

# Propiedades fungicida, bactericida y aglutinante de las semillas de *Moringa oleifera* Lam.

Autor: Abdoul Nasser Mahamadou Bafoutché



**Santa clara**

**Año 56 del triunfo de la Revolución**



# Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

Propiedades fungicida, bactericida y aglutinante  
de las semillas de *Moringa oleifera* Lam.

Fungicidal, bactericidal and agglutinating properties of  
seeds from *Moringa oleifera* Lam.

Autor: Abdoul Nasser Mahamadou Bafoutché

Tutor: Dr. C. Luis Orlando Maroto Martín

Asesora: Annarella Chea Gonzalez

Año: 2013-2014

“No existe cosas imposibles solo hombres incapaces”

Fidel Castro Ruiz

## Dedicatoria

A mi familia por estar siempre conmigo y creer en mí,  
especialmente a mi Mamá y Papá.

## **Agradecimientos**

Doy las gracias a Dios primero por darme esta oportunidad de vivir y por estar siempre conmigo.

A mi Mamá y Papá por darme el amor y todo el apoyo que necesitaba, por la buena educación que me dieron y por hacer de mi vida una alegría.

A mis hermanos por el apoyo que me brindaron, a mi hermano Abdoul Kader M. Bafoutché y su esposa por su apoyo material, a Sanoussi M. Bafoutché y Haoua M. Bafoutché por ser mis ejemplo a seguir.

A Foumakoye Gado y el Partido Nigerino para la Democracia y el Socialismo (PNDS-Tarayya) por ofrecerme la beca para seguir mis estudios universitarios en Cuba.

A la Revolución Cubana por brindarme esta oportunidad de realizar mi sueño de ser un profesional y por hacer de mi estancia en Cuba un paraíso terrenal.

A mi tutor Dr. C. Luis Orlando Maroto Martin por apoyarme en momentos difíciles y por el duro trabajo que pasó para la confección del trabajo y a su familia.

A Annarella Chea Gonzalez por el duro trabajo que hizo y su apoyo incondicional.

A mi familia cubana, la familia de Mayrelis Lavastida Pérez por su amor y su apoyo.

A mi novia Betsy B. Orellanes Navarrete por su amor, su compañía y su ayuda y a su mamá, Marta por el apoyo infinito.

A todos mis compañeros de clase por sus apoyos, que contribuyeron de una forma u otra a que mi vida en Cuba sea mejor.

A todo el colectivo de profesores del Departamento de Biología de Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV) por convertirme a un profesional.

A la oficina de las Relaciones Internacionales de la UCLV y el Instituto Cubano de Amistad por los Pueblos (ICAP) por su apoyo.

A todos mis compatriotas nigerinos en Cuba por la unión, la fraternidad y apoyos.

## Resumen

La investigación se ha desarrollado con el objetivo de estudiar las propiedades fungicidas de semillas de *Moringa oleifera* frente *Rhizoctonia solani* y *Stemphylium solani*, bactericida contra *Escherichia coli* y aglutinantes contra coliformes totales. La acción fungicida de semillas de *M. oleifera* fue comprobada en el test de inhibición del crecimiento de hifas y/o micelios por la técnica de difusión en agar. La propiedad bactericida fue comprobada mediante el ensayo de susceptibilidad que se realizó por el método de difusión por disco. Se realizó un aislamiento de los microorganismos más representativos presentes en la muestra de agua residual. La capacidad floculante y aglutinante de semillas maceradas y extracto acuoso, respectivamente, se comprobó frente a coliformes totales. El extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* no tuvo inhibición de crecimiento del hongo *R. solani* pero tuvo inhibió frente a *S. solani*. La prueba de susceptibilidad demostró que la cepa de *E. coli* es más susceptible con las diluciones pura y 1/2. Se aislaron y caracterizaron cuatro tipos diferentes bacterias en el agua residual y se comprobó que las semillas maceradas de *M. oleifera* poseen propiedades floculantes producto de su capacidad de adsorción y neutralización de microorganismos. El extracto acuoso de *M. oleifera* demostró una fuerte aglutinación frente a dos de las cepas y una aglutinación normal frente a las otras dos cepas.

Palabras claves: *Moringa oleifera*\*, *Escherichia coli*\*, *Rhizoctonia solani*\*, *Stemphylium solani*\*, susceptibilidad, propiedad floculante, aglutinación.

## Abstract

The research has been developed with the aim of studying the fungicidal properties of seed of *Moringa oleifera* against *Stemphylium solani* and *Rhizoctonia solani*, bactericidal against *Escherichia coli* and agglutinating against total coliforms. The fungicidal action of *M. oleifera* seeds was checked on the test hyphal growth inhibition and / or mycelia by agar diffusion technique. The bactericidal property was proven by testing susceptibility was performed by the disk diffusion method. The flocculant and agglutinating capacity of macerated seeds and aqueous extract, respectively, was checked against total coliforms. The aqueous extract of *M. oleifera* seeds did not inhibit growth of the fungus *Rhizoctonia solani*, but was inhibited against *S. solani*. Susceptibility tests showed that *E. coli* strain is more susceptible to the pure and 1/2 dilutions. Was isolated and characterized four different types of bacteria in the waste water and it was found that *M. oleifera* macerated seed product having flocculating properties of its adsorption capacity and neutralizing microorganisms. The aqueous extract of *M. oleifera* showed strong agglutination against two strains and normal agglutination for the other two strains.

Key words: *Moringa oleifera*\*, *Escherichia coli*\*, *Rhizoctonia solani*\*, *Stemphylium solani*\*, Susceptibility, flocculating properties, agglutination.

# Índice

|       |  |    |
|-------|--|----|
| I.    | Introducción .....   | 11 |
| II.   | Revisión bibliográfica .....   | 14 |
| 2.1.  | <i>Moringa oleifera</i> .....  | 14 |
| 2.1.1 | Características y composición general de <i>Moringa oleifera</i> .....                                 | 14 |
| 2.1.2 | Usos alimenticios: Alimentación humana .....   | 15 |
| 2.1.3 | Producción de etanol y biodiesel .....   | 16 |
| 2.1.4 | Usos generales de la <i>M. oleifera</i> .....  | 16 |
| 2.1.5 | Plagas y enfermedades .....  | 19 |
| 2.1.6 | Fitoquímicos presentes en <i>M. oleifera</i> .....   | 19 |
| 2.1.7 | Propiedad aglutinante de <i>Moringa oleifera</i> frente a microorganismos y purificación de agua ..... | 20 |
| 2.2.  | <i>Escherichia coli</i> .....  | 22 |
| 2.2.1 | Hábitat.....   | 22 |
| 2.2.2 | Patogenicidad .....  | 23 |
| 2.2.3 | Factor de virulencia.....  | 23 |
| 2.2.4 | Sensibilidad a los antimicrobianos .....   | 24 |
| 2.2.5 | Prevención de las infecciones.....   | 24 |
| 2.2.6 | Relevancia .....   | 25 |
| 2.2.7 | Actividad antibacteriana de <i>Moringa oleifera</i> .....  | 25 |
| 2.3.  | <i>Rhizoctonia solani Kuhn</i> .....   | 26 |
| 2.3.1 | Epidemiología de la enfermedad .....   | 27 |
| 2.3.2 | Ciclo de la enfermedad.....  | 27 |
| 2.3.3 | Control químico y biológico .....  | 28 |
| 2.4.  | <i>Stemphylium solani Weber</i> .....  | 28 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.4.1 Características morfológicas.....   | 28  |
| 2.4.2 Diagnostico .....   | 29  |
| 2.4.3 Los metabolitos fitotoxicos del genero <i>Stemphylium</i> .....   | 29  |
| III. Materiales y métodos .....   | 30  |
| 3.1 Ensayo de inhibición del crecimiento de hifas/micelios por el extracto acuoso de semillas de <i>M. oleifera</i> ..... | 31  |
| 3.2 Actividad antibacteriana de extracto de semillas de <i>Moringa oleifera</i> contra <i>Escherichia coli</i> .....      | 332 |
| 3.3 Pruebas para determinar las capacidades floculante y aglutinante del extracto acuoso de <i>Moringa oleifera</i> ..... | 33  |
| 3.3.1 Ensayo para determinar la capacidad floculante de las semillas de <i>M. oleifera</i> .....                          | 34  |
| 3.3.2 Aislamiento de coliformes del agua residual.....  | 34  |
| 3.3.3 Prueba de aglutinación bacteriana mediada por el extracto acuoso de semillas de <i>M. oleifera</i> .....            | 34  |
| IV. Resultados .....  | 36  |
| 4.1 Resultados del ensayo con los hongos .....  | 36  |
| 4.2 Actividad antibacteriana de semillas de <i>M. oleifera</i> Prueba de susceptibilidad. ....                            | 40  |
| 4.3 Resultados de las actividades floculante y aglutinante.....   | 42  |
| 4.3.1 Capacidad floculante de semillas de <i>Moringa oleifera</i> .....   | 42  |
| 4.3.2 Microorganismos aislados del agua residual.....   | 43  |
| 4.3.3 Capacidad de aglutinación bacteriana de las semillas de <i>M. oleifera</i> .....                                    | 45  |
| V. Discusión.....   | 47  |
| 5.1 Los ensayos de inhibición de crecimiento fúngico .....  | 47  |
| 5.2 Capacidad floculante de semillas de <i>M. oleifera</i> .....  | 48  |

|   |    |
|---|----|
| 5.2.1 Capacidad aglutinante de extracto de semillas de <i>M. oleifera</i> ..... | 53 |
| VI. Conclusiones .....  | 51 |
| VII. Recomendaciones .....  | 52 |
| VIII. Bibliografía .....  | 53 |
| IX. Anexos.....   | 66 |
| 1. Actividad fungicida de extracto acuoso de <i>Moringa oleifera. Lam</i> ....  | 66 |
| 2. Muestra de agua utilizada .....  | 71 |

## I. Introducción

---

Por más de seis décadas el uso de productos químicos ha sido la principal estrategia para reducir las enfermedades y plagas en plantas y animales. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha provocado dos grandes problemas: el incremento de residuos químicos potencialmente tóxicos al humano y la proliferación de fitopatógenos resistentes. Debido a esos problemas hoy, día hay un incremento potencial de la fitoterapia (que es la ciencia del uso extractivo de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos, para la prevención o tratamiento de patologías), que es más económica, efectiva y menos dañina al ambiente y a la salud humana, de manera que se han reportado estudios que demuestran los efectos antifúngicos, antibacteriales, nematocidas e insecticidas de extractos de diversas plantas. Los hongos, las bacterias y los virus son los principales microorganismos que afectan los animales y las plantas, lo que provoca una gran pérdida de especies y aumenta considerablemente las enfermedades y el hambre en el mundo.

La novedad de este trabajo reside en que se evidenció actividad fungicida de extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera* frente a *Stemphylium solani* y la sensibilización a la utilización de esas semillas para la purificación de aguas turbias porque según el informe del 2012 de la OMS más de 783 millones personas no tienen acceso a agua potable en el mundo.

*Escherichia coli* es una bacteria que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez-Angeles, 2002).

El hongo *Rhizoctonia solani* pertenece a la Clase *Hyphomycetes*, es la fase patogénica y se caracteriza porque no produce conidios, las hifas son de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación tiene una constricción. El hongo es causante de pudrición de hojas y frutos de plantas, se diseminan en las semillas de tomate, pimentón y berenjena; en suelo contaminado en forma de clamidosporas; por el agua de riego a partir de los focos de infección en los semillero; por la distribución de semilleros enfermos y por el uso de herramientas con suelo contaminado (Tamayo *et al.*, 2006).

*Stemphylium solani* G.F. Weber es un hongo patógeno de plantas pertenece al *Phylum Ascomycota*. Es el causante de un lunar gris en las hojas de tomates y

quemado de hojas en alliums y algodón, consta de dos fases bien diferenciadas, una sexual *Pleospora allii* L. y otra asexual *Stemphylium vesicarium* L. (Zheng et al., 2009).

Este trabajo se resume a la búsqueda de alternativas de naturaleza vegetal que su aplicación permitirá desarrollar una estrategia para el control del crecimiento bacteriano y fúngico. En esta búsqueda utilizamos extracto de las semillas de *Moringa oleifera* para determinar su actividad antibacteriana frente a coliformes totales de aguas turbias en particular con *E. coli* y actividad antifúngica frente a *S. solani* y *R. solani*.

## Objetivo General

Determinar la acción fungicida, bactericida y aglutinante de semillas de *Moringa oleifera*.

## Objetivos específicos

1. Demostrar el efecto *in vitro*, del extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera* contra los hongos *Rhizoctonia solani* y *Stemphylium solani*.
2. Comprobar el control microbiano *in vitro* del extracto de semillas de *Moringa oleifera* contra *Escherichia coli*.
3. Evaluar la capacidad flocculante de la torta de semillas de *Moringa oleifera* en aguas residuales.
4. Determinar la capacidad aglutinante del extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera* frente a coliformes totales.

## II. Revisión bibliográfica

---

### 2.1. *Moringa oleifera*

#### 2.1.1 Características y composición general de *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* Lam. Conocida comúnmente como moringa es un árbol pequeño y de crecimiento acelerado que usualmente alcanza de 10-12 metros de altura (Liñan, 2010), tiene una copa abierta y esparcida de ramas inclinadas y frágiles, un follaje plumoso de hojas pinadas en tres y una corteza gruesa, blanquecina y de aspecto corchozo (Parrotta, 1993). Es originario de los Himalayas, pero ha sido introducido en diferentes lugares como: Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sri Lanka, el Sureste asiático, Asia occidental, la Península Arábiga, África del Oeste, Madagascar, el sur de la Florida, las islas del Caribe, América del Sur, desde México a Perú, Paraguay y Brasil; crece con rapidez en lugares favorables incrementando de 1 a 2 m por año en altura durante los primeros 3 a 4 años (Liñan, 2010).

Una de las características fundamentales de la *Moringa* es su capacidad de resistencia a la sequía y el potencial agronómico siendo un árbol cultivable en regiones áridas y semiáridas. Esto es de particular importancia debido a que hoy en día se sabe que las condiciones climáticas ya no se rigen por las temporadas, esto debido a que con el paso del tiempo las estaciones del año han cambiado radicalmente de un clima caluroso en invierno hasta una sequía en verano. Las flores son bisexuales, con pétalos blancos y estambres amarillos (Falasca *et al.*, 2008). En algunas regiones florece una sola vez al año, pero puede florecer dos veces al año; tal es el caso de los países del Caribe, como Cuba. Las flores son polinizadas por abejas, otros insectos y algunas aves (Morton, 1991). Las flores están agrupadas en grandes panículas axilares; cinco pétalos, desiguales y blancos. Fruto capsular, lineal, 3-angular, pendular, de hasta 40 cm de largo y 1 o 2 cm de ancho (La Comisión Técnica de Fitomed, 2010). Los frutos son cápsulas trilobuladas, dehiscentes, de 20 a 40 cm de longitud. Contienen de 12 a 25 semillas por fruto. Las semillas son de forma redonda y color castaño oscuro, con tres alas blanquecinas. Cada árbol puede producir de 15 000 a 25 000 semillas por año (FAO-OMS, 2005).

Tradicionalmente, el ghee o manteca clarificada de leche de vaca o búfala se ha preparado con hojas de *Moringa*, lo cual retarda el deterioro oxidativo del ghee, por actuar como antioxidante natural. El poder reductor o antioxidante de los extractos de moringa aumenta con el aumento de concentración de polifenoles de estos extractos. Los flavonoides están entre los más potentes antioxidantes de las plantas debido a que poseen uno o más de los siguientes componentes estructurales que están involucrados en la actividad antiradical o antioxidante: un

grupo ortodifenol en el anillo B, un doble enlace conjugado en 2-3, con una función oxo en el C4 y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Siddhuraju *et al.*, 2003).

Todas las partes de la planta son comestibles desde las hojas hasta la raíz. Los estudios de *Moringa* han ido incrementándose en los últimos años debido a su importancia nutricional ya que el contenido de proteínas, vitaminas y minerales es muy sobresaliente destacando que en esta planta se encuentran todos los aminoácidos esenciales (Mathur, 2005). En la actualidad existe una variedad de productos elaborados a partir de la planta de *moringa* como: cápsulas genéricas; chocolate en polvo; cápsulas de *moringa* y *ginseng*; cremas hidratantes; vainas frescas, refrigeradas y enlatadas para el consumo humano principalmente a lo largo de la India (Folkard *et al.*, 1996) destacando en estos productos los altos contenidos de vitaminas y minerales como: vitamina A, B1, B2, B3, C y calcio, cobre, cromo, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, proteínas y zinc (Aslam *et al.*, 2005). Aunque el contenido de minerales de *Moringa oleifera* demuestra variación en la composición de una localidad a otra (Anjorin *et al.*, 2010).

Se conoce que el contenido de vitamina A es elevado y se ha demostrado su utilización en la suplementación a niños con deficiencias de este importante elemento (Olson *et al.*, 2007). Referente al calcio contenido en el material vegetal, la absorción de éste por el cuerpo humano es no asimilable debido a que éste se encuentra como cristales de oxalato en las células de la planta y por lo mismo excretada directamente del cuerpo (Olson *et al.*, 2007).

### **2.1.2 Usos alimenticios: Alimentación humana**

En la literatura se reportan preparaciones alimenticias utilizando las diversas partes de la planta y sus productos: hojas, harina de hojas, vainas tiernas y maduras, semillas, aceite de las semillas, etcétera. Las vainas verdes (parecidas a las legumbres), las hojas, las flores, las semillas (negruzcas y redondeadas) y las raíces son muy nutritivas y se pueden usar para el consumo humano por su alto contenido en proteínas, vitaminas y minerales (Berger *et al.*, 1984). Frutos o vainas verdes inmaduros se consumen cocidos. Las vainas tiernas son comestibles y se usan en sopa o se preparan a manera de espárrago. Las raíces tienen sabor picante como el rábano rústico y se usan como condimento en lugar de éste. Las semillas maduras se tuestan y consumen como nueces, siendo su sabor dulce, ligeramente amargo y agradable, las almendras son oleaginosas, las hojas se comen como verdura o ensalada. Las flores cocinadas con huevo resultan un platillo exquisito, el uso del aceite con calidad similar al aceite de oliva, es empleado para el aliño de ensaladas (Agrodesierto, 2006). La actividad de coagulación de la leche por medio del extracto acuoso de las semillas, ha

mostrado evidencias para sugerir que podría utilizarse para la preparación de quesos (Dalsot, 1985).

