



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**



## **TESIS**

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

Por

**ANGÉLICA CRUZ SOLORIO**

**INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

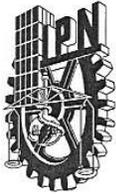
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CEPAS HÍBRIDAS DE  
*Pleurotus spp.***

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO**

**M. en C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR**

**México, D.F. Junio de 2011**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14BIS

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la UPIBI para examinar la tesis titulada:

“Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas híbridas de *Pleurotus spp*”

Presentada por la alumna:

<u>CRUZ</u>	<u>SOLORIO</u>	<u>ANGÉLICA</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	4	7	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Director de tesis

\_\_\_\_\_

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Co-Director de tesis

\_\_\_\_\_

M. en C. María Eugenia Garín Aguilar

\_\_\_\_\_

Dr. Enrique Durán Páramo

\_\_\_\_\_

Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo

\_\_\_\_\_

Dr. Fabián Robles Martínez

**EL PRESIDENTE DEL COLEGIO**

\_\_\_\_\_

Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 24 del mes Junio del año 2011, la que suscribe Angélica Cruz Solorio alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091471 adscrito a la Unidad Profesional Intersdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Gustavo Valencia del Toro y codirección M. en C. María Eugenia Garín Aguilar y cede los derechos del trabajo intitulado "Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas híbridas de *Pleurotus* spp." al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [gvalencia@ipn.mx](mailto:gvalencia@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Angélica Cruz Solorio

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Angélica Cruz Solorio

Vo. Bo.



Dr. Gustavo Valencia del Toro



M. en C. María Eugenia Garín Aguilar

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Cultivos Celulares y Bioconversiones de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Gustavo Valencia del Toro y de la M. en C. María Eugenia Garín Aguilar. El trabajo contó con el apoyo de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del IPN Proyecto 20110977 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Proyecto CB-2008-105683, cuyo responsable es el Dr. Gustavo Valencia del Toro. También se contó con el apoyo parcial del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA FES-Iztacala, UNAM) Proyecto 78; así como del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) Proyecto IN212906-3, cuya responsable es la M. en C. María Eugenia Garín Aguilar.

## RESUMEN

Los basidiomicetos son fuente de productos naturales y ofrecen grandes posibilidades para la obtención de nuevos compuestos biológicamente activos. Debido a biotecnologías eficientes es posible obtener hongos comestibles durante todo el año y proveerles de mejoramiento genético. Estudios previos mostraron que algunas cepas híbridas de *Pleurotus* spp. mantienen o superan la productividad y la actividad antibacteriana de las cepas progenitoras; por lo que en este estudio, a partir de cepas parentales e híbridas obtuvimos extractos y fracciones con actividad antibacteriana que en otro momento permitirán la obtención de fármacos. Se utilizaron 4 cepas parentales de *Pleurotus* spp. y 8 cepas híbridas que fueron cultivadas y cosechadas para obtener extractos hexánicos y metanólicos a partir de los cuerpos fructíferos frescos. El método de difusión en agar de Kirby Bauer se empleó para determinar la actividad antibacteriana de los extractos sobre bacterias Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 123989), *Staphylococcus aureus* aislamiento clínico (CINVESTAV-IPN) y Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13884), *Enterobacter agglomerans* (ATCC 27155), *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* (INDRE B2188) y *Klebsiella rhinoscleromatis*. El método de microdilución en placa se utilizó para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico y de sus fracciones obtenidas por cromatografía en columna. El ANOVA de dos vías indicó que el extracto metanólico de la cepa híbrida PAPO presentó los diámetros de inhibición más grandes (11 a 15 mm) y que las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* fueron los microorganismos más sensibles. La fracción F9 del extracto metanólico de la cepa parental PCM presentó una CMI de 2.3 y 2.65 mg/mL para las cepas de *S. aureus* 1 y 2 respectivamente, mientras que la fracción F28 tuvo valores de CMI=1.75 mg/mL tanto para *S. aureus* 2 como para *K. pneumoniae*. Por otro lado, la CMI de la fracción F4 del extracto metanólico de la cepa parental POS fue de 2.65 mg/mL. El análisis fitoquímico practicado a los extractos metanólicos de las cepas POS, PCM y PAPO reveló la presencia de azúcares reductores, glicósidos cardiacos, sesquiterpenlactonas, esteroles y triterpenos. El análisis fitoquímico de la fracción F28 de la cepa parental PCM, sugiere que esteroles y triterpenos podrían ser los metabolitos con la actividad antimicrobiana observada.

## ABSTRACT

Basidiomycetes are source of natural products and offer great possibilities to obtain new biologically active compounds. Is possible to obtain edible fungi throughout the year due to actual efficient biotechnologies and provide them genetic improvement. Previous research showed that hybrid strains of *Pleurotus* spp. maintain or exceed productivity and antibacterial activity as their progenitor strains. On this basis, at our research we obtained extracts and fractions with antibacterial proprieties from extracts of fruit bodies from parental and hybrid strains. Later, they allowing obtain drugs. Four parental strains and 8 hybrid strains of *Pleurotus* spp. were used, these strains were grown and harvested to obtained methanol and hexane extracts from fresh fruiting bodies. The agar diffusion method of Kirby Bauer was used to determine the antibacterial activity of extracts on Gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 123989), *Staphylococcus aureus* clinical isolate (CINVESTAV-IPN) and Gram-negative: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13 884), *Enterobacter agglomerans* (ATCC 27155), *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* (Indre B2188) and *Klebsiella rhinoscleromatis*. The microdilution plate method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the methanol extracts and their fractions obtained in column chromatography. The two-factor ANOVA indicated that the methanol extract of hybrid strain PAPO presented bigger inhibition diameters (11 to 15 mm) and the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were the most sensitive organisms. The F9 fraction of methanol extract of parental strain PCM presented values of MIC of 2.3 and 2.65 mg/mL for the *S. aureus* 1 and 2 respectively, while F28 methanol fraction was of 1.75 mg/mL for both bacterial strains: *S. aureus* 2 and *Klebsiella pneumoniae*. On the other hand, the MIC of F4 fraction of POS strain methanol extract was 2.65 mg/mL. The phytochemical analysis of methanol extracts of the strains POS, PCM, PAPO revealed presence of reducing sugars, cardiac glycosides, sesquiterpenelactone, sterols and triterpenes. The phytochemical analysis of fraction F28 of the parental strain PCM, suggests that sterols and triterpenes would be the metabolites with the observer antibacterial activity.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Expreso mi agradecimiento al Dr. Gustavo Valencia del Toro por el apoyo, esmero y dedicación en la elaboración de este proyecto, por compartir conocimientos conmigo, por darme la oportunidad de permanecer a un gran equipo de trabajo y por su ayuda en la construcción de este documento. A la M. en C. María Eugenia Garín Aguilar por sus comentarios, apoyo, aportaciones y por el tiempo dedicado a la revisión y mejora de este trabajo.*

*Dedico este trabajo a todas las personas que me acompañaron en el transcurso de mi vida, en especial a mis padres: Ma.de la Luz y David, mis hermanas: Verónica y Rocio, mi novio Gandhi, por apoyarme en los momentos que más necesité, ayudarme y aconsejarme en los momentos más duros. A aquellas personas que me soportaron durante estos años, a quienes con regaños y un poco de afán por verme crecer como persona supieron comprenderme y aquellos que tal vez no me vieron como la mejor pero siempre con un pensamiento de que podría serlo.*

*A mis amigos: Elda, Verenice, Rocio, Gustavo, Alejandra, Blanca, Noemí por compartir sonrisas, lágrimas, desvelos, pero sobre todo una gran amistad.*

*A todos ellos Gracias.*

Ing. Angélica Cruz Solorio

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Género <i>Pleurotus</i>	1
1.2 Importancia de hongos comestibles del género <i>Pleurotus</i>	1
1.2.1 Importancia nutracéutica	2
1.2.2 Importancia farmacológica	3
1.2.3 Uso medicinal de otros hongos superiores	4
1.3 Antibióticos	7
1.3.1 Clasificación y mecanismos de acción de los antibióticos	9
1.3.1.1 Inhibición de la síntesis de los constituyentes de la pared celular	10
1.3.1.2 Alteración del funcionamiento de la membrana citoplasmática	10
1.3.1.3 Inhibición de la síntesis de proteínas y/o de ácidos nucleicos	11
1.3.1.4 Antagonismo metabólico	11

1.3.2 Acción bactericida	12
1.3.3 Resistencia antibacteriana	13
1.3.4 Requerimientos de los antimicrobianos	17
<b>2. ANTECEDENTES</b>	18
2.1 Actividad antibacteriana del género <i>Pleurotus</i>	18
2.2 Metabolitos presentes en el género <i>Pleurotus</i>	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>4. OBJETIVOS</b>	22
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
5.1 Cultivo de cepas parentales e híbridas de <i>Pleurotus</i>	23
5.1.1 Resiembra de cepas <i>Pleurotus</i> spp.	23
5.1.2 Inóculo-grano a partir de micelio crecido en medio sólido	23
5.1.3 Preparación de sustrato	23
5.1.4 Obtención de cuerpos fructíferos	24
5.2 Material biológico	24
5.3 Obtención de los extractos	24
5.3.1 Extracto crudo hexánico y metánolico	25
5.4 Obtención de fracciones a partir del extracto metánolico	25
5.4.1 Cromatografía en columna (cc) y capa fina (cf)	25

5.5 Bioensayo	26
5.5.1 Microorganismos	26
5.5.2 Determinación de halos de inhibición	26
5.5.2.1 Preparación de medio de cultivo	26
5.5.2.2 Actividad antibacteriana	26
5.6 Concentración Mínima Inhibitoria	27
5.7 Análisis Preliminar Fitoquímico de los extractos y fracciones metanólicas	28
5.7.1 Alcaloides	28
5.7.2 Flavonoides	28
5.7.3 Glicósidos Cianogénicos	29
5.7.4 Azúcares Reductores	29
5.7.5 Saponinas	30
5.7.6 Taninos	30
5.7.7 Quinonas	30
5.7.8 Cumarinas	31
5.7.9 Glicósidos Cardiacos	32
5.7.10 Sesquiterpenlactonas	32
5.7.11 Triterpenos y esteroles	32
5.8 Análisis estadístico	33

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	35
6.1 Parámetros de productividad	35
6.1.1 Eficiencia biológica (%EB)	35
6.1.2 Rendimiento (%R)	38
6.1.3 Tasa de producción (%TP)	38
6.2 Rendimientos de los extractos	42
6.3 Pruebas de sensibilidad	44
6.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	51
6.4.1 Extractos metanólicos	51
6.4.2 Fracciones metanólicas	51
6.5 Análisis preliminar fitoquímico	55
<b>7. HALLAZGOS RELEVANTES DE LA INVESTIGACIÓN</b>	62
<b>8. CONCLUSIONES</b>	64
<b>9. PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN</b>	65
<b>10. REFERENCIAS</b>	66

## Índice de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas	9
Figura 2. Mecanismo de acción de antibacterianos	13
Figura 3. Mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos en bacterias Gram positivas	16
Figura 4. Diagrama de bloques del desarrollo experimental	34
Figura 5. Promedio de %Eficiencia biológica de las cepas parentales e híbridas de <i>Pleurotus</i> spp.	37
Figura 6. Promedio de %Rendimiento de las cepas parentales e híbridas de <i>Pleurotus</i> spp.	39
Figura 7. Promedio de %Tasa de Producción de las cepas parentales e híbridas de <i>Pleurotus</i> spp.	40
Figura 8. Cuerpos fructíferos de la cepas parentales e híbridas de <i>Pleurotus</i> spp.	42
Figura 9. Prueba de sensibilidad. Halos de inhibición (mm) de extractos metanólicos de cepas híbridas	46
Figura 10. Formación de grupos de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan. Diámetro de los halos de inhibición analizando el factor bacteria	49

Figura 11. Formación de grupos de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan. Diámetro de los halos de inhibición analizando el factor extracto metánolico de <i>Pleurotus</i> spp.	50
Figura 12. Resultados de la CMI al aplicar de 0.35 a 4mg/mL de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna	53
Figura 13. Pruebas para la presencia de azúcares reductores	56
Figura 14. Prueba de la reacción con hidroximato férrico	57
Figura 15. Resultados para la identificación de glicósidos cardiacos	57
Figura 16. Revelado de placa cromatográfica para la detección de esteroides y triterpenos	58
Figura 17. Revelado de placa cromatográfica para la detección de esteroides y triterpenos de la fracción F28 de la cepa parental PCM	59

## Índice de Cuadros

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Pleurotus</i>	1
Cuadro 2. Mecanismos de resistencia de las bacterias Gram negativas	15
Cuadro 3. Cepas híbridas y parentales del género <i>Pleurotus</i> spp.	24
Cuadro 4. Parámetros de productividad de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	35
Cuadro 5. Rendimiento en porcentaje de los extractos hexánicos y metanólicos obtenidos de la cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	43
Cuadro 6. Diámetro promedio de los halos de inhibición presentados por las bacterias en contacto con los extractos metanólicos de las cepas de <i>Pleurotus</i> spp.	45
Cuadro 7. Resultados de la CMI de extractos metanólicos de <i>Pleurotus</i> spp.	51
Cuadro 8. Resultados de la CMI de fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de <i>Pleurotus</i> spp.	52
Cuadro 9. Análisis preliminar fitoquímico de extractos metanólicos de cepas de <i>Pleurotus</i> spp. que presentaron halos de inhibición	56

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Género *Pleurotus*

Los basidiomicetos comestibles forman cuerpos fructíferos detectables a simple vista llamados basidiocarpos que portan las esporas de origen sexual, éstos se conocen comúnmente como hongos y pueden tener formas muy diversas (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001). El género *Pleurotus* pertenece a la clase de los basidiomicetos, cuya principal característica es la presencia de basidios sobre los cuales se producen las basidiosporas (Herrera y Ulloa, 1998).

Los hongos del género *Pleurotus* son hongos degradadores de materiales lignocelulósicos, por lo que utilizan para su crecimiento residuos tanto agrícolas como agroindustriales (Baena, 2000).

La ubicación taxonómica del género *Pleurotus* se observa en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del género *Pleurotus*

Reino	Fungi
División	<i>Amastigomicotes</i>
Subdivisión	<i>Basidiomicotinas</i>
Clase	<i>Basidiomicetes</i>
Subclase	<i>Holobasidiomecétidas</i>
Familia	<i>Tricholomataceae</i>
Género	<i>Pleurotus</i>

(Tomado de Alexopoulos y Mins, 1985)

### 1.2 Importancia de los hongos comestibles del género *Pleurotus*

Mundialmente se producen alrededor de 7 millones de toneladas de hongos comestibles frescos cultivados por año. México es el mayor productor de Latinoamérica, ya que genera alrededor del 58.9% de la producción total de esa región y se ubica como el 16° productor a nivel mundial. A nivel nacional los

volúmenes de producción ascienden a 47,468 toneladas anuales de hongos frescos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales. En México los hongos comestibles del género *Pleurotus* son conocidos con el nombre comercial de setas. Este tipo de hongos ocupan el segundo lugar en producción en Latinoamérica con el 4.6% (seta blanca, gris y café: 2,190 ton/año), sólo después de *Agaricus bisporus*. Actualmente las setas son cultivadas en 21 estados de México y se observa que el interés por cultivarlos se incrementa no únicamente en este país, sino en la mayoría de los países latinoamericanos, como estrategia de desarrollo económico de producción de un alimento, y de utilización de subproductos agrícolas (Martínez-Carrera y col., 2006).

### **1.2.1 Importancia nutracéutica**

Se define como nutracéutico a cualquier alimento o ingrediente de los alimentos que ejercen acción benéfica en la salud del hombre. El término es adoptado a partir de los que la industria de alimentos califica como alimentos funcionales por tener algún efecto fisiológico que puede beneficiar la salud de quienes los ingieren, un ejemplo claro son los hongos comestibles (Guzmán y col., 2009).

En cuanto a características alimenticias de los hongos del género *Pleurotus* spp. se destaca su sabor, altas cantidades de proteínas, fibra dietética, carbohidratos, minerales (fosforo, hierro, calcio), vitaminas (riboflavina, tiamina, ácido ascórbico y niacina, ácido linoleico, así como bajas concentraciones de grasas (Bautista y col., 1998). Akyuz y Kirbag (2010), determinaron el valor nutricional de dos especies de setas, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm. y *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer, teniendo un intervalo de 0.5 a 1.3 % en peso seco de grasas cruda, de 27.8 a 41.6 % en peso seco de proteína cruda, de 76 a 84% en peso seco de materia orgánica; además, de poseer de 0.2 a 41.2 g/kg en peso seco y 0.63 a 838 g/kg en peso seco de macronutrientes y micronutrientes, respectivamente. Nutricionalmente, en estos

hongos se ha encontrado un contenido de vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B5 (niacina), B6 (piridoxina) y B7 (biotina) (Iwalokun y col., 2007).

Diferentes hongos han sido estudiados por comunidades científicas, en el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas, y los resultados han demostrado sus propiedades bioactivas. Los hongos del género *Pleurotus* no son la excepción; dada la importancia que han adquirido tanto por su valor nutricional como farmacéutico, en la actualidad se habla del término “nutracéutico” para caracterizarlos. Una definición para este tipo de productos aplicada a los hongos es la siguiente: “Productos de hongos puros y/o parcialmente refinados o sin refinar, procedentes de cuerpos fructíferos, micelio de hongos o del medio de cultivo filtrado después del crecimiento micelial en cultivo sumergido. Que poseen propiedades nutricionales y/o promueven la salud, y se consumen en forma de cápsulas o comprimidos como un suplemento dietético” (Chang y Buswell, 1996, citado en: Valencia del Toro y Garín, 2011 en prensa). Los hongos comestibles son ricas fuentes de nutracéuticos responsables de propiedades antitumorales, antioxidantes y antimicrobiales (Barros y col., 2008).

### **1.2.2 Importancia farmacológica**

Varias especies de *Pleurotus* han demostrado poseer propiedades medicinales, las cuales se presentan en los extractos o compuestos aislados de *Pleurotus* spp, en el medio de cultivo obtenido por fermentación, en su micelio o en los cuerpos fructíferos (Gregori y col., 2007).

En los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* se encontró un inhibidor competitivo de la enzima 3- hidroxil - 3 metil - glutonnil coenzima A reductasa, que baja el colesterol de la sangre (Cardona, 2001). Un marcado efecto hipocolesterolémico de *P. ostreatus*, junto con la inhibición de la peroxidación lipídica, se demostró en ratas y conejos, debido a una dieta de este hongo (10% cuerpos fructíferos secos) que redujo significativamente la incidencia y el tamaño de las placas de ateroma en conejos (Lindesquist y col., 2005).

Se ha reportado que 16 fracciones de polisacáridos aislados de *P. pulmonarius* tienen diferentes niveles de actividad antitumoral (Wasser, 2002) y el consumo de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* en ratas, protege de ciertos efectos anticancerígenos y disminuye la toxicidad de la ciclofosfamida (Lindesquist y col., 2005).

Por otra parte, los componentes de *P. ostreatus* como 3-octanona, 3-octanol, 1-octanol, benzaldehído, ácido benzoico, *p*-anisaldehído y otros compuestos solubles en cloroformo y las ribonucleasas de *Pleurotus sajor-caju* muestran actividad antimicrobiana contra varias bacterias y hongos (Santoyo y col., 2009). Además se ha reportado que un extracto metánolico del cuerpo fructífero reduce la inducción de carragenina y la inducción de la formalina mediante experimentos *in vivo* con ratones (Lindesquist y col., 2005).

