únicamente se utilizaron sus extractos (precipitado y sobrenadante) para realizar el bioensayo con las 12 bacterias seleccionadas. Existen halos de inhibición contra las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris* (Ver Cuadro 7). En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* existe un halo en el que la bacteria crece con menor densidad, mientras que con *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Stenotrophomonas maltophilia* existe un halo en el cual hay colonias individuales (Ver Cuadro 7).

Se realizó una prueba en caldo con las bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* para comprobar un efecto bacteriostático y se observó inhibición del crecimiento con los precipitados metanólicos y acuosos únicamente para la bacteria *Staphylococcus epidermidis*.

B. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO *IN VITRO*

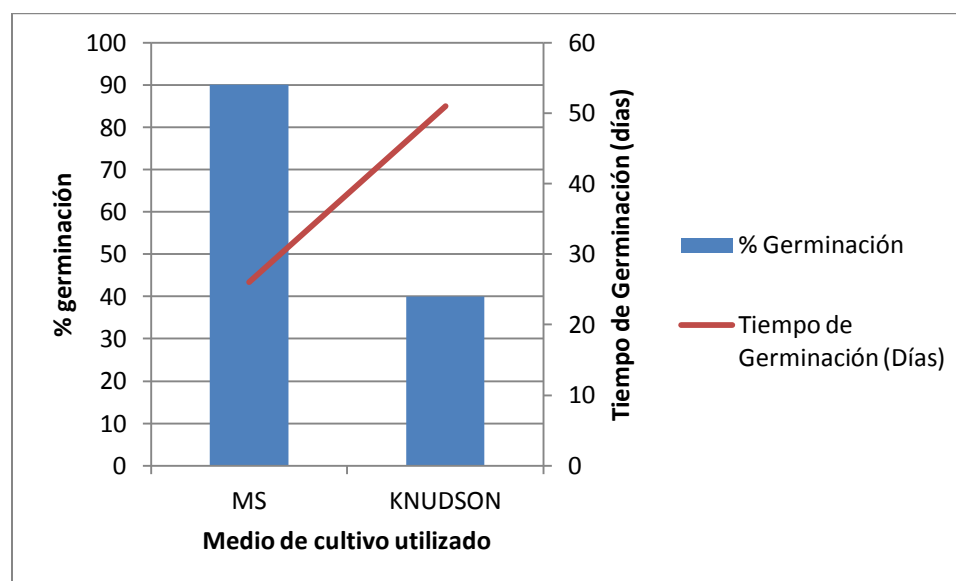
El primer ensayo realizado fue el de desinfección de esporas, en el que se utilizaron tres protocolos de desinfección diferentes. Los primeros dos protocolos fueron inefectivos ya que todas las muestras se contaminaron principalmente con diferentes colonias de hongos. Se seleccionó el tercer protocolo (Etanol 95%, Cloro 10%, Agua estéril x 3) para el resto de pruebas (Ver Cuadro 9 y Figura 11).

Figura 11. Ensayo de desinfección de esporas



En el ensayo de germinación se utilizaron dos medios diferentes (MS y KNUDSON) siguiendo el protocolo de desinfección seleccionado en el ensayo anterior, las cajas fueron observadas semanalmente bajo estereoscopio para comprobar germinación. Las esporas en medio MS germinaron a los 26 días después de su siembra mientras que las sembradas en medio Knudson germinaron 51 días después de su siembra (Ver Figura 12).

Figura 12. Ensayo de germinación de esporas



El porcentaje de germinación es menor y el tiempo de germinación mayor en el medio Knudson.

Se utilizó el medio MS para germinar las esporas y para propagar la masa de prótalos obtenida, después de un mes de propagación de prótalos se realizó el ensayo de apogamia (inducción del esporofito) en cuatro medios diferentes (MS, MS+BAP 4.4 μ M, 1/2MS Y MS sin fuente de carbono); el ensayo fue realizado en una placa de cultivo y se obtuvo esporofitos visibles en estereoscopio en el medio MS un mes después del trasplante (Ver Figura 13).

Cuadro 9. Porcentaje de contaminación con diferentes protocolos de desinfección de esporas

Tratamiento	Soluciones	Tiempo (min)	Porcentaje de contaminación
1	Cloro 10 % + Tween20 2%	10	100%
	Agua estéril	1	
	Agua estéril	1	
	Agua estéril	1	
2	Etanol 70 %	1	100%
	Cloro 10 % + Tween20 2%	10	
	Cloro 10 % + Tween20 2%	5	
	Agua estéril	1	
	Agua estéril	1	
	Agua estéril	1	
3	Etanol 95 %	1	8%
	Cloro 10 % + Tween20 2%	5	
	Agua estéril	1	
	Agua estéril	1	

Se muestran porcentajes de contaminación a partir de 12 placas de siembra de esporas

Figura 13. Esporofito de *Nephrolepis cordifolia* desarrollándose en medio MS

VII. DISCUSIÓN

A. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El objetivo de esta parte del estudio fue detectar presencia de actividad antibacteriana en infusiones del helecho *Nephrolepis cordifolia* mediante la técnica de susceptibilidad por difusión en disco. Se eligió el método de Kirby-Bauer (difusión en disco) debido a que es uno de los métodos estándar para ensayar el efecto antibacteriano de nuevos compuestos y a que se contaba con los recursos necesarios para poder utilizar esta técnica, además este método nos permite datos semicuantitativos (diámetro del halo de inhibición) mientras que otros como la dilución en caldo son netamente cualitativos.