### **2.1.3 Producción de etanol y biodiesel**

*M. oleifera* ha sido recomendada para la producción de etanol y biodiesel (Garavito, 2008; Corella 2010). *M. oleifera* es considerada como un cultivo atractivo para la producción de biodiesel, fundamentalmente porque sus semillas contienen un 31-47% de aceite. El alto tenor de ácido oleico del aceite indica que es adecuado para la obtención de biodiesel (Falasca *et al.*, 2008).

### **2.1.4 Usos generales de la *M. oleifera***

Todos los usos medicinales de *M. oleifera* están relacionados con las propiedades antibacterianas de sus proteínas presentes en hojas, semillas y raíces.

#### **2.1.4.1. Prevención del cáncer**

La actividad antitumoral de remedios preparados a partir de las hojas, flores y raíces de *M. oleifera* es reconocida en la medicina popular (Murakami *et al.*, 1998). Muchos de los efectos anticancerígenos han sido confirmados científicamente durante los últimos lustros. Recientemente se reveló que los extractos hidroalcohólicos de frutos de moringa, debido a sus efectos positivos sobre el citocromo hepático, pueden ser usados para la prevención de la carcinogénesis química. A esa conclusión se llegó luego de un riguroso estudio sobre la génesis de papilomas de la piel inducida por 7,12-dimetilbenzantraceno en ratas albinas (Bharali *et al.*, 2003). Los efectos de los extractos de esta planta en la prevención del cáncer se deben a la presencia de fitoquímicos que modulan la actividad de las enzimas, lo que facilita la detoxificación y garantiza la actividad antitumoral. Por ejemplo, se ha comprobado la acción inhibitoria del 4-(4'-O-acetil-  $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo y de la niacimicina sobre los ésteres forbólicos responsables de la activación temprana de antígenos en células linfoblastoides (Guevara *et al.*, 1999). Además, isotiocianatos aislados de las hojas inhiben la activación del virus de *Epstein-Barr*, en lo que el grupo isotiociano parece ser el factor estructural decisivo (Murakami *et al.*, 1998).

#### **2.1.4.2. Propiedades antiinflamatorias y antiasmática de *M. oleifera***

Las partes de la planta de Moringa tienen actividad anti-inflamatoria sustancial. Por ejemplo, el extracto de raíz de moringa exhibe actividad anti-inflamatoria significativa en carragenina inducida por edema (Ezeamuzie *et al.*, 1996). El extracto de metanol crudo de la raíz inhibe el edema de pata de rata inducido por carragenina en una manera dependiente de la dosis después de la administración oral (Anónimo, 2005). Por otra parte, el extracto de n-butanol de las semillas de *Moringa* muestra actividad anti-inflamatoria contra la inflamación de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en los conejillos de indias

(Mahajan *et al.*, 2009). Mejora la inflamación asociada a las enfermedades crónicas con la actividad anti-inflamatoria potente de los compuestos bioactivos de la moringa (Muangnoi *et al.*, 2011).

Se ha informado desde hace mucho tiempo que los alcaloides de la planta de *Moringa* se asemejan mucho a la efedrina en la acción y se puede utilizar para el tratamiento del asma. El Alcaloide moringina relaja los bronquiolos (Kirtikar y Basu, 1975). Los granos de semillas de *Moringa* también mostraron efecto prometedor en el tratamiento del asma bronquial, durante un estudio para analizar la eficacia y la seguridad de los granos de semillas para el tratamiento de pacientes asmáticos. El estudio mostró disminución significativa en la gravedad de los síntomas del asma y también mejora las funciones respiratorias concurrente (Agrawal *et al.*, 2008).

#### **2.1.4.3. Propiedad analgésica y antipirética de *M. oleifera***

La actividad analgésica de *M. oleifera* se ha informado en varias especies de *Moringa*. En un estudio con extractos etanólicos de *Moringa concanensis* con frutos tiernos en animales de experimentación, se observó una actividad analgésica significativa (Rao *et al.*, 2008). Por otra parte, el extracto alcohólico de las hojas y semillas de *M. oleifera* también poseen una marcada actividad analgésica como se evidencia a través de la placa caliente y el método de inmersión de la cola (Sutar *et al.*, 2008).

Como resultado de la acción anti-inflamatoria de la *M. oleifera*, la actividad antipirética puede ser la hipótesis. Un estudio fue diseñado para evaluar el efecto antipirético del etanol, éter de petróleo, éter disolvente y los extractos de acetato de etilo de las semillas de *M. oleifera* inducida por el método hiperpirexia. El paracetamol se utilizó como control durante el estudio. No es sorprendente que el etanol y extractos de acetato de las semillas mostraron actividad antipirética significativa en ratas (Hukkeri *et al.*, 2006).

#### **2.1.4.4. Propiedad antihipertensivos, diuréticos y de disminución del colesterol de *M. oleifera***

Las hojas de *M. oleifera* contienen varios compuestos bioactivos, ejercen un efecto directo sobre la presión arterial, por lo que estos pueden ser utilizados para la estabilización de la presión arterial. Los compuestos de la *moringa* que llevan al efecto hipotensor incluye el nitrilo, glucósidos de aceite de mostaza y tiocarbamato glucósidos presentes en las hojas de *M. oleifera* (Anwar *et al.*, 2007). Además, la actividad diurética de la *M. oleifera* existe en sus raíces, hojas, flores, la corteza y la infusión acuosa de semillas (Morton, 1991). Además, las hojas de *moringa* también contienen  $\beta$ -sitosterol, con efectos de disminución

del colesterol. Este compuesto es capaz de reducir el nivel de colesterol del suero de la dieta alta en grasa en ratas. (Ghasi *et al.*, 2000).

#### **2.1.4.5. Propiedad antidiabética y hepatoprotectora de *M. oleifera***

Varias plantas medicinales han sido evaluadas por su potencial como agente terapéutico para la diabetes. *M. oleifera* es también un componente importante en esta categoría. Las hojas de *M. oleifera* pueden reducir significativamente la concentración de glucosa en sangre en ratas Wistar con la diabetes 2 (Ndong *et al.*, 2007). Otro estudio indicó que el extracto de *Moringa* es efectivo para bajar los niveles de azúcar en la sangre dentro de 3 horas después de la ingestión (Mittal *et al.*, 2007). Como un modelo mecanicista de la actividad antidiabética de *M. oleifera*, se ha indicado que los polifenoles del chocolate negro (Grassi *et al.*, 2005.) y otros polifenoles (Al-Awwadi *et al.*, 2004; Moharram *et al.*, 2003) son los responsables de la actividad hipoglucemiante. Las hojas de *Moringa* son potentes fuente de polifenoles, incluyendo la quercetina-3-glucósido, rutina, glucósidos kaempferol, y otros polifenoles (Ndong *et al.*, 2007). Por lo tanto, el potencial de la actividad antidiabética de *M. oleifera* puede ser comercializado a través del desarrollo de la tecnología adecuada con el logro de la actividad antidiabética a los fármacos convencionales.

La moringa ha demostrado actividad hepatoprotectora significativa en varios estudios. Los extractos etanólicos de las hojas de moringa mostraron una protección significativa contra el daño hepático inducido por fármacos antituberculosos [isoniazida (INH), rifampicina (RMP), y la pirazinamida (PZA)] en ratas. Se encontró que la actividad hepatoprotectora de *M. oleifera* es mediado por su efecto sobre los niveles de transaminasa glutámico-oxalacética (aspartato aminotransferasa), transaminasa glutámico pirúvico (alanina aminotransferasa), fosfatasa alcalina y bilirrubina en el suero; lípidos, y los niveles de peroxidación de lípidos en el hígado (Pari *et al.*, 2002). Por otra parte, los extractos metanólicos y cloroformo de las hojas de *Moringa* también mostraron una protección significativa contra el tetra-cloruro de Carbono (CCl<sub>4</sub>) que causa daño hepático inducido en ratas albinas. Además de la actividad hepatoprotectora de las hojas de *Moringa*, su raíz y flores también poseen una fuerte actividad hepatoprotectora. Las flores de *M. oleifera* contienen un flavonoide bien reconocido (quercetina), que puede ser responsable de su actividad hepatoprotectora potente (Ruckmani *et al.*, 1998; Selvakumar *et al.*, 2008). En un estudio reciente que evalúa el efecto del extracto de semilla de la moringa en la fibrosis hepática, se encontró que el extracto de semilla de moringa tiene la capacidad de disminuir la fibrosis hepática. Este estudio involucró al CCl<sub>4</sub> induciendo fibrosis hepática y la administración simultánea de extracto de semilla de la moringa. El extracto de semilla de moringa controló la elevación de las aminotransferasas séricas y el

nivel de globulina inducidos por CCl<sub>4</sub>. Por otra parte, los estudios inmunohistoquímicos mostraron también que la *Moringa* reduce la fibrosis hepática (Hamza, 2010).

#### **2.1.4.6. Propiedad antiespasmódica y antiulcerosas de *M. oleifera***

La raíz y las hojas de *M. oleifera* contienen varios compuestos con actividad espasmolítica. Estos compuestos incluyen 4-(alfa-L-rhamnosyloxybenzyl)-O-metil-tio-carbamato que está posiblemente afectada a través del bloqueo del canal de calcio; niazinina A y niazinina B con efecto hipotensor y el efecto bradicárdico. La actividad espasmolítica de diferentes constituyentes se utiliza para ayudar en los trastornos de la motilidad gastrointestinal (Gilani *et al.*, 1994). El extracto de *M. oleifera* metanólico también posee acción en la protección de las ratas experimentales de lesiones gástricas inducidas por ácido acetilsalicílico, la serotonina y la indometacina. Además, también mejora el proceso de curación de las lesiones gástricas crónicas inducidas por ácido acético en animales de experimentación (Pal *et al.*, 1995). Otro estudio ha reportado el efecto antiulceroso de las hojas de *Moringa* en ratas albinas Holtzman adultos (Debnath *et al.*, 2007).

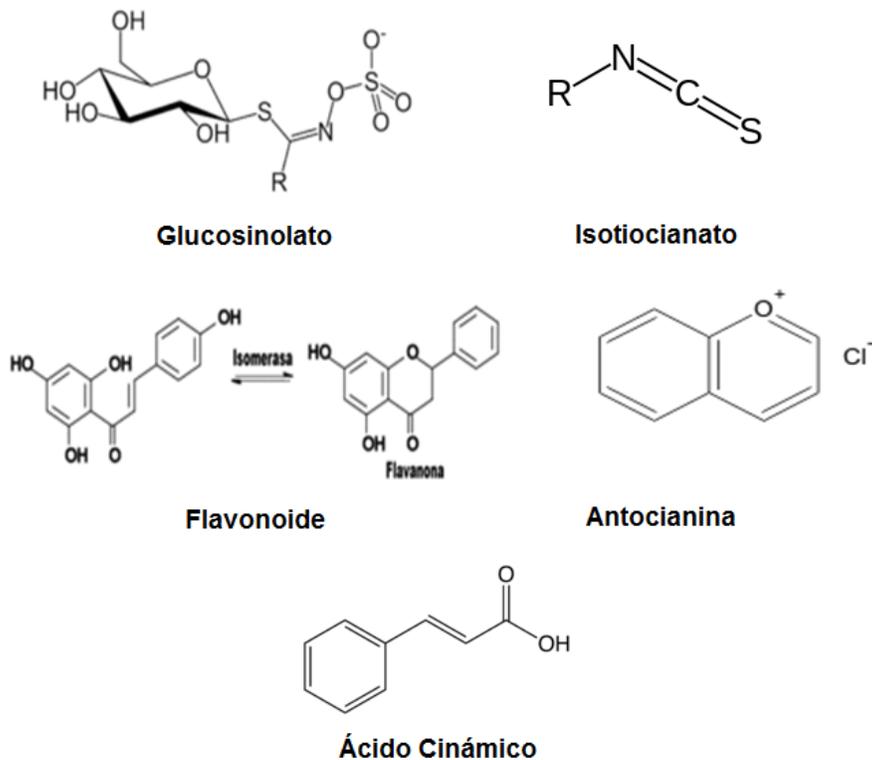
#### **2.1.5 Plagas y enfermedades**

Las plagas predominantes en la plantación de *M. oleifera* son las siguientes: gusano desfoliador (*Spodoptera sp.*), picudo abultado (*Phantomorus femoratus*) y zompopo (*Atta sp.*); este último es el de mayor importancia económica. Para el control de desfoliadores y picudos se utilizan métodos manuales de eliminación, ya que las poblaciones son bajas (Roa, 2003).

#### **2.1.6 Fitoquímicos presentes en *M. oleifera***

Recientemente se ha *demostrado* la presencia, en *M. oleifera* de importantes fitoquímicos responsables de sus propiedades curativas. En uno de los primeros estudios exhaustivos sobre la composición química de esta especie se reveló que es rica en varias sustancias muy peculiares, como glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos (Benett *et al.*, 2003) ver Figura 1; también se incluyó la distribución de fitoquímicos en las distintas partes del árbol. Varios de los compuestos identificados pueden considerarse nutracéuticos, ya que son útiles tanto en la nutrición como en la salud humana. Por ejemplo, el 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocianato de bencilo, el 4-( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocianato de bencilo, el isotiocianato de bencilo y el 4-( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-glucosinolato de bencilo presentan actividad anticancerígena, hipotensiva y antibacteriana (Fahey, 2005). El alto contenido de vitaminas, minerales y otros fitoquímicos como vainillina, ácidos grasos omega, carotenoides, ascorbatos, tocoferoles,  $\beta$ -sitosterol, ácido octacosanoico,

moringina, moringinina y fitoestrógenos también es un factor importante en los efectos terapéuticos de *M. oleifera* (Fuglie, 2001; Fahey, 2005; Singh *et al.*, 2009).



**Figura 1. Algunos fitoquímicos presentes en *Moringa oleifera* según Bennet *et al.* (2003)**

### 2.1.7 Propiedad aglutinante de *M. oleifera* frente a microorganismos y purificación de agua

Uno de los grandes problemas afrontados por el mundo es la disponibilidad de agua dulce, ya que esta es vital para la supervivencia de los seres humanos. En el planeta existe una limitación de la disponibilidad de agua dulce. Del 0,8% del agua dulce existente, el 97% son aguas subterráneas y solamente el 3% es agua superficial. Aun así, no siempre esta es apropiada para el consumo humano, haciéndose necesario realizar la remoción de las impurezas presentes para adecuarla a los patrones de potabilidad. El color y la turbiedad son los principales parámetros que se consideran en la evaluación de la calidad de efluentes tratados, siendo indicadores sanitarios y patrones de aceptación del agua para consumo humano (FUNASA, 2006). Las partículas coloidales que confieren turbiedad y color, sobre todo en aguas naturales, poseen en su mayor parte cargas eléctricas negativas en su superficie, que crean una barrera repelente entre sí, lo que imposibilita su aglomeración. Así, se hace necesario promover la alteración de las

características de la superficie de las partículas con la adición de coagulantes, siendo uno de los primeros pasos en el proceso de tratamiento del agua en la entrada del agua bruta de una Estación de tratamiento de agua. Las sales de aluminio son los coagulantes más ampliamente utilizados en el tratamiento del agua y de aguas residuales en todo el mundo. Sin embargo diversos investigadores (Crapper *et al.*, 1973, Martyn *et al.*, 1989, Miller, *et al.*, 1984) sugieren que el aluminio puede inducir la enfermedad de Alzheimer. Diversos estudios mostraron que la utilización del *Moringa oleifera* es comparable al sulfato de aluminio, siendo recomendada su utilización como uno coagulante eficaz para el tratamiento de agua en diversas aplicaciones (Diaz *et al.*, 1999; Jahn, 1986; Ndabigengesere *et al.*, 1998; Sutherland *et al.*, 1994). La eficiencia y las propiedades de *M. oleifera* como coagulante natural y su mecanismo de coagulación en el agua turbia han sido bien estudiado (Ndabigengesere *et al.*, 1998). Se verificó que los componentes activos de las semillas de *M. oleifera* son proteínas catiónicas solubles que tienen peso molecular de cerca de 13 kDa y punto isoeléctrico en pH entre 10 y 11, sugieren que el mecanismo predominante de coagulación sea el de adsorción y neutralización de cargas. El empleo de *M. oleifera* no presenta cambios significativos en los valores de pH y conductividad del agua después de su tratamiento (Ndabigengesere *et al.*, 1998). Según los autores la mayor desventaja en la utilización de *M. oleifera* es el incremento del carbono orgánico disuelto en el agua tratada, que aumenta la demanda de cloro y puede llevar la formación de trihalometanos durante la desinfección por ese agente químico. Este incremento representa también una fuente de olor, sabor, entre otros (Okuda *et al.*, 2001). El lodo generado por las semillas de *M. oleifera* no es tóxico y presenta un volumen considerablemente menor que el lodo producido mediante el empleo del sulfato de aluminio (Ndabigengesere *et al.*, 1995). Diversos investigadores verificaron también la presencia de propiedades bactericidas en las semillas de *M. oleifera* (Jahn, 1986; Ghebremichael *et al.*, 2005). La capacidad de coagulación de las proteínas se ve incrementada cuando se emplean sales inorgánicas en su extracto (Okuda *et al.*, 2001). Estos autores investigaron la extracción y purificación de los componentes activos de *M. oleifera* y verificaron que el coagulante extracto con solución salina no aumenta la concentración orgánica residual de la agua después de la coagulación (Okuda *et al.*, 2001). *M. oleifera* también puede ser útil en el control de vectores en aguas estancadas. Recientemente se demostró que los extractos de semillas evitan la adaptación de las larvas de *Aedes aegypti* a los medios de control utilizados en la lucha antivectorial. La actividad larvívica se atribuye a la lectina hidrosoluble contenida en los extractos, la cual promueve el retardo en el crecimiento de las larvas y su mortalidad (Coelho *et al.*, 2009).