Badole y col., 2008 sugieren que *P. pulmonarius* puede utilizarse como un antioxidante natural, debido a que se demostró mediante un experimento *in vitro*, que el extracto acuoso de este hongo presenta una fuerte actividad antioxidante en 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), también se mostró su potencial antioxidante contra el radical hidroxilo y óxido nítrico.

### **1.2.3 Uso medicinal de otros hongos superiores**

Actualmente, el uso de los macromicetos con fines medicinales se ha extendido alrededor del mundo; en el Oriente países como Corea, China y Japón, así mismo, en Rusia, Estados Unidos y Canadá han incorporado estos hongos en el tratamiento de diversas enfermedades, debido a que se han descubierto notables propiedades medicinales en estos organismos (González y col., 2009). Los hongos comestibles son una fuente importante de moléculas bioactivas, compuestos o fracciones específicas son extraídas para producir antibióticos o drogas farmacéuticas, para la preparación de suplementos alimenticios o para diseñar alimentos funcionales (Santoyo y col., 2009).

Un número de hongos medicinales como *Aleurodiscus*, *Coprinus*, *Clitocybe*, *Daedalea*, *Marasmius*, *Merulius*, *Polyporus*, *Poria*, *Psathyrella* y *Tricholoma* spp son fuentes ricas de  $\beta$ -glucanos, proteoglucanos, lectinas, compuestos fenólicos, flavonoides, polisacáridos, triterpenoides, fibra dietética, esteroides, glicopéptidos, terpenos, saponinas, xantonas, curaminas, alcaloides, purinas, purimidinas, ribonucleasas (Akyuz y Kirbag, 2009).

Los cuerpos fructíferos y el micelio de diversos hongos contienen compuestos con actividad antimicrobial, las cuales son fuentes ricas de antibióticos naturales donde los glucanos de la pared celular son bien conocidos por sus propiedades inmunomodulatorias, y algunos de sus metabolitos secundarios combaten contra bacterias, hongos y virus (Akyuz y Kirbag, 2009). La producción de compuestos antimicrobianos por los hongos, no es muy usual, pero se debe a que ellos los necesitan para competir contra una bacteria u otro microorganismo para colonizar el sustrato o sobrevivir en su ambiente natural (Santoyo y col., 2009). Algunos ejemplos de estos compuestos antimicrobianos son:

- *Lentinula edodes* contiene compuestos como lentionina, bi[[metilsulfonil]metil]disulfido y otros componentes no identificados con actividad antimicrobiana (Santoyo y col., 2009). Se ha reportado que el ácido oxálico y la lentinamicina de este mismo género son los responsables del efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* y otras bacterias (Tambekar y col., 2006).
- Compuestos como Lentinan de *L. edodes*, Schizophyllan de *Schizophyllum commune*, dos compuestos denominados PSK “Krestin” y PSP (polisacáridos con unión a un componente de una proteína) de *Trametes versicolor* y una fracción MD de *Grifola frondosa* tienen uso clínico, principalmente en la inmunoterapia (Lindesquist y col., 2005).
- Schizophyllan activa macrófagos (*in vitro* e *in vivo*), lo que resulta en el aumento de las actividades de las células T y aumenta la sensibilidad de las

células citotóxicas activadas LAK (limphokine-activated killer cells) y las células citotóxicas naturales NK (natural killer) a la Interleucina 2 (Wasser, 2002).

- Se identificó una fracción presente en el micelio y en el cuerpo fructífero del hongo comestible *Grifola frondosa* con actividad antitumoral al estimular a los macrófagos. Esta fracción, se denominó Fracción D y está constituida por una mezcla de proteínas y polisacáridos con una cadena principal de  $\alpha$ -D-(1-6)-glucano con ramificaciones de  $\alpha$ -D-(1-3)-glucano. Recientemente se ha aislado un nuevo polisacárido de *G. frondosa*, denominado GFPS1b, que también presenta actividad antitumoral sobre células cancerígenas in vitro (Illana-Esteban, 2008).
- Algunos esteroides aislados de *Ganoderma applanatum* proveen actividad contra un número de bacterias Gram positivas y negativas (Fan y col., 2006).
- Algunos compuestos extraídos de *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Coprinus comatus* y *Oudemansiella mucida* han reportado tener propiedades antifúngicas y antibacteriales (Rai y col., 2005).
- *Flammulina velutipes* sintetiza sesquiterpenoides contra *Cladosporium herbarum*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Santoyo y col., 2009).
- Algunos extractos de *Agaricus bisporus* y otras especies de este género muestran actividad *Staphylococcus saprophyticus* (Tambekar y col., 2006).
- *Agaricus blazei* contiene algunos componentes, los cuales activan los macrófagos contribuyendo a la respuesta inmune in vitro; por otro lado, los polisacáridos de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*, incrementan los niveles de interleucinas y del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) con respecto a cultivo de células no tratadas (Wang y col., 1997, citado en: Valencia del Toro y Garín, 2011 en prensa).
- En una cepa de *Cyathus striatus* fueron encontrados tres componentes (antibióticos cristalinos) durante el crecimiento micelial, los cuales

presentaron una alta actividad contra bacterias Gram positivas y hongos imperfectos (Shittu y col., 2005).

- Clitocibina, un antibiótico extraído del micelio de *Leucopaxillus giganteus* y un péptido producido por *Boletus sp* ambos exhiben actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas (Santoyo y col., 2009).
- El ácido glucuronoxilomanan (de conformación helicoidal) aislado del cuerpo fructífero de *Tremella fuciformis* demostró actividad antitumoral (Wasser, 2002).
- *Hericium erinaceus* muestra una fuerte actividad antimicrobiana contra un amplio rango de agentes infecciosos (Rai y col., 2005).
- Farmacológicamente los polisacáridos de *Poria cocos* tienen actividad inmunomoduladora y anticancerígena, los cuales podrían ser una alternativa en terapias contra el cáncer, ya que *in vitro* han demostrado tener una potente actividad antisupresora en células leucémicas humana (Illana-Esteban, 2009).

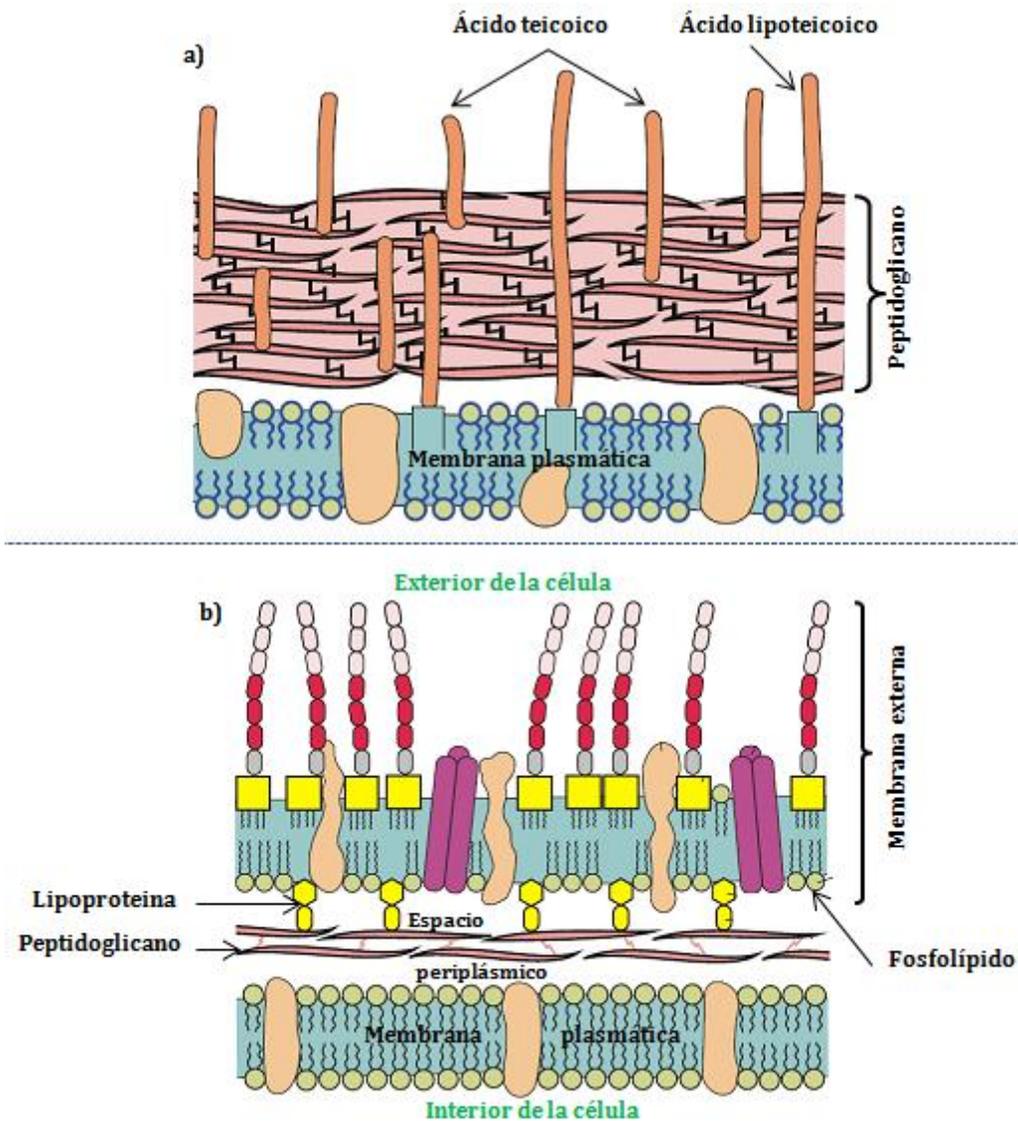
### **1.3 Antibióticos**

Los antimicrobianos incluyen los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como, los generados totalmente en el laboratorio. Un agente antimicrobiano debe cumplir tres condiciones como mínimo: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped (Paredes y Roca, 2004). Dentro de los compuestos antimicrobianos se ubican los antibióticos, estos compuestos son generalmente activos sólo contra bacterias y no contra hongos, protozoos o virus: Los antibióticos actúan contra fisiologías o rutas bioquímicas que son específicas para las bacterias. Otros organismos, tales como hongos (levaduras) y protozoos tienen rutas bioquímicas diferentes a la de las bacterias y, como consecuencia, los antibióticos no funcionan en contra de ellos.

Algunos antibióticos son activos contra ciertos tipos de bacterias: existe una gran diversidad entre las bacterias, y ellas no comparten todas las rutas fisiológicas ni bioquímicas. Por lo tanto, no todos los antibióticos son activos contra todas las bacterias. Por ejemplo, la penicilina actúa en la pared celular de las bacterias inhibiendo el crecimiento de las mismas. Las micobacterias, que son la causa de la tuberculosis, no tienen la misma estructura de la pared celular como otras bacterias, y la penicilina no afectará el crecimiento de las micobacterias porque no hay objetivo para su acción.

La pared celular de las micobacterias es un ejemplo específico de propiedades que hacen que algunas bacterias sean intrínsecamente resistentes a uno o más antibióticos. Las bacterias se clasifican como Gram positivas o Gram negativas debido a que difieren en la composición de su pared celular, ver Figura 1. Algunos antibióticos son efectivos frente a sólo las bacterias Gram positivas, algunos sólo son eficaces contra bacterias Gram negativas, y los que afectan ambos tipos de bacterias se conocen como antibióticos de amplio espectro siendo eficaces contra ambos.

Algunas bacterias crecen en biopelículas que no pueden ser fácilmente penetradas por los antibióticos: Las biopelículas son poblaciones bacterianas múltiples incrustadas en una película que se une a una cierta superficie. Algunos ejemplos de bacterias que crecen en biopelículas son las del sarro dental, cuales causan la caries dentales (Herdman, 1995).



**Figura 1.** Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivas (a) y Gram negativas (b). (Modificada de [microbiol.udc.es/microgen/images/Pared\\_bact.pdf](http://microbiol.udc.es/microgen/images/Pared_bact.pdf))

### 1.3.1 Clasificación y mecanismos de acción de los antibióticos

En la práctica diaria, las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, es decir, según su mecanismo de acción y de acuerdo al efecto que ejercen sobre la bacteria (Cordiés y col., 1998). La acción de un antibiótico se mide en términos de espectro de acción sobre las bacterias. Se observa que algunos antibióticos actúan en un sector restringido (grupos selectos de microorganismos), por esta razón se les denomina de espectro limitado. Cuando

actúan contra un mayor número de bacterias se les denomina de amplio espectro y cuando lo hacen en un solo grupo de bacterias se les llama de espectro selectivo (Patiño, 2003). En la Figura 2 se presentan los principales mecanismos de acción de los antimicrobianos que pueden clasificarse como:

#### **1.3.1.1 Inhibición de la síntesis de los constituyentes de la pared celular**

Los antibióticos actúan inhibiendo cualquiera de los tres mecanismos de la biosíntesis de la pared celular (Nuñez, 2008):

**a.** Inhibición de la fase citoplasmática.- Actúan en el citoplasma bacteriano inhibiendo la síntesis de los precursores del pentapéptido N- acetilmurámico. En este proceso actúa la fosfomicina, la daptomicina, y la cicloserina.

**b.** Inhibición de la fase de transporte de precursores.- Actúan dentro de la membrana citoplasmática impidiendo la d-fosforilación de sus precursores. La bacitracina es uno de los antibióticos que actúan en esta fase.

**c.** Inhibición de la organización estructural del péptidoglicano.- Mediante este mecanismo se bloquea selectivamente la transferencia del polímero lineal a la pared celular existente, interfiriendo la organización estructural definitiva del péptidoglicano, evitando su polimerización al ligarse a las proteínas fijadoras de Penicilina, como lo hacen todos los beta-lactámicos. En tanto que los glucopéptidos evitan la polimerización del péptidoglicano en la proximidad de la membrana citoplasmática bacteriana.

#### **1.3.1.2 Alteración del funcionamiento de la membrana citoplasmática**

La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio extracelular de la bacteria. Esta membrana tiene una estructura particular en las bacterias y puede lesionarse por algunos antibióticos (Patiño, 2003). Los antibióticos de este grupo tienen efecto bactericida, pero no debe olvidarse que tienen gran toxicidad sobre las

células eucarióticas. Actúan con diversos mecanismos sobre la membrana citoplasmática bacteriana, los cuales se describen a continuación:

**a. Ionóforos.**- La tirocidina que pertenece a este grupo actúa incorporando iones y transportándolos a través de la membrana creando una elevada penetración de iones de  $K^+$  con el consecuente potencial eléctrico y el gradiente químico que altera la funcionalidad bacteriana.

**b. Formadores de Poros.**- Los antibióticos de este grupo, como la gramicidina, provocan el paso selectivo de moléculas a través del canal abierto por los mismos (antibióticos).

**c. Desestructuración de la membrana citoplasmática.**- La daptomicina ejerce un efecto sobre la membrana que determina una pérdida de iones  $K^+$  intracelular. Activo contra Gram+, se une a la membrana bacteriana causando despolarización y conduciendo a inhibición rápida de síntesis de proteínas, ADN y ARN.

### **1.3.1.3 Inhibición de la síntesis de proteínas y/o de ácidos nucleicos**

Los antibióticos impiden que las bacterias sinteticen las proteínas que son indispensables para su supervivencia (Patiño, 2003). La unidad funcional de la síntesis de proteína en las bacterias es el ribosoma 70S, compuesto por dos subunidades, 30S y 50S, esto explicaría por qué los fármacos antimicrobianos pueden inhibir la síntesis en los ribosomas bacterianos, sin tener efecto en los ribosomas de los mamíferos (Paredes y Roca, 2004).

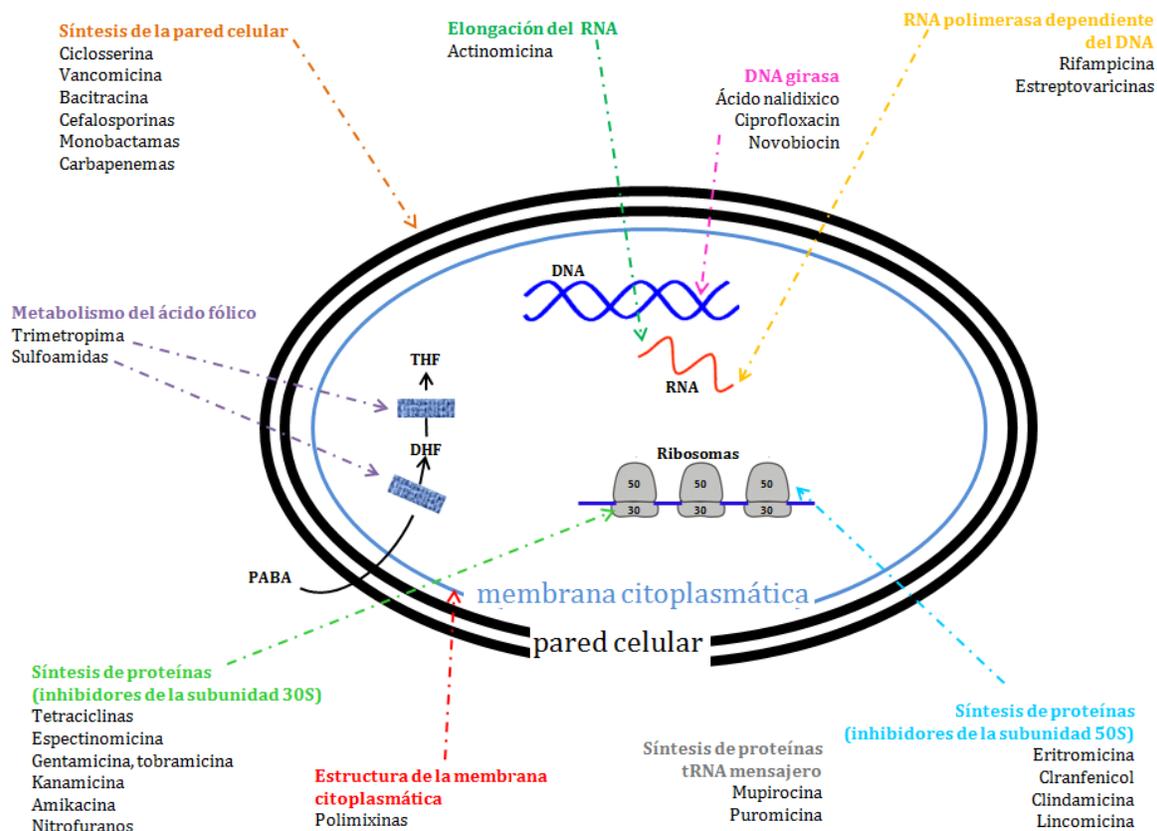
### **1.3.1.4 Antagonismo metabólico (inhibición de la síntesis de ácido fólico)**

Las sulfamidas inhiben la incorporación del PABA para la formación del ácido fólico, de aquí su efecto antibacteriano selectivo. Las diaminopirimidinas inhiben la hidrofólicoreductasa e impiden el paso de ácido fólico a folínico (paso necesario para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas (Paredes y Roca, 2004).