Las infusiones son una de las preparaciones medicinales más utilizadas por las comunidades para extraer compuestos activos de distintas plantas, por lo tanto, es importante estudiar si este proceso conserva los metabolitos que puedan tener bioactividad. En el caso de *Nephrolepis cordifolia* no existen estudios que confirmen este hecho pero se ha comprobado que realizando un extracto etanólico y un posterior fraccionamiento, la fase acuosa posee actividad antibacteriana (Rani *et al.* 2010).

Los extractos fueron filtrados en gasa inmediatamente después de la infusión para eliminar los restos de material vegetal, cuando el extracto comenzaba a enfriarse se observó precipitación. Los extractos filtrados en poro de 0.2 μm no presentaron ningún tipo de actividad probablemente debido a que el poro es muy pequeño y no permitió que el precipitado se filtrara.

Los primeros ensayos realizados con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* parecen indicar que es el precipitado de los extractos el que posee algún tipo de actividad antibacteriana, esto debido a que se obtuvieron resultados cuando se homogeneizó el sobrenadante y el precipitado. Asimismo se observa que al descongelar los extractos, el precipitado forma un conglomerado, lo cual sugiere que la temperatura afecta la interacción de los compuestos.

Se utilizó únicamente el espécimen 12 en la segunda fase de los bioensayos debido a que en la primera etapa se obtuvieron resultados recurrentes con este helecho. Esto puede deberse a varios factores como: la etapa del ciclo de vida del helecho, la edad de desarrollo y el estado fisiológico. Se ha demostrado con el género *Nephrolepis* que los compuestos antibacterianos son sintetizados como respuesta a elicitores activados por productos de descomposición de hongos y

bacterias (Basile *et al.* 1997). Es posible que en el momento de la colecta este helecho haya estado sintetizando estos compuestos y por lo tanto hayan sido extraídos.

Se decidió aislar el precipitado del extracto ya que todas las pruebas parecían indicar que la posible actividad antibacteriana se encontraba en esa parte; la centrifugación ocasionó que el precipitado se volviera homogéneo, al evaporar el solvente y secar el precipitado en horno este se tornó de un color café. El precipitado fue soluble tanto en agua como en metanol lo cual indica que el precipitado puede estar compuesto por varias moléculas y que puede ser purificado, de la misma manera la solubilidad en agua puede indicar que el extracto inicial se saturó y por eso al disminuir la temperatura el compuesto comenzó a precipitar.

Otra posible explicación para la gama de solubilidad del precipitado es que en el momento de la infusión algunos compuestos hayan sido extraídos del material vegetal por cosolubilidad o que sean compuestos que pueden ser glucosidados lo cual explica su solubilidad parcial en agua. El ensayo de solubilidad permitió ver que existe diferencia en el grado de solubilidad entre el precipitado que fue congelado a -20°C y el que fue congelado a -4°C siendo el primero el menos soluble tanto en agua como en metanol (Ver figura 9 y cuadro 6).

Los resultados de la fase dos de los bioensayos muestran que la actividad antibacteriana se encuentra en el precipitado de los extractos que fueron congelados a -4°C esto puede deberse a que la baja temperatura en los congelados a -20°C haya ocasionado interacciones que formaron superestructuras en las cuales la molécula o compuesto bioactivo no están disponibles o podría ser que la temperatura de -4°C ocasione la hidrólisis de alguna parte glucosídica ocasionando que una molécula se vuelva bioactiva contra bacterias por esta ruptura de carbohidratos.

Erwinia carotovora y *Xanthomonas campestris* fueron las únicas bacterias que presentaron un halo de inhibición completo por acción de las diluciones metanólica y acuosa del precipitado del extracto congelado a -4°C , esto puede deberse a que estas bacterias son fitopatógenas y por lo tanto los compuestos sintetizados por el helecho pudieron haber coevolucionado para afectar especialmente a este tipo de bacterias. Sin embargo el tamaño de los halos obtenidos no permite concluir que estas bacterias sean susceptibles, tomando como referencia los estándares para gentamicina (Ver cuadros 7 y 10). Se recomienda realizar otros bioensayos con estas bacterias para determinar el grado de inhibición debido a que el método de Kirby- Bauer no es comúnmente utilizado con bacterias fitopatógenas.

Las bacterias que mostraron disminución aparente de la densidad de crecimiento en presencia de las diluciones metanólicas del precipitado tanto del extracto congelado a -4°C como a -20°C fueron *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Esto puede deberse a que ambas bacterias son Gram positivas y están altamente relacionadas, lo cual puede sugerir que el compuesto bioactivo es diferente al que tuvo efecto contra las bacterias fitopatógenas.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* fueron los sobrenadantes de ambos extractos (-4°C y -20°C) los que inhibieron su crecimiento parcialmente ya que sólo hay un halo de menor densidad (no significativa comparada con estándares de gentamicina); debido a que es el sobrenadante puede ser que el factor de congelamiento no tenga efecto y por lo tanto se trate de un tercer posible compuesto que tenga posible actividad antibacteriana.

Por último *Klebsiella pneumoniae* y *Stenotrophomonas maltophilia* presentaron un halo de inhibición con colonias resistentes dentro, esto ejemplifica los múltiples mecanismos de resistencia que poseen estas bacterias; aunque probablemente sean afectadas por algún compuesto del precipitado no se puede concluir que sean susceptibles ya que el método de Kirby-Bauer no permite concluir esto en presencia de colonias resistentes. La prueba en caldos demostró una disminución del crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* pero debido a la ausencia de material con el cual realizar la prueba, los resultados son cualitativos y no se puede concluir; sin embargo es consistente con los resultados en placa ya que fueron únicamente las diluciones metanólicas las que tuvieron algún efecto lo cual podría sugerir un efecto bacteriostático contra este tipo de bacterias.