## **2.2. *Escherichia coli***

En 1885 Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli* en su homenaje y desde entonces ha sido uno de los seres vivos más estudiados, de hecho gran parte de los conocimientos sobre la biología celular fueron adquiridos en estudios con este microorganismo (Donnenberg, 2002). *Escherichia coli* es uno de los principales habitantes del tracto intestinal del hombre y de la mayoría de las especies animales. Se caracteriza por ser un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, cuyos miembros en general son no-patógenos. Sin embargo, una pequeña proporción de este grupo causa importantes enfermedades de distribución mundial, tanto para el hombre como para los animales. Estas cepas potencialmente patógenas se clasifican en categorías en función de los factores de virulencia que presentan y de la manifestación clínica que ellas causan (Fairbrother *et al.*, 2006; Gyles, 2007). Morfológicamente se caracteriza por ser un bacilo recto y cilíndrico de 1,1-1,5 por 2-6  $\mu\text{m}$ , que se presenta solo o de a pares. Es Gram negativo. Móvil debido a la presencia de flagelos peritricos. Fisiológicamente, *E. coli* es versátil y bien adaptado a sus hábitats característicos. Aerobio y anaerobio facultativo; presenta ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo. Puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Bajo condiciones anaeróbicas, desarrolla por la vía fermentativa produciendo las clásicas combinaciones de ácidos y gas como productos finales. Sin embargo, también puede desarrollar por la vía anaeróbica, ya que es capaz de utilizar amoníaco, amonio o fumarato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Es oxidasa negativo y quimioorganotrófico, ya que puede desarrollar en medios que contienen glucosa como única constituyente orgánica. En general, fermenta la lactosa y no produce  $\text{SH}_2$ ; aunque una escasa cantidad de aislamientos de origen porcino, pueden hacerlo. Se recuperan con facilidad a partir de muestras clínicas sembradas en medios comunes o selectivos (agar MacConkey, agar eosina azul de metileno, etc.) e incubadas a 37° C bajo condiciones aeróbicas (Scheutz *et al.*, 2005).

### **2.2.1 Hábitat**

*E. coli* es la especie predominante de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastro-intestinal de los animales de sangre caliente y se elimina por las heces al exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico. (Blanco *et al.*, 2003; Todar, 2008). Algunos anaerobios como *Bacteroides sp.* son, al menos, veinte veces más abundantes que *E. coli* en el intestino grueso. Sin embargo, por su presencia regular en el intestino y en las

heces, *E. coli* es utilizada como indicador de contaminación fecal. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Blanco *et al.*, 2003; Todar, 2008).

### **2.2.2 Patogenicidad**

*E. coli* es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extra intestinales en humanos y animales (Johnson, 2000). La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedante, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos (Todar, 2008). No obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extra intestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos (Blanco *et al.*, 2003). El tipo de interacción resultante entre microorganismo y hospedador, permite clasificar las cepas de *E. coli* como comensales avirulentos, como patógenos oportunistas o altamente especializados, que a su vez son frecuentemente clasificados en patotipos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan y por su conjunto de factores de virulencia (Sousa, 2006). Los síndromes clínicos son clasificados como enfermedad entérica/diarreica, infección del aparato urinario o sepsis/meningitis. Entre los patógenos intestinales hay seis categorías de *E. coli* bien descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

### **2.2.3 Factor de virulencia**

La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos enfermedades intestinales y extra intestinales procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideroforos y sistemas de secreción, entre otros (Blanco *et al.*, 2003; Johnson, 2000). Esos factores no son necesarios para la replicación vegetativa y tampoco para el simple comensalismo, pero contribuyen al aumento de eficacia en la colonización de superficies específicas del hospedante, evasión de las defensas inmunológicas, o

daño directo a sus células y tejidos lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Johnson, 2000). La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial. Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Blanco *et al.*, 2003). Los distintos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clónales que son caracterizados por compartir determinados tipos de antígenos. Se define serogrupo como el conjunto de cepas que comparten una variedad antigénica teniendo en cuenta solo los antígenos O (lipopolisacáridos); por otro lado los serotipos son definidos por la combinación de los antígenos O y H (flagelar) y a veces del antígeno capsular o K (Kaper *et al.*, 2004). El principal factor de virulencia de las cepas uropatógenas de *E. coli* es la fimbria P que está presente en la mayor parte de las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis (Blanco *et al.*, 2003). Esta fimbria permite a la bacteria fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario (Blanco *et al.*, 2003; Emődy *et al.*, 2003).

#### **2.2.4 Sensibilidad a los antimicrobianos**

Las cepas de *E. coli*, como las otras bacterias Gram-negativas, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos hidrófobos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico (Scheutz *et al.*, 2005). Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* patógenas extra intestinales son la amoxicilina, ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglicósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Sin embargo, la capacidad de *E. coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que esta debe determinarse siempre mediante antibiograma (Blanco *et al.*, 2003). Resistencia adquirida a los aminoglicósidos, betalactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim se ha descrito para cepas de *E. coli* por cuatro mecanismos distintos: alteración de diana, inactivación enzimática, menor acumulación intracelular del antimicrobiano y desvío de una etapa metabólica (Scheutz *et al.*, 2005). Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas (15 a 30%) las cepas resistentes a las cefalosporinas de primera generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencias se dispone de amoxicilina, ácido clavulánico, cefalosporinas de segunda y tercera generación, gentamicina, tobramicina, ampicilina, colistina y polimixina B (Blanco *et al.*, 2003).

#### **2.2.5 Prevención de las infecciones**

Los patógenos pueden ser aislados de la vejiga (cistitis), riñones (pielonefritis), orina (bacteriuria) o próstata (prostatitis) son los patógenos más frecuentes en estas infecciones (Smith *et al.*, 2007; Emődy *et al.*, 2003). Tradicionalmente las

estrategias terapéuticas y preventivas dependen del uso de antimicrobianos con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano, pero urgen alternativas a estos compuestos debido al drástico aumento de resistencia múltiple a los antimicrobianos (Dobrindt *et al.*, 2008). Además, recientemente se ha demostrado que concentraciones subinhibitorias de antibióticos aminoglicosidos inducen a la formación de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (Hoffman *et al.*, 2007).

### **2.2.6 Relevancia**

Se sabe que las infecciones gastrointestinales a repetición y la diarrea prolongada afectan seriamente el estado nutricional, el crecimiento y el desarrollo intelectual del niño (Guerrant *et al.*, 1999). Por esta razón, es importante conocer la frecuencia de las *E. coli* diarreogénicas y de otros patógenos para tomar medidas terapéuticas y de prevención en el futuro. La identificación de las cepas y serotipos más comunes es de importancia para el desarrollo futuro de vacunas. Adicionalmente, los patrones de aislamiento de bacterias y virus varían con el tiempo, conforme se va reduciendo la mortalidad infantil. En una revisión reciente para la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encontró que EPEC y ETEC son la siguiente prioridad luego de rotavirus, por las tasas de mortalidad (Lanata, 2005).

### **2.2.7 Actividad antibacteriana de *Moringa oleifera***

El uso de *M. oleifera* para el control de diversas infecciones provocadas por microorganismos es bien conocido, y en años recientes se han generado resultados científicos que confirman su actividad antimicrobiana. Estudios *in vitro* han comprobado la actividad de diferentes partes de la planta sobre los microorganismos patógenos. La inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por extractos acuosos de las hojas fue demostrada por científicos guatemaltecos (Cáceres *et al.*, 1991). Por otra parte, Chuang *et al.* (2007) demostraron la actividad antifúngica de aceites esenciales de las hojas y de extractos alcohólicos de las semillas y las hojas contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Además, se logró identificar 44 componentes de los aceites esenciales de las hojas que pueden ser utilizados en el desarrollo futuro de fármacos para el tratamiento de enfermedades cutáneas típicas de las áreas tropicales. Estudios bacteriológicos demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de *M. oleifera*, los cuales floculan bacterias Gram positivas y Gram negativas del mismo modo que lo hacen con los coloides del agua. Su acción bacteriostática consiste en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales (Suárez *et al.*, 2003). El principal ingrediente responsable de dicha actividad es el 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo, el cual tiene acción bactericida sobre varias especies patógenas, incluyendo

aislados de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella* resistentes a antibióticos. La potencia de los isotiocianatos como antibióticos también quedó demostrada en un estudio con *Helicobacter pylori*, que es el causante de úlceras gástricas y duodenales (Fahey, 2005). En una investigación muy reciente realizada en Kenya se demostró la actividad antimicrobiana de extractos de semillas de *M. oleifera* sobre las bacterias *Salmonella typhii*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, causantes de la fiebre tifoidea, el cólera y la gastroenteritis, respectivamente (Walter *et al.*, 2011). Los autores de la presente reseña consideran que ese resultado puede tener un gran impacto, ya que se trata de agentes antimicrobianos naturales que constituyen un método barato y sostenible para el control de enfermedades y para mejorar la calidad de vida en comunidades pobres. Debe tenerse en cuenta que en muchas regiones rurales de los países subdesarrollados, debido al alto costo del cloro y otros desinfectantes, no se les practica ningún tratamiento a las aguas, lo que genera enfermedades provocadas por los microorganismos contaminantes.

### **2.3 *Rhizoctonia solani* Kuhn**

En 1858, Julius Kuhn describió un hongo en papas enfermas y lo ubicó en el género *Rhizoctonia*, cual ya era descrito por el micólogo sueco A. P. De Candolle (1815), denominándolo así *Rhizoctonia solani* Kuhn (Parmeter *et al.*, 1970). La fase asexual es *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Thanatephorus cucumeris* (Frank.), es la fase sexual. *R. solani*, pertenece a la Clase *Hyphomycetes*; es la fase patogénica y se caracteriza porque no produce conidios, las hifas son de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación tiene una constricción. *T. cucumeris* pertenece a la Clase *Basidiomycetes*. *Rhizoctonia solani* es un fitopatógeno importante, se distribuye en todo el mundo causando diversas enfermedades en una gran variedad de cultivos (Parmeter *et al.*, 1970; Sneh *et al.*, 1991). Algunos de los hongos causantes de pudriciones (*Pythium sp.*, *R. solani*, *P. infestans*) se diseminan en las semillas de tomate, pimentón y berenjena, en suelo contaminado en forma de clamidosporas, por el agua de riego a partir de los focos de infección en los semilleros, por la distribución de semilleros enfermos y por el uso de herramientas con suelo contaminado (Tamayo *et al.*, 2006). Las hifas de este hongo tienen la particularidad de anastomosarse, condición que se ha tomado en cuenta para clasificarlo en grupos de anastomosis (GA) (Parmeter *et al.*, 1969 y Ogoshi, 1985). Estos GA se diferencian entre sí morfológica, fisiológica y serológicamente (Adams *et al.*, 1979; Sherwood, 1969). Hasta la fecha, se conocen 14 grupos diferentes de anastomosis de *R. solani*, sin embargo, el comportamiento del hongo no puede basarse solamente en términos de grupo de anastomosis (Castro, 1989). Los grupos de anastomosis que afectan a la papa (*Solanum tuberosum*) son GA2, GA3, GA4, GA5 y GA7. De estos, los más

importantes son GA3 y GA4. El GA3 se caracteriza porque en la superficie de los tubérculos forma esclerocios (masas compactas de micelio, cuyas células han reducido su tamaño y adquirido el color negro por la presencia del pigmento melanina), soporta temperaturas bajas y afecta especialmente a la planta de papa y a las raíces de la cebada. El GA4, es el más patogénico, no forma esclerocios, soporta temperaturas más altas y afecta a muchos cultivos incluyendo papa (Anguis *et al.*, 1990). En el caso del Perú, el GA4 se encuentra en la Costa y el GA3 en la Sierra. Esta distribución está asociada con la altitud. En las partes altas de la sierra donde el frío es persistente se encuentra el GA3 y en las partes bajas que son calientes, como ocurre en la costa y en los valles interandinos, el GA4; sin embargo, en una altitud intermedia es posible encontrar los dos Grupos (Anguis *et al.*, 1990). En caso del tabaco (*Nicotiana tabacum*), *R. solani* puede sobrevivir muchos años en el suelo por medio de esclerocios o como un saprofito, colonizando la materia orgánica del suelo. Esclerocios y/o micelios presenten en el suelo y/o en los tejidos de las plantas pueden eventualmente activarse para producir hifas vegetativas que pueden atacar un rango muy grande de plantas (Keijer, 1996). En algunas circunstancias *R. solani* puede producir basidiosporas que causan enfermedades o servir también de fuente por una rápida y larga distancia de dispersión del hongo. Las basidiosporas germinan para producir hifas que afectan las hojas en periodos de alta humedad. Aunque la mayoría de las enfermedades de *Rhizoctonia* son iniciadas por micelios y/o esclerocios varias enfermedades importantes del tabaco y otras plantas como frijoles, la remolacha son resultados de infección por basidiosporas (González *et al.*, 2006; Harveson *et al.*, 2009). El *Damping off* es el síntoma más extendido causado por *R. solani* observado en tabaco. En general los semilleros son susceptibles a una paralización durante las primeras semanas de su desarrollo y vuelven progresivamente menos susceptibles como maduran a través del desarrollo de mecanismos de defensa bioquímicos y físicos y/o de barreras (Sneh *et al.*, 1991).

### **2.3.1 Epidemiología de la enfermedad**

El síntoma inicial del ataque de *R. solani* en plántulas de pimentón, aparece como manchas acuosas y oscuras en la base del tallo, con poco crecimiento de raíces secundarias. Las plántulas afectadas son de menor tamaño y presentan amarillamiento generalizado y marchitez (Tamayo *et al.*, 2006).

### **2.3.2 Ciclo de la enfermedad**

El hongo se mantiene de un año a otro, como esclerocios (GA3) y como micelio (GA4) en residuos de cosecha que se encuentran en el suelo. En la siembra de papa del siguiente año y en presencia de condiciones favorables de humedad, los esclerocios germinan y el micelio desarrolla infectando los brotes y tallos que se encuentran en estado de pre y/o post emergencia. Las raíces y los estolones son

también afectados durante el desarrollo de las plantas. La formación de esclerocios sobre la superficie de los nuevos tubérculos ocurre en condiciones de suficiente humedad y temperatura óptima de 18°C, sin embargo, el máximo desarrollo de esclerocios se produce cuando los tubérculos que se encuentran listos para ser cosechados se mantienen en el campo por un tiempo prolongado (Castro, 1989).

### **2.3.3 Control químico y biológico**

El uso de fungicidas (aplicados al suelo o como desinfectantes de tubérculos), no incrementa los rendimientos, pero, incrementa la calidad sanitaria de los tubérculos. Por otro lado, los fungicidas deberán utilizarse de acuerdo al GA presente. Trabajos realizados en México, han determinado que el monceren controla eficientemente el GA3 y el rizolex, el GA4; pero el GA7, que también forma esclerocios es tolerante a todos los fungicidas (Martin *et al.*, 1989.).

Entre los enemigos naturales de *R. solani*, los más eficientes son *Trichoderma harzianum* L., *Rhizoctonia binucleada* L. (Gutiérrez *et al.*, 1990) y *Verticillium biguttatum* Nees, aunque en la práctica el control biológico debe ser considerado sólo como un componente del control integrado (Moreno, 2003).

## **2.4 *Stemphylium solani* Weber**

El quemado de las hojas de ajo (*Allium sativum* L.) causado por *Stemphylium solani* es una enfermedad muy seria en las áreas de cultivo de vegetales. Los síntomas de esta enfermedad empiezan como un pequeño blanco lunar (1 a 3 mm) alargándose hasta llegar a una lesión necrótica morada a lo largo de la vaina, seguido por quemadura de la hoja (Zheng *et al.*, 2009). Hemos descubierto recientemente que los aislados de *S. solani* del ajo han producidos toxinas que son no específicos al hospedante, y han causados síntomas normalmente asociados al quemado de hoja en diferentes variedades de plantas (Zheng *et al.*, 2009). En los folíolos, las lesiones en los folíolos son pequeñas, de color, castaño y rodeadas de un tenue halo clorótico por el haz. El patógeno esporula por el envés, donde la lesión es de color castaño oscuro. Con el transcurrir del tiempo, el centro de la lesión se torna quebradiza y se perfora, produciendo un amarillamiento foliar y posterior caída de la hoja afectada (Tamayo *et al.*, 2006).

### **2.4.1 Características morfológicas**

Desde el punto de vista microscópico, los conidióforos son cilíndricos con el ápice dilatado, septados, rectos a variablemente curvados, simples y raras veces con una ramificación, percurrentes, de color marrón amarillento a marrón oliváceo y de 87,2 x 4,9µm. La célula conidiogena presenta dos bandas oscuras y en la dilatación promedia 7,5 (6,9-8,2) µm de diámetro. Los conidios son dictiosporos, solitarios, oblongos a elipsoidales con ápice obtuso, color marrón amarillento a

marrón oliváceo, 3-7 septados, contritos en los tres septos transversales más largos, con pared espinosa y cicatriz basal oscura. Los conidios son de 30,5 (27,0-34,0) x 16,5 (15,1-17,9)  $\mu\text{m}$  (l/a= 1,8) (Cedeño *et al.*, 2003).

#### **2.4.2 Diagnostico**

*Stemphylium* es un patógeno que es difícil de diagnosticar tempranamente, por lo cual los productos que se pueden aplicar para su control, reducen la intensidad del daño, pero no lo controlan en su totalidad ya que como cualquier enfermedad lo mejor es la prevención. Una medida a corto plazo para mitigar el efecto de la patología, será instruir y guiar, mediante especialistas, a los productores para el reconocimiento temprano y efectivo de los síntomas, permitiendo la acción rápida del agricultor. Por otro lado, se debe incorporar a la brevedad todo residuo vegetal que quede en el campo para evitar la formación de la fase sexual. Se debe considerar la presencia de hospederos alternantes como el ajo, espárrago, perales, tomate, entre otros, para evitar la permanencia del patógeno en cultivos próximos (Alvarado, 2000).

Se usa un control químico para las lesiones causadas por este hongo por las aspersiones foliares con productos a base de Clorotalonil y Mancozeb, controlan adecuadamente la mancha gris del tomate (Tamayo *et al.*, 2006).

#### **2.4.3 Los metabolitos fitotoxicos del genero *Stemphylium***

Los metabolitos fitotoxicos de varias especies de *Stemphylium* han sido aislados o caracterizados estructuralmente. Las fitotoxinas producidas por *S. botryosum* L. incluyen stemphytoxina (I- IV), stemhyperylenol, stemphylin, stemphyloxina (I, II), y stemphol. Stemphylona/radicinina y pyrenophorina fueron hallados en *S. radicinum* L., y stemphona fue hallada en *S. sarcinaeforme* L. La estructura química parcial de la toxina SV (SV-toxin) producida por *S. vesicarium* L. es un anillo benzaldehído asociado a algunos grupos no conocidos. Todas estas toxinas caracterizadas estructuralmente son componentes secundarios de poco peso molecular con estructuras químicas diversas. Sin embargo, la toxina secretada por *S. solani* no ha sido todavía elucidada estructuralmente. Los aislados de los cultivos filtrados de *S. solani* de algodón fueron hallados contener toxinas específicos al hospedante (host- specific) que fueron probados que no son proteicos. La caracterización química preliminar de la toxina SS (SS-toxin) producida por *S. solani* demostró ser un componente de quinona que contiene grupos hidroxil fenólicos, y los espectros de UV e IR de la toxina SS (SS-toxin) ambos son diferentes de los otros metabolitos de *Stemphylium* descritos de este (Zheng *et al.*, 2009).