### **1.3.2 Acción bactericida**

La importancia de los antibióticos bactericidas (aquellos que matan las bacterias) frente a los antibióticos bacteriostáticos (que inhiben el crecimiento de bacterias) en el tratamiento de infecciones se ha debatido durante muchos años (Finberg y col., 2004). La actividad bactericida no es una propiedad invariable de un antibiótico, sino que puede depender del organismo y las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* no es eliminada por los inhibidores de la síntesis de proteínas, el cloranfenicol y la eritromicina, que son clásicos agentes bacteriostáticos y que se dirigen directamente a los ribosomas bacterianos. *Streptococcus pneumoniae*, por el contrario, es un organismo intrínsecamente muy susceptible, es fácilmente eliminado por estos y otros antibióticos que son bacteriostáticos contra especies de bacterias más resistentes. Como la mayoría de las bacterias, *S. aureus* y *S. pneumoniae* son eliminados por los inhibidores de la pared celular, la penicilina y vancomicina, así como las fluoroquinolonas, que son clásicos agentes bactericidas. Sin embargo, estos agentes *in vitro* no producen un 99,9% de eliminación de los enterococos dentro de un plazo de 24 horas, y se le considera por lo tanto a ser bacteriostático contra este organismo.

Las condiciones de crecimiento también afectan la actividad bactericida de agentes. Muchos antibióticos, y especialmente el beta-lactámicos, requieren que las células estén en crecimiento y en división celular para tener una acción bactericida. Además, el lento crecimiento afecta la actividad bactericida. Las condiciones en el hospedero en el sitio de infección que no favorecen el crecimiento o el bajo crecimiento de la bacteria se negaran a la acción bactericida de un antibiótico. Por lo tanto, si un efecto bactericida o bacteriostático se logra puede variar dependiendo no sólo en los antibióticos, sino también el organismo y condiciones de crecimiento (Chambers, 2003).



**Figura 2.** Mecanismo de acción de antibacterianos: THF: Tetrahidrofolato; DHF: Dihidrofolato (Modificada de Madigan y col., 2006).

### 1.3.3 Resistencia antibacteriana

En los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido la resistencia a estos como un problema de consecuencias impredecibles, sobre todo por la aparición en las bacterias, virus, hongos y protozoarios de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de estas sustancias (Fernández-Riverón y col., 2003). La resistencia bacteriana, es la capacidad natural o adquirida de una bacteria de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico (Greca ,2000).

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de células diana para un antibiótico. La

resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la transmitible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Daza-Pérez, 1998). Las mutaciones pueden ser sólo cambios microevolutivos, es decir que comprometen un par de nucleótidos en la estructura del DNA, mientras que los macroevolutivos involucran grandes segmentos del mismo incluyendo inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones y transposiciones (Greca, 2000).

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. De esta forma son inhibidos los aminoglicósidos, el cloranfenicol por la acetil transferasa, y el caso más típico, el de las beta-lactamasas, para el grupo de los betalactámicos. En años recientes la aparición de beta lactamasas de amplio espectro que incluyen a las antibetalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), dificulta el uso de estos antibióticos tan utilizados. Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Becerra y col., 2009).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por

distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Daza-Pérez, 1998).

Un ejemplo claro, es la publicación de una noticia (Kelland, 2011), en donde se menciona que un equipo de científicos de Alemania se encuentran analizando diferentes muestras de alimentos debido a que se desconoce el origen del reciente brote letal de la bacteria *Escherichia coli*, ya que ha traído como consecuencia una alta infección y a su vez la muerte de personas, hasta el momento, ha sido imposible hallar la fuente del problema.

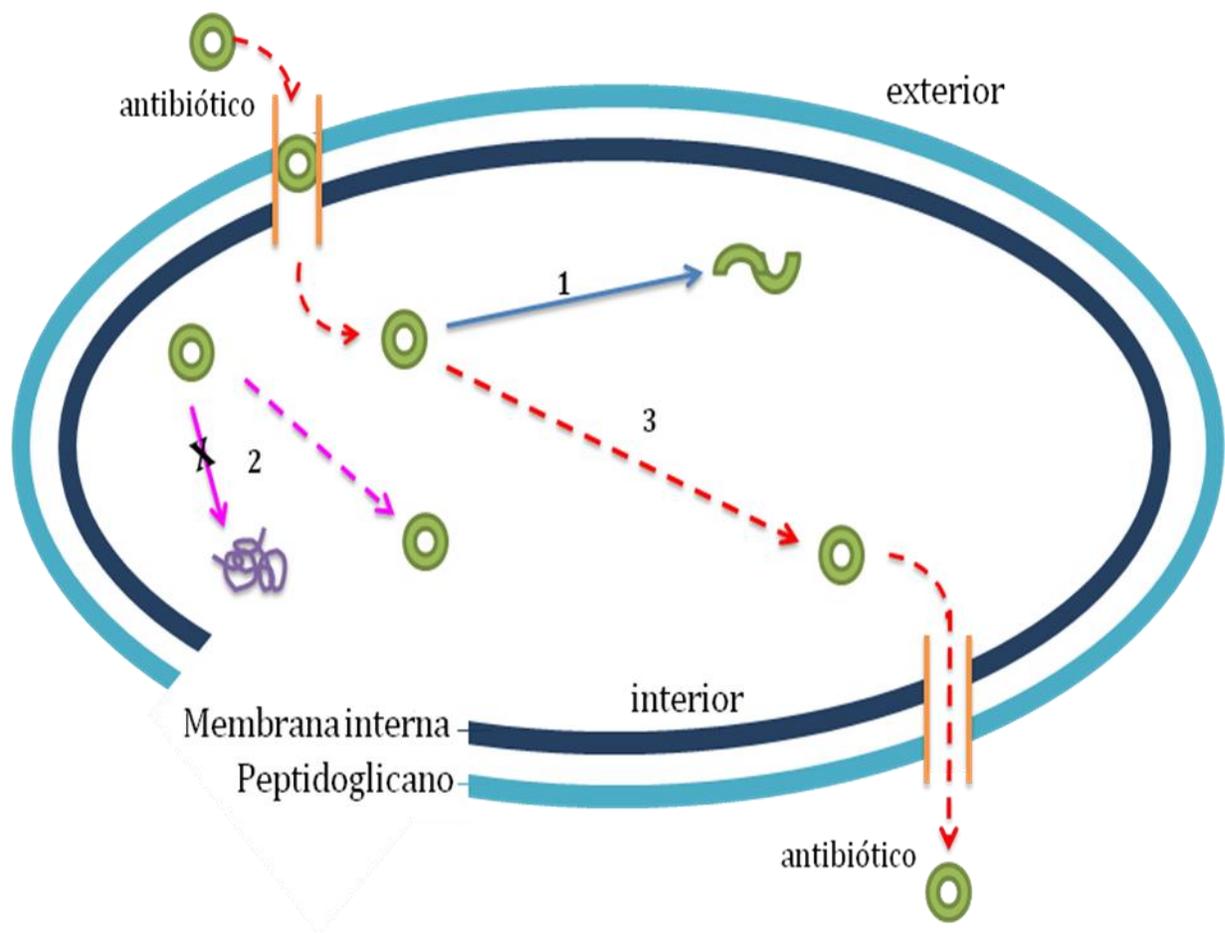
Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica. Estos mecanismos de resistencia terapéutica podrían resumirse en cuatro categorías mostradas en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Mecanismos de resistencia de las bacterias Gram negativas (Tafur y col., 2008).

Modificación enzimática del antibiótico	Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad.
Bombas de expulsión	Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su estado de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas.
Cambios en la permeabilidad de la membrana externa	Las bacterias pueden generar cambios de la capa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente por cambios en las porinas.
Alteraciones del sitio de acción	Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas.

En el caso de las bacterias Gram positivas, en la Figura 3 se esquematizan los principales mecanismos de resistencia, los cuales son (Sierra y Vila, 2007):

- La inactivación del agente antimicrobiano, ya sea mediante su hidrólisis o su modificación.
- La reducción de la sensibilidad de la diana frente al antimicrobiano, mediante la modificación de la diana del antibiótico, sin que esta pierda su actividad funcional.
- Los sistemas de expulsión, capaces de sacar al fármaco del interior celular.



**Figura 3.** Mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos en bacterias Gram positivas: 1) hidrólisis o modificación del antibiótico; 2) cambio conformacional en la proteína diana; 3) sobreexpresión de sistemas de expulsión activa (Modificado de Sierra y Vila, 2007).

#### **1.3.4 Requerimientos de los antimicrobianos**

A continuación se enlistan las condiciones que debe de cubrir un antimicrobiano para su función (Toro, 2008):

- Especificidad: espectro unión a un sitio específico de la bacteria
- Potencia biológica: concentración del antibiótico capaz de ejercer la acción específica
- Toxicidad selectiva: actividad máxima sobre el microorganismo sin afectar la célula hospedera
- Buena distribución tisular: no todos los antibióticos tiene la misma llegada a todos los sitios de excreción
- Estables, de bajo costo y fáciles de administrar

Es importante mencionar los requerimientos que debe cubrir un antimicrobiano, debido a que en un futuro el propósito de esta investigación es obtener biofármacos con propiedades antibacterianas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Actividad antibacteriana del género *Pleurotus*

En el año de 1997, Beltran-García y col. identificaron compuestos volátiles del cuerpo fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, los cuales tienen por nombre 1-3-octanol, 3-octanol, octanol, 3-octanona y 2 octanona. Estos compuestos volátiles presentaron actividad antimicrobiana contra diversas bacterias tales como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, teniendo un intervalo de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 3.9 a 1000 µg/g.

Se ha reportado que extractos metanólicos extraídos del caldo de fermentación de *Pleurotus eryngii*, no presentaron actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Micobacterium smegmatis*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, pero presentaron ligeros halos de inhibición de las bacterias *Enterococcus faecium* y *Aspergillus fumigatus*, seguidos de *B. subtilis* con halos de inhibición menores de 15 mm y por último *Staphylococcus aureus* con halo de inhibición mayor e igual a 15 mm (Suay y col., 2000).

Por otro lado, Tambekar y col. (2006) trabajaron con la especie de *Pleurotus sajor caju*, del cual obtuvieron extractos acuosos y de diferentes solventes orgánicos (etanol, metanol, xileno, éter, benceno y acetona), en donde se mostró que las bacterias *Escherichia coli* 390, *Escherichia coli* 739, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* mostraron más sensibilidad a los extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y xilenos en un intervalo de 12 a 20 mm en el diámetro de los halos de inhibición; indicando que este género provee de antibióticos naturales para combatir a microorganismos patógenos.

En el 2007, Iwalokun y colaboradores examinaron las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de extractos de acetona y éter de *Pleurotus ostreatus*. El estudio

evidenció actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y algunos hongos aislados como *Candida albicans* ATCC 1880, *Candida* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*, presentándose diámetros de halos de inhibición menores a 10 mm y la CMI osciló entre 65 a 100 mg/mL contra los microorganismos estudiados. Este autor reveló que los extractos utilizados contienen un nivel moderado de terpenoides, taninos, glicósidos esteroidales y carbohidratos. Ese mismo año, Gdologade y col. reportaron la actividad antibacteriana de los extractos crudos y purificados de *P. florida* y de *P. tuber-regium*, donde halos de inhibición de diámetros menores de 19 mm se presentaron en *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. Por otro lado, las dos especies fúngicas presentaron un intervalo de CMI de 5 a 7.75 mg/mL.

Rahman y col. (2009) trabajaron con el extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* (Jacquin ex Fr.), el cual mostró efecto contra microorganismos patógenos (entre ellos: *Klebsiella* sp. y *Staphylococcus* sp.) usando medio Mc Conkey. En cambio, la actividad antimicrobiana del extracto de alcohol metílico obtenido del medio de cultivo de *P. eryngii* var. *ferulae* mostró inhibir el crecimiento de algunas bacterias y que el diámetro de esta inhibición osciló entre 7.7 a 13 mm. Las bacterias estudiadas fueron *B. megaterium*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Trichophyton* spp., y *Epidermophyton* spp. (Akyuz y Kirbag, 2009).

Valencia del Toro y col. (2008) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cuatro cepas de *Pleurotus djamor*, dos de ellas variedad blanca IE200 e IE2001 y dos más variedad rosa ECS127R y RP, en bacterias Gram positivas: *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *K. Enterobacter agglomerans*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigela dysenteriae* y *Klebsiella rhinoscleromatis*. Estos microorganismos desarrollaron halos de inhibición con diámetros de 12 a 25.6 mm (variedad blanca) y de 8.3 a 22.6 mm (variedad rosa). Los autores también reportaron que una cepa híbrida de *Pleurotus* spp. SAUA (SEC1xUAP9<sub>1</sub>) provocó halos de inhibición contra las bacterias antes mencionadas, donde *Y. enterocolitica* presentó los

mayores halos de inhibición, en cambio, *K. pneumoniae* presentó los más pequeños y la CMI fue de 0.75 mg/mL para la bacteria *S. aureus* 1 (Valencia-del Toro y col., 2011, en prensa).

## **2.2 Metabolitos presentes en el género Pleurotus**

Bermúdez y col., (2002) determinaron mediante cromatografía en capa delgada la presencia de dos micoesteroles, los cuales son ergosterol y peróxido de ergosterol, en extractos de cloroformo-metanol de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. Por otro lado, Jagadish y col., (2008) reportaron mediante una evaluación fitoquímica la presencia de diferentes compuestos: flavonoides totales (0.86, 1.03 y 0.94 µg/mg), fenólicos (6, 7.5 y 6.7 µg/mg) en los extractos etanólicos de *Pleurotus florida*, *Pleurotus sajor caju* y *Pleurotus auerovillosus*, respectivamente; también se mostró que estas especies fúngicas contienen terpenoides, taninos, glicósidos esteroidales y carbohidratos.

Chidinma y Chigozie (2008) trabajaron con el género *Pleurotus tuber-regium*, en donde lograron identificar que esta especie es rica en flavonoides y taninos, moderadamente rica en alcaloides y altamente rica en fitatos. Un año más tarde, Ijeh y col. (2009) evaluó fitoquímicamente el cuerpo fructífero de este mismo género, reportando un rendimiento de 2.19 g/100g de saponinas, 0.32 g/100g de alcaloides, 2.84 g/100g de flavonoides y un 14.14 g/100g de oligosacaridos.

Extractos hexánicos y metanólicos de cepas parentales (POS, PCM, SEC y UAP9) e híbridas (PAPO, UBPO, SAUA, SAUB) de *Pleurotus* spp. presentaron sesquiterpenlactonas, glicósidos cardiacos y azúcares reductores (Valencia-del Toro y col., 2011, en prensa).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La creciente demanda de productos farmacéuticos de origen natural ha obligado a intensificar la investigación en cuanto al descubrimiento y desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades. En este sentido, la obtención de metabolitos secundarios producidos por algunos organismos se ha convertido en una de estas alternativas. Otra alternativa la conforman los basidiomicetos, debido a que son fuentes de productos naturales y ofrecen grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras biológicamente activas.

Las biotecnologías en la producción de hongos comestibles son cada vez más eficientes, por lo que es posible obtener estos macromicetos durante todo el año sin necesidad de esperar la época de lluvias para recolectarlos y proveerles de mejoramiento genético.

Estudios previos realizados en el laboratorio mostraron que algunas cepas híbridas de *Pleurotus* spp. superan o mantienen la misma productividad y actividad antibacteriana de las cepas progenitoras que les dieron origen; por lo que en este estudio cepas parentales e híbridas se cultivaron con el propósito de obtener a partir de extractos de carpóforos de estas cepas, las fracciones que presenten propiedades antibacterianas que posteriormente permitan la obtención de biofármacos.

## 4. OBJETIVOS

### General

- Evaluar la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas durante la cromatografía en columna, a partir de extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.*

### Específicos

- Generar el inóculo-grano o “semilla” y producir cuerpos fructíferos de las cepas parentales e híbridas.
- Obtener extractos metanólicos y hexánicos de los cuerpos fructíferos de las cepas.
- Separar mediante cromatografía en columna las fracciones metanólicas de los extractos de los cuerpos fructíferos de las cepas parentales e híbridas y de *Pleurotus spp.*
- Determinar los halos de inhibición en bacterias patógenas producidos por los extractos obtenidos de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.*
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos y de las fracciones metanólicas de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.*

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para lograr los objetivos planteados la parte experimental tuvo las siguientes etapas:

### **5.1 Cultivo de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus***

#### **5.1.1 Resiembra de cepas *Pleurotus spp.***

Se sembraron trozos de micelio en medio sólido EMA (extracto de malta y agar bacteriológico SIGMA) que se incubaron a 28°C con una duración de 8 días y con una revisión diaria. Para cada cepa se realizaron 8 replicas.

#### **5.1.2 Inóculo-grano a partir de micelio crecido en medio sólido**

Para obtener el inóculo grano se utilizó trigo perfectamente lavado, remojado a temperatura ambiente durante 24 horas y drenado para eliminar el exceso de agua, del cual se colocaron 150 g de trigo en bolsas de polipapel para su esterilización en autoclave Presto a 121°C y a una presión de 15 lb durante 20 minutos. Después de ser esterilizado y enfriado a temperatura ambiente, se inocularon con trozos de micelio, en cantidades equivalentes para cada una de las cepas. Las bolsas inoculadas se incubaron en una cámara oscura a 28°C hasta la invasión total por el micelio.

#### **5.1.3 Preparación del sustrato**

El sustrato que se empleó fue la paja de trigo, el cual se cortó en trozos de 2-4 cm de longitud aproximadamente, se sumergió en un recipiente con agua durante 24 horas para hidratarla a una temperatura ambiente con su paso posterior de eliminar el exceso de agua. A continuación se empacó en bolsas de 1 kg de polipapel, se pasteurizó con vapor por 2 horas.

#### 5.1.4 Obtención de cuerpos fructíferos

El sustrato estéril y frío fue inoculado en condiciones de esterilidad con el inóculo-grano (aproximadamente 5 g inóculo-grano/100g de sustrato húmedo). Las bolsas fueron comprimidos y sellados, en este caso se realizaron 10 replicas de cada cepa.

Las bolsas se incubaron a 28°C, al haber transcurrido 5 días se perforaron para permitir el intercambio gaseoso manteniéndose en incubación hasta que el micelio invadió todo el sustrato. En el tiempo de incubación se llevaron a cabo observaciones periódicas. Al evidenciarse la formación de primordios, se quitaron las cubiertas de plástico a los empaques que posteriormente se llevaron a una cámara de fructificación con una humedad de 85-95% HR, una ventilación de 0.5% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 15 a 30°C, y luz por 12 h/día con el objetivo de inducir la formación de los cuerpos fructíferos. Al pasar una semana aproximadamente y antes de que ocurra del proceso de esporulación, se cortaron los cuerpos fructíferos desde la base.

#### 5.2 Material biológico

En el Cuadro 3 se presentan las 8 cepas híbridas y 4 cepas parentales de hongos del género *Pleurotus spp.* que se utilizaron en este estudio.