Finalmente, hay evidencia de posibles compuestos candidatos con actividad antibacteriana dentro del precipitado de los extractos acuosos de *N. cordifolia* pero estos deben ser aislados y purificados para comprobar estas propiedades.

B. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO *IN VITRO*

El objetivo de esta parte del estudio fue establecer un método de cultivo *in vitro* a partir de esporas para el helecho *Nephrolepis cordifolia*. Se seleccionó este material vegetal para iniciar el cultivo debido a que la desinfección puede realizarse más eficientemente en comparación a las puntas de rizomas o las secciones de pinas. Sin embargo utilizar esporas representa una desventaja debido a la gran pérdida de material vegetal en los métodos de esterilización. El primer ensayo realizado fue el de desinfección, se decidió utilizar una modificación al método de filtración debido a que se ha probado que es más eficiente y produce menos pérdida de esporas que otros métodos como el de desinfección por paquetes o por centrifugación, además es más económico y se puede realizar con equipo básico de laboratorio (Knauss 1976; Hua *et al.* 2009).

Las esporas pueden ser obtenidas por simple desecación del fronde en papel mantequilla o pueden ser cepilladas del soro con un pincel, la diferencia radica en el estado de maduración de la spora y por lo tanto en el tiempo en que esta germinará en el cultivo *in vitro*. El protocolo de desinfección con menor porcentaje de contaminación fue el que incluye un lavado con etanol al

95% debido a que la mayor parte de los agentes contaminantes eran hongos (según contaminación con los otros protocolos). La desventaja de este protocolo es que si no se filtra rápidamente, la exposición prolongada al etanol 95% puede dañar la viabilidad de la espora y por lo tanto evitar su germinación.

El ensayo de germinación se realizó únicamente con los medios MS y Knudson. Se seleccionó el medio Knudson ya que es comúnmente utilizado con plantas angiospermas debido a que contiene agua de coco. Las esporas germinaron más rápido con el medio MS probablemente porque los nutrientes del endospermo no son necesarios en esporas porque los helechos no tienen endospermo. La germinación en medio Knudson fue prácticamente en el doble de tiempo lo cual puede indicar que las esporas necesitan mayor cantidad de sacarosa y presencia de compuestos orgánicos para su germinación.

Los gametofitos se desarrollaron rápidamente por lo cual se propagó, en el cultivo seccionando, las masas de estos con pinzas estériles. El proceso involucra la separación de partes de gametofito que estaban débilmente unidas para evitar el daño del tejido. Es probable que la propagación y aumento de material vegetal haya sido posible ya que se utilizó medio MS y se ha reportado que este promueve el incremento del peso seco de prótalos en otros helechos (Fernandez & Revilla 2003).

El último ensayo realizado fue el de apogamia que se define como el proceso de desarrollo de esporofitos directamente de gametofitos sin fusión sexual (Martin *et al.* 2006). Usualmente se utiliza un fraccionamiento mecánico de los gametofitos debido a que estos tienen una amplia tasa de regeneración y a que esto estimula la fusión de gametos (Fernandez *et al.* 1999; Somer *et al.* 2010); sin embargo, se prefirió inducir apogamia debido a que el proceso de fraccionamiento mecánico necesita equipo y cuidados especiales y puede resultar en pérdida de material por contaminación, además se contaba con poco material vegetal para realizar esa técnica.

Los cuatro medios utilizados para el ensayo se eligieron según lo reportado para el cultivo de otros helechos (Hirsch 1975; Fernandez & Revilla 2003; Martin *et al.* 2006; Hua *et al.* 2009; Hiendlmeyer & Randi 2010). El medio MS fue el más efectivo para inducir la formación de esporofitos pero también se obtuvieron con los medios MS + BAP y 1/2MS aunque en menor cantidad y mayor tiempo, el medio MS sin azúcar no generó ningún esporofito esto concuerda con lo reportado para otros helechos ya que se ha demostrado que la sacarosa promueve la apogamia en cultivos *in vitro* (Hirsch 1975; Fernandez & Revilla 2003).

A pesar de que el proceso seguido induce la apogamia no se puede descartar que haya ocurrido fusión de gametos ya que algunas veces ocurre condensación de agua en los recipientes debido a las condiciones del cuarto de cultivo, lo cual pudo promover que el

espermatozoide nadara hacia el arquegonio y fecundara la ova. Este hecho puede ser comprobado con un análisis genético de la ploidía de los esporofitos generados; sin embargo, no se realizó el análisis porque no era parte de los objetivos de este estudio.

Finalmente, se comprobó que es posible cultivar *N. cordifolia in vitro* a partir de esporas utilizando un protocolo de desinfección que involucre filtrado con etanol 95%, cloro 10% y lavados con agua estéril y medio MS para la germinación e inducción de apogamia. El tiempo aproximado de cultivo es de 80 días para obtener esporofitos que pueden pasar a la fase de aclimatización pero el protocolo para esta fase aún debe ser investigado.

La posibilidad de establecer el cultivo *in vitro* de *Nephrolepis cordifolia* permitirá que el uso de este helecho, para obtener algún producto natural, sea auto sostenible; sin embargo, se necesita evaluar todos los posibles compuestos que tengan actividad antibacteriana para determinar el grado de factibilidad. Es importante realizar futuras investigaciones para fraccionar y purificar el precipitado del extracto para determinar si hay compuestos con alguna bioactividad. Los resultados de esta investigación no descartan la posibilidad de obtener productos naturales derivados de este helecho.