### III. Materiales y métodos

---

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de microbiología agrícola perteneciente a la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV). Entre los meses de Octubre de 2013 hasta Abril 2014.

Las semillas de *Moringa oleifera* fueron recolectados en la ciudad de Santa Clara (Villa Clara, Cuba) en Mayo 2013, alrededor de las viviendas y cercas. Se recolectaron las cajetas (frutos) frescas y secas que contienen las semillas. Los frutos frescos fueron puestos a secar al sol durante una semana. Se realizó selección de las semillas de acuerdo al estado. Se procedió al lavado con etanol por 10 minutos, y posteriormente se lavaron con dicloruro de mercurio ( $\text{Cl}_2\text{H}_2$  1g/1000mL) por 2 minutos y finalmente se lavaron con agua destillada estéril cuatro veces (4x) en un tubo previamente esterilizado. Después de secadas se guardaron en un frasco estéril a la temperatura ambiente.

Para la obtención del extracto crudo se maceraron 20 g de semilla de *M. oleifera* en un mortero previamente esterilizado, después se agregaron 100 mL una solución de tampón fosfato-Salino (0,1 M PBS) en el flujo laminar (Bio 60). Se colocaron en frascos, luego se centrifugaron (a 5000x g, 5 min), el sobrenadante fue filtrado utilizando papel Wathman N° 3 y posteriormente esterilizado por filtración utilizando una membrana de acetato de celulosa (0,2  $\mu\text{m}$ ) y se conservó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a  $-20^\circ\text{C}$ .

Los microorganismos empleados pertenecen al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Hongos: *Rhizoctonia solani* y *Stemphylium solani*, conservados en PDA (Agar Papa Dextrosa) a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Hongos fitopatógenos de la familia *Solanaceae*. Multiplicados en PDA.

Bacteria: *Escherichia coli*, conservada en glicerol a  $-20^\circ\text{C}$ . Bacteria con características enteropatogénicas. Multiplicada en Agar Endo.

Coliformes totales. Aislados durante la experimentación de aguas residuales. Conservados temporalmente en Caldo Nutriente.

El medio de cultivo empleado para hongos fue PDA, que se esterilizó en autoclave (Raypa®) a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min en elermaeyer de 500 mL.

El medio utilizado para *E. coli* y Coliformes totales fue Agar Endo, igualmente esterilizado.

Nota: toda la cristalería utilizada en los experimentos (placas Petri 9x1,5 cm, tubos, frascos) fue previamente esterilizada en estufa (Memmart®) a una temperatura de 170°C por dos (2) horas. Las placas fueron incubadas a 28°C ±2°C.

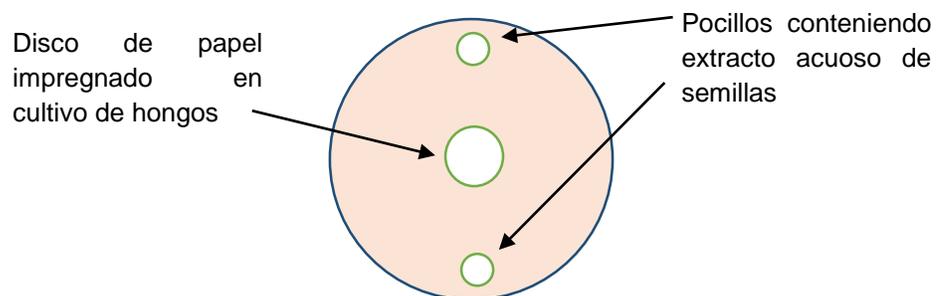
### 3.1 Ensayo de inhibición del crecimiento de hifas/micelios por el extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*

Las diluciones del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* se prepararon en forma sucesiva doble hasta la dilución 1/8.

Brevemente:

- Todos los tubos contienen 3 mL de la solución de PBS 0,15 M excepto el 1er tubo que contiene el extracto puro (6 mL).
- Se transfieren 3 mL del 1er tubo al 2do y se mezclan hasta obtener una solución homogénea y se repite la operación transfiriendo 3mL hasta alcanzar la dilución 1/8.

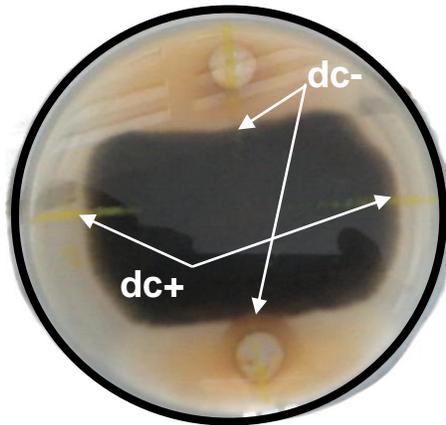
Se prepararon placas Petri con PDA se colocó una masa de un hongo (*R. solani* o *S. solani*) en cada placa ponchando el medio de cultivo con un horador metálico de 10 mm. La masa o porción del hongo se ubicó en el centro de la placa con una aguja estéril. Las placas poseían una doble capa de medio de cultivo con un contenido mayor de agar en la inferior, lo cual permitió realizar orificios de 10 mm de diámetro (Ø) en la capa superior a ambos extremos de la placa donde se colocaron extractos de semillas de *M. oleifera*. En la figura que aparece debajo se puede apreciar la disposición del disco y la ubicación de los orificios.



**Figura 2. Disposición del disco y orificios para extracto**

Para este ensayo se utilizaron 50 placas con PDA, se emplearon cinco replicas por cada dilución y se probaron dos patógenos fúngicos.

Las placas se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y se realizaron evaluaciones del crecimiento fúngico a las 24, 48, 72 y 96 horas, midiéndose la distancia de crecimiento mayor o ancho (dc+) y la menor o largo (dc-) para cada caso (Figura 2). Los controles fueron evaluados positivos al verificarse crecimiento fúngico.



**Figura 3. Forma de realizar las mediciones en los experimentos de inhibición del crecimiento de *R. solani* y *S. solani*.**

Con los datos del valor medio del diámetro de la colonia fúngica, al que se le sustrajo el valor inicial del disco de inóculo, se determinó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) del hongo patógeno por el producto objeto de estudio mediante la fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{(d1 - d2)}{d1} \times 100$$

Donde:

d1: Diámetro de la colonia del hongo patógeno sin producto.

d2: Diámetro de la colonia del hongo patógeno en presencia del producto.

Se evaluó la capacidad antifúngica del extracto de semillas de *M. oleifera*, de acuerdo con una escala de crecimiento de los hongos.

- Clase 1: el extracto anula completamente el crecimiento del hongo en la dirección de los pocillos.
- Clase 2: el extracto impide el crecimiento del hongo patógeno hasta 1/3 de la distancia desde el centro de la placa al centro del pocillo.

- Clase 3: el extracto impide el crecimiento del hongo patógeno hasta 2/3 de la distancia desde el centro de la placa al centro del pocillo.
- Clase 4: el extracto no impide el crecimiento del hongo patógeno de 2/3 en adelante desde el centro de la placa al centro del pocillo.

### **3.2 Actividad antibacteriana de extracto de semillas de *Moringa oleifera* contra *Escherichia coli***

Se realizaron diluciones sucesivas dobles (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) del extracto crudo de semillas de *M. oleifera* tal como se explicó anteriormente.

Se realizó de manera macroscópica y microscópica.

- La comprobación macroscópica consistió en sembrar la cepa de *E. coli* en agar endo y se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente se observaron colonias de color rojo con un pequeño halo blanco-rosa.
- La comprobación microscópica se realizó por la tinción de Gram.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó como base el método desarrollado por Kirby-Bauer para determinar la susceptibilidad de bacterias a antibióticos (Bauer *et al.*, 1966). Brevemente, *E. coli* se sembró en placas de Agar Endo por el método de extensión, una vez secado se colocaron los discos impregnados con 15 µL del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*. Esta prueba se realizó utilizando 13 placas ubicando todas las diluciones en forma circular. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C. Se evaluó la susceptibilidad midiendo el diámetro de la zona de demarcación que se formó alrededor de cada dilución en cada placa. Las mediciones se indicaron en milímetros.

### **3.3 Pruebas para determinar las capacidades floculante y aglutinante del extracto acuoso de *Moringa oleifera***

La muestra de agua residual se tomó de en un estercolero en la estación experimental de zootecnia perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) en la provincia de Villa Clara (Cuba).

Se prepararon placas Petri con medio de cultivo (Caldo Nutriente) para el aislamiento inespecífico de microorganismos. Se sembraron 50 µL del agua de la estación experimental y se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-14}$ . Posteriormente se incubaron a una temperatura de 37°C por 18 horas, al cabo de las 18 horas se seleccionó la dilución a la cual era factible contar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Se maceraron de la forma más fina posible cinco (5) gramos de semillas en un mortero previamente esterilizado y las semillas previamente desinfectadas.

### 3.3.1 Ensayo para determinar la capacidad flocculante de las semillas de *M. oleifera*

En este ensayo se prepararon bolsas de gasa con las siguientes cantidades de harina de semillas de *M. oleifera*: 2.0 g, 1.0 g y 0.5 g. Se realizó la prueba con la dilución de  $10^{-6}$  del agua residual del estercolero, de la cual se tomaron 450 mL, divididos en tres tubos (150 mL x tubo). En los tubos se introdujeron las bolsas con las diferentes cantidades semillas molidas de *M. oleifera* tal como se muestra en la Figura 4

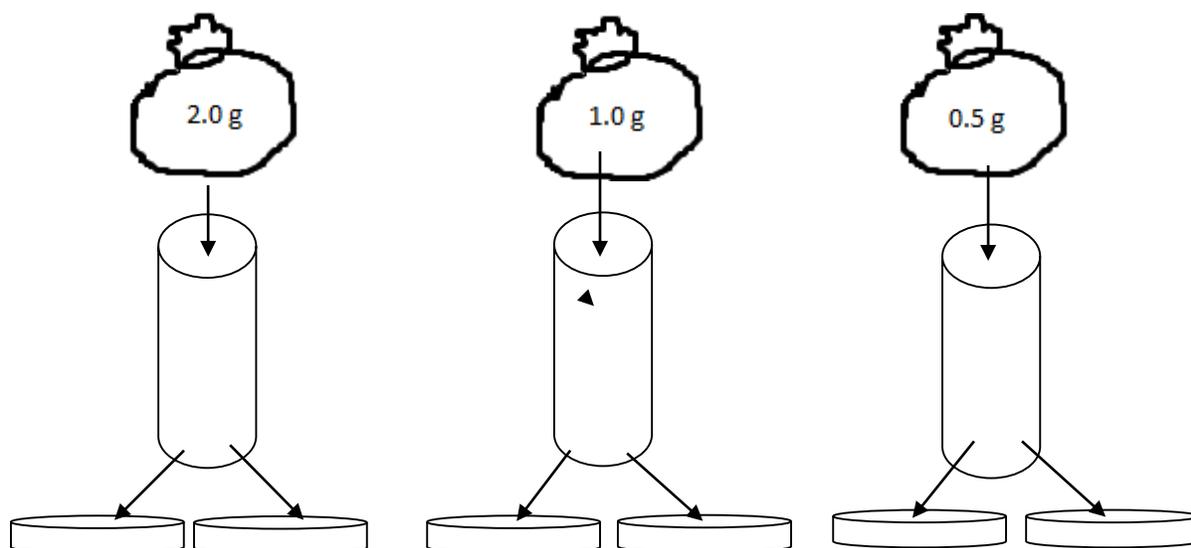


Figura 4: Forma en que se dispusieron las bolsas con semillas maceradas de *M. oleifera* en los tubos con agua residual. Procedimiento general para el control de la contaminación bacteriana.

Transcurridas 2 horas; 4 horas; 6 horas y 18 hrs se realizaron siembras de cada tubo (50  $\mu$ L) en placas con medio de cultivo de Agar Endo y se incubaron a 37°C por 18 hrs. Realizando conteo bacteriano transcurrido el tiempo de incubación.

### 3.3.2 Aislamiento de coliformes de aguas residuales

A partir de la dilución  $10^{-6}$  se sembraron 50  $\mu$ L de agua residual del estercolero en placas con medio Agar Endo y se incubaron 37°C, 18 hrs. Se procedió al aislamiento y caracterización de los microorganismos más representativos de la dilución teniendo en cuenta la configuración, el margen y la elevación. Los

microorganismos aislados fueron identificados como coliformes y sembrados en Caldo Nutriente.

### **3.3.3 Prueba de aglutinación bacteriana mediada por el extracto acuoso de semillas de *M. oleifera***

El ensayo de aglutinación bacteriana se realizó con el extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* (obtenido con anterioridad). Posteriormente se procedió a realizar el ensayo enfrentando cada bacteria aislada al extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* de la siguiente forma:

1. 40  $\mu$ L de cada cultivo aislado en un portaobjeto.
2. 40  $\mu$ L del extracto de *M. oleifera* al cultivo en el portaobjeto y se mezcló suavemente hasta lograr homogeneidad.
3. reposo por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizar lecturas de cada portaobjeto al microscopio óptico (Novel con cámara digital Canon EOS 5D acoplada) chequeando la formación o no de grumos bacterianos.

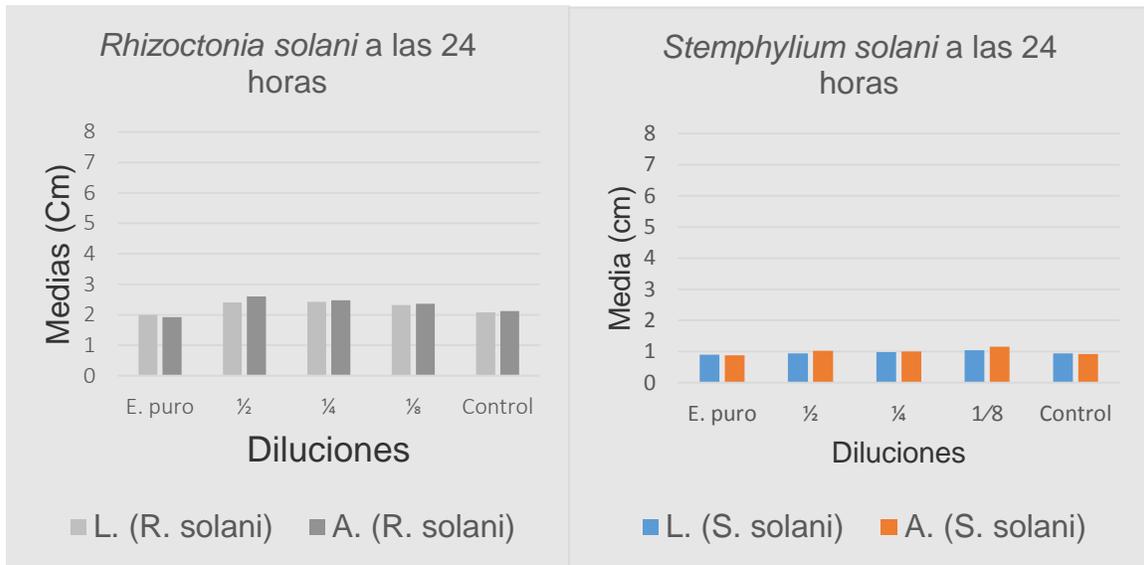
A cada ensayo se le realizaron dos réplicas.

Para el procesamiento de los datos se usó el STATGRAPHICS centurion XVII. Se aplicó la prueba de hipótesis para dos muestras (prueba de Kruscal-Wally) para comparar las dc- (largos) y dc+ (anchos) de las colonias de los ensayos de 24 horas (hrs), 48hrs, 72hrs y 96 hrs. Se aplicó la prueba de Kruscal-Wally porque es una prueba no paramétrica y hay ausencia de homogeneidad de varianzas. Se aplicó esta prueba con  $\alpha = 0,05$  y un nivel de confianza de 95%.

## IV. Resultados

### 4.1 Resultados del ensayo con los hongos

En el presente estudio las semillas de *M. oleifera* fueron usados para probar su efecto fungicida sobre el crecimiento fúngico *R. solani* y *S. solani*. Esos resultados son representados en las figuras siguientes:

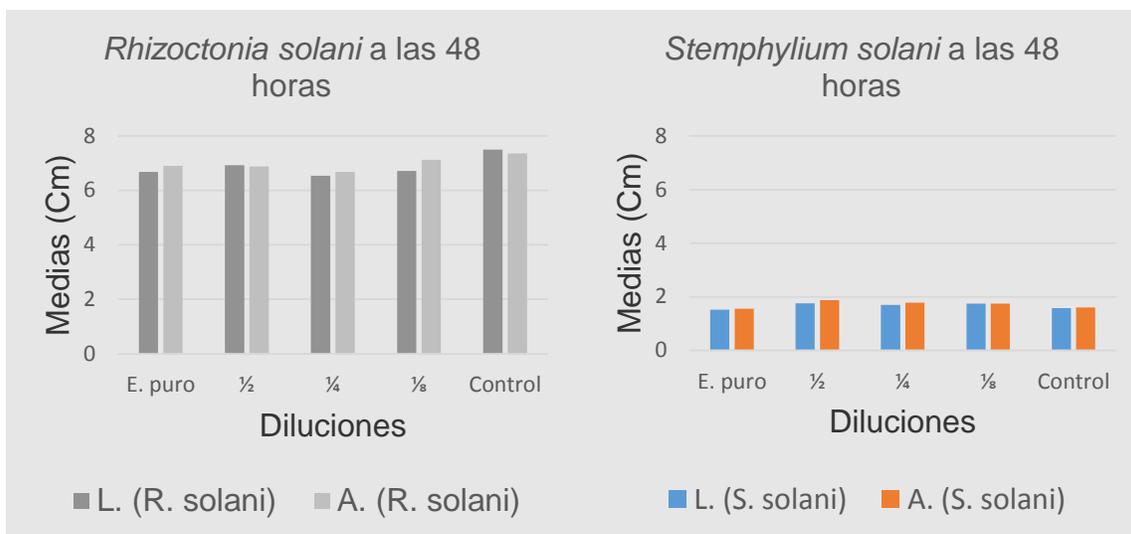


A)

B)

**Figura 5:** Los resultados del test de inhibición del crecimiento del extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* frente a *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) y *Stemphylium solani* (*S. solani*) a las 24 horas. A) *R. solani* a las 24 horas y B) *S. solani* a las 24 horas.