**Cuadro 3.** Cepas híbridas y parentales del género *Pleurotus spp.*

Parentales	Híbrido	Clave
POS	PCM <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub>	PAPO
SEC	PCM <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub>	PAUA
PCM	PCM <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>2</sub>	PAUB
UAP <sub>9</sub>	SEC <sub>1</sub> x PCM <sub>1</sub>	SAPA
	SEC <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub>	SAPO
	SEC <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub>	SAUA
	SEC <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>2</sub>	SAUB
	UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub>	UAPO

### **5.3 Obtención de los extractos**

Recién cosechados los cuerpos fructíferos de las cepas parentales e híbridas, se cortaron y se deshidrataron a temperatura ambiente por 48 horas, una vez deshidratados se molieron para la obtención de los extractos hexánicos y metanólicos.

#### **5.3.1 Extracto crudo hexánico y metanólico**

El hongo molido (100 g) se extrajo por 24 horas en un equipo Soxhlet utilizando 150 mL de hexano. El extracto crudo hexánico se obtuvo retirando el exceso de disolvente usando un rotavapor Büchi 461 Brinkmann. Ahora, la muestra desengrasada contenida en el cartucho, se sometió nuevamente a reflujo por 24 horas usando metanol como disolvente. El extracto crudo metanólico se obtuvo retirando a presión reducida el exceso de disolvente. Los extractos crudos se conservaron en refrigeración hasta antes de realizar el bioensayo y la obtención de fracciones por cromatografía en columna.

### **5.4 Obtención de fracciones a partir del extracto metanólico**

#### **5.4.1 Cromatografía en columna (cc) y capa fina (cf)**

El extracto metanólico se pasó por una cromatografía en columna para la obtención de fracciones metabólicas. La cromatografía en columna se desarrolló teniendo como fase estacionaria: sílica gel 60 (con una altura de 15 cm aproximadamente), como fase móvil un sistema binario diclorometano-metanol a diferentes proporciones (desde 100:00 hasta 50:50) y una columna de 35 cm de altura y un diámetro interno de 2.8 cm. Se realizaron de manera independiente, cromatografías en columna colocando 1.5 g de extracto metanólico de las cepas parentales POS y PCM y de la cepa híbrida PCM<sub>1</sub>xPOS<sub>1</sub> (PAPO). El volumen de elusión fue de 300 mL para coleccionar muestras de 10 mL. Se realizaron cromatografías en capa fina (utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>) y las fracciones que presentaron R<sub>f</sub> similares, se juntaron, etiquetaron y una vez evaporado el disolvente se pesaron. Las fracciones metanólicas

obtenidas con las proporciones diclorometano-metanol de 50:50, 60:40, 70:30 y 80:20 fueron las más abundantes y por lo tanto, con ellas se determinó la CMI.

## **5.5 Bioensayo**

### **5.5.1 Microorganismos**

Para la determinación de la actividad antibacteriana y de la CMI se utilizaron cepas bacterianas Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, denominada *S. aureus*<sub>1</sub> y un aislamiento clínico, denominado *S. aureus*<sub>2</sub> y bacterias Gram negativas: *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Shigella dysenteriae* INDRE B2188, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Yersinia enterocolitica* y *K. pneumoniae* ATCC 13884. Las bacterias en la que no se indicó número de colección fueron donadas por el laboratorio de Microbiología de las FES-Cuautitlán, UNAM. Todas las cepas bacterianas y fúngicas trabajadas se encuentran depositadas en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la UPIBI, IPN.

### **5.5.2 Determinación de halos de inhibición**

#### **5.5.2.1 Preparación de medio de cultivo**

Para esta evaluación se utilizó Agar nutritivo (AN) y Agar Muller-Hilton (MH), los cuales se esterilizaron en autoclave Presto a 121°C y a una presión de 15 lb durante 20 minutos. Los medios de cultivo se colocaron en cajas de Petri (9 cm de diámetro) en condiciones de esterilidad, al gelificarse se incubaron a 28°C durante 72 horas.

#### **5.5.2.2 Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana se evaluó con el Método de difusión en agar en disco Kirby-Bauer (Bailey y Finegold, 1991; Koneman y col., 1999). Como primer paso se inocularon con una suspensión celular cuya turbidez se igualó con la del tubo 0.5 de la

escala de turbidez de McFarland (equivalente a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) las cajas de Petri con medio MH.

Una vez inoculadas las cajas, se colocaron sensidiscos (6mm de diámetro y estériles) impregnados con 20  $\mu$ L de cada uno de los extractos de los hongos. Utilizando como control positivo un sensidisco con 15  $\mu$ g de cloranfenicol y como control negativo sólo con los solventes utilizados. Se incubaron las cajas a 35°C alrededor de 18 h. El diámetro de los halos de inhibición se midió en milímetros incluyendo el diámetro del disco.

Cada prueba se realizó por triplicado y los datos fueron analizados con ANOVA de uno y dos factores para detectar diferencias entre los halos obtenidos por los extractos de las cepas híbridas de *Pleurotus*, así como, entre el efecto inhibitorio provocado en las bacterias utilizadas. Para identificar diferencias estadísticas entre extractos hexánicos y/o bacterias se utilizó la prueba, a posteriori, de comparación de medias de Duncan.

### **5.6 Concentración Mínima Inhibitoria**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) se prepararon ocho concentraciones 0.75, 1.5, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0, 12.0 mg/mL del extracto crudo metanólico de las cepas POS, PCM y PAPO, y se prepararon concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 1.65, 2.3, 2.65, 3.3 y 4 mg/mL para las fracciones más abundantes: F28 de PCM; F4 de POS; F7, F9 y F15 de PAPO. Posteriormente, en los pozos de una placa de ELISA se colocaron 50 $\mu$ L de cada una de estas soluciones y se les adicionaron 50  $\mu$ L de caldo Muller Hinton llevando un inóculo bacteriano equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Las placas se incubaron por 18-24 h y transcurrido este tiempo, se adicionó a cada pozo 50  $\mu$ L de violeta de tetrazolio y las cajas se incubaron por 30 minutos más. La presencia de crecimiento bacteriano se observó por la formación de un botón morado, en el fondo del microtubo (Bailey y Finegold, 1991). La CMI correspondió a la concentración de los pozos que no presentaron crecimiento bacteriano.

## **5.7 Análisis Preliminar Fitoquímico de los extractos y fracciones metanólicas**

En los extractos y fracciones de las cepas parentales PCM y POS, además de su respectivo híbrido PAPO (PCM<sub>1</sub>xPOS<sub>1</sub>), se realizó el análisis preliminar fitoquímico (Moore y Darlrymple, 1976; Pavia y Lampman, 1988; Ávila y col. 2001; Valencia del Toro y Garín, 2010), para determinar de manera cualitativa la presencia los siguientes metabolitos secundarios.

### **5.7.1 Alcaloides**

En un tubo de ensaye se colocaron 5 mL de extracto y se adicionaron 5 mL de ácido clorhídrico al 10%, el tubo se calentó a ebullición por cinco minutos, se enfrió y filtró. Después el filtrado se dividió en tres tubos de ensaye (2.5 mL aproximadamente), uno de los cuales se utilizó como testigo.

Tubo 1. Se adicionó una gota del reactivo Dragendorff, la prueba se considera positiva si se forma un precipitado naranja.

Tubo 2. Se adicionó una gota del reactivo Sonneschain, la prueba se considera positiva si se forma un precipitado naranja.

### **5.7.2 Flavonoides**

Se disolvieron en un tubo de ensaye 0.5 mL del extracto con 2mL de etanol absoluto y el volumen final se dividió en tres tubos para realizar las siguientes pruebas. Uno de ellos fue el testigo.

*Reacción de Shinoda.-* Al adicionar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se observó si ocurría algún cambio de coloración. Una coloración roja indicó presencia de auronas o chalconas. En caso de no haber cambio, se colocó un trozo de magnesio metálico; una coloración naranja a rojo, indicó la presencia de flavonas; rojo flavonoles y si fue magenta flavononas.

*Reacción de hidróxido de sodio al 10%.-* A otro tubo se le adicionaron 3 gotas de hidróxido de sodio al 10%. Una coloración amarillo-rojo indicó la presencia de santonas y flavonas; café a naranja de flavonoles; púrpura a rojizo la presencia de chalconas y azul presencia de antocianinas.

### **5.7.3 Glicósidos Cianogénicos**

En un tubo de ensaye con 0.5 mL de extracto, se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico al 10% y 1 mL de cloroformo. Se calentó el tubo en baño de María colocando en la boca del tubo una tira de papel filtro impregnado con reactivo de Grignard. La formación de una mancha rosa a rojo indicó prueba positiva.

### **5.7.4 Azúcares Reductores**

Se tomaron 2 mL del extracto, midiendo el pH y adicionando hidróxido de sodio al 10% (si es necesario) hasta tener un pH de 11. Se dividió el extracto en dos tubos de ensaye para las siguientes pruebas:

*Reacción de Fehling.-* Se adicionaron 0.5 mL de solución Fehling A y 0.5 mL de solución Fehling B y 1 mL de agua destilada.

*Reacción de Benedict.-* Se adicionaron 0.5 mL de reactivo Benedict y 1 mL de agua destilada.

Se preparó un blanco para cada tubo. Se colocaron los cuatro tubos en baño de María por 15 minutos. Cuando hubo azúcares presentes en los tubos que contenían el extracto se formó un precipitado de color naranja a rojo.

### **5.7.5 Saponinas**

Reacción de Rosenthaler.- Se concentró otra porción del extracto, adicionando dos gotas del reactivo de Rosenthaler y se estratificó con dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una coloración violeta, se consideró positiva para saponinas triterpenoides.

### **5.7.6 Taninos**

A un tubo de ensaye que contenía 1 mL del extracto se le adicionaron 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%, se calentó a ebullición por un minuto, se enfrió y filtró. El filtrado se dividió en cuatro tubos de ensaye, el cuarto tubo se utilizó como testigo.

Reacción con gelatina.- Al primer tubo se le adicionaron 2 gotas del reactivo de gelatina. La prueba se consideró positiva si se formó un precipitado blanco.

Reacción de cloruro férrico.- Al segundo tubo se le adicionó una gota de cloruro férrico al 1%, la formación de coloraciones de azul a negro indicó la presencia de derivados del ácido gálico y coloraciones verdes de derivados del catecol.

Reacción de ferricianuro de potasio.- En dado caso de haber obtenido una prueba negativa, al segundo tubo se le agregó una gota de ferricianuro de potasio al 1%. La formación de una coloración azul, indicó la presencia de compuestos fenólicos.

### **5.7.7 Quinonas**

En una cápsula de porcelana se colocaron 2 mL del extracto y se concentró a sequedad, posterior a ello se dividió el extracto siruposo en tres porciones, para realizar las siguientes pruebas en una placa horadada.

Reacción de hidróxido de amonio.- Se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se consideró positiva la prueba para antraquinonas si apareció de una coloración roja que en los dos primeros minutos.

Reacción con ácido sulfúrico.- Se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción del extracto. La formación de una coloración roja indicó la presencia de antraquinonas.

Reacción de Börntrager. Se diluyó una porción del extracto en un tubo de ensaye, con 3 mL de agua destilada, se filtró y al líquido filtrado, se le añadieron 3 mL de hidróxido de potasio al 5% y se calentó a ebullición por 3 minutos, una vez enfriando se realizó una extracción con 3 mL de cloroformo. Se eliminó la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le adicionaron 2mL de hidróxido de potasio al 5%. Un color rojo indicó la presencia de benzoquinonas; si fue amarillo verdoso, se le adicionó 1 gota de peróxido de hidrógeno al 6%. Si la coloración cambió a roja, se consideró positiva para derivados de antrona.

### **5.7.8 Cumarinas**

Reacción de Erlich.- Se colocaron 0.5 mL de cada uno de los extractos en una placa horadada de porcelana después de ser concentrados, se agregaron dos gotas de Reactivo Erlich y una gota de ácido clorhídrico concentrado. La coloración naranja indicó presencia de cumarinas.

Reacción con hidróxido de amonio.- Se concentró otra porción del extracto y se le adicionaron 0.5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado en una placa horadada. Se considera positiva la prueba para cumarinas si se presentó una fluorescencia azul-violeta.

### **5.7.9 Glicósidos Cardiacos**

Se transfirieron 2 mL del extracto a una cápsula de porcelana y se concentró a la tercera parte de su volumen original. Se dividió en tres porciones en una placa de porcelana horadada.

Reacción de Legal.- Se dejó evaporar el disolvente y se adicionaron 2 ó 3 gotas de piridina, se agregó una gota de nitroprusiato de sodio al 5% y 4 gotas de hidróxido de potasio. Una coloración roja poco estable indicó la presencia de glicósidos cardiacos.

Reacción de Baljet.- Se adicionaron 3 gotas del reactivo Baljet. Una coloración de naranja a rojo oscuro indicó presencia de glicósidos cardiacos.

### **5.7.10 Sesquiterpenlactonas**

Reacción con hidroximato férrico.- Se agregó una porción del extracto a una cápsula de porcelana, se le adicionaron dos gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2 N y una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Se calentó la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, se enfrió y se llevó a pH de 1 con ácido clorhídrico 0.5 N. Se adicionó una gota de cloruro férrico 1%. Las coloraciones roja, violeta o rosa indicaron que la prueba es positiva para este metabolito.

### **5.7.11 Triterpenos y esteroides**

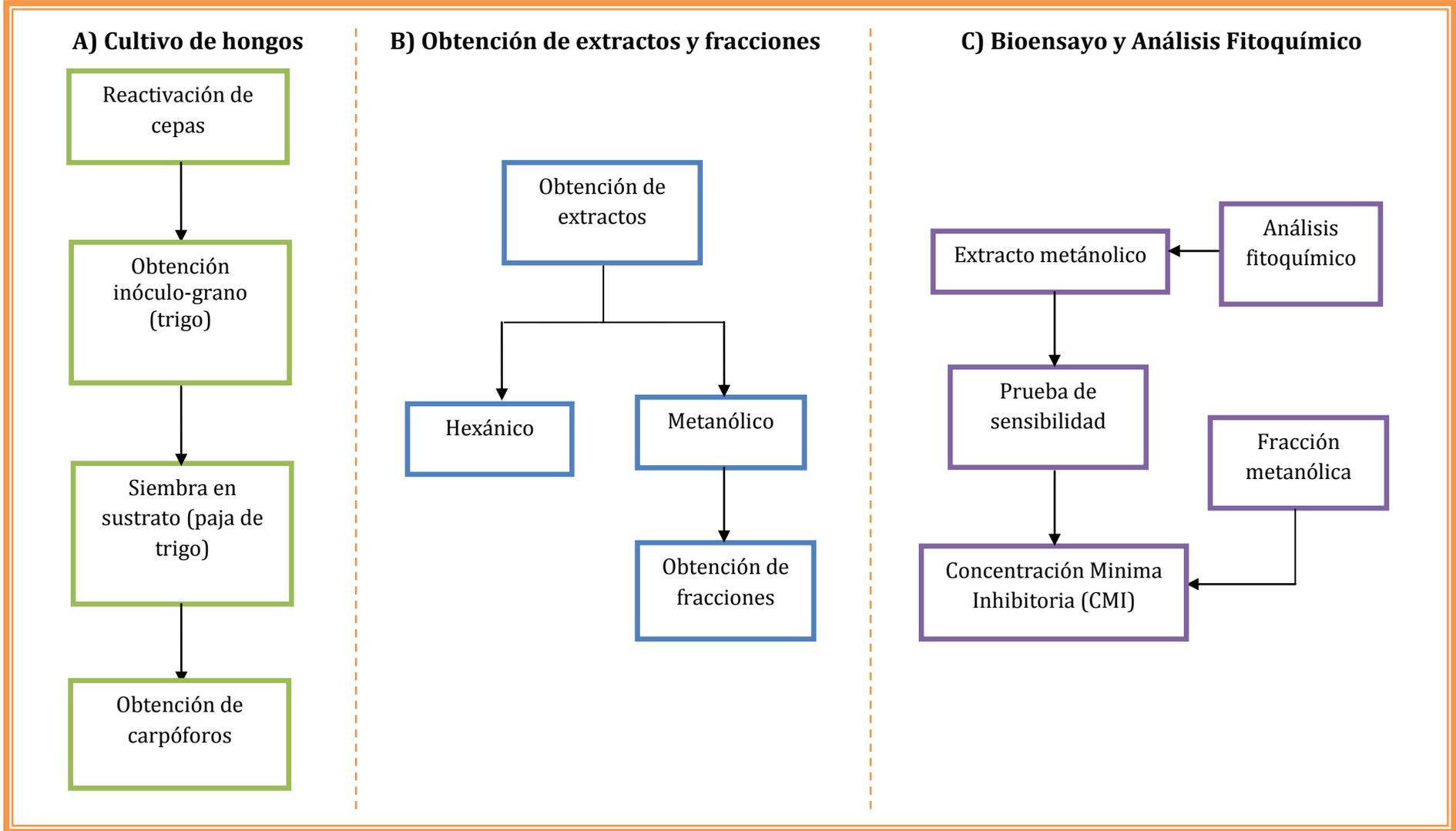
La reacción fue llevada a cabo en un placa cromatográfica de sílica gel 60 F<sub>254</sub> asperjando el Reactivo de Lieberman Bouchard, el cual contiene 1 mL de anhídrido acético, 1 mL de ácido sulfúrico (97%) y 10 mL de etanol absoluto, una vez que se corrieron nuestras muestras de los extractos metanólicos con un sistema terciario etanol:agua:acetato de etilo (4:2:4).

En la Figura 4 se muestra un diagrama de bloques de la metodología seguida para el desarrollo del proyecto, teniendo en primera fase el cultivo de hongos de *Pleurotus*

spp. (A), seguido de la obtención de extractos hexánicos y metanólicos y fracciones metanólicas (B) y por último, la realización de un bioensayo de las fracciones y extractos metanólicas y a la vez un análisis preliminar fitoquímico de dichos extractos (C).

### **5.8 Análisis estadístico**

Para evaluar la productividad de las cepas híbridas y parentales, se utilizó un ANOVA de una vía para comparar los parámetros %EB, %TP y %R de cada una de las cepas y así como para determinar las diferencias estadísticas entre los halos de inhibición provocados por los extractos metanólicos; como prueba a posteriori se utilizó el análisis de Duncan. También se realizó un ANOVA de dos vías considerando el factor bacteria y factor hongo, con prueba a posteriori de Duncan. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS para Windows ver. 15.0.



**Figura 4.** Diagrama de bloques del desarrollo experimental

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Parámetros de productividad

Los parámetros de productividad tales como eficiencia biológica (%EB), rendimiento (%R) y tasa de producción (%TP) de las cepas de *Pleurotus* spp. cultivadas se presentan en el Cuadro 4, los cuales fueron determinados en la primera cosecha de hongos frescos.