VIII. CONCLUSIONES

El precipitado que se aisló de los extractos acuosos del helecho *Nephrolepis cordifolia* es parcialmente soluble en agua y en metanol.

La dilución metanólica del precipitado que se aisló de los extractos acuosos de *Nephrolepis cordifolia* congelados a -4 °C tuvo algún efecto sobre seis de las doce bacterias ensayadas.

No se puede afirmar que alguna bacteria sea susceptible a los extractos ensayados; sin embargo, existen halos de inhibición para *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*.

El tratamiento más efectivo para desinfectar esporas de *Nephrolepis cordifolia* consiste en etanol (95%), cloro (10%) y tres lavados con agua estériles.

El medio ideal para la germinación de esporas e inducción de apogamia de gametofitos del helecho *Nephrolepis cordifolia* es el Murashige & Skoog (MS).

El desarrollo de un producto derivado del helecho *Nephrolepis cordifolia* es factible basándose en la propagación *in vitro* del mismo y la posibilidad de encontrar compuestos bioactivos en sus extractos.

IX. RECOMENDACIONES

Realizar un fraccionamiento y purificación de los componentes del precipitado obtenido en el extracto acuoso del helecho *Nephrolepis cordifolia* y repetir los ensayos de susceptibilidad bacteriana.

Concentrar todos los extractos realizados para determinar la concentración mínima inhibitoria contra las bacterias que mostraron algún tipo de susceptibilidad en los ensayos de susceptibilidad por difusión en disco.

Realizar un tamizaje fitoquímico de cada fracción generada de los extractos acuosos del helecho.

Determinar si existe efecto bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* ejercido por las diluciones metanólicas del precipitado de los extractos acuosos de *Nephrolepis cordifolia*.

Establecer un protocolo de aclimatización para los esporofitos de *Nephrolepis cordifolia* cultivados *in vitro*.

Evaluar si los extractos de *Nephrolepis cordifolia* tienen algún efecto citotóxico en animales o humanos.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aceret, Robert. 2012. <<Determination of the secondary metabolites and anti-microbial capability of *Spheomeris chinensis* (L.) Maxon>>. *Graduate School Journal*. 1 (1): 1-13.
- Andrews, Jennifer. 2001. <<Determination of minimum inhibitory concentrations>>. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 5-16
- Arnesen, Lotte; A. Fagerlund y P. Granum. 2008. <<From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins>>. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 579-606.
- Barry, Arthu, *et al.* 1979. <<Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 10 (6): 885-889.
- Basile, A, *et al.* 1997. <<Induction of antibacterial activity by α -D-oligogalacturonides in *Nephrolepis* sp. (pteridophyta)>>. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 8: 131-134.
- Boyle, James, *et al.* 1973. <<Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single , high-concentration antimicrobial disks>>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 3 (3): 418-424.
- Breidenstein, Elena, *et al.* 2011. <<*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance>>. *Trends in Microbiology*. 19 (8): 419-426.
- Christenhusz, Maarten; X. Zhang y H. Schneider. 2011. <<A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns>>. *Phytotaxa*. 19: 7-54.
- Coile, Nancy. 1996. <<Which Boston Fern is it? The exotic *Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl, or the native *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott.>>. *Botany circular*. 32
- Cowan, Marjorie. 1999. <<Plant products as antimicrobial agents>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
- Doods, John y L. Roberts. 1990. *Experiments in plant tissue culture*. 2da edición. Cambridge. Cambridge University Press. 232 pags.

- Fernández, H. & M. Revilla. 2003. <<In vitro culture of ornamental ferns>>. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 1-13
- Fernández, H, et al. 1999. <<Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication>>. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56: 211-214.
- Gartemann, Karl-Heinz, et al. 2003. <<Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium>>. Journal of Biotechnology. 106: 179-191.
- Hasebe, Mitsuyasu, et al. 1994. <<rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns>>. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91 : 5730-5734.
- Hasegawa, H, et al. 2005. <<Elevated temperature enhances virulence of Erwinia carotovora subsp. carotovora strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-Acyl homoserine lactone, and extracellular proteins>>. Applied and Environmental Microbiology. 71 (8): 4655-4663.
- He, Ya-Wen y L. Zhang. 2008. <<Quorum sensing and virulence regulation in Xanthomonas campestris>>. FEMS Microbiology Reviews. 32: 842-857.
- Hernández, Ruth. 2011. <<Etnobotánica de los helechos del parque nacional La Tigra, Honduras>>. Manual de Herramientas etnobotánicas relativas a la conservación y el uso sostenible de los recursos vegetales. Red Latinoamericana de Botánica. <http://www.rlb-botanica.org/Publicaciones/ManualEtnobotanica-VEbaja.pdf> [01 de abril de 2013]
- Hiendlmeyer, Rosane & A. Randi. 2010. <<Potential for spore germination, sporophyte formation and growth of young sporophytes of four fern species from the atlantic forest (Brazil)>>. American Fern Journal. 100 (4): 207-218.
- Hirsch, Ann. 1975. <<The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes>>. Plant Physiology. 56: 390-393.
- Hua, Wu, et al. <<An efficient method for surface sterilization and sowing ferns spores in vitro>>. American Fern Journal. 99 (3): 226-230