Se aplicó la Prueba de hipótesis de Kruskal-Wally comparando las medias de las distancias de crecimiento de la colonia de *R. solani*, la hipótesis nula era que la media de las muestras de datos de dc- = dc+. El P-value  $\geq 0,05$  entonces no existe diferencias significativa entre las distancias de crecimientos de los hongos.

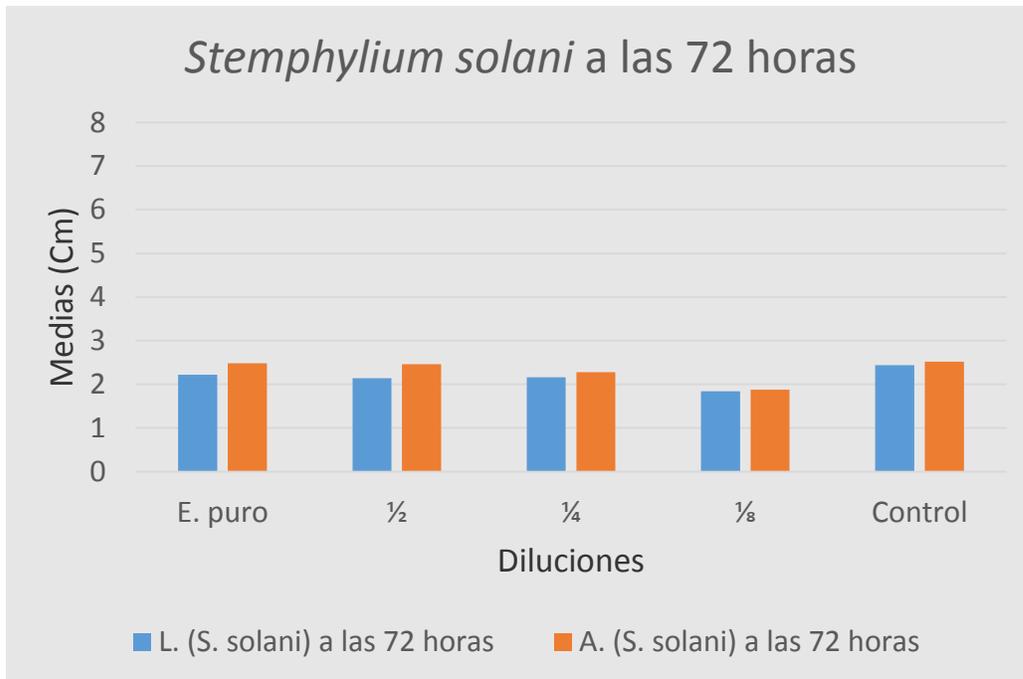


A)

B)

**Figura 6: Los resultados del test de inhibición del crecimiento del extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* frente a *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) y *Stemphylium solani* (*S. solani*) a las 48 horas. A) *R. solani* a las 48 horas y B) *S. solani* a las 48 horas.**

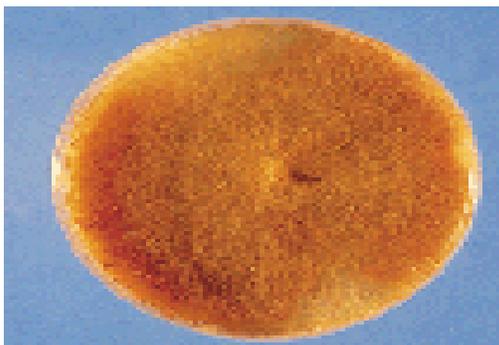
Al final de las 48 horas se observó un crecimiento acelerado de *R. solani*, aplicando la prueba de Kruskal-Wally, para comparar las medias de las distancias de crecimiento para cada dilución. Esta prueba nos indicó que no hay diferencia significativa entre las medias de las dc- (que son los largos de la colonia de *R. solani* o distancia de crecimiento menor) y las medias de las dc+ (que son los anchos de colonia de *R. solani* o distancia de crecimiento mayor) porque los P-value  $\geq 0,05$ . El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) a las 48 horas de *R. solani* es de 8,47%. Los ensayos de 24 horas, 48 horas demostraron que el extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* no tiene efecto inhibitorio contra el hongo patógeno *R. solani*. Por el caso de *S. solani*, no se aplicó ninguna prueba estadística ni se calculó el PICR porque durante las 24 hrs y 48 hrs todavía la colonia de *S. solani* no ha crecido suficiente para poder observar inhibición de crecimiento de la colonia fúngica por parte del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*



**Figura 7: los resultados del test de inhibición del crecimiento del extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* frente a *Stemphylium solani* (*S. solani*) a las 72 horas.**

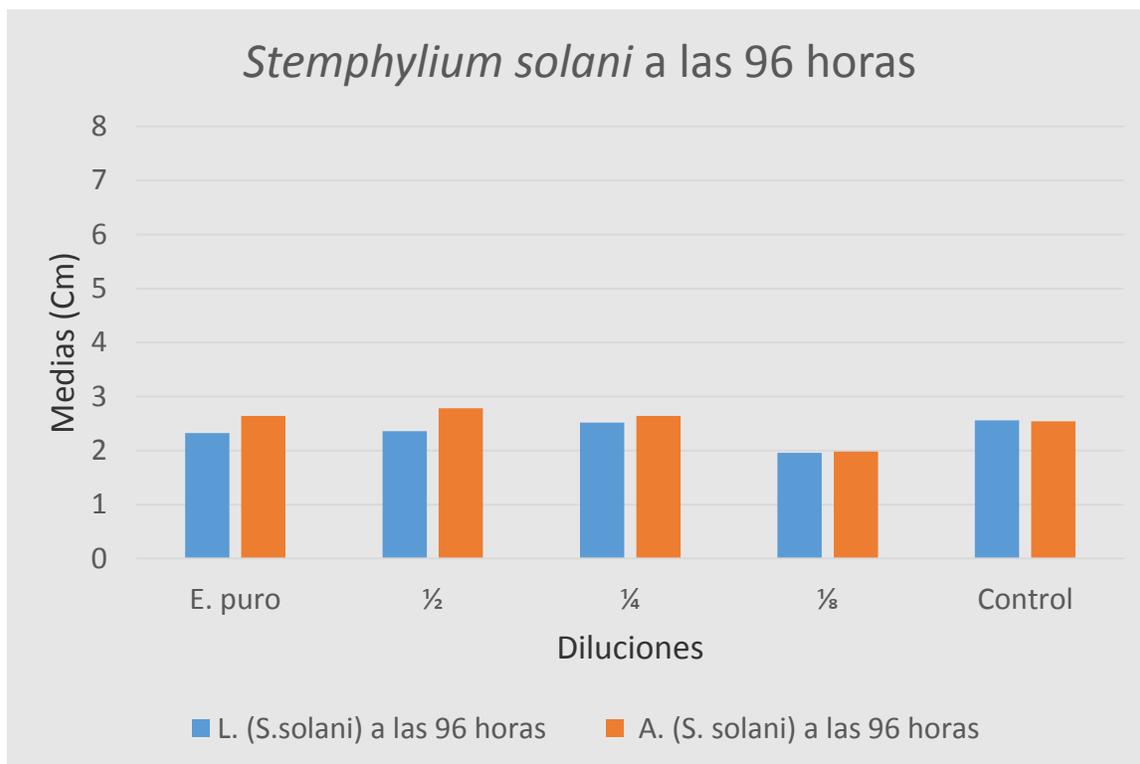
A partir de las 72 horas ya el hongo *R. solani* ha crecido mucho y consumió toda la superficie de las placas que lo contienen. Entonces a partir de este tiempo se dejó de medir las distancias de crecimiento del hongo *R. solani* solo se midieron las distancias de crecimiento de las colonias de *S. solani*. El PICR de *S. solani* a este tiempo es de 12,09%. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wally para comparar las medias de las distancias de crecimiento para cada dilución. Esta prueba nos indicó que no hay diferencia significativa entre las medias de las dc- (los largos de la colonia de *S. solani*) y las medias de las dc+ (los anchos de colonia de *S. solani*) porque los P-value  $\geq 0,05$ .

La figura siguiente es una placa de *R. solani* a las 72 horas frente a extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*.



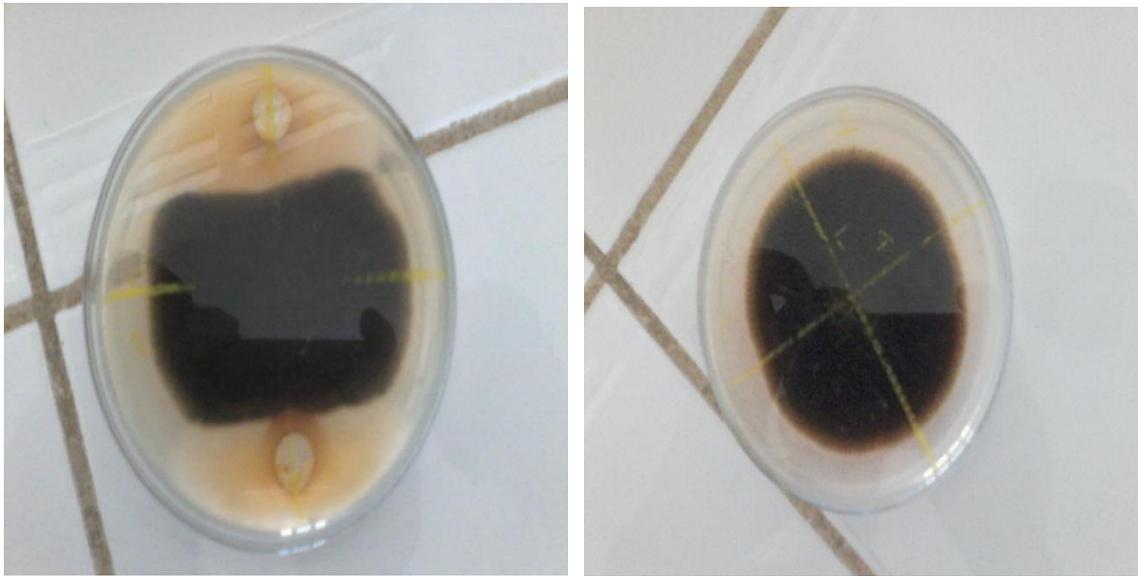
**Figura 8: Placa de *Rhizoctonia solani* a las 72 horas.**

En la figura 8 se observa que a las 72 horas el hongo *R. solani* ha consumido toda la placa incluyendo los pocillos que contienen extractos acuoso de semillas de *M. oleifera*.



**Figura 9: los resultados del test de inhibición del crecimiento del extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* frente a *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) y *Stemphylium solani* (*S. solani*) a las 96 horas.**

En la figura 9 la dilución pura y 1/2 a las 96 horas se ve zonas de demarcaciones producidas por la presencia de los pocillos de *M. oleifera* en el crecimiento a los largos (dc-) del hongo *S. solani*. El PICR de *S. solani* es igual a 41,76%. Se aplicó la prueba de hipótesis para dos muestras y nos demostró que si existe diferencia significativa estadísticamente entre las distancia de crecimiento menor (largos) y las distancias de crecimiento mayor (ancho) del extracto puro y 1/2, se obtuvieron P-value  $\leq 0,05$ . La dilución 1/8 resultó ser de menor crecimiento entonces se especuló que sea la dilución a la cual las semillas de *M. oleifera* expresa mejor su actividad fungicida. Las figuras siguientes ilustran la actividad fungicida de extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera*.



A

B

Figura 10: A) placa mostrando la inhibición del crecimiento de *S. solani* por extracto de semillas de *M. oleífera* y B) placa del control sin extracto de semillas.

#### 4.2 Actividad antibacteriana de semillas de *M. oleífera* Prueba de susceptibilidad.

La prueba de susceptibilidad demostró que *E. coli* es susceptible al extracto acuoso de semillas de *Moringa oleífera*. La medición de la susceptibilidad se ilustra en la Figura siguiente.

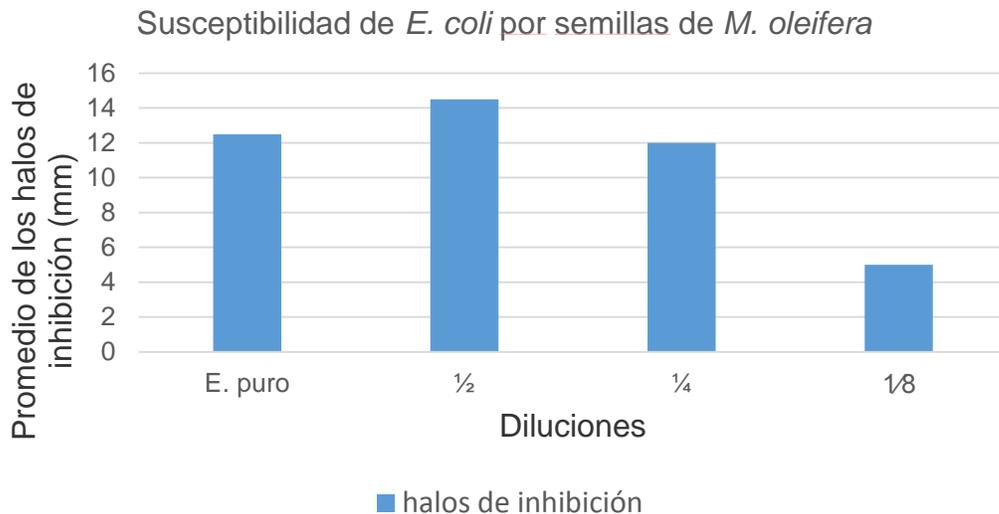


Figura 11: Resultados de la prueba de susceptibilidad (mm)

La Figura 11 muestra los resultados de la difusión por disco de la cepa de *E. coli* en presencia de extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*. Esta prueba demostró que las diluciones puras y 1/2 son aquellas en las que *E. coli* es más susceptible. Entonces son las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM).



A

B

**Figura 12:** A y B son placas donde se realizaron la difusión por disco de *E. coli* con las distintas diluciones.

En la figura 12 A los números escritos en la placa representan los distintos discos de papeles impregnados con las diluciones siguientes 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 y al centro de la placa se encuentra el papel de disco con la dilución pura. En la 12 B se muestra la placa donde el número de la dilución 1/2 fue borrado para una mejor vista de la zona de demarcación.

#### **4.3 Resultados de las actividades floculante y aglutinante.**

##### **4.3.1 Capacidad floculante de semillas de *Moringa oleifera***

Las semillas molidas de *Moringa oleifera* demostraron su capacidad floculante mediante la adsorción de los materiales en suspensión del agua residual y la neutralización de los microorganismos. Como se puede observar en la tabla siguiente.

**Tabla I: resultados de la siembra del agua residual después de aplicarle las bolsas de gasas a las 2 horas, 4 horas y 6 horas.**

| Tiempo |         |         |         |
|--------|---------|---------|---------|
| Peso   | 2 horas | 4 horas | 6 horas |
| 0,5 g  | -       | -       | -       |
| 1,0 g  | +       | +       |         |
| 2,0 g  | ++      |         |         |

En la tabla I, se ilustra los resultados de las siembras del agua residual de la estación experimental. En esta tabla los signos positivos (+) indican que por las cantidades de 1,0 g y 2,0 g se puede utilizar la torta de semillas a una cantidad de 150 mL de agua residual y observar su efecto floculante a las 2 hrs y 4 hrs. Los signos (-) indican que para una cantidad de 0,5 g torta de semillas de *M. oleifera*, esta última no expresó su propiedad o capacidad floculante frente a los 150 mL del agua residual. A través de este ensayo se evidenció la cantidad en gramos de semillas de *M. oleifera* que se puede utilizar para obtener una actividad bactericida eficaz por cada 150 mL de agua turbia. En la tabla I, se puede observar que la mejor actividad bactericida se obtuvo con la cantidad de 2,0 g de semillas molidas cada 2 horas, porque ya se muestra en la tabla I, que a las 2 horas los 2,0 g de torta de semillas han adsorbidos y neutralizados todos microorganismos presentes en las 150 mL de aguas residuales que a las 4 horas ya en esta agua no se presenta microorganismos. Mientras que por la cantidad de 1,0 g la adsorción y neutralización de los microorganismos es más lento hasta a las 4 horas.

**Tabla II Resultados del conteo bacteriano al final del ensayo con las bolsas de gasa**

| Replicas | Peso  |       |       |
|----------|-------|-------|-------|
|          | 0,5 g | 1,0 g | 2,0 g |
| 1        | 32    |       |       |
| 2        | 9     |       |       |
| 3        | 25    |       |       |
| 4        | 11    |       |       |
| 5        | 13    |       |       |
| 6        | 17    |       |       |

La tabla II muestra los resultados del conteo bacteriano después de la siembra de las soluciones con las diferentes bolsas de gasas de 0,5 g; 1,0 g y 2,0 g y se incubaron a 37° C por 18 hrs. En el ensayo realizado con 0,5 g de semillas molidas de *M. oleifera* hubo crecimiento de unidades formadoras de colonias bacterianas, lo que significa que con 150 mL de agua residual de la laguna de oxidación la cantidad de 0.5 g no es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Entonces con esa cantidad *M. oleifera* no posee capacidad flocculante. Mientras que los ensayos realizados con los pesos 1,0 g y 2,0 g de semillas molidas demostraron buenas capacidades flocculantes con la eliminación total de las unidades formadoras de colonias bacterianas presentes en la dilución usada e inhibición del crecimiento bacteriano. Entonces los pesos de 1,0 g y 2,0 g son los pesos adecuados para comprobar el efecto antibacteriano de las semillas molidas de *M. oleifera* en 150 mL de las aguas residuales de la estación experimental de zootecnia de la UCLV.