**Cuadro 4.** Parámetros de productividad de cepas de *Pleurotus* spp.

<b>Parámetros de productividad</b>			
<b>CEPA</b>	<b>%EB ± ESM</b>	<b>%R ± ESM</b>	<b>%TP ± ESM</b>
<b>Parental</b>			
POS	72.89 ± 6.62	7.29 ± 0.66	2.29 ± 0.22
SEC	69.99 ± 2.20	7.00 ± 0.22	2.33 ± 0.09
UAP <sub>9</sub>	98.69 ± 7.00	9.87 ± 0.70	3.48 ± 0.34
PCM	61.99 ± 7.36	6.20 ± 0.74	1.94 ± 0.23
<b>Híbrido</b>			
PAUA (PCM <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub> )	58.67 ± 3.58	5.87 ± 0.36	2.10 ± 0.13
PAUB (PCM <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>2</sub> )	97.72 ± 10.65	9.77 ± 1.07	3.20 ± 0.35
PAPU (PCM <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub> )	76.90 ± 7.96	7.69 ± 0.80	3.66 ± 0.38
UAPO (UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub> )	95.44 ± 10.35	9.54 ± 1.03	3.13 ± 0.34
SAUA (SEC <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub> )	68.94 ± 7.33	6.89 ± 0.73	2.46 ± 0.26
SAUB (SEC <sub>1</sub> x UAP <sub>9</sub> <sub>2</sub> )	60.06 ± 5.19	6.01 ± 0.52	1.77 ± 0.15
SAPA (SEC <sub>1</sub> x PCM <sub>1</sub> )	64.89 ± 10.77	6.49 ± 1.08	2.60 ± 0.43
SAPO (SEC <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub> )	52.60 ± 3.92	5.26 ± 0.39	1.72 ± 0.13

Nota: se presenta el promedio de 3 repeticiones ± el error estándar de la media (ESM)

#### 6.1.1 Eficiencia biológica (%EB)

Con los datos de %EB se elaboró la Figura 5, donde se muestra que este parámetro de productividad oscila entre un 52.6 a 98.7 %. El ANOVA aplicado indicó la presencia de diferencias significativas ( $F_{(12,119)} = 4.94, p=0.0001$ ) y la prueba post hoc de Duncan formó tres grupos. En el grupo “c” se encuentran las cepas PAUB, UAPO, UAP<sub>9</sub> que presentaron mayor %EB (95.44-98.69%); en el grupo “b” se ubican las cepas PAPO y

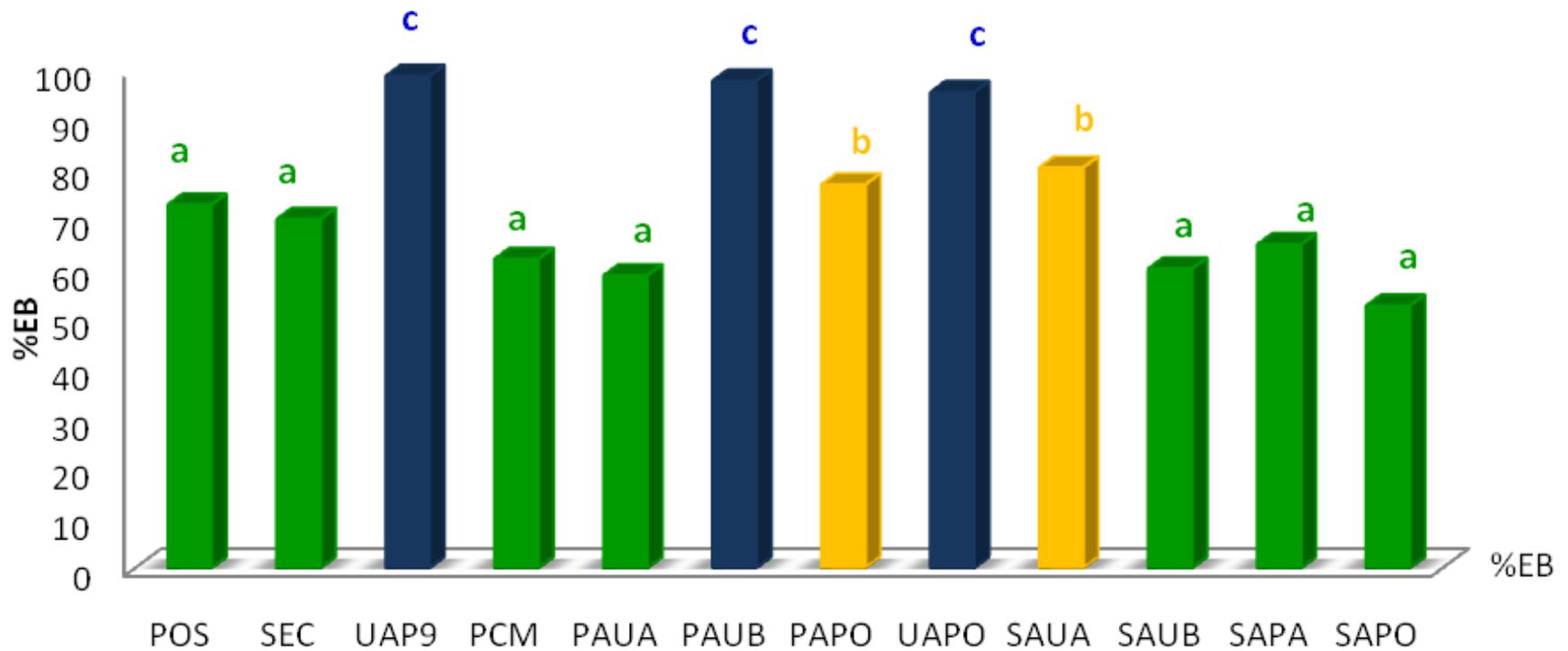
SAUA de %EB intermedio (68.94-76.90%) y finalmente el grupo “a” con las cepas SEC, PCM, PAUA, SAUB y SAPO que tuvieron los valores de %EB más bajos (52.60-69.99%).

Los datos muestran que la cepa parental UAP9 presentó la mayor %EB (98.7%) así como las cepas híbridas PAUB ( $PCM_1 \times UAP9_2$ ) con el 97.72% y UAPO ( $UAP9_1 \times POS_1$ ) con el 95.44%, cepas generadas a partir de la cepa parental UAP9.

Valencia del Toro y col. (2011 en prensa) reportaron para cepas parentales (POS, SEC, PCM y UAP9) e híbridas (SAUA, SAUB, PAPO Y UBPO) de *Pleurotus* spp. valores de eficiencia biológica con un intervalo de 30 a 51% en la primera cosecha. Por otro lado, Romero (2010) reportó diferentes %EB dependiendo del sustrato que utilizó (hoja de plátano, pajilla de frijol, paja de cebada y rastrojo de maíz); usando paja de trigo *P. ostreatus* presentó 129 %EB para las primeras tres cosechas. En otro estudio, Salmones y col. (2004) usando como sustrato la paja de cebada inoculada con “semilla” de sorgo, encontraron que entre la 3ra y 5ta cosecha, el %EB de las cepas híbridas (73.6 a 114.4%) de *P. djamor* (Fr.) Boedijn superaron el %EB de las cepas parentales (53.6 a 86.4%).

Ya ha sido señalado que los parámetros de productividad dependen de las características del sustrato que se utiliza y de las circunstancias en el que el proceso de crecimiento se lleva a cabo (Melo de Carvalho y col., 2010), esto puede explicar las diferencias en el %EB que se presentaron con el trabajo de Romero (2010). Por otro lado, los resultados de %EB obtenidos en este estudio con cepas parentales e híbridas se encuentran entre los datos promedio que reportan Salmones y col. (2004), quienes trabajaron con cepas parentales e híbridas de *P. djamor*.

## % EFICIENCIA BIOLÓGICA (%EB)



**Figura 5.** Promedio de %Eficiencia biológica de las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus* spp., letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan,  $p < 0.05$ ),  $n=3$ .

### **6.1.2 Rendimiento (%R)**

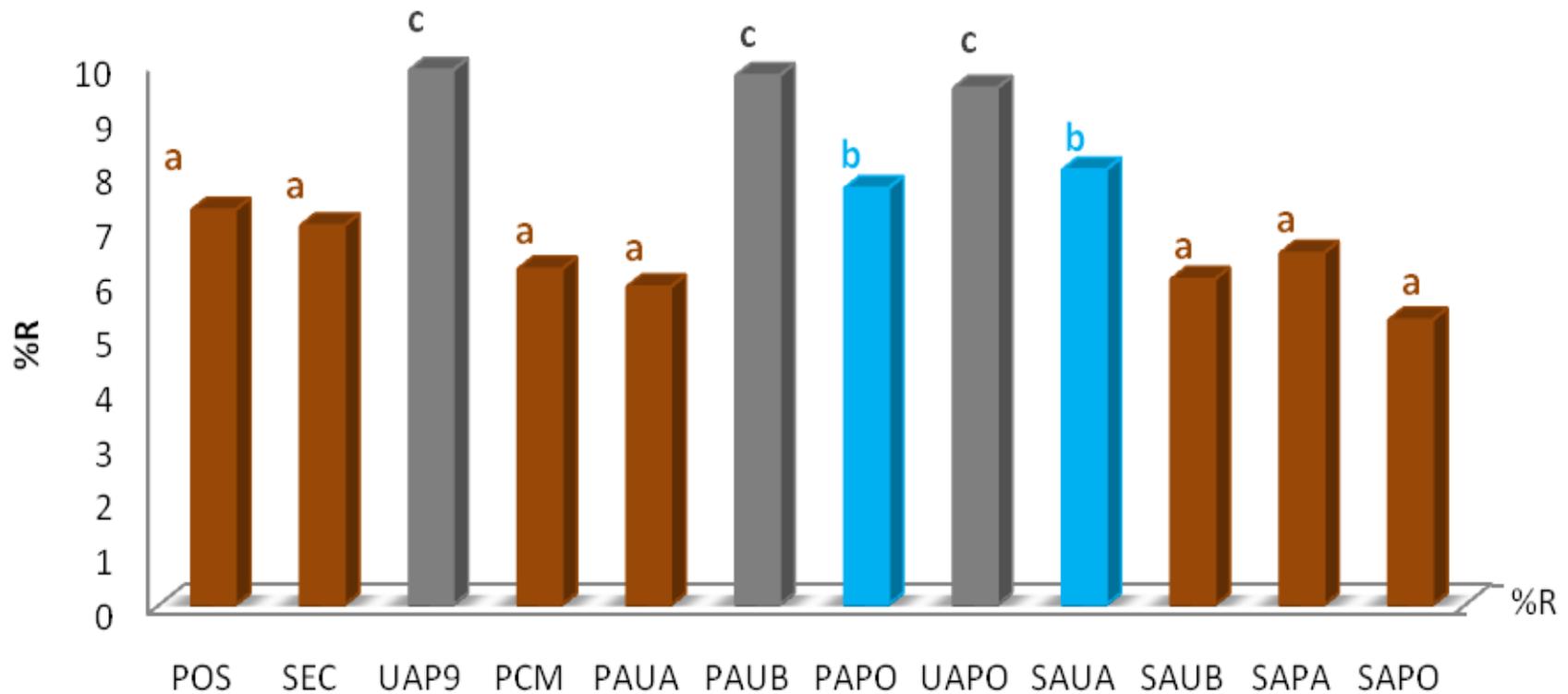
Para el parámetro de productividad definido como porcentaje de rendimiento (%R), se toma en cuenta la producción de hongos frescos con respecto a la cantidad de sustrato húmedo utilizado. Los valores para este parámetro obtenidos por las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.* se encuentran entre 5.26 - 9.87%. El ANOVA de una vía aplicada a los valores de rendimiento indicó que se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $F_{(12,119)} = 4.94$ ,  $p=0.0001$ ) y la prueba de Duncan formó tres grupos. El grupo "c" que mostró los rendimientos más altos esta conformado por la cepa parental UAP9 (9.87 %) y las cepas híbridas PAUB ( $PCM_1 \times UAP9_2$ ) y UAPO ( $UAP9_1 \times POS_1$ ) con valores de 9.77 % y 9.54 % respectivamente (Figura 6). Estos datos son consistentes con reportes previos en el laboratorio, donde se indicó un %R de 6 - 11.8% para las mismas cepas parentales e híbridas (Cruz, 2009).

### **6.1.3 Tasa de producción (%TP)**

La tasa de producción es la relación del %EB entre el ciclo de producción, donde el ciclo de producción se refiere al número de días transcurridos desde la inoculación del sustrato hasta obtención del total de la primera cosecha de cuerpos fructíferos. Este parámetro de productividad considera el tiempo que las cepas tardan en fructificar, (ya que cada cepa tiene su propio ciclo de crecimiento) por lo que es un parámetro importante para la caracterización de cepas productivas.

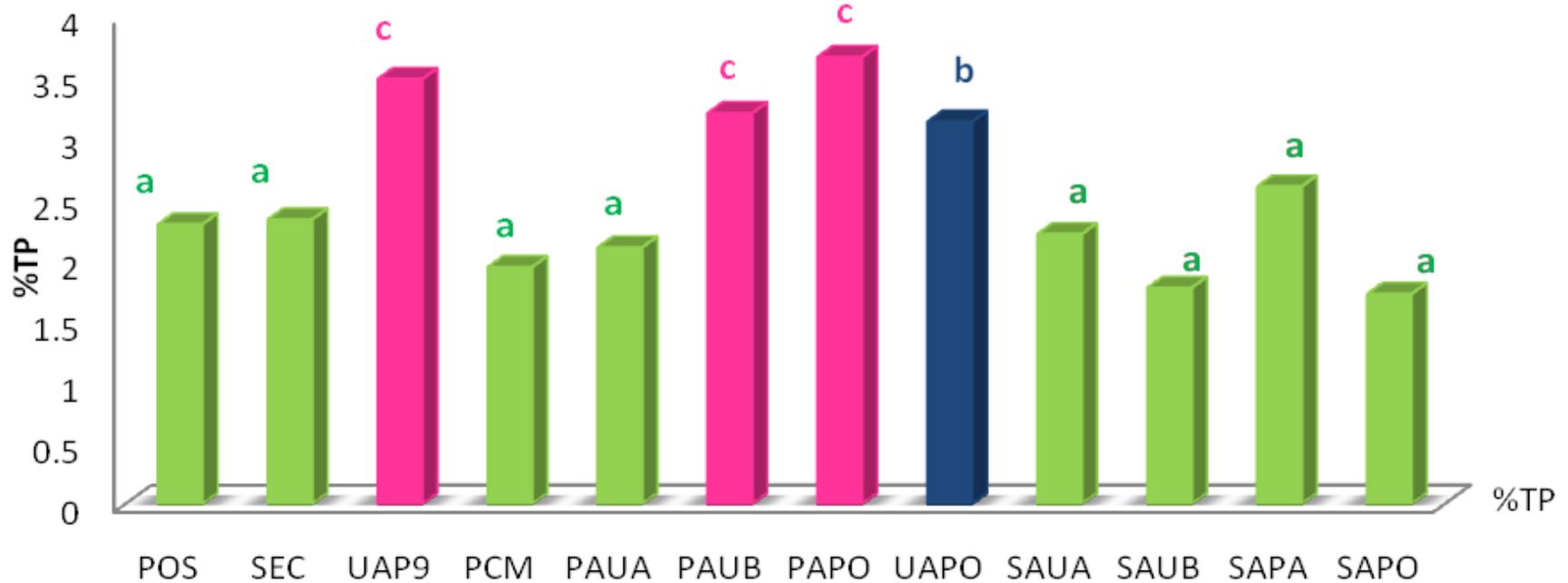
Con respecto a este parámetro, tasa de producción, el ANOVA de una vía indicó la presencia de diferencias significativas ( $F_{(12,119)} = 6.099$ ,  $p=0.0001$ ) y de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan, la cepa parental UAP9 (%TP = 3.48) y las cepas híbridas PAPO ( $PCM_1 \times POS_1$ ) y PAUB ( $PCM_1 \times UAP9_2$ ) con %TP de 3.66 y %TP de 3.20 respectivamente, formaron el grupo "c" con el valor más alto de %TP (Figura 7).

## % RENDIMIENTO (%R)



**Figura 6.** Promedio de %Rendimiento de las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus* spp., letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan,  $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

## % TASA DE PRODUCCIÓN (%TP)



**Figura 7.** Promedio de % Tasa de Producción de las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus* spp., letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan,  $p < 0.05$ ),  $n=3$ .

En la literatura se han reportado valores de %TP para el género *Pleurotus* con intervalos de 0.34 a 1.68 % cuando las cepas IE-11, IE-121, IE-145, IE-179 y IE-180 fueron cultivadas en paja de cebada y efectuándose de dos a cinco cosechas (Salmones y col., 1997). En otro estudio, el intervalo de %TP fue de 1.53 a 2.46 % cuando se usó el mismo sustrato realizando 3 cosechas de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* (Pérez y Mata, 2005).

En una investigación previa sobre cultivo en paja de trigo, realizada en este laboratorio con las mismas cepas parentales e híbridas que hoy nos ocupan, se obtuvo en la primera cosecha un %TP de 0.4 a 1.1 % (Cruz, 2009).

Los valores de %TP obtenidos en este trabajo superaron a los tres intervalos reportados en la literatura. Debido que el parámetro tasa de producción considera el tiempo que las cepas tardan en fructificar, es evidente que la cepa parental UAP9 y las cepas híbridas PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) y PAUB (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>), que presentaron valores de %TP superiores a 3%, resulten valiosas para el cultivo comercial de *Pleurotus* spp. dado su ciclo de producción corto. En la Figura 8 se muestran los cuerpos fructíferos de las cepas de *Pleurotus* spp. más representativas de acuerdo a sus parámetros de productividad. La cepa parental UAP9 y la cepa híbrida PAUB presentaron altos %EB y %R; la cepa híbrida PAPO presentó un alto %TP y la cepa PCM es una de la cepa progenitora de las dos cepas híbridas (PAUB y PAPO).



**Figura 8.** Cuerpos fructíferos de la cepas parentales e híbridas de *Pleurotus* spp. (a: PCM; b: UAP9<sub>2</sub>; c: PAUB (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>); d: PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>)).

## 6.2 Rendimientos de los extractos

Una vez concentrados los extractos hexánicos y metanólicos obtenidos de los cuerpos fructíferos de las cepas híbridas y parentales de *Pleurotus* spp. se les determinó su rendimiento, los valores obtenidos se muestran en el Cuadro 5. El rendimiento de los extractos no polares (hexánicos) osciló entre 0.85 - 2.95 % para todas las cepas. Con respecto a los extractos polares (metanólicos) el rendimiento se encontró entre 16.09 - 32.80%.

**Cuadro 5.** Rendimiento en porcentaje de los extractos hexánicos y metanólicos obtenidos de la cepas de *Pleurotus* spp.

CEPA	Extractos (%)	
	hexánicos	metanólicos
<b>Parentales</b>		
POS	1.31	18.84
SEC	1.13	16.09
UAP9	0.85	22.14
PCM	2.27	27.08
<b>Híbridos</b>		
PAUA (PCM <sub>1</sub> x UAP9 <sub>1</sub> )	1.74	32.80
PAUB (PCM <sub>1</sub> x UAP9 <sub>2</sub> )	2.13	17.78
PAPO (PCM <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub> )	2.95	18.40
UAPO (UAP9 <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub> )	1.41	16.44
SAUA (SEC <sub>1</sub> x UAP9 <sub>1</sub> )	1.40	27.55
SAUB (SEC <sub>1</sub> x UAP9 <sub>2</sub> )	1.34	19.80
SAPA (SEC <sub>1</sub> x PCM <sub>1</sub> )	1.40	20.25
SAPO (SEC <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub> )	1.15	21.38

Iwalokun y col. (2007) reportaron que el rendimiento de los extractos de acetona y éter obtenidos a partir de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* fue de 3.32 a 3.40 mg/g de peso seco del hongo. Valencia del Toro y col. (2008) reportaron el rendimiento para los extractos de cuatro cepas de *Pleurotus djamor* (IE200, IE2001, ECS127R y RP), indicando que en los extractos hexánicos fue de 0.98 - 1.65 % y para los metanólicos de 3.30 - 11.78 %. En otro estudio (2011 en prensa) estos autores, cultivando cuatro cepas parentales (POS, SEC, PCM y UAP9) y cuatro híbridas (SAUA, SAUB, PAPO y UBPO), obtuvieron un rendimiento de 0.5 - 2.0 % para los extractos hexánicos y para los extractos metanólicos un rendimiento de 9.4 - 26.4 %.