- Hudzicki, Jan. 2009. *Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol*.
<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol> [04 de abril 2014]
- Jhon, Joseph y R. Sharbaugh. 1982. <<Enterobacter cloacae: Bacteremia, Epidemiology, and antibiotic resistance>>. *Reviews of Infectious Diseases*. 4 (1): 13-28
- Jiménez, Jorge. 2010. <<Diversidad de helechos (Monilophyta) en el Corredor del Bosque Nuboso, Baja Verapaz, Guatemala: distribución y manejo de las áreas protegidas>>. *Ciencia y Conservación*. 1: 22-31.
- Jiménez, Jorge. 2010. <<Los helechos (Monilophyta: Psilotopsida, Equisetopsida, Marattiopsida y Polipodiopsida) de Guatemala>>. En *Biodeversidad de Guatemala II*, de Enio Cano. Guatemala. Universidad del Valle de Guatemala Pags 9-16
- Jiménez, Jorge. 2010. *Los helechos del corredor del Bosque Nuboso de Baja Verapaz, Guatemala*. Costa Rica. INBio. 192 pags.
- Juanjuan, D; Z. Zhiyong y L. Xiaoju. 2007. <<Retrospective analysis of bacteremia because of *Enterobacter cloacae* compared with *Escherichia coli* bacteremia>>. *The International Journal of Clinical Practice*. 61 (4): 583-588.
- Keynan, Yoav y E. Rubinstein. 2007. <<The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community>>. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30(5): 385-389.
- Klein, Eili; D. Smith y R. Laxminarayan. 2007. <<Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005>>. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (12): 1840-1846.
- Knauss, J. 1976. <<A partial tissue cultura method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores>>. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 89: 363-365.
- Kotiranta, Anja; K. Lounatmaa y M. Haapasalo. 2000. <<Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections>>. *Microbes and Infection*. 2: 189-198.

- Kraker, Marlieke; P. Davey y H. Grundmann. 2011. <<Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteriemia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe>>. *PLoS Medicine*. 8 (10): e1001104.
- Kuytmans, Jan; A. Belkum y H. Verbrugh. 1997. <<Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 10 (3): 505-520.
- Lehtonen, Samuli. 2011. <<Towards resolving the complete fern tree of life>>. *PLoS ONE*. 6 (10): e24851.
- Liberman, Daniel y R. Robertson. 1975. <<Evaluation of a rapid Bauer-Kirby antibiotic susceptibility determination>>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7 (3): 250-255.
- Maragakis, Lisa y T. Perl. 2008. <<*Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options>>. *Antimicrobial Resistance*. 46: 1254-1263.
- Martin, Kottackal, *et al.* 2006. <<Efficient induction of apospory and apogamy in vitro in silver fern (*Pityrogramma calomelanos* L.)>>. *Plant Cell Reproduction*. 25: 1300-1307.
- Mehltreter, Klaus; L. Walker y J. Sharpe. 2010. <<Ecological importance of ferns>>. En *Fern ecology*. Cambridge. Cambridge University Press. 429 págs.
- Morais-Braga, Maria. *et al.* 2012. <<Antimicrobial and modulatory activity of ethanol extract of the leaves from *Lygodium venustum* SW>>. *American Fern Journal*. 102 (2): 154-160.
- Muñiz, María Eugenia, *et al.* 2005. <<Usos de los helechos y plantas afines>>. *Etnobiología*. 5: 117-125.
- Nelson, Gil. 2000. *The ferns of Florida a reference and field guide*. Sarasota. Pineapple Press, Inc. 208 págs.
- Obritsch, Marilee, *et al.* 2005. <<Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options>>. *Pharmacotherapy*. 25 (10): 1353-1364
- Peleg, Anton; H. Seifert y D. Peterson. 2008. <<*Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 21 (3):538-582.

- Podschun, R. y U. Ullmann. 1998. <<Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors>>. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (4): 589-603.
- Pryer, Kathleen, *et al.* 2004. <<Phylogeny and evolution of ferns (Monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences>>. *American Journal of Botany*. 91 (10): 1582-1598.
- Rani, Dolly; P. Khare y P. Dantu. 2010. <<In vitro antibacterial and antifungal properties of aqueous and non-aqueous frond extracts of *Psilotum nudum*, *Nephrolepis biserrata* and *Nephrolepis cordifolia*>>. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 72 (6): 818-822.
- Rasmussen, Lars. *et al.* 2003. <<Distribution of the carcinogenic terpene ptaquiloside in bracken fronds, rhizomes (*Pteridium aquilinum*) and litter in Denmark>>. *Journal of Chemical Ecology*. 29 (3): 771-778.
- Ryan, Robert, *et al.* 2011. <<Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions>>. *Nature Reviews Microbiology*. 9: 344-355.
- Schneider, Harald, *et al.* 2004. <<Ferns diversified in the shadow of angiosperms>>. *Nature*. 428: 553-557.
- Schuettpelz, Eric y K. Pryer. 2009. <<Evidence for a Cenozoic radiation of ferns in an angiosperm-dominated canopy>>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (27): 11200-11205.
- Slater, Adrian; N. Scott y M. Fowler. 2008. << 2. Plant tissue culture>>. *Plant biotechnology the genetic manipulation of plants*. 2da edición. OXFORD. Pags. 37-53.
- Somer, M. *et al.* 2010. <<Sporophyte induction studies in ferns in vitro>>. *Euphytica*. 171: 203-210
- Stolze, Robert. 1981. *Ferns and ferns allies of Guatemala Part II Polypodiaceae*. Field Museum of Natural History. 522 pags.
- Toval, Francisco, *et al.* 2014. <<Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection>>. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (2): 407-418.