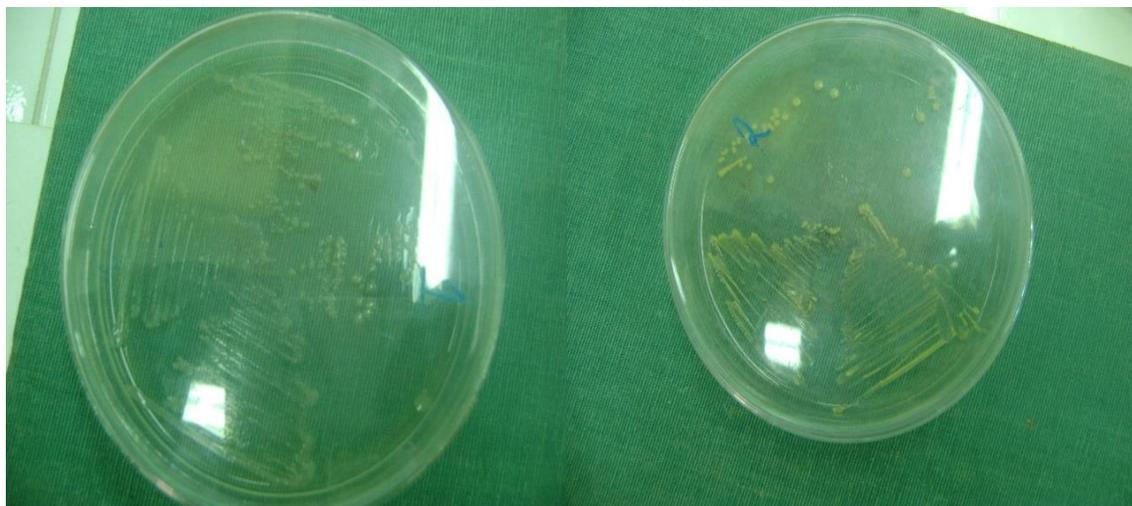
#### **4.3.2 Microorganismos aislados del agua residual**

En la tabla siguiente se destaca las características de las bacterias más representativas aisladas del agua residual del estercolero de la estación estatal.

**Tabla III: Características de las bacterias aisladas del agua residual del estercolero de la estación estatal**

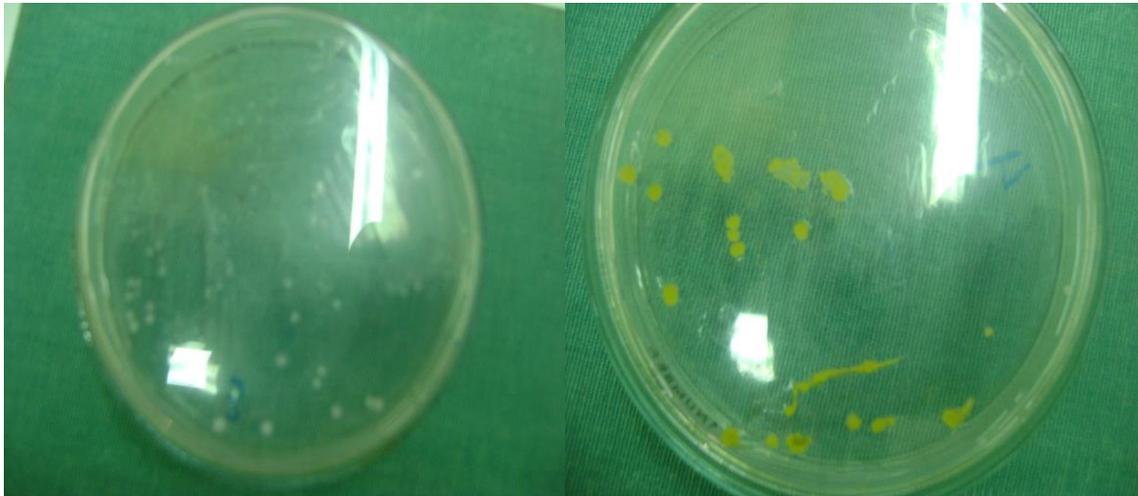
|          | <b>Configuración</b>  | <b>Margen</b>         | <b>Elevación</b> |
|----------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| <b>1</b> | Redondo (round)       | Entero (smooth)       | Convexo          |
| <b>2</b> | Redondo (round)       | Ondulado (wavy)       | Umbonate         |
| <b>3</b> | Rhizoide              | Lanudo (wooly)        | Colina (hilly)   |
| <b>4</b> | Irregular (irregular) | Irregular (irregular) | Elevado (raised) |

La tabla III muestra las características de las bacterias aisladas del agua residual del estercolero mediante la observación de las configuraciones, los márgenes y las elevaciones de las cepas aisladas. La caracterización nos permitió diferenciar las distintas cepas y/o colonias presenten en el agua residual y poder evidenciar las características estructurales bacterianas (coliformes totales) más apropiadas para la adsorción de las proteínas coagulantes de semillas de *M. oleifera* y reveló la presencia de cuatro tipos de microorganismos, que fueron aisladas y sembradas.



A

B



C

D

Figura 13: placas de las cuatro cepas de bacterias aisladas a partir del agua residual. A) Representa la placa que contiene la cepa 1; B) la placa que contiene la cepa 2; C) la placa que contiene la cepa 3 y D) la placa de la cepa 4.

#### 4.3.3 Capacidad de aglutinación bacteriana de las semillas de *M. oleifera*

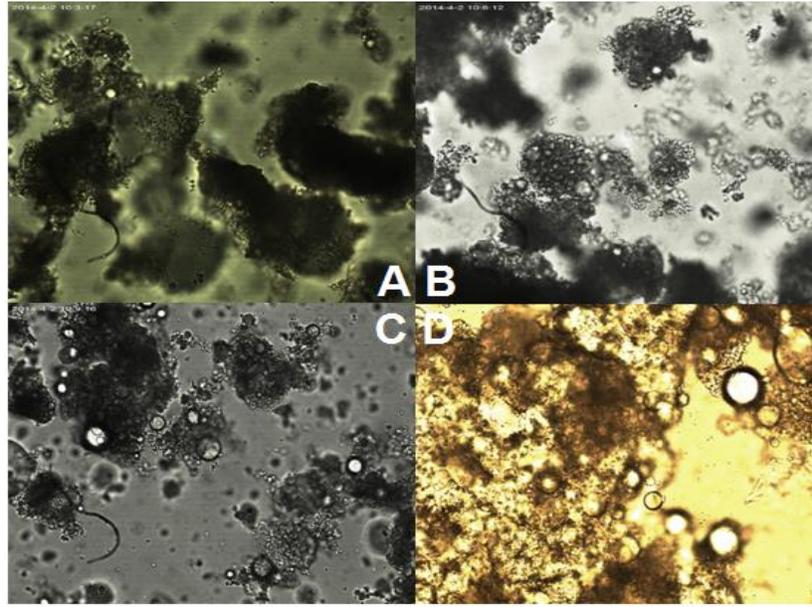
El extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* demostró una buena capacidad aglutinante frente a las bacterias aisladas del agua residual. La tabla siguiente ilustra la capacidad aglutinante del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*.

Tabla IV: Capacidad aglutinante de extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*.

| Cepas  | Efecto         |            |                 |
|--------|----------------|------------|-----------------|
|        | Muy aglutinado | Aglutinado | Poco aglutinado |
| Cepa 1 | +++            |            |                 |
| Cepa 2 |                | ++         |                 |
| Cepa 3 |                | ++         |                 |
| Cepa 4 | +++            |            |                 |

En este presente trabajo se hizo este test de aglutinación para comprobar la capacidad de aglutinación microbiana de las semillas de *M. oleifera*. Se hizo el test con las bacterias aisladas del agua residual de la laguna de oxidación, se aisló cuatro cepas no identificadas de bacterias. Como se ve en la tabla IV el extracto de las semillas *M. oleifera* tuvo una fuerte aglutinación (+++) contra las cepas 1 y

4. Mientras que en las cepas 2 y 3 la aglutinación (++) fue de menor grado. Las figuras tomadas demuestran la fuerte capacidad aglutinante del extracto de *M. oleifera* contra las cepas 1 y 4 (Figuras C y F), en las cepas 2 y 3 se observó una formación de grumos no muy oscuros (una aglutinación normal) (Figuras D y E) como se puede observar en la figura siguientes.



**Figura 14:** A) fuerte aglutinación del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* frente a la cepa aislada 1; B) aglutinación normal del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* frente a la cepa aislada 2; C) aglutinación normal del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* frente a la cepa aislada 3; D) fuerte aglutinación del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* frente a la cepa aislada 4.

## V. Discusión

---

### 5.1 Los ensayos de inhibición de crecimiento fúngico

En este presente trabajo, el extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* no mostraron ninguna zona de demarcación ni un halo de inhibición frente a *R. solani*. Eso se demostró estadísticamente aplicando la prueba de hipótesis comparando las medias de las distancias de crecimiento (los “Largos” y los “Anchos”) de la colonia de *R. solani* para cada dilución. Lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Goun et al., que usaron extracto metanólico y de clorhidrato de metilo de las semillas de *M. oleifera* contra *R. solani* y no observaron inhibición de esos extractos metanólico y de clorhidrato de metilo frente a este hongo. (Goun et al., 2003). Entre los agentes importantes productores de enfermedades en plantas se encuentra *Rhizopus stolonifer* L. que produce la pudrición blanda de frutas y hortalizas. Los extractos de semillas de paraíso blanco (*Moringa oleifera* Lam.), tienen un efecto fungicida sobre el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *R. stolonifer* en condiciones *in vitro* pero no tienen ningún efecto fungicida sobre el crecimiento micelial ni la germinación de esporas de *R. solani* (Velázquez-Gurrola et al., 2005). Otros extractos de semillas, como los de *Lupinus exaltatus* L., *L. rotundiflorus* L. y *L. montanus* L. (concentración respectiva en alcaloides de 2.42, 1.93 y 1.84%) han demostrado también su capacidad antifúngica sobre el desarrollo del micelio de *Sclerotium rolfsii* L., *Alternaria solani* Cooke Wint., *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum* Schltld. (Bernal et al., 2005).

Se demostró la actividad antifúngica de los aceites esenciales de las hojas y de extractos alcohólicos de las semillas y las hojas contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* Malmsten y *Trichophyton mentagrophytes* (Chuang et al., 2007). Actividad antibiótica y anti-inflamatoria de las semillas de *M. oleifera* fueron también ampliamente usados por diversas poblaciones en el mundo. Las actividades antibacteriales y antifúngicas de 20 plantas de Indonesia dentro de las cuales se encuentra *M. oleifera* y se demostró que *M. oleifera* no tiene ninguna actividad contra *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Aspergillus fumigatus* Fresenius (Goun et al., 2003). Se realizó ensayos de validación aplicando una solución de 8 g/L de pasta obtenida a partir de cotiledones de las semillas de *Moringa oleifera* en muestras de leche. En la muestra tratada con pasta de *Moringa oleifera* se logró eliminar el grupo de mohos y levaduras en un 98,18% (Silva, 2008). En el caso de los hongos, *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem se inhibió seguido de *Aspergillus oryzae* Cohn, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus nidulans* G. Winter (Kekuda et al., 2010). Contrariamente a la resistencia contra *Pseudomona aeruginosa* Migula y *Candida albicans* un estudio utilizando extracto etanólico de las hojas, semillas y flores

mostraron actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* Schroeter, *Proteus mirabilis* Hauser, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi* *S. aureus*, *Streptococcus* y *Candida albicans* Berkhout (Nepolean *et al.*, 2009). La *moringa* contiene Pterygospermin (originalmente encontrada en *Moringa pterygosperma*), que tiene potentes efectos antibacterianos y fungicidas (Nepolean *et al.*, 2009).

En esta investigación se demostró que el extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* tiene una capacidad inhibitoria sobre el crecimiento fúngico *in vitro* de *Stemphylium solani* por la formación de zonas de demarcación alrededor de los pozos del extracto de *M. oleifera*, lo que impidió el crecimiento del hongo a los largos de las placas. La actividad antifúngica de *M. oleifera* frente a *S. solani* no ha sido investigada por lo que no se encuentre ninguna investigación acerca de la actividad antifúngica de *M. oleifera* contra *S. solani*. El control fungicida *in vitro* que se utiliza contra *S. solani* es un enfrentamiento de cepas de *S. solani* frente a *Trichoderma*, que es un importante hongo antagonista a *S. solani*.

## 5.2 Capacidad floculante de semillas de *M. oleifera*

La actividad antibacteriana del extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera* contra *E. coli* en este trabajo se comprobó con una prueba de susceptibilidad por el test de difusión en agar. Esta prueba de susceptibilidad nos dio que la cepa de *E. coli* es susceptible al extracto acuoso de las semillas de *M. oleifera*. Vieira *et al.*, han demostrado que el extracto de *Moringa oleifera* a base de agua ha inhibido eficientemente (halo > 13 mm) el crecimiento de *S. aureus*, *V. cholerae* y *E. coli* aislados de muestras de gambas, especialmente al 150 y 200 µL/disco. Cepas similares aisladas de Tilapia y muestras de gambas han sido inhibidas por extracto de semillas de *M. oleifera* a base de etanol a todos los volúmenes probados. La sustancia bactericida de las semillas de *M. oleifera* fue identificada como pterygospermina, moringina y glucósido 4-(α-L-rhamnosyloxy)-benzylisothiocianato y 4-(α-L-rhamnosyloxy)-phenilacetónitrilo. Esta sustancia ha demostrado inhibir principalmente *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phei*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* y *Streptococcus* (Jahn *et al.*, 2001). En un estudio reciente se encontró que los extractos acuosos de la *Moringa* era inhibidora contra muchas bacterias patógenas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en forma dependiente de dosis (Saadabi *et al.*, 2011).

La actividad bactericida de las semillas de *M. oleifera* ha sido comprobada también con un polipéptido llamado Flo que fue sintetizado usando secuencia de aminoácido de un componente de las semillas de *M. oleifera* M.O.2.1 (Gassenschmidt *et al.*, 1995). La inhibición del crecimiento fue detectable a

concentraciones muy bajas de Flo con una concentración de inhibición de próximamente 100 µg/mL. La inhibición del crecimiento de *E. coli* fue transitorio con una reanudación del crecimiento después de 3-6 horas (Suárez *et al.*, 2002). *M. oleifera* además de ser totalmente biodisponible y muy eficiente en cuanto a clarificación del agua presenta propiedades desinfectantes capaces de eliminar efectivamente microorganismos presentes en agua como coliformes totales y fecales (Mendoza, *et al.*, 2000), así como también algunas cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* (Oluduro, *et al.*, 2010). Se realizó un estudio de la actividad antimicrobiana de cinco partes de la planta de *M. oleifera* contra tres bacterias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), dos Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* INCAP 8700200) y su actividad antifúngica contra *C. albicans*. Hubo una inhibición positiva del extracto de las semillas al 56°C contra *P. aeruginosa* e ídem hubo una inhibición positiva del extracto de las semillas al 56°C contra *S. aureus* pero no hubo ninguna inhibición que sea del extracto de las semillas y/o del jugo de las hojas de *M. oleifera* contra *E. coli* ATCC 25922 (Cáceres *et al.*, 1990). Igual en el artículo (Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants) publicado por Goun *et al.*, (2003) con extracto metanólico y de clorhidrato de etanol de las semillas de *M. oleifera* ningún de los dos extractos inhibió *E. coli* (Goun *et al.*, (2003). Un estudio de comparación de la actividad antimicrobiana relativa de extractos de semillas contra bacterias (*Pasteurella multocida*, *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*) y hongos (*Fusarium solani* y *Rhizopus solani*) reveló que *P. multocida* y *B. subtilis* fueron las cepas más sensibles, y su actividad fue influenciado por cationes (Na, K, Mg y Ca 2+) (Jabeen *et al.*, 2008). Otro estudio muestra la habilidad de una proteína recombinante (MO2.1) con una capacidad floculante de arcilla y bacterias (*Paenibacillus*) expresando niveles de floculación por medio de microscopia electrónica, así como también muestran la aglomeración de montmorillonita y floculación de *Paenibacillus* por acción de la proteína floculante de *M. oleifera* (Broin *et al.*, 2002). De las semillas se extrae un floculante natural tipo polielectrolito con función aniónica y catiónica, el cual sirve para la purificación de agua potable y para la sedimentación de partículas minerales orgánicas en aguas residuales. Asimismo es útil en la industria de pulpas y jugos para flocular y sedimentar fibras, y en la industria cervecera para la sedimentación de levaduras, con lo que se elimina la turbidez y le da brillo a la bebida (González *et al.* 2006).

### **5.2.1 Capacidad aglutinante de extracto de semillas de *M. oleifera***

El procesamiento del agua cruda contempla un tratamiento fisicoquímico, conocido como coagulación y floculación. La coagulación, se define como la

adición de sustancias químicas y la provisión de mezcla, para que las partículas y algunos contaminantes disueltos se aglutinen en partículas más grandes que se puedan retirar mediante procesos de remoción de sólidos (Dempsey, 2006). Su aplicación incluye la remoción de especies químicas disueltas y la turbiedad del agua por adición de coagulantes químicos convencionales; además, la coagulación/floculación es un paso fundamental en el proceso de tratamiento del agua, no solamente porque remueve las partículas responsables de la turbiedad producida por las partículas suspendidas y por el material coloidal, sino porque también remueve los microorganismos que, a menudo, se adhieren a las partículas (McCarthy *et al.*, 1989; Antov *et al.*, 2010). El uso de coagulantes a base de plantas para el tratamiento de aguas turbias data de varios milenios (Sanghi *et al.* 2002) y, hasta ahora, los científicos medioambientales han podido identificar varios tipos de plantas, para este propósito. El empleo de materiales naturales puede minimizar o evitar la importación de los coagulantes químicos (Yin, 2010). Es importante la introducción de los coagulantes naturales en los procesos de clarificación de agua para el consumo humano, como una tecnología apropiada ante las condiciones económicas actuales de Cuba (Muñoz *et al.*, 2008). En este trabajo el extracto acuoso de *M. oleifera* demostró su capacidad aglutinante de microorganismos por la formación de grumos y se determinó la cantidad de 2,0 g de torta de semillas de *M. oleifera* como la cantidad apropiada para obtener la capacidad floculante y aglutinante adecuada de torta de semillas de *M. oleifera* en un tiempo de 2 horas y una cantidad de 150mL de agua residuales. Se demostró que muestras de extracto salino y extracto de agua destillada de proteínas coagulantes de *M. oleifera* demostraron una buena actividad coagulante y actividad bactericida contra *E. coli*, *B. thuringiensis* (Kebreab *et al.*, 2005). En un estudio efectuado sobre la eficiencia del coagulante de las semillas de *M. oleifera* (Eficiencia del coagulante de la semilla de *Moringa oleifera* en el tratamiento de agua con baja turbidez), determinó que el rendimiento obtenido en cada uno de los tratamientos donde se utilizó la moringa, ha disminuido la turbidez inicial. Este efecto se debe a que la semilla presenta el coagulante que forma floculos de los sedimentos en suspensión y no un simple proceso de sedimentación (Rogelia, 2010). En un estudio se demostró la capacidad coagulante de la harina de semillas de *M. oleifera*, estableciendo como dosis óptima 50 mg/L (Ndabigengesere *et al.*, 1995).