El rendimiento de los extractos hexánicos y metanólicos obtenidos en esta investigación con las cepas parentales e híbridas en estudio, son superiores a los reportados en la literatura. Las diferencias entre nuestros resultados con respecto a los investigadores citados, se pueden explicar en términos de la cepa trabajada, el disolvente utilizado así como de los tiempos de extracción.

### 6.3 Pruebas de sensibilidad

La prueba de sensibilidad antibacteriana se realizó sólo con los extractos metanólicos debido a que sus rendimientos fueron superiores a los extractos hexánicos. En el Cuadro 6 se presentan los valores de los halos (mm) obtenidos por la inhibición del crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-) generado por la aplicación de los extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus spp.*

El análisis de los datos del Cuadro 6 se hace usando el criterio de clasificación de las bacterias con base a su resistencia microbiana como sigue: la bacteria será **Resistente** cuando el halo de inhibición es  $\leq 12$ mm; la bacteria tendrá una **Susceptibilidad Intermedia** cuando el halo de inhibición es de 13 – 17mm; y cuando el halo de inhibición es  $\geq 18$ mm, la bacteria se designará como **Susceptible** (Prescott y Harley, 2002).

Los datos del Cuadro 6 muestran que las bacterias *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *Y. enterocolitica*, *E. agglomerans* y *S. disenterae* presentaron resistencia frente al extracto metanólico de la cepa parental POS teniendo un halo de inhibición de 9mm, 10mm, 7mm, 10mm y 11mm respectivamente; *B. subtilis* presentó susceptibilidad intermedia (13mm). En cambio las bacterias *K. rhinoscleromatis* y *K. pneumoniae* no desarrollaron halos de inhibición frente este extracto.

Todas las bacterias fueron resistentes al extracto crudo metanólico de la cepas parentales SEC y PCM pues sus halos de inhibición fueron menores a 12 mm.

Por lo que respecta a la cepa híbrida de PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) de *Pleurotus spp.*, tenemos que todas las bacterias evaluadas, excepto *K. pneumoniae*, generaron una susceptibilidad intermedia que osciló de 13-15 mm para el extracto crudo metanólico (Figura 9) y la bacteria Gram(-) *Y. enterocolitica* no tuvo actividad.

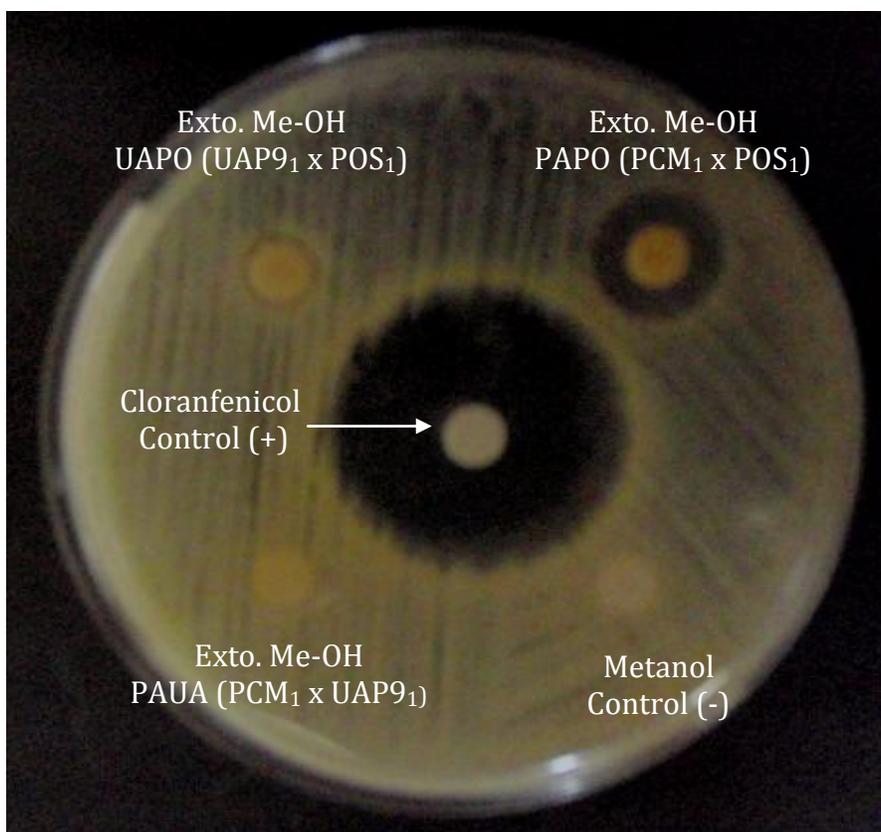
**Cuadro 6.** Diámetro promedio de los halos de inhibición presentados por las bacterias al entrar en contacto con los extractos metanólicos de las cepas de *Pleurotus spp.*

CEPAS	Extractos metanólicos					
	Halos de inhibición* (mm) ± ESM					
	POS	SEC	PCM	PAPO PCM <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub>	UAPO UAP <sub>9</sub> <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub>	SAPO SEC <sub>1</sub> x POS <sub>1</sub>
<i>B. subtilis</i>	13.0±0.58	7.0±0.0	10.0±0.0	14.67±0.88	8.67±0.33	10.33±0.33
<i>S. aureus</i> 1	9.0±0.0	8.0±0.0	11.67±0.33	15.0±0.0	8.0±0.0	9.67±0.33
<i>S. aureus</i> 2	10.0±0.0	7.67±0.33	11.0±0.0	14.67±0.33	8.33±0.33	10.0±1.0
<b>Gram negativas</b>						
<i>E. agglomerans</i>	10.0±0.0	7.67±0.33	10.67±0.33	12.67±0.33	8.0±0.0	9.33±0.67
<i>S. disenterae</i>	11.0±0.0	7.0±0.0	10±0.58	12.67±0.33	8.0±0.0	11.0±0.58
<i>Y. enterocolitica</i>	7.0±0.0	-	9.67±0.33	-	-	8.0±0.0
<i>K. rhinoescleromatis</i>	-	-	8.0±0.0	13.3±0.88	7.0±0.0	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	11.33±0.33	11.0±0.0	8.0±0.0	-

\*Promedio de tres repeticiones ± el error estándar de la media (ESM). El símbolo (-) indica ausencia del halo de inhibición. El color indica la resistencia microbiana presentada por la bacteria: **resistente** (verde), **susceptibilidad intermedia** (azul).

Frente al extracto metanólico de las cepas híbridas UAPO (UAP9<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) y SAPO (SEC1 x POS<sub>1</sub>), tanto las bacterias Gram (+) como las Gram (-) fueron resistentes.

Para los extractos de las cepas híbridas PAUB (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>), PAUA (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>1</sub>), SAUA (SEC<sub>1</sub> x UAP9<sub>1</sub>), SAUB (SEC<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>), SAPA (SEC<sub>1</sub> x PCM<sub>1</sub>) y la cepa parental UAP9 las bacterias Gram (+) y Gram (-) no mostraron actividad (no se muestran resultados).



**Figura 9.** Prueba de sensibilidad. Halos de inhibición (mm) de extractos metanólicos de cepas híbridas PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>), PAUA (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>1</sub>), UAPO (UAP9<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) contra *Shigella dysenteriae*.

De acuerdo con lo reportado por Valencia del Toro y col. (2011 en prensa), las dos bacterias Gram (+) *S. aureus* 1 y *S. aureus* 2, fueron sensibles al extracto metánolico de la cepa parental SEC con halos de inhibición de 37.3 y 21.6 mm respectivamente; comparado esto con nuestros resultados, podemos pensar que estos microorganismos “disminuyeron su sensibilidad” a este extracto. Por otro lado, los autores también reportaron que tanto las bacterias Gram (+) como Gram (-) fueron resistentes al extracto metanólico de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>); mientras que en nuestros resultados, la mayoría de las bacterias, a excepción de *K. pneumoniae*, presentaron susceptibilidad intermedia o sea, “incrementaron su sensibilidad” al extracto. En la literatura, se menciona que la resistencia puede, en consecuencia originarse en mutaciones al azar de genes localizados en los cromosomas o como consecuencia del uso repetitivo de un determinado compuesto (Greca, 2000); por lo que se puede mencionar que las bacterias están propensas a tener cambios y consigo alterar su sensibilidad bacteriana.

En otro estudio se evidenció que otras cepas de *S. aureus* y *B. subtilis* (*S. aureus* MB5393 y *B. subtilis* MB964) presentaron resistencia intermedia o fueron sensibles, con halos de inhibición iguales o mayores a 15mm cuando se aplicaron 25 µL/mL del extracto metánolico (dilución en placa) de *Pleurotus eryngi* (Suay y col., 2000).

En cambio, Iwalokun (2007) trabajó con 100 µL de los extractos de *Pleurotus ostreatus* obtenidos con dos solventes (acetona y éter), de los cuales si tuvieron efecto contra la bacteria Gram (-) *K. pneumoniae* presentándose un halo de inhibición de 7.0 mm para ambos extractos, tal es caso de los extractos de la cepa parental PCM y de los híbridos UAPO (UAP9<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) y PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) utilizados en este trabajo. Pero Tambekar (2006) reportó para esta misma bacteria un halo de inhibición de 18 mm frente a un extracto metánolico de *Pleurotus sajor caju*. Es importante mencionar que cada cepa fúngica presenta diferentes compuestos que los hacen ser más efectivos. Así mismo, las inconsistencias entre los datos de la literatura con los nuestros, pueden deberse a diferencias en los métodos de evaluación (microdilución, disco), el tipo y cantidad de

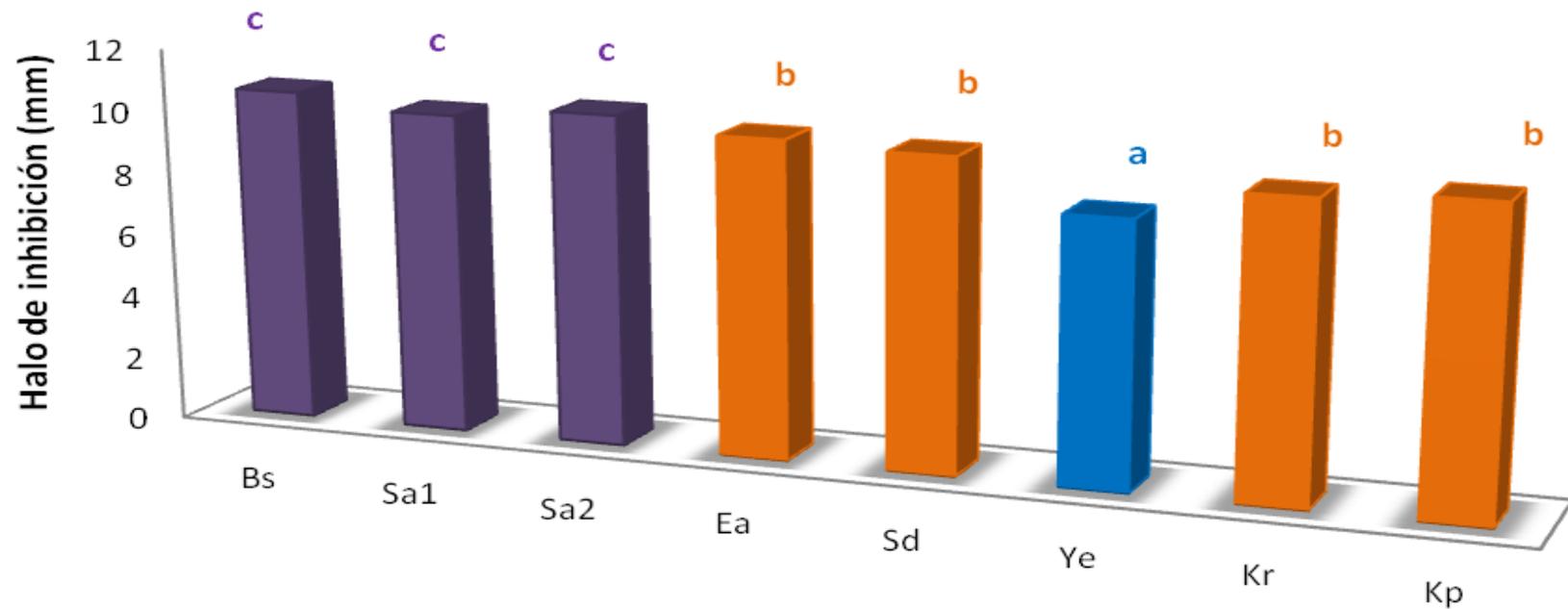
extracto, de la cepa bacteriana en estudio (aislamiento, cepa de referencia), así como de las condiciones en las que se realiza el cultivo. En el estudio realizado por Bermudez y col. (2002) se encontró una variación en el contenido de ergosterol (provitamina D<sub>2</sub>) en *Pleurotus ostreatus* var. *florida* dependiente del tiempo de exposición a la luz durante la fase de fructificación el cultivo.

Los halos de inhibición (mm) que presentaron las bacterias al estar en contacto con los extractos metanólicos de las diferentes cepas fúngicas, se analizaron con un ANOVA de dos factores (Bacteria x Extracto), Este estadístico indicó la presencia de diferencias estadísticas significativas para el factor bacteria ( $F_{(7,35)} = 26.5$ ,  $p=0.0001$ ); y la prueba a posteriori de Duncan mostró la formación de 3 grupos (a, b y c). Como se aprecia en la Figura 10, el grupo “c” está conformado por *B. subtilis*, *S. aureus* 1 y *S. aureus* 2, microorganismos que presentaron susceptibilidad intermedia; el grupo “b” esta constituido por *E. agglomerans*, *S. disenterae*, *K. rhinoscleromatis* y *K. pneumoniae*. La bacteria Gram (-) *Y. enterocolitica* conforma el grupo “a” presentando resistencia ante los extractos metanólicos de las cepas híbridas de *Pleurotus* spp.

Con respecto al factor extracto metanólico de la cepa fúngica (factor hongo), también la ANOVA de un factor arrojó diferencias significativas ( $F_{(6,35)} = 171.9$ ,  $p=0.0001$ ), y la prueba de Duncan formó 3 grupos (Figura 11), quedando en el grupo “a” la cepa parental SEC y la cepa híbrida UAPO (UAP<sub>91</sub> x POS<sub>1</sub>); el grupo “b” lo integran 2 cepas parentales PCM y POS y una híbrida SAPO (SEC<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>); mientras que el grupo “c” lo constituyó la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) que generó susceptibilidad intermedia en la mayoría de las bacterias evaluadas.

Es importante resaltar que el híbrido PAPO superó los halos de inhibición, obtenidos en la mayoría de las bacterias estudiadas, con respecto a los halos de inhibición obtenidos con las cepas parentales PCM y POS que le dieron origen. Lo anterior, permite sugerir que la actividad antibacteriana se conservó y/o se incrementó en esta cepa híbrida de *Pleurotus* spp.

## Factor bacteria



**Figura 10.** Formación de grupos de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan. Diámetro de los halos de inhibición (mm) analizando el factor bacteria.

**Nota.** Bs: *Bacillus subtilis*; Sa1: *Staphylococcus aureus* 1; Sa2: *Staphylococcus aureus* 2; Ea: *Enterobacter agglomerans*; Sd: *Shigella disenterae*; Ye: *Yersenia enterocolitica*; Kr: *Klebsiella rhinoscleromatis*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*.

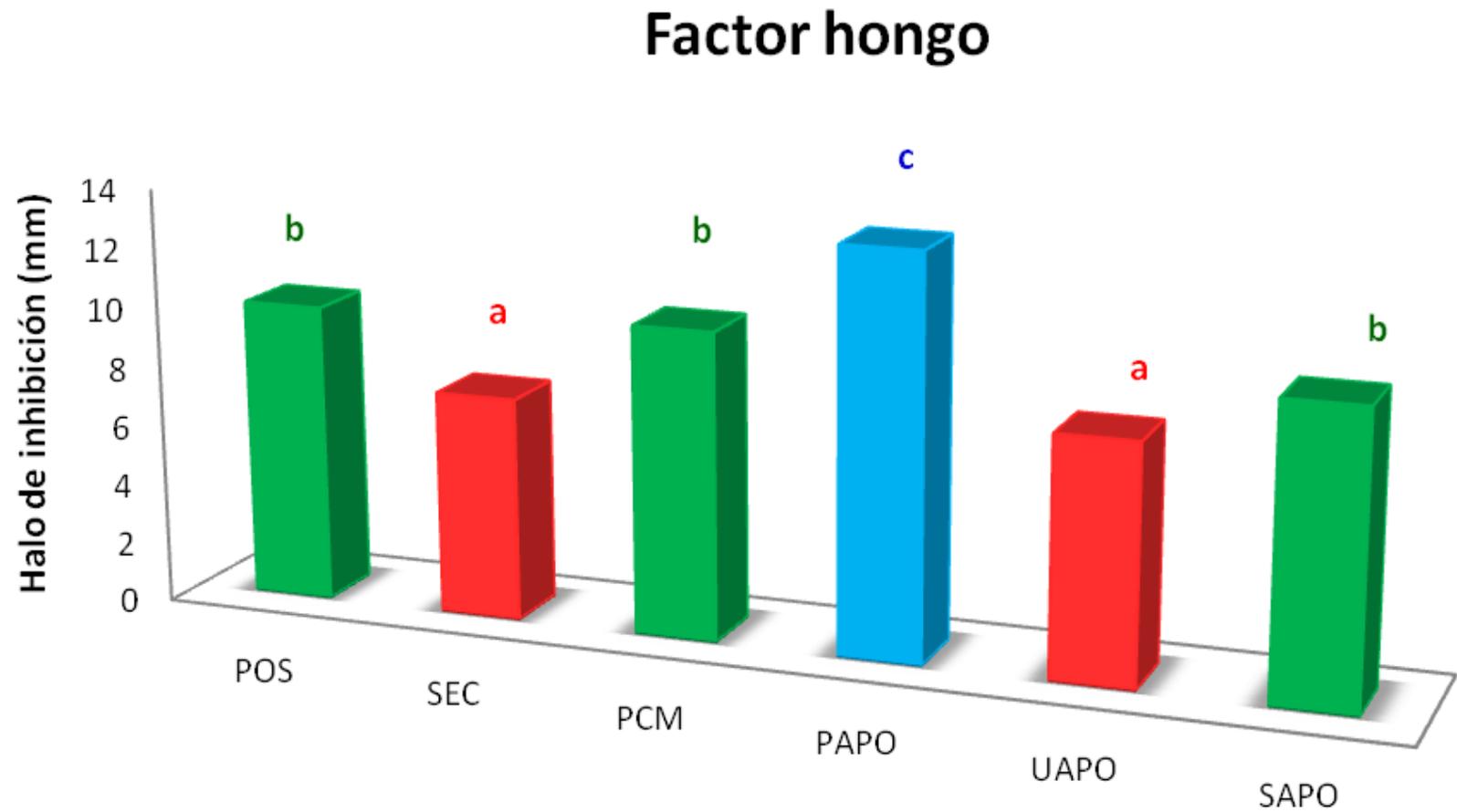


Figura 11. Formación de grupos de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan. Diámetro de los halos de inhibición (mm) analizando el factor extracto metánolico de *Pleurotus* spp.