- Uprety, Yadav, *et al.* 2012. <<Diversity of use and local knowledge of wild edible plant resources in Nepal>>. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 8 (16): 1-15.
- Vasco, Alejandra; R. Moran y B. Ambrose. 2013. <<The evolution, morphology, and development of fern leaves>>. *Frontiers in Plant Science*. 4: 1-16.
- Vicente, J, *et al.* 2001. <<Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars>>. *Phytopathology*. 91 (5): 492-499.
- Wiehlmann, L, *et al.* 2007. <<Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*>>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (19): 8101-8106.
- Wisplinghoff, H, *et al.* 2007. <<Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*>>. *Journal of Hospital Infection*. 66: 174-181.
- Yap, Mee-Ngan; J. Barak y A. Charkowski. 2004. <<Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence>>. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (5): 3013-3023.

XI. ANEXOS

A. CLAVES DICOTÓMICAS UTILIZADAS

Figura 14. Clave dicotómica del género *Nephrolepis*

Key to the Native or Naturalized Species of Florida *Nephrolepis*

Tubers present.....	<i>N. cordifolia</i>
Tubers absent.	
Hairs present on the upper surface of the pinnae; indusia less than 1 mm wide and circular, horseshoe, or peltate.	
Petioles have many dark scales with pale margins.....	<i>N. multiflora</i>
Petioles have a few light brown scales with reddish to light brown margins.	
Densely hairy.....	<i>N. biserrata</i>
Sparsely hairy.....	<i>N. x averyi</i>
Hairs absent; indusia greater than 1 mm wide and shaped like kidneys, horseshoes, or half-moons.	
Petioles with pale brown scales; rachis with pale to dark brown scales which have a dark point of attachment.....	<i>N. cordifolia</i>
Petioles with pale brown to reddish brown scales; rachis with pale to dark brown scales and same color throughout.....	<i>N. exaltata</i>

(Adaptada de Coile 1996)

Figura 15. Clave dicotómica del género *Nephrolepis*

a.	Indusium lunate to reniform (sinus broad and shallow, or lacking), mostly opening toward pinna apex.	
b.	Pinnae (most of them) cuneate at base basiscopically.	<i>N. pectinata.</i>
b.	Pinnae mostly rounded to cordate basiscopically.	
c.	Veins distinct; pinnae broadly or narrowly triangular, margin crenate to shallowly lobed.	<i>N. occidentalis.</i>
c.	Veins indistinct to obscure; pinnae oblong or lance-oblong, margin subentire to broadly and shallowly crenate.	<i>N. cordifolia.</i>
a.	Indusium circular to hippocrepiform (sinus narrow to U-shaped), mostly opening toward pinna margin.	
d.	Pinnae very strongly inequilateral at base, most of them basiscopically cuneate; pinnae abaxially glabrous to very minutely squamulose, the squamules usually stellate.	<i>N. rivularis.</i>
d.	Pinnae subequilateral to somewhat inequilateral at base, basiscopically broadly rounded, truncate or auriculate; pinnae abaxially hirtellous or filiform-scaly.	
e.	Pinnae not or scarcely auriculate at base acroscopically; tissue densely hirtellous (rarely glabrate) abaxially; petiole scales spreading, pale, filiform.	<i>N. biserrata.</i>
e.	Pinnae (most of them) with a long, narrow, usually acute auricle at base acroscopically; tissue sparsely to amply filiform-scaly abaxially; petiole scales mostly appressed, often castaneous, with ciliolate or fimbriate margins.	<i>N. multiflora.</i>

(Adaptada de Stolze 1981)

B. VALORES DE INHIBICIÓN ESTANDAR

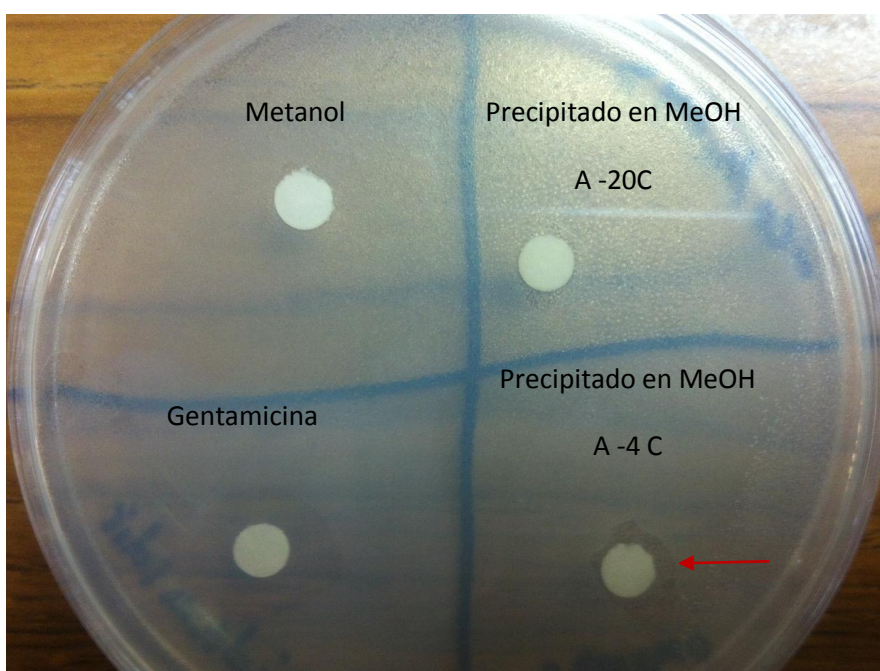
Cuadro 10. Diámetros de inhibición estándar de Gentamicina

Bacteria	Resistente (mm)	Intermedia (mm)	Susceptible (mm)
<i>Staphylococcus</i>	<12	13-14	>15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<12	13-14	>15
<i>Escherichia coli</i>	<12	13-14	>15

(Adaptado de Hudzicki 2009).