## VI. Conclusiones

---

El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio y la discusión de los mismos hace posible concluir que:

1. El extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera* no tiene propiedad antifúngica *in vitro* frente al hongo *Rhizoctonia solani*, sin embargo demostró su actividad fungicida *in vitro* inhibiendo el crecimiento de *Stemphylium solani*.
2. El extracto de *Moringa oleifera* posee actividad antibacteriana *in vitro* vs. *Escherichia coli*.
3. Las semillas maceradas de *M. oleifera* pueden ser ampliamente utilizadas en la purificación de aguas residuales con alto contenido de coliformes totales.
4. Los extractos acuoso de semillas de *M. oleifera* presentaron poder aglutinante frente a coliformes totales.

## VII. Recomendaciones

---

1. Extender los estudios para determinar con exactitud propiedades antifúngicas y antimicrobianas de las semillas de *Moringa oleifera* frente a otros hongos y bacterias.
2. La utilización de semillas de *M. oleifera* es factible para la purificación de aguas residuales turbias con alto grado de contaminación.

## VIII. Bibliografía

---

- Adams, G.C. and E.E. Butler. 1979. *Serological relationships among anastomosis groups of Rhizoctonia solani*. Phytopathology 69: 629-633.
- Agrodesierto. 2006. *Moringa (Moringa oleifera)*. Programas Agroforestales. Consultado en 2014, en <http://www.agrodesierto.com>
- Agrawal A. K., Joshi A. P., Kandwal S.K., Dhasmana R. 1986. *An ecological analysis of Malin riverain forest of outer Garhwal Himalaya (western Himalaya)*. Indian Journal of Ecology. 13(1): 15-21.
- Anjorin T.B., Ikokoh P., Okolo S. (2010). *Mineral composition of Moringa oleifera leaves, pods and seeds from two regions in Abuja, Nigeria*. Int. J. Agric. Biol. 12:431-434.
- Al-Awwadi N., Azay J., Poucheret P., Cassanas G., Krosniak M., Auger G., Gasc F., Rouanet G.C., Teissedre P.L. (2004). *Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol, or both in streptozotocintreated rats*. J. Agric. Food Chem. 52:1008-1016.
- Al Anwar Farooq N., Zafar Rashid. 2009, *caracterización del aceite de semillas de Moringa oleifera Lam., obtenidas en las regiones de secano y de regadío del Punjab, Pakistán*. Departamento de química agrícola de la Universidad de Faisalabad. Revista Grasas y aceites, 57 (2) P160-168.
- Alvarado P.A. 2000. *Monitoreo de la producción y comercio de Ajo y Cebolla en Chile*. Tesis de Maestría de Ing. Agr. Santiago, Chile.
- Anguis, R. y C. Martin. 1990. *Caracterización y Patogenicidad de Rhizoctonia solani Khun., que afecta a la papa en tres zonas ecológicas del Perú*. Fitopatología 25: 16-22.
- Antov, M.G.; Sibani, M.B.; Petrovis N.J. 2010. *Protein from common bean (Phaseolus vulgaris) seed as a natural coagulant for potential application in water turbidity removal*. Biores. Techn. 101:2167-2172.
- Aslam M., Anwar F., Nadeem R., Rashid U., Kazi T.G., Nadeem M. (2005). *Mineral composition of Moringa oleifera leaves and pods from different regions of Punjab, Pakistan*. Asian J. Plant Sci., 4: 417-421.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Truck M., 1966. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method*. Amer. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.

- Barl T., Dobrindt U., Yu X., Katcoff D.J., Sompolinsky D., Bonacorsi S., Hacker J., Bachmann T.T. 2008. *Genotyping DNA chip for the simultaneous assessment of antibiotic resistance and pathogenic potential of extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. Int. J. Antimicrob. Agents. 32, 272-277.
- Becker, B. & Nair, P.K. 2004. *Cultivation of medicinal plants in an alley cropping system with Moringa oleifera in the United States Virgin Islands*. 1st World Congress of Agroforestry. Orlando, Florida, USA
- Bennett R.N, F.A. Mellon, N. Foidl, J.H. Pratt, M.S DuPont, L Perkins and P.A Kroon (2003) *Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees Moringa oleifera L. (Horseradish tree) and Moringa stenopetala L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 3546-3553.
- Benson H. 2002. *Microbiological applications* (séptima edición). Vol 1. P.151-155.
- Berger, M.R., M. Habs, S.A. Jahn and S. Schmahl. 1984. *Toxicological assessment of seeds from Moringa oleifera and Moringa stenopetala, two highly efficient primary coagulants for domestic water treatment of tropical raw water*. East African Medical Journal 61: 712-716.
- Bharali, R.; Tabassum, J. & Azad, M.R.H. 2003. *Chemomodulatory effect of Moringa oleifera Lam, on hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice*. Asian Pacific J. Cancer Prev. 4:131.
- Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Gonzalez E. A., Bernardez M.I., Alonso M.P., Coira A., Rodriguez A., Rey J., Usera M.A., 2003. *Escherichia coli productora de verotoxina: prevalencia, serotipo y genes de virulencia de 0157:H7 y non-0157 VTEC en rumiantes, productos de vaca crudos y humanos*. Exp. Biol.Med. 228: 345-351.
- Broin, M., Santaella, C., Cuine, S., Kokou, K, Peltier, G. (2002). *Flocculent activity of a recombinant protein from Moringa oleifera Lam. seeds*. Appl Microbiol Biotechnol, 60, 114-119.
- Cáceres, A. et al. 1991. *Pharmacological properties of M. oleifera. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity*. J. Ethnopharmacology. 33:213.

- Castro, C. 1989. *Ecology of Rhizoctonia solani and diseases development in relation to anastomosis groups*. Fungal Diseases of the Potato. International Potato Center. Report of Planning Conference on Fungal Disease of the Potato. Held at CIP, Lima, Peru. Pages 181-190
- Cedeño, L., Briceño, A., Fermin, G., Domínguez, I., Pino, H. y Quintero, K. 2007. *First record of Colletotrichum acutatum on lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. Fitopatol. Venez. 20: 41-43.
- Chuang, P.H. 2007. *Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of Moringa oleifera Lam*. Bioresource Technology. 98:232.
- Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, *et al*. 2008. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of Moringa oleifera Lam leaves. J Ethnopharmacol; 116(3):439-446.
- Coelho, J.S. *et al*. 2009. *Effect of M. oleifera lectin on development and mortality of A. aegypti larvae*. Chemosphere. 77:934.
- Comisión Técnica de Fitomed. 2010. *Paraíso francés..* [http://www.sld.cu/fitomed/par\\_aiso\\_frances.htm](http://www.sld.cu/fitomed/par_aiso_frances.htm)
- Corella, J. 2010. *Evaluación de biodiesel y subproductos, a través de la biomasa de la Moringa oleifera Lam como alternativa complementaria al problema energético de la provincia de Chiriquí y del país*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. 6 p. [http://www.sica.int/busqueda/busqueda\\_archivo.aspx?Archivo=dpro\\_14270\\_1\\_1704\\_2007.pdf](http://www.sica.int/busqueda/busqueda_archivo.aspx?Archivo=dpro_14270_1_1704_2007.pdf)
- Crapper D.R., Krishnan S.S., Dalton A.J. 1973. *Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration*. Science 180: 511-513.
- Dalsot M.V. Azub Ali S. Memon A.R. 1985. *Proteolytic enzyme of Moringa oleifera Lam. Seeds*. J. Pharma; 1(2): 1-10.
- Debnath S, Biswas D, Ray K, Guha D. 2007. *Moringa oleifera induced potentiation of serotonin release by 5-HT (3) receptors in experimental ulcer model*. Phytomedicine; 18(2-3):91-95.
- Dempsey, B. 2006. *Coagulant characteristics and reactions*. En: Newcombe, G.; Dixon, D. (Eds.) Interface Science in Drinking Water

- Treatment: Theory and Applications. Arthur Hubbard (Series Editor), Interface Science and Technology Vol. 10, Elsevier. The Netherlands, 5p.
- Diaz C., L.S. Melchers, P.J.J. Hooykaas, B.J.J. Lugtenberg and J.W.Kijne, 1989. *Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis*. *Natura*, 338: 579-588.
  - Dobrindt U. 2005. *Pathogenomics of Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295: 357-371.
  - Donnenberg M.S. 1999. *Interactions between enteropathogenic Escherichia coli and epithelial cells*. *Clin. Infect. Dis.* 28(3): 451-455.
  - Eilert U., B. Wolters, A. Nahrstedt (1981). *The antibiotic principle of seeds of Moringa oleifera and Moringa stenopetala*. *Planta Medica* 42: 55-61.
  - Emödy L., Kerényi M., Nagy G. 2003. *Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrobial Agents*. 22: 29-33.
  - Ezeamuzie I.C., A.W. Ambakederemo, (1996) *Antiinflammatory effects of Moringa oleifera root extract*. *International Journal of Pharmacognosy* 34(3): 207-212.
  - Faizi S., B.S. Siddiqui, (1992) *Isolation and structure elucidation of novel hypotensive agents, niazinin A, niazinin B, niazimicin and niaziminin A plus B from Moringa oleifera: The first naturally occurring thiocarbamates*. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I* (23): 3237-3241.
  - Fairbrother J.M., Nadeau E. 2006. *Escherichia coli: on-farm contamination of animals*. *Rev Sci Ech Off Int Epiz*; 25: 555-569.
  - Fahey, J 2005. *Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties*. *J. Trees for Life*. 1:5.
  - Falasca, Silvia & Bernabé, María A. 2008. *Potenciales usos y delimitación del área de cultivo de Moringa oleifera en Argentina*. *Revista Virtual de Redesma*.p.1.  
<http://revistavirtual.redesma.org/vol3/pdf/investigacion/Moringa.pdf>.
  - FAO-OMS. 2005. *Normas alimentarias FAO/OMS. Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas. Reunión 37*.  
[http://www.codexalimentarius.net/download/report/641/al28\\_24s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/641/al28_24s.pdf)
  - Foidl , N. et al. (1999). *Utilización del marango (Moringa oleifera) como forraje fresco para ganado. En: Agroforestería para la alimentación animal*

- en *Latinoamérica*. (Eds. M.D. Sánchez y M. Rosales). Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal No. 143, p. 341.
- Folkard, G.K.; Sutherland, J.P. 1994. *Moringa oleifera a multipurpose tree*. Footsteps 20:14-15.
  - Fuentes, L.; Mendoza, I.; Ángela, S.; López, M.; Castro, M.; Urdaneta, C. 2011. *Efectividad de un coagulante extraído de Stenocereus griseus (Haw.) Buxb. en la potabilización del agua*. Rev. Téc. Ing. U. Zulia. 1(34):48-56.
  - Fuglie, L. (2000). *Se estudian nuevos usos del marango en Nicaragua*. EDN 68 (Spanish). P 64.
  - FUNASA (2006). *Manual práctico de análise de água*. 2edição, 39-79. Fundação Nacional de Saúde, Brasília.
  - Garavito, U. (2008). *Moringa oleifera, alimento ecológico para ganado vacuno, porcino, equino, aves y peces, para alimentación humana, también para producción de etanol y biodiesel*. [En línea]. [http://www.engormix.com/moringa\\_oleifera%20alimento\\_ecologico\\_s\\_articulos%201891\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/moringa_oleifera%20alimento_ecologico_s_articulos%201891_AGR.htm)
  - García Fayos, B. (2007). *Metodología de extracción in situ de coagulantes natural para la clarificación de agua superficial. Aplicación en países en vías de desarrollo*. Valencia.
  - García Roa, M. (2003). *Producción de semillas forestales de especies forrajeras enfatizadas en sistemas silvopastoriles*. INAFOR. 37 p. [En línea]. <http://www.inafor.gob.ni/index.php/publicaciones>.
  - Gassenschmidt U., K.D. Jany, B. Tauscher, and H. Niebergall (1995) *Isolation and characterization of a flocculating protein from Moringa oleifera Lam*. Biochimica Biophysica Acta 1243: 477-481.
  - Ghasi S., E. Nwobodo, and J.O. Ofili (2000) *Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of Moringa oleifera Lam in high-fat diet fed Wistar rats*. Journal of Ethnopharmacology 69(1): 21-25.
  - Grassi D., Lippi C., Necozione S., Desideri G., Ferri C. (2005). *Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons*. Am. J. Clin. Nutr. 81:611-614.
  - Ghebremichael K.A., Gunaratna K.R., Henriksson H., Brumer H., Dalhammar G.A. 2005. *Simple purification and activity assay of the*

- coagulant protein from Moringa oleifera seed*. Water Research.39: 2338-2344.
- Gilani A.H, K. Aftab, A. Suria, S. Siddiqui, R. Saleem, B.S. Siddiqui, S. Faizi (1994) *Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from Moringa oleifera*. Phytotherapy Research 8(2): 87-91.
  - González-García, V., Portal-Onco, M.A. and Rubio, V. (2006) *Biology and systematics of the form genus Rhizoctonia*. Span. J. Agric. Res. 4, 55–79.
  - Goun E., G. Cunningham, D. Chu, C. Nguyen, D. Miles. 2003. *Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants*. Fitoterapia 76(2003). 592-596
  - Guevara A.P, C. Vargas, H. Sakurai, Y. Fujiwara, K. Hashimoto, T. Maoka, M. Kozuka, Y. Ito, H. Tokuda, and H. Nishino (1999) *An antitumor promoter from Moringa oleifera Lam*. Mutation Research 440: 181-188.
  - Guevara, A.P.; Vargas, C. & Uy, M. 1996. *Antiinflammatory and antitumor activities of seed extracts of malunggay, M. oleifera L. (Moringaceae)*. Philippine J. Sc. 125:175.
  - Gutierrez, Patricia y H. Torres. 1990. *Control biológico de Rhizoctonia solani con Rhizoctonia binucleada*. Fitopatología 25: 45-50.
  - Gyles CL. 2007. *Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview*. J Anim Sci; 85: E45-E62. [On line]
  - Hamza, A.A. 2010. *Ameliorative effects of Moringa oleifera Lam seed extract on liver fibrosis in rats*. Food Chem Toxicol, 48: 345-355.
  - Harveson, R.M., Hanson, L.E. and Hein, G.L. (2009). *Compendium of Beet Diseases and Pests*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
  - Jabeen R, Shahid M, Jamil A, Ashraf M. 2008. *Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of Moringa oleifera*. Pak J Bot.; 40:1349-58.
  - Jahn, S.A.A. 1988. *Using moringa seeds as a coagulant in developing countries*. Journal American Water works Association (EE.UU). 80:43-50.
  - Jaramillo, J.E., Díaz, C.A., Sánchez, G. & P.J. Tamayo. 2006. *Manejo de Semilleros de Hortalizas*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Centro de Investigación «La Selva», Rionegro,

- Antioquia, Colombia. Manual Técnico 7. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 52 p.
- Johnson J.R., Russo T.A. 2002. *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E. coli"*. J. Lab. Clin. Med. 139. 155-162.
  - Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. 2004. *Pathogenic Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2: 123-140.
  - Kar A., B. Choundhary, and N. Bandyopadhyay (2003) *Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology 84(1): 105-108.
  - Karen Rogelia G. G. 2010. *Eficiencia del coagulante de la semilla de Moringa oleifera en el tratamiento de agua con baja turbidez*. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Desarrollo Socioeconómico y Ambiente en el Grado Académico de Licenciatura; Zamorano, Honduras.
  - Keijer, J. (1996). *The initial steps of the infection process in Rhizoctonia solani*. Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control (Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G., eds), pp.149–162.
  - Kenneth Todar. 2008. *Pathogenic E. coli*. Todar's online textbook of bacteriology, <http://www.microbelibrary.org>
  - Kirtikar, K.R. & Basu, B.D. 1975. *Moringa oleifera*. In: *Indian medicinal plants*. Vol. 1. (Eds. D. Dun, B. Singh and M.P. Singh). Bishen Singh Mahendrapal Singh Publishers. Dehra Dun, India. p. 676.
  - Hukkeri V.I., Nagathan C.V., Karadi R.V., Patil B.S. (2006). *Antipyretic and wound healing activities of Moringa oleifera Lam. in rats*. Ind. J. Pharm. Sci. 68:124-126.
  - Ledo, P.G.S.; Lima, R. F. S.; Paulo, J. B. A. 2010. *Efficiency of aluminium sulphate and Moringa oleifera seeds as coagulants for the clarification of water land contamination & reclamation*. 7p.
  - Liñan, F. (2010). *Moringa oleifera el árbol de la nutrición*. Ciencia y Salud.
  - Mahajan, S.G. & Mehta, A.A. 2008. *Effect of M. oleifera Lam. seed extract on ovalbumininduced airway inflammation in guinea pigs*. Inhalation Toxicology. 20:897.

- Martyn C.N., Barker D.J., Osmond C., Harris E.C., Edwardson J.A., Lacey R.F. 1989. *Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water*. Lancet 1: 59-62.
- Martin, C. and H. Torres. 1989. *Control of Rhizoctonia and other soil-borne diseases of TPS*. Fungal Diseases of the Potato. Report of Planning Conference on Fungal Diseases of the Potato. Held at CIP, Lima, Peru. Pages 191-205.
- Martín, C., G. Martín, A. García, Teresa Fernández, E. Hernández y Jürgen Puls. 2013. *Potenciales aplicaciones de Moringa oleifera. Una revisión crítica*. Pastos y Forrajes, Vol. 36, No. 2, abril-junio, 137-149.
- Mathur, B. (2005). *Trees for life*. Recuperado el 4 de mayo de 2012, [http://www.treesforlife.org/sites/default/files/documents/Moringa\\_Book\\_Sp\(screen\).pdf](http://www.treesforlife.org/sites/default/files/documents/Moringa_Book_Sp(screen).pdf).
- Mello M.E. 1995. *Stemphylium leaf blight and stalk rot*. Swartz y Mohan (eds.) Compendium of onion and Garlic diseases. APS Press. St. Paul, Minnesota. P. 25-26.
- Mendoza I., Fernández N., Ettiene, G., & Díaz, A. (2000). *Uso de la Moringa oleifera como coagulante en la potabilización de las aguas*. Ciencia, 8 (2), 235-242.
- Miller, R.G.; Kopfler, F.C.; Kelty, K.C.; Stober, J.A.; Ulmer, N.S. 1984. *The occurrence of aluminium in drinking water*. J. Am. Water Workers Assoc. 76:84-91.
- Mittal M., Mittal P., Agarwal A.C. (2007). *Pharmacognostical and phytochemical investigation of antidiabetic activity of Moringa oleifera lam leaf*. Ind. Pharm. 6:70-72.
- Moharram F.A., Marzouk M.S., El-Toumy S.A., Ahmed A.A., Aboutabl E.A. (2003). *Polyphenols of Melaleuca quinquenervia leaves pharmacological studies of grandinin*. Phytother. Res. 17:767-773.
- Morton J.F. (1991). *The horseradish tree, Moringa pterygosperma (Moringaceae) A boon to arid lands?* Economic Botany 45: 318-333.
- Muangnoi C., Chingsuwanrote P., Praengamthanachoti P., Svasti S., Tuntipopipat S. (2011). *Moringa oleifera pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide stimulated*. RAW 264.7 murine macrophage cell lines. Inflammation.