## 6.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

### 6.4.1 Extractos metanólicos

El Cuadro 7 muestra que la concentración mínima inhibitoria obtenida sólo con los extractos metanólicos de las dos cepas parentales PCM y POS y su respectivo híbrido PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>). Los datos muestran que con los tres extractos metanólicos la CMI fue mayor de 12 mg/mL tanto para las cepas bacterianas Gram (+) como para las Gram (-). Considerando que la CMI mide la capacidad del agente antimicrobiano para inhibir la multiplicación de un microorganismo (Bailey y col., 1991), la concentración de extracto metanólico necesaria para inhibir el crecimiento de las bacterias en estudio, debe ser superior a los 12mg/mL.

**Cuadro 7.** Resultados de la CMI de extractos metanólicos de *Pleurotus* spp.

Bacterias	Extractos metanólicos		
	PCM	POS	PAPO (PCM <sub>1</sub> XPOS <sub>1</sub> )
<b>Gram positivas</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	>12	>12	>12
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	>12	>12	>12
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	>12	>12	>12
<b>Gram negativas</b>			
<i>Enterobacter agglomerans</i>	>12	>12	>12
<i>Shigella disenterae</i>	>12	>12	>12
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>12	>12	>12
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	>12	>12	>12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>12	>12	>12

### 6.4.1 Fracciones metanólicas

La CMI de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de los extractos metanólicos de las dos cepas parentales POS y PCM y de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub>XPOS<sub>1</sub>) aparecen en el Cuadro 8. Los datos muestran que la F28 del extracto metanólico de la cepa parental PCM (obtenida en la proporción de 50:50 diclorometano:metanol), impidió el crecimiento de casi todas las bacterias con las concentraciones más bajas, de tal manera que su CMI se encuentra en un intervalo de

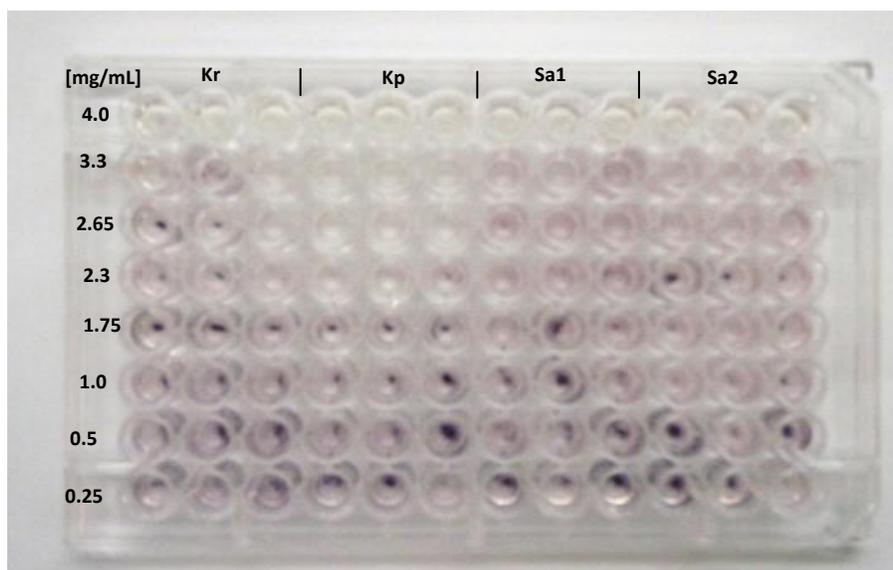
1.75 – 3.3 mg/mL; la bacteria Gram negativa *Yersinia enterocolitica* presentó una CMI >4 mg/mL con esta fracción. Las CMI de las tres fracciones (F7, F9, F5) de la cepa híbrida PAPO fueron las más altas del estudio (CMI >4 mg/mL). Con respecto a los microorganismos, los resultados también hacen evidente que las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron sensibles a cuatro fracciones (PCM F28, F3, F9 y POS F4) donde su crecimiento se inhibió con los valores más bajos de CMI (1.75-3.3 mg/mL).

**Cuadro 8.** Resultados de la MIC de fracciones obtenidas de los extractos metanólicos de *Pleurotus spp.*

Bacterias	Fracciones metanólicas						
	PCM (Parental)			POS (Parental)	PAPO (Híbrido)		
	F28	F3	F9	F4	F7	F9	F15
<b>Gram positivas</b>							
<i>Bacillus subtilis</i>	3.3	>4	>4	>4	>4	>4	>4
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	2.3	3.3	2.65	2.65	>4	>4	>4
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	1.75	3.3	2.3	3.3	>4	>4	>4
<b>Gram negativas</b>							
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3.3	>4	>4	2.65	>4	>4	>4
<i>Shigella disenterae</i>	3.3	>4	>4	>4	>4	>4	>4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>4	>4	>4	>4	ND	ND	ND
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	2.65	>4	>4	>4	>4	>4	>4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.75	>4	>4	>4	>4	>4	>4

Nota: PCM= F28 (50:50), F3 y F9 (60:40); POS= F4 (60:40); PAPO= F7 (80:20), F9 y F15 (50:50); ND: no determinado

En la Figura 12 se presenta una placa que muestra la presencia de un botón color morado, sólo en los pozos donde las concentraciones de extracto aplicadas permitieron el crecimiento microbiano. Esta caja hace evidente que la bacteria *Klebsiella pneumoniae* presentó un valor de CMI=1.75mg/mL.



Nota: Kr: *Klebsiella rhinoscleromatis*; Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Sa1: *Staphylococcus aureus* 1; Sa2: *Staphylococcus aureus* 2

**Figura 12.** Resultados de la CMI al aplicar de 0.25 - 4mg/mL de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Aunque la información sobre la actividad antibacteriana con extractos es muy escasa o poco disponible en la literatura; Gbolagade y col. (2007) determinaron la CMI de extractos metanólicos purificados de cuerpos fructíferos de dos basidiomicetos: *P. florida*, que presentó una CMI= 6mg/mL para *S. aureus* y una CMI=7.75 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*; mientras que con los extractos de *P. tuber regium* se obtuvo una CMI= 6.25mg/mL para *K. pneumoniae*.

Por otro lado, Oyelade y Fagade (2009) cuantificaron la CMI de los extractos etanólicos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus florida*, encontrando una CMI= 1000mg/mL para la bacteria Gram (-) *K. pneumoniae*, en cambio para la bacteria Gram (+) *S. aureus* se obtuvo una CMI de 750mg/mL.

En otro estudio, Valencia del Toro (2011 en prensa) reportó una CMI > 12 mg/mL en la mayoría de los extractos metanólicos de tres cepas parentales: SEC, POS, PCM, y tres cepas híbridas: SAUA, SAUB, PAPO para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 1, *Staphylococcus aureus* 2, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter agglomerans*, *Yersinia*

*enterocolitica*, *Klebsiella rhinoescleromatis* y *Klebsiella pneumoniae*. Excepto en los extractos de la cepa parental PCM y la cepa híbrida PAPO que presentaron una CMI=0.75mg/mL para la bacteria *Staphylococcus aureus* 1.

Los resultados del presente estudio muestran que si bien, la mayoría de los valores de CMI de las fracciones metanólicas de las cepas parentales POS, PCM y el híbrido PAPO son >4mg/mL, éstas se encuentran por debajo de los reportados por Gbolagade y col. (2007) que obtienen para los extractos metanólicos de *P. florida* y *P. tuber regium* CMI que oscilan entre 6 y 7.75 mg/mL para *S. aureus* y/o *Klebsiella pneumoniae*; y son muy pequeños con respecto a los obtenidos por Fagade y Oyelade (2009) que obtuvieron con extractos etanólicos de *Pleurotus florida*, CMI de 750 y 1000mg/mL frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae*, respectivamente. Las diferencias entre nuestros datos de CMI y las reportadas en la literatura pueden explicarse porque en nuestro estudio, se evaluaron las fracciones metanólicas obtenidas por cromatografía en columna que presentan podríamos considerar tienen compuestos “más puros” con respecto a los extractos, lo que hace posible un efecto antibacteriano con bajas concentraciones. Otros factores importantes a considerar para estas marcadas diferencias son las condiciones de cultivo y la especie del macromiceto.

Otro aspecto a analizar es el hecho de que el extracto metánolico de la cepa parental PCM presentó halos de inhibición menores respecto al extracto metánolico de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>), es decir, el extracto metanólico de la cepa híbrida resultó ser más activo en la formación del halo; en contraste, la CMI de la fracciones de esta cepa híbrida fue superior a la CMI de la fracción de la cepa parental. Estos datos aparentemente contradictorios entre extractos y fracciones de cepas híbridas y parentales, pueden explicarse en función de la cantidad de compuesto(s) biológicamente activo(s) presentes en el extracto o en la fracción. Por lo que es necesario realizar el aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones para poder así determinar en un ensayo biológico, cuál de ellos es el responsable de la actividad antibacteriana.

Espinosa–García (2001) menciona que los metabolitos secundarios generalmente están presentes en las plantas como mezclas de compuestos y los parásitos y patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones; esto nos lleva a considerar otra explicación a las diferencias de actividad antibacteriana encontradas entre extractos y fracciones, es decir, el sinergismo de los compuestos es necesario para potenciar la actividad antibacteriana.

Ahora bien, relacionando los parámetros de productividad con las características antibacterianas de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub>XPOS<sub>1</sub>), observamos que esta cepa presentó un alto %TP, lo que significa que su tiempo de fructificación es corto, siendo ésta una característica importante para el uso comercial de la misma. Por otro lado, si bien esta cepa fúngica no tiene un alto porcentaje de rendimiento en la obtención de extracto metánolico, en comparación con las otras cepas fúngicas trabajadas, sí presentó una susceptibilidad intermedia frente a las 8 bacterias en estudio, alcanzando halos de inhibición hasta 15mm.

### **6.5 Análisis preliminar fitoquímico**

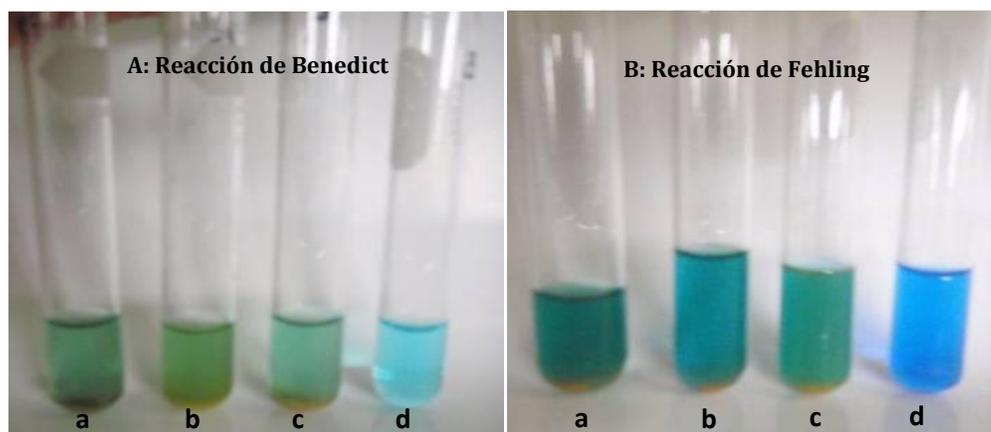
En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos una vez realizado el análisis fitoquímico preliminar de los extractos metanólicos a partir de cepas de *Pleurotus spp.* El análisis fitoquímico reveló la presencia de azúcares reductores, glicósidos cardiacos, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenos.

**Cuadro 9.** Análisis preliminar fitoquímico de extractos metanólicos de las cepas de *Pleurotus* spp. que presentaron halos de inhibición.

Compuesto	Extractos metanólicos		
	PCM	POS	PAPO (PCM <sub>1</sub> XPOS <sub>1</sub> )
Alcaloides	-	-	-
<b>Azúcares reductores</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
Cumarinas	-	-	-
<b>Glicósidos cardiacos</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
Glicósidos cianogénicos	-	-	-
Flavonoides	-	-	-
Quinonas	-	-	-
Saponinas	-	-	-
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
Taninos	-	-	-
<b>Esteroles y terpenoides</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

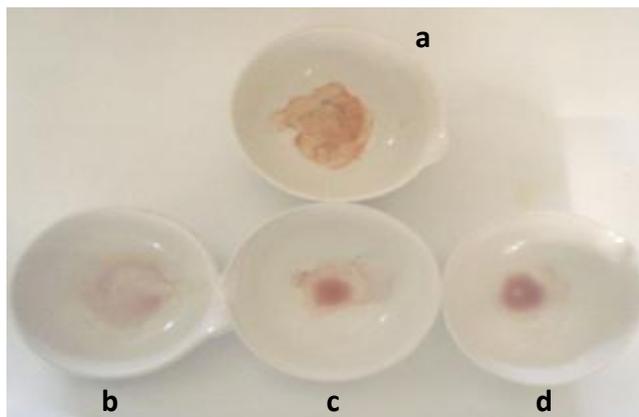
Nota: El símbolo (+) indica la presencia del compuesto, el símbolo (-) indica ausencia del compuesto

En la Figura 13 se muestran los resultados de las pruebas cualitativas practicadas a los extractos metanólicos de las cepas parentales PCM y POS y de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>), para la identificación de azúcares reductores, dando prueba positiva a la reacción de Fehling y de Benedict por la presencia de precipitados en la muestras analizadas.



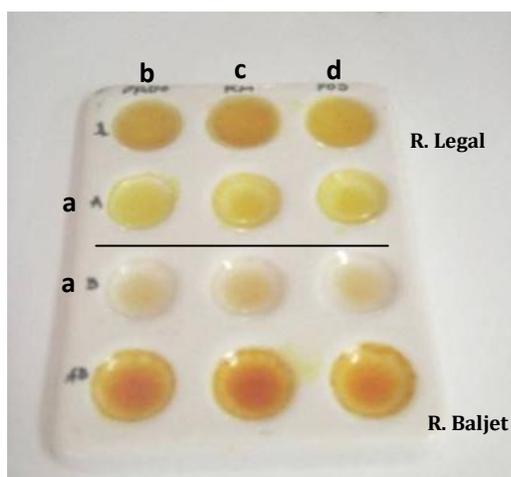
**Figura 13.** Pruebas para la presencia de azúcares reductores, A: Reacción de Benedict y B: reacción de Fehling. Extracto metanólico PCM (a); extracto metanólico POS (b); extracto metanólico PAPO (c); control negativo (d).

En la reacción con hidroximato férrico, se presentó un color rosa-purpura indicando prueba positiva para las sesquiterpenlactonas en los extractos metanólicos de las cepas parentales PCM y POS y de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) (Figura 14).



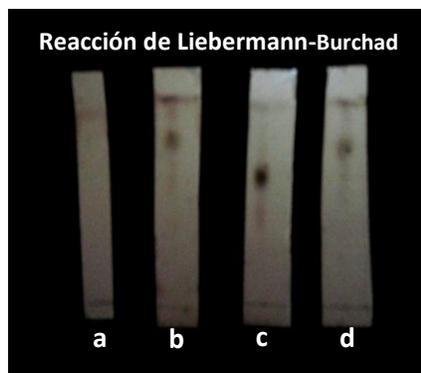
**Figura 14.** Prueba de la reacción con hidroximato férrico. Control negativo (a); extracto metanólico PCM (b); extracto metanólico POS (c); extracto metanólico PAPO (d).

Respecto al análisis de los glicósidos cardiacos, las pruebas realizadas indicaron la presencia de estos compuestos mediante una coloración roja (poco estable) en la reacción de Legal y una coloración naranja oscuro con el reactivo de Baljet (Figura 15) para los tres extractos fúngicos analizados.



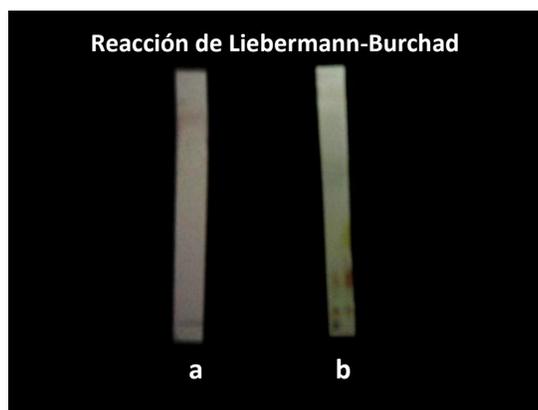
**Figura 15.** Resultados de la identificación de glicósidos cardiacos: control negativo (a); extracto metanólico PAPO (b); extracto metanólico PCM (c); d: extracto metanólico POS (d)

Se realizó una cromatografía en capa fina con los extractos metanólicos obtenidos y se aplicó el reactivo de Liebermann-Burchard, para la detección de esteroides y triterpenos, esta prueba permitió determinar la presencia de estos compuestos en los tres extractos (PCM, POS y PAPO), lo que se evidenció con la detección de manchas color café con diferente Rf para cada uno de los extractos (Figura 16).



**Figura 16.** Revelado de placa cromatográfica para la detección de esteroides y triterpenos: el control negativo sólo contiene el reactivo (a); extracto metanólico PCM (b); extracto metanólico POS (c); extracto metanólico PAPO (d).

Dado que el extracto metanólico de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) ocasionó una susceptibilidad intermedia con la mayoría de las cepas bacterianas, el extracto metanólico de las cepas parentales que generaron este híbrido, se analizaron por cromatografía en columna, y las fracciones que resultaron mayoritarias (PCM: F3, F9 y F28; POS: F4 y PAPO: F7, F9 y F15), se usaron para determinarles su CMI. Muestras de estas fracciones también se corrieron en cromatografía en capa fina y se revelaron con el reactivo de Liebermann-Burchard para la detección de esteroides y triterpenos. La Figura 17 sólo muestra los resultados que indican la presencia de dichos compuestos (mancha color café) en la fracción F28 de la cepa parental PCM, misma que en el ensayo microbiológico generó los valores de CMI más pequeños.



**Figura 17.** Revelado de placa cromatográfica para la detección de esteroides y triterpenos de la F28 de la cepa parental PCM. Control negativo (a); fracción metanólica F28 de PCM (b). En el ensayo microbiológico esta fracción presentó los valores de CMI más pequeños.

Cabe señalar, que en las fracciones cromatográficas obtenidas, sólo se hizo la prueba para la detección de esteroides y triterpenos, debido que en la literatura se reporta que el metabolismo secundario de los basidiomicetos es rico en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides. Se ha señalado, que muchos de éstos compuestos poseen estructuras que hasta ahora sólo han sido detectadas en esta clase de microorganismos, mientras que otras, están estrechamente vinculadas a los metabolitos de plantas. Por lo general, se ha encontrado que estos compuestos presentan actividad antibiótica y citotóxica (Brizuela y col. 1998).