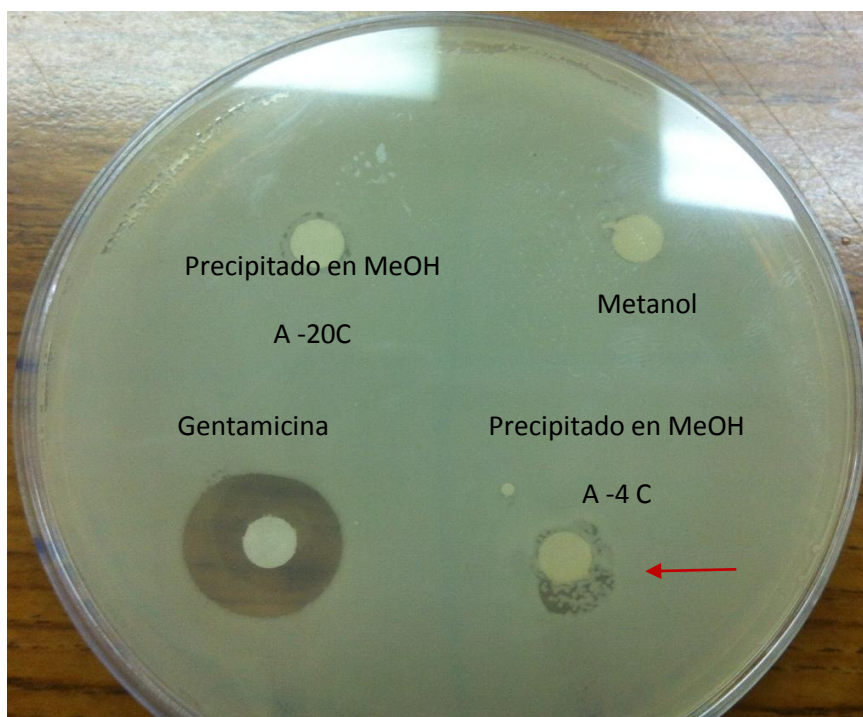
C. IMÁGENES BIOENSAYOS

Figura 16. Ejemplo de los resultados obtenidos con *Staphylococcus epidermidis*



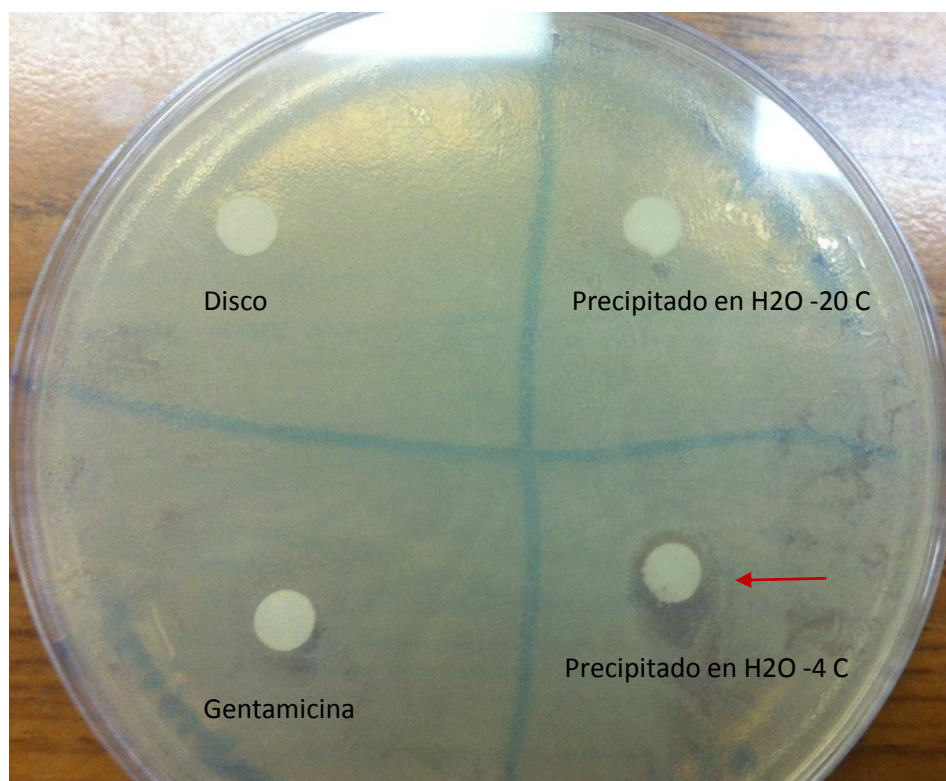
Se observa disminución de la densidad de crecimiento alrededor del disco que contiene precipitado congelado a -4C diluido en metanol