- Muñoz R.S., Garcia R.O., Muñoz M.R. 2008. *Evaluación de la Moringa oleifera tropicalizada en Cuba como insumo potencial para el tratamiento de aguas*. Rev. Betsime. La Havana, Cuba.
- Murakami, A. 1998. *Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of Moringa oleifera, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein–Barr virus activation*. Planta Medica. 64:319.
- Neidhardt F.C.1999. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. 2<sup>nd</sup> edition. ASM Press, Washington.
- Nepolean P., Anitha J., Emilin Renitta R. (2009). *Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of Moringa oleifera Lam*. Current Biotica, 3 (1), 33-39.
- Ndabigengesere, A.; Narasiah, S.K.; Talbot, B.G.1995. *Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using Moringa oleifera*. Water Research. 7p.
- Ndong, M., Uehara, M., Katsumata,S., Suzuki, K. J. 2007. *Effects of Oral Administration of Moringa oleifera Lam on Glucose Tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar Rats*. Clin. Biochem. Nutr., 40, 229–233.
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijimam, W., & Okadam, M. (2001). *Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in moringa oleifera seeds*. Elsevier Science Ltd., 35 (3), 830-834.
- Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas*. Revista mexicana de Biodiversidad, 82, 1071-1082.
- Oluduro, O., Aderiye, B., Conolly, J., Akintayo, E., & Famurewa, O. (2010). *Characterization and Antimicrobial Activity of 4-(-D-Glucopyranosyl-1→4--L-rhamnopyranosyloxy) benzylthiocarboxamide; a Novel Bioactive Compound from Moringa oleifera Seed Extract*. Folia Microbiol, 55 (5), 422-426.
- Paiva de Sousa C. 2006. *Escherichia coli as a specialized bacterial pathogen*. Rev. de Biologia e Ciências da Terra Vol 6(2): 2.
- Pal S.K., P.K. Mukherjee, K. Saha, M. Pal and B.P. Saha (1995) *Antimicrobial action of the leaf extract of Moringa oleifera Lam*. Ancient Science of Life 14(3): 197-199.

- Pari L. and N.A. Kumar (2002) *Hepatoprotective activity of Moringa oleifera on antitubercular drug-induced liver damage in rats*. Journal of Medical Foods 5(3): 171-177.
- Parmeter, J.C.; R.T. Sherwood and W.D. Platt.1969. *Anastomosis groups among isolates of Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1270-1278.
- Parmerter, J.R. and Whitney, H.S. (1970) *Taxonomy and nomenclature of the imperfect state*. Rhizoctonia Solani: Biology and Pathology (Parmerter, J.R., ed.), p. 225.
- Parrotta, J. A. (1993). *Moringa oleifera Lam.* 366-370.
- Parrotta J. A. 2003. *Resedá, árbol de rábano, Moringa oleifera Lam. Fruit-bearing forest trees: technical notes*. FAO. For. P 34
- Pérez, A. Tania Sánchez, Nayda Armengol y F. Reyes. 2010. *Características y potencialidades de Moringa oleifera, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal*. Pastos y Forrajes, Vol. 33, No. 4, ISSN 0864-0394.
- Prashith Kekuda, T.R., Mallikarjun, N., Swathi, D., Nayana, K.V., Meera B Aiyar., & Rohini, T.R. (2010) *Antibacterial and Antifungal efficacy of steam distillate of Moringa oleifera Lam.* Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, Vol 2(1), 34-37.
- Price, M.L. 2000. *The Moringa tree. Educational Concerns for Hunger Organization (ECHO). Technical Note. 1985 (revised 2000).* <http://www.echotech.org/technical/technotes/moringabiomasa.pdf>.
- Rahman MM, Rahman MM, Akhter S, Jamal MA, Pandeya DR, Haque MA, Alam MF, Rahman A. 2010. *Control of coliform bacteria detected from diarrhea associated patients by extracts of Moringa oleifera*. Nepal Med Coll J. 12 (1):12-19.
- Ramachandran C., K.V. Peter, and P.K. Gopalakrishnan (1980) *Drumstick (Moringa oleifera): A multipurpose Indian Vegetable*. Economic Botany 34(3): 276-283.
- Rao K.N.V., V. Gopalakrishnan, V. Loganathan, and S. Shanmuganathan (1999) *Antiinflammatory activity of Moringa oleifera Lam.* Ancient Science of Life 18(3-4): 195-198.

- Rodríguez, S. 2002. Una solución para la clarificación de aguas para consumo humano. Noticias Técnicas del Laboratorio. 1: 21.
- Rodríguez-Angeles G. 2002, *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. salud pública de México / vol.44, no.5.
- Ruckmani K., S. Kavimani. (1998) *Effect of Moringa oleifera Lam. on paracetamol-induced hepatotoxicity*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 60(1): 33-35.
- Saadabi A.M., Abu Z.A.I. (2011). *An in vitro antimicrobial activity of Moringa oleifera L. seed extracts against different groups of microorganisms*. Asian J. Basic Appl. Sci. 5:129-134.
- Sánchez-Peña Y.A., Martínez-Avila G.C.G., Sinagawa-García S.R., Vázquez-Rodríguez J.A. 2013. *Moringa oleifera; Importancia, Funcionalidad y Estudios Involucrados*. Volumen 5, No 9 Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. P 25-27.
- Sanghi R., Bhattacharya B. & Singh V. (2002) *Cassia angustifolia seed gum as an effective natural coagulant for decolourisation of dye solutions*. Green Chemistry 4:252–254.
- Scheutz F., Strockbine N.A. 2005. *Genus I. Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2°ed. Springer. USA p 607-624.
- Semarnat. (2008). *Información ambiental de Semarnat*. Recuperado el 6 de Mayo de 2012, de Información de la situación de medio ambiente en México:  
[http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_2008/index\\_informe\\_2008.html](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/index_informe_2008.html).
- Selvakumar D., Natarajan P. (2008). *Hepatoprotective activity of Moringa oleifera Lam. leaves in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats*. Pharmacogn. Mag. 4:97-98.
- Sherwood, R.T. 1969. *Morphology and physiology in four anastomosis groups of Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1924-1929.
- Siddhuraju P., and K. Becker (2003) *Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different*

- agroclimatic origins of drumstick tree (Moringa oleifera Lam.) leaves.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2144-2155.
- Silva Pereira, Luiz Faustino. 2008. *Uso de Moringa oleifera Lam. Como purificador natural de alimentos.* Escola agrotécnica Federal de Uberlândia, Brazil.
  - Singh K.K., and K. Kumar (1999) *Ethnotherapeutics of some medicinal plants used as antipyretic agents among the tribals of India.* Journal of Economic and Taxonomic Botany. 23(1): 135-141.
  - Sneh B.; Burpee L. and Ogoshi A. 1991. *Identification of Rhizoctonia species.* The American Phytopathological Society. p133.
  - Sreelatha S., Padma P. R. 2010. *Protective Mechanisms of Moringa oleifera against CCl4-Induced Oxidative.* Stress in Precision-Cut Liver Slices. FORSCHENDE COMPLEMENTARMEDIZIN -NEW SERIES, 17: 189-194
  - Suárez, M.; Entenza, J.M. & Doerries, C. 2003. *Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities.* Biotechnol. Bioeng. 81:13.
  - Sutar N.G., Bonde C.G., Patil V.V., Narkhede S.B., Patil A.P., Kakade R.T. (2008). *Analgesic activity of seeds of Moringa oleifera Lam.* Int. J. Green Pharm. 2:108-110.
  - Velázquez–Gurrola, A., Angulo–Escalante, M.A., García–Estrada, R.S., Carrillo–Fasio, J.A. y Guerrero–Ontiveros, C. 2005. *Actividad antifúngica de extractos con metabolitos secundarios de semillas de Moringa oleifera para el control de Rhizopus stolonifer.* Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chihuahua, México. Resumen L–40.
  - Vieira, G. H. F., Mourao. J. A., Ângelo. Â. M., Costa. R. A. & Vieira. R. H. S. 2010. *Antibacterial effect (in vitro) of Moringa oleifera & Annona muricata against Gram positive & Gram negative bacteria.* Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 52(3):129-132.
  - Weber, G.F. 1930. *Leafspot of tomato caused by Stemphylium solani sp.* Phytopathol. 20: 513-518.
  - Yin, C.Y. 2010. *Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment.* Process Biochem. 45:1437-1444.

- Zheng, L., Lv, R. J., Hsiang, T., and Huang, J.B. 2009. Host range and phytotoxicity of *Stemphylium solani*, causing leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in China. *Eur. J. Plant Pathol.* 124:21-30.

## Anexos

---

### **1. Actividad fungicida de extracto acuoso de *Moringa oleifera*. *Lam***

Las distancias crecimiento mayor (dc-) y las distancias de crecimiento menores (dc+) de los hongos *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) y *Stemphylium solani* (*S. solani*) fueron medidos para comprobado la estimulación o inhibición de crecimiento de los hongos por extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera*. Se observara posteriormente que a partir de las 72 horas el hongo *R. solani* ha crecido mucho que consumió toda la superficie de los medios de cultivo (incluyendo el extracto acuoso de semillas de *M. oleifera*) de las placas donde está creciendo. Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición de crecimiento de hifas/micelios están representadas en las tablas siguientes:

**Tabla 1: distancias de crecimiento (dc) de los hongos *R. solani* y *S. solani* a las 24 horas de siembra con las distintas diluciones y el control.**

| Dilución      | Replica | <i>R. solani</i> |     | <i>S. solani</i> |     |
|---------------|---------|------------------|-----|------------------|-----|
|               |         | dc-              | dc+ | dc-              | dc+ |
| Extracto puro | R1      | 2,4              | 2,0 | 0,9              | 0,8 |
|               | R2      | 1,9              | 1,9 | 0,9              | 0,9 |
|               | R3      | 1,9              | 1,9 | 0,9              | 0,9 |
|               | R4      | 1,9              | 1,9 | 0,9              | 0,9 |
|               | R5      | 1,9              | 1,9 | 0,9              | 0,9 |
| 1/2           | R1      | 2,9              | 2,9 | 1,1              | 1,1 |
|               | R2      | 2,2              | 2,2 | 0,9              | 1,1 |
|               | R3      | 2,4              | 2,4 | 0,9              | 0,9 |
|               | R4      | 2,6              | 2,6 | 0,9              | 1,1 |
|               | R5      | 2,4              | 2,9 | 0,9              | 0,9 |
| 1/4           | R1      | 2,1              | 2,7 | 0,9              | 0,9 |
|               | R2      | 2,2              | 2,9 | 0,9              | 1,0 |
|               | R3      | 2,0              | 1,9 | 0,9              | 0,9 |
|               | R4      | 2,9              | 2,9 | 1,1              | 1,1 |
|               | R5      | 2,9              | 2,0 | 1,1              | 1,1 |
| 1/8           | R1      | 2,8              | 2,8 | 0,7              | 0,9 |
|               | R2      | 2,2              | 2,1 | 0,8              | 0,9 |
|               | R3      | 2,0              | 2,4 | 0,9              | 1,1 |
|               | R4      | 2,5              | 2,5 | 1,3              | 0,9 |
|               | R5      | 2,9              | 2,4 | 1,1              | 0,9 |
| Control       | R1      | 1,9              | 2,1 | 0,9              | 0,7 |
|               | R2      | 1,9              | 2,5 | 1,0              | 1,0 |
|               | R3      | 2,4              | 2,9 | 0,9              | 1,0 |
|               | R4      | 1,9              | 1,9 | 1,0              | 0,9 |
|               | R5      | 2,3              | 2,3 | 0,9              | 1,0 |

**Tabla 2: distancias de crecimiento de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Stemphylium solani* a las 48 horas de siembra con las distintas diluciones y el control.**

| Dilución      | Replica | <i>R. solani</i> |     | <i>S. solani</i> |     |
|---------------|---------|------------------|-----|------------------|-----|
|               |         | dc-              | dc+ | dc-              | dc+ |
| Extracto puro | R1      | 6,4              | 7,0 | 1,5              | 1,6 |
|               | R2      | 7,2              | 6,5 | 1,5              | 1,7 |
|               | R3      | 6,5              | 7,0 | 1,5              | 1,8 |
|               | R4      | 6,5              | 7,0 | 1,6              | 1,6 |
|               | R5      | 6,8              | 7,0 | 1,5              | 1,8 |
| 1/2           | R1      | 7,0              | 6,5 | 2,0              | 1,9 |
|               | R2      | 7,0              | 6,9 | 1,8              | 1,9 |
|               | R3      | 6,8              | 7,2 | 1,6              | 1,7 |
|               | R4      | 6,3              | 7,0 | 1,8              | 2,0 |
|               | R5      | 7,5              | 6,8 | 1,6              | 1,9 |
| 1/4           | R1      | 6,5              | 6,9 | 1,7              | 1,9 |
|               | R2      | 6,5              | 7,2 | 1,6              | 1,6 |
|               | R3      | 6,4              | 6,5 | 1,9              | 2,1 |
|               | R4      | 6,9              | 6,5 | 1,6              | 1,7 |
|               | R5      | 6,6              | 6,5 | 1,7              | 1,6 |
| 1/8           | R1      | 6,4              | 7,0 | 2,0              | 1,9 |
|               | R2      | 6,9              | 7,0 | 2,1              | 2,0 |
|               | R3      | 6,7              | 7,0 | 1,0              | 1,4 |
|               | R4      | 6,7              | 7,2 | 2,1              | 1,5 |
|               | R5      | 6,8              | 7,4 | 1,5              | 2,1 |
| Control       | R1      | 8,4              | 7,4 | 1,9              | 1,5 |
|               | R2      | 7,9              | 7,7 | 1,3              | 1,3 |
|               | R3      | 7,5              | 7,3 | 1,6              | 1,7 |
|               | R4      | 6,6              | 7,0 | 1,8              | 1,7 |
|               | R5      | 7,1              | 7,4 | 1,1              | 1,6 |

**Tabla 3: distancias de crecimiento del hongo *Stemphylium solani* a las 72 horas de siembra con las distintas diluciones y el control.**

| Dilución      | Replica | <i>S. solani</i> dc- | <i>S. solani</i> dc+ |
|---------------|---------|----------------------|----------------------|
| Extracto puro | R1      | 2,2                  | 2,9                  |
|               | R2      | 2,4                  | 2,4                  |
|               | R3      | 2,2                  | 2,5                  |
|               | R4      | 2,2                  | 2,2                  |
|               | R5      | 2,1                  | 2,6                  |
| 1/2           | R1      | 2,1                  | 2,6                  |
|               | R2      | 2,2                  | 2,3                  |
|               | R3      | 2,1                  | 2,4                  |
|               | R4      | 2,3                  | 2,7                  |
|               | R5      | 2,0                  | 2,3                  |
| 1/4           | R1      | 2,2                  | 2,4                  |
|               | R2      | 1,8                  | 2,0                  |
|               | R3      | 2,7                  | 2,8                  |
|               | R4      | 2,1                  | 2,2                  |
|               | R5      | 2,0                  | 2,0                  |
| 1/8           | R1      | 2,1                  | 2,0                  |
|               | R2      | 2,1                  | 2,0                  |
|               | R3      | 1,3                  | 1,5                  |
|               | R4      | 2,2                  | 1,6                  |
|               | R5      | 1,5                  | 2,3                  |
| Control       | R1      | 3,0                  | 3,0                  |
|               | R2      | 3,0                  | 3,2                  |
|               | R3      | 2,2                  | 2,4                  |
|               | R4      | 2,2                  | 2,0                  |
|               | R5      | 1,8                  | 2,0                  |

**Tabla 4: distancias de crecimiento del hongo *Stemphylium solani* a las 96 horas de siembra con las distintas diluciones y el control.**

| Dilución      | Replica | <i>S. solani</i> dc- | <i>S. solani</i> dc+ |
|---------------|---------|----------------------|----------------------|
| Extracto puro | R1      | 2,5                  | 3,0                  |
|               | R2      | 2,7                  | 3,0                  |
|               | R3      | 2,2                  | 2,7                  |
|               | R4      | 2,0                  | 2,1                  |
|               | R5      | 2,2                  | 2,4                  |
| 1/2           | R1      | 2,5                  | 3,0                  |
|               | R2      | 2,4                  | 2,7                  |
|               | R3      | 2,4                  | 2,6                  |
|               | R4      | 2,1                  | 2,9                  |
|               | R5      | 2,4                  | 2,7                  |
| 1/4           | R1      | 2,2                  | 2,6                  |
|               | R2      | 2,2                  | 2,4                  |
|               | R3      | 2,9                  | 2,9                  |
|               | R4      | 3,0                  | 3,0                  |
|               | R5      | 2,3                  | 2,3                  |
| 1/8           | R1      | 2,2                  | 2,1                  |
|               | R2      | 2,3                  | 2,1                  |
|               | R3      | 1,4                  | 1,6                  |
|               | R4      | 2,3                  | 1,7                  |
|               | R5      | 1,6                  | 2,4                  |
| Control       | R1      | 3,0                  | 3,0                  |
|               | R2      | 3,0                  | 3,0                  |
|               | R3      | 2,5                  | 2,5                  |
|               | R4      | 2,3                  | 2,2                  |
|               | R5      | 2,0                  | 3,0                  |

## 2. Muestra de agua utilizada

En las figuras siguientes se puede observar el estercolero de la estación experimental zootecnia de la UCLV y la muestra de agua tomada en un frasco estéril.



A

B

**Figura 1: A) el estercolero donde se tomó la muestra de agua residual, B) frasco de la muestra de agua residual.**

La figura siguiente (figura 2) nos muestra la placa donde se sembró la muestra de agua residual del estercolero sin dilución. Se puede observar que crecieron una cantidad enorme de microorganismos.



**Figura 2: placa de la siembra del agua residual pura.**