Otro metabolito, el ergosterol (tipo de esteroide), se ha reportado como el principal constituyente de los hongos superiores (Rivera, 1998), por lo que será necesario realizar un preliminar fitoquímico para evidenciar si este metabolito está presente en las fracciones metanólicas.

En el estudio realizado por Ijeh y col. (2009) se evidenció a través del análisis fitoquímico practicado a los cuerpos fructíferos de *Pleurotus tuber regium*, que este hongo es rico en alcaloides, saponinas, flavonoides y oligosacáridos. Los alcaloides y saponinas los cuales pueden ser tóxicos en altas dosis, fueron encontrados en dosis no-tóxicas. De acuerdo con el estudio de Chidinma y col. (2008), esta especie es

altamente rica en fitatos y moderadamente rica en alcaloides, flavonoides (auronas, chalconas, flavonas, flavonoles y leucoantocianinas) y taninos.

En cepas de *P. ostreatus* var. *florida* se ha cuantificado mediante cromatografía de gases el contenido de micosterol, específicamente ergosterol y el peróxido de ergosterol en el extracto cloroformo-metanol de la biomasa fúngica (Bermudez y col., 2002).

El análisis fitoquímico de los extractos de éter de petróleo y acetona a partir de *P. ostreatus*, realizado en el estudio por Iwalokun y col. (2007) detectó bajos o moderados niveles de terpenoides, taninos, glicósidos esteroidales y carbohidratos. Mientras que el análisis fitoquímico del micelio de tres cepas de *Pleurotus*, *P. sajor-caju*, *P. florida* y *P. aureovillosus* se evidenció también la presencia de terpenoides, taninos, glicósidos esteroidales y carbohidratos; los autores también cuantificaron el contenido total de flavonoides y compuestos fenólicos totales (Jagadish y col., 2008). Otro estudio con cepas parentales e híbridas de *Pleurotus* spp., Valencia del Toro y col. (2011 en prensa) detectaron en el preliminar fitoquímico la presencia de azúcares, sesquiterpenlactonas y glicósidos cardíacos.

Como ya se indicó, el análisis preliminar fitoquímico practicado a los extractos metanólicos de las 2 cepas parentales POS y PCM y su respectivo híbrido PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>), detectó la presencia de cinco compuestos: azúcares reductores, sesquiterpenlactonas, esteroides, triterpenos y glicósidos cardíacos. En la literatura, se ha señalado que los terpenoides son metabolitos responsables de la actividad antibacteriana en plantas; aunque no se ha entendido completamente sus mecanismo de acción, se han implicado en la ruptura de la membrana celular por sus compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). Las sesquiterpenlactonas son compuestos lactónicos de gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado, entre ellas la antitumoral, antimicrobiana (Lock, 1994) y citotóxica; ésta última, ha sido relacionada con el anillo lactónico (Martínez, 2001). El hinofilin, el pleurotelol y el ácido pleurotético son compuestos aislados de fermentaciones de *Pleurotellus hypnophilus*.

Mientras que el pleurotelol y el ácido pleurotólico pertenecen al grupo de los sesquiterpenoides, el hinofilin es un nuevo miembro de la familia de los hirsutanos a la cual pertenecen un gran número de los típicos metabolitos presentes en basidiomicetos. Estos tres antibióticos poseen alta actividad antimicrobiana y citotóxica (Brizuela y col. 1998). Los esteroides presentes en los extractos de *Peltostigma guatemalense*, especie de la familia de las Rutáceas, fueron responsables de la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) (Lozano y Cuca, 2008). Como se mencionó anteriormente, el compuesto esteroide es un constituyente de los hongos superiores (Rivera, 1998).

Sin embargo, para conocer cuáles de los cinco metabolitos detectados en los extractos metanólicos y/o las fracciones tienen la actividad antibacteriana, es necesario continuar con el estudio fitoquímico para poder aislar y caracterizar químicamente el o los metabolitos secundarios responsables de tal actividad biológica en las cepas parentales e híbridas de *Pleurotus*.

## 7.-HALLAZGOS RELEVANTES DE LA INVESTIGACIÓN

- Los valores más altos del % EB y del %R se presentaron con las cepas híbridas PAUB (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>) y UAPO (UAP9<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) y la cepa parental UAP9.
- La cepa parental UAP9 y las cepas híbridas PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) y PAUB (PCM<sub>1</sub> x UAP9<sub>2</sub>), presentaron los valores mayores de %tasa de producción 3.48 %, 3.66 % y 3.20 % respectivamente, siendo un indicativo comercial de acuerdo a su ciclo de producción para la utilización a escala industrial.
- Los rendimientos de los extractos metabólicos, a los cuales se les atribuye la actividad antibacteriana de *Pleurotus* spp., fueron mayores que los de los extractos hexánicos.
- Las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 1 y *Staphylococcus aureus* 2 presentaron susceptibilidad intermedia al estar en contacto con los extractos metanólicos de las cepas híbridas y parentales de *Pleurotus* spp.
- La bacteria *Yersenia enterocolitica* fue la bacteria más resistente a los extractos metanólicos de las cepas fúngicas.
- El extracto metanólico de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>) presentó un intervalo del diámetro del halo de inhibición de 11 a 15 mm, superando ligeramente los diámetros con respecto de sus parentales, debido a que estos presentan de 7 a 13 mm para la cepa POS y de 9.67 a 11.67mm para la cepa PCM.
- El comportamiento de las cepas híbridas podría sugerir cierto “mejoramiento genético” con respecto a sus parentales, evidenciado en los valores altos obtenidos de los parámetros de productividad y los halos de inhibición durante la prueba de susceptibilidad.

- Los extractos metanólicos de las dos cepas parentales POS y PCM y su híbrido respectivo PAPO, inhiben el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-) cuando se aplican a concentraciones mayores a 12mg/mL (CMI).
- La fracción F28 de la cepa parental PCM, evidenció tener actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), presentándose una CMI de 1.75mg/mL contra *Staphylococcus aureus* 1 y *Klebsiella pneumoniae*. Además, se puede proponer que los posibles responsables de este efecto son los esteroides y triterpenos detectados por el análisis preliminar fitoquímico.
- Concentraciones >4mg/mL de las fracciones F7, F9 y F15 de la cepa híbrida PAPO inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram (+) y Gram (-) trabajadas en este estudio.

## 8. CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de la cepa híbrida PAPO (PCM<sub>1</sub> x POS<sub>1</sub>), mostró actividad antibacteriana sobre la mayoría de los microorganismos evaluados, formando halos de inhibición hasta 15 mm (susceptibilidad intermedia) y presentando un tiempo de fructificación aceptable para su cultivo.
- La fracción F28 de la cepa parental PCM generó valores de CMI=1.75-3.3 mg/mL que son inferiores a los reportados en la literatura con otros hongos del género.
- El análisis preliminar fitoquímico de los extractos metanólicos de las cepas parentales PCM, POS y el híbrido PAPO indicó la presencia de azúcares reductores, sesquiterpenlactonas, glicósidos cardiacos, esteroles y triterpenos.
- Las fracciones más abundantes de cepas parentales PCM, POS y el híbrido PAPO, dieron reacción positiva para la presencia de esteroles y triterpenos, sustancias a las que se les ha probado actividad antibacteriana.
- El estudio evidenció que la propiedad antibacteriana de las cepas parentales no sólo se conserva en las cepas híbridas, sino que en algunas de ellas se incrementa, esto hace de *Pleurotus* spp. un recurso con potencial comercial y farmacéutico.

## **9. PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN**

- Elucidar la estructura química de los compuestos presentes en los extractos y en las fracciones metánolicas de *Pleurotus* spp. responsables del efecto antibacteriano.
- Evaluar la posibilidad de obtener los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana a partir del micelio, o del medio de cultivo del hongo.
- Realizar la prueba de susceptibilidad con otros microorganismos patógenos de interés clínico y agronómico.

## 10. REFERENCIAS

- Akyuz, M. y Kirbag, S. 2009. Antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* grown on various agro-wastes. Eur. Asian. Journal of BioSciences. 3:58-63.
- Akyuz, M. y Kirbag, S. 2010. Nutritive value of wild edible and cultured mushrooms. Turk J. Biol. 34:97-102.
- Akyuz, M., Onganer, A., Erecevit, P. y Kirbag, S. 2010. Antimicrobial activity of some edible mushroom in the Eastern and Southeast Anatolia Region of Turkey. Gazi University Journal of Science. 23(2):125-130.
- Alexopoulos, C. y Mins, C. 1985. Introducción a la micología. 1ª. Edición Ediciones Omega, A. A., Barcelona. pp 470.
- Ávila, J., García, M., Gavilán, C., León, C., Méndez, M., Cendejas, G., Rodriguez, P., Vela, A., Mendoza, S., Santos, A. y Soto, M. 2001. Química orgánica. Exérimentos con enfoque ecológico. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Badole, S., Thakurdesai, P. y Bodhankar, S. 2008. Antioxidant activity of aqueous extracts of *Pleurotus pulmonarius* (fries) quell-champ. Pharmacologyonline 2:27-41.
- Baena, A. 2000. Aprovechamiento del Bagazo del Maguey (*Agave Salmiana*) Verde de la Agroindustria del Mezcal en San Luis Potosi para la Producción de de Hongo Ostra (*Pleutotus ostreatus*) Tesis Maestria. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosi, S.L.P.
- Bailey, S., Finegold, S., Baron, E. 1991. Diagnostico microbiologico. Ed. Médica Panamericana, 7ª edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 190-209.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estrvinho, L. y Ferreira, I. 2008. Wild and commercial musrhrooms as source of nutrients and nutraceuticals. Food and Chemical toxicology. 46: 2742-2747.
- Bautista, M., Alanís, M., González, E. y García, C. 1998. Composición química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). ALAN. 48:359-363.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. 2009. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. Enfermedades Infecciones y microbiología. 29(2): 70-76.

- Beltran-Garcia M., Estarron-Esponosa, M. y Ogura, T. 1997. Volatile compounds secreted by Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4049-4052.
- Bermúdez, R., Donoso, C., Martínez, C., Ramos, E. y Morris, H. 2002. Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. *Revista Cuabana Nutr.* 16(1):13-18.
- Brizuela, M., García, L. Pérez, L. y Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:68-74.
- Cardona, L. 2001. Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Crónica forestal y del medio ambiente.* 16:99-119.
- Cabrera, C., Gómez, R. y Zuñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* 38:149-158.
- Chambers, H. 2003. Bactericidal Vs. bacteriostatic antibiotic therapy: A clinical mini-review. *Education Prevention Research, National Foundation for Infectious Diseases.* 6(4):1-6.
- Chirinang, P. y Intarapichet, K. 2009. Amino acids and antioxidant properties of oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *ScienceAsia.* 35:326-331.
- Chidinma, C. y Chigozie, J. 2008. Chemical profile of *Pleurotus tuberregium* (Fr) Sing's sclerotia. *The Pacific Journal of Science and Technology.* 10(1):295-299.
- Cordiés, L., Machado, L. y Hamilton, M. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica.* 8(1):13-27.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.
- Cruz, A. 2009. Evaluación morfológica y de productividad de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. Tesis de Licenciatura. UPIBI-IPN, México, DF.
- Daza-Pérez, R. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.* 22: 57-67.

- Espinosa-García, F. J. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. In: Anaya A. L., F. J. Espinosa-García, R. Cruz-Ortega, (Coordinadores). Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas. Instituto de Ecología. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México D. F.
- Fan. L., Pan, H. y Soccol, A. 2006. Advances in Mushroom Research in the last decade. Food Technol. Biotechnol. 44(3):303-311.
- Finberg, r., Moellering, r., Tally, f., Craig, W., Pankey, g., Dellinger, E., West, M., Joshi, M., Linden, P., Rolston, K., Rostchafer, J. y Rybak, J. 2004. The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious Disease. Clinical Infections Diseases. 39:1314-1320.
- Fernández-Riverón, López-Hernández, F., Ponce-Mart, J., y Machado-Betarte, C. 2003. Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar. 32: 44-48.
- Gbolagade, J., Kigigha, L. y Ohimain, E. 2007. Antagonistic effect or extracts of some Nigerian higher fungi against selected pathogenic microorganisms. J. Agric y Environ. Sci. 2(4):364-368.
- González, P., Garza, L., Salinas, M., Vera, L., Garza, F., Ramirez, X. y Torres, O. 2009. Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotoxicidad de dos especies mexicanas de *Suillus* spp. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. XII (001):62-70.
- Greca, A. 2000. La resistencia bacteriana y los nuevos antibióticos. VI Jornadas Internacionales de Medicina Interna- X Jornadas de Medicina Interna del Litoral Argentino. 1:7.
- Gregori, A., Suagelj, M. y Pohleven, J. 2007. Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. Food Technol. Biotechnol. 45(3): 236-247.
- Guzman, G. 1990. Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. Int J of Med Mushrooms. 2(2): 95-123.
- Guzmán, B., Hernández, J., Ortega, S. Viruegas, R. y Barrita, S. 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. Revista Mexicana de Pediatría. 76 (3): 136-145.
- Herman, R. 1995. Impacts of antibiotic-resistant bacteria. Office of Technology Assessment, Congress of the Unites States., Washington, U.S. p. 39-41.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. Micología básica aplicada. Fondo de Cultura Económica y UNAM. México. pp. 552.

- Ijeh, I., Okwujiako, I., Nwosu, P. y Nnodim, H. 2009. Phytochemical composition of *Pleurotus tuber regium* and effect of this dietary incorporation on body/organ weights and serum triacylglycerols in albino mice. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(11): 939-943.
- Illana-Esteban, C. 2008. El hongo maitake (*Grifola frondosa*) y su potencial terapéutico. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:141-144.
- Illana-Esteban, C. 2009. Interés medicinal de *Poria cocos* (= *Wolfiporia extensa*). *Rev. Iberoam. Micol.* 26(2):103-107.
- Iwalokun, B., Usen, U., Otunba, A. y Olukoya, D. 2007. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*. 6(15):1732-1739.
- Jagadish, L., Shenbhagaraman, R., Venkataktishnan, V. y Kaviyarasan, V. 2008. Studies on the Phytochemical, antioxidant and antimicrobial Properties of three indigenous *Pleurotus* species. *Journal of Molecular Biology y Biotechnology*. 1:20-29.
- Kelland, K. 2011. Científicos dicen fuente *E.coli* seguirá siendo misterio. <http://mx.noticias.yahoo.com/cient%C3%ADficos-dicen-fuente-e-coli-seguir%C3%A1-siendo-misterio-161606012.html>
- Komeman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G. y Screckenberger, P. 2004. Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica-PAnamericana. 5a. Edición. Argentina. p 565-620.
- Lindesquist, U., Niedermeyer, T y Julich, W. 2005. The pharmacological potencial of mushrooms. *eCAM* 2(3);285-299.
- Lock, O. 1994. Métodos de Estudios de Productos Naturales. Fondo Editorial, PUCP.
- Lozano, J. y Cuca, L. 2008. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de *Peltostigma guatemalense*, una especie colombiana de Rutáceas contra el parásito *Plasmodium falciparum* y contra cepas bacterianas. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 37 (2): 164-176.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. 2006. Brock, Biología de los microorganismos. 10a edición. Pearson PrenticeHall. Madrid, España.
- Martínez, A. 2001. Sesquiterpenlactonas. Medellín: Universidad de Antioquia-Facultad de Química Farmacéutica: 1-5.

- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla & W. Martínez. 2006. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Biotecnología de Hongos Comestibles, Puebla, México.
- Melo de Carvalho, C., Sales-Campos, C. y Nogueira, M. 2010. Mushrooms of the *Pleurotus* Genus: A review of cultivation techniques. *Interciencia*. 35(3):177-182.
- Moore, A. y Darlymple, L. 1976. *Experimentals Methods in Organic Chemistry* W.B. Saunders, USA.
- Nuñez, B. 2008. Mecanismos de acción de los antibióticos. Uso racional de los antibióticos. *Biblioteca medica* p. 2-5.
- Oyelade, A. y Fagade, E. 2009. A comparative study of the antibacterial activities of some wood\_decay fungi to synthetic antibiotic discs. *EJEAFChe*. 8(3):184-188.
- Paredes, F. y Roca, J. 2004. Acción de los antibióticos, perspectiva de la medición antimicrobiana. *Ambito Farmaceutico, farmacología*. 23(3):116-124.
- Patiño, D. 2003. ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico*. 3:47-56.
- Pavia, L. y Lampman, M. 1988. *Introduction to Organic Laboratory Techniques* W.B. Saunders, USA.
- Pérez, B., Mayett, Y y Martinez, D. 2010. Propiedades nutricionales y medicinales de los hongos comestibles. *Texto de divulgación*. p. 5-11.
- Pérez, R. y Mata, G. 2005. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonaris* en vituta de pino: obtención de nuevas cepas y evaluación de su producción. *Revista Mexicana de Micología*. 20:53-59.
- Prescott, L. y Harley, J. 2002. *Microbiología*. Mc-Graw-hill Interamericana, 5a. edición, España.
- Rahman, A., Hossan, T., Ruhul, S., Asiqur, K., Ali, M. y Khalil, I. 2009. Antimicrobial activity of *Pleurotus ostreatus* (Jacquin ex Fr.) Kummer Upon human pathogenic bacteria. *Bangladesh J. Mushroom*. 3(1): 9-13.
- Rai, M., Tidke, G. y Wasser, S. 2005. Therapeutic Potencial of Mushrooms. *Natural Produt Radiance*. 4(4): 246-257.

- Rivera, A. 1998. Producción de Vitamina D2 a partir de hongos macromicetos: aspectos científicos, técnicos y económicos. CYTED-COLCIENCIAS, Ed. Guadalupe, Bogotá, p.75.
- Rodríguez, A., Durán, E., Anchondo, A., López, J. López, G. y Aguilar, M. 2010 El consumo de hongos comestibles en Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas 55: 13-15.
- Romero, O., Huerta, M., Damián, M., Macías, A., Tapia, A., Parraguirre, J. y Juárez, J. 2010. Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L., CV ROATAN) deshidratada, en relación con otros sustratos agrícolas. *Agronomía Costarricense* .34(1):53-63.
- Salmones, D., Gaitán-Hernández, R., Pérez, R., Guzmán, G. 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus* VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:173-176.
- Salmones, D., Mestizo, L. y Gaitán- Hernández, R. 2004. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Revista Mexicana de Micología*. 18:21-26.
- Sánchez-Vásquez J. y Royse, D. 2001. Crecimiento y fructificación. In: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Ecosur. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. Ed. 2001.
- Santoyo, S., Ramirez-Anguiano, A., Reglero, G., y Soler-Rivas, C. 2009. Improvement of the antimicrobial activity of edible mushroom extracts by inhibition of oxidative enzymes. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 1057-1064.
- Shittu, O., Alofe, F., Onawunmi, G., Ogundaini, A. y Tiwalade, T. 2005. Mycelial growth and antibacterial metabolite production by wild mushrooms. *African Journal of Biomedical Research*. 8: 157-162.
- Sierra, J. y Villa J. 2007. Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram positivas. *Infecciones e inmunologías*. Servicio de microbiología, Facultad de medicina. p.22-32.
- Suay, I., Arenal, F., Asencio, F., Basilio, A., Cabello, M., Díez, M., García, J., González, A., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Peláez, F. y Vicente, F. 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Kluwer Academic Publishers