Figura 17. Ejemplo de los resultados obtenidos con *Klebsiella pneumoniae*



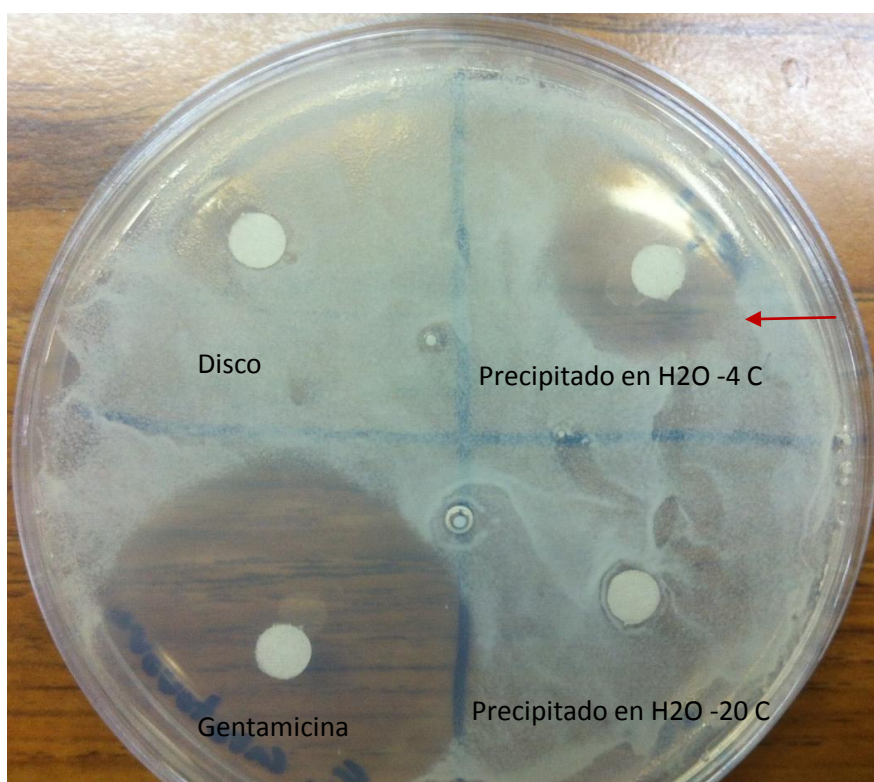
Se observa un halo de inhibición alrededor del disco que contiene el precipitado diluido en metanol congelado a -4C, existen colonias resistentes dentro del halo.

Figura 18. Ejemplo de los resultados obtenidos con *Xanthomonas campestris*



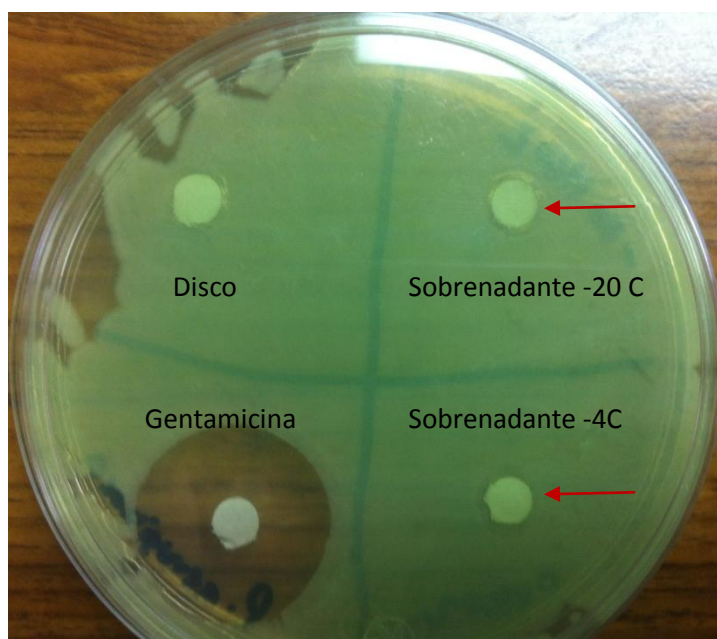
Se observa un halo de inhibición en el disco que contiene el precipitado diluido en agua congelado a -4C, este halo de inhibición es mayor que el generado por la gentamicina.

Figura 19. Ejemplo de los resultados obtenidos con *Erwinia carotovora*



Se observa un halo de inhibición en el disco que contiene el precipitado diluido en agua congelado a -4C, el halo es más pequeño comparado con el producido por la gentamicina.

Figura 20. Ejemplo de los resultados obtenidos con *Pseudomonas aeruginosa*



Se observa disminución de la densidad de crecimiento alrededor de los discos que contienen sobrenadante del extracto a ambas temperaturas.

D. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Cuadro 11. Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS)

Elemento	Concentración (g/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.370
KH ₂ PO ₄	0.170
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.440
Micronutrientes	
KI	0.00083
H ₃ BO ₃	0.0062
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.0223
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0086
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.000025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.000025
Fuente de Hierro	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0278
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.0373
Compuestos orgánicos	
Myoinositol	0.100
Ácido nicotínico	0.0005
Piridoxina-HCl	0.0005
Tiamina - HCl	0.0005
Glicina	0.002
Fuente de carbono	
Sacarosa	30.000

Cuadro 12. Composición del medio de cultivo Knudson (K)

Elemento	Concentración (g/L)
Macronutrientes	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.250
KH ₂ PO ₄	0.250
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1.000
Micronutrientes	
KI	0.00083
H ₃ BO ₃	0.0062
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.0223
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0086
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.000025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.000025
Fuente de Hierro	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0278
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.0373
Compuestos orgánicos	
Ácido Naftalenacetico	0.0000186
Bencilaminopurina	0.000180
Fuente de carbono	
Sacarosa	20.000
Agua de coco	100 mL

Cuadro 13. Composición del medio Mueller-Hinton

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de carne	2.0
Digerido ácido de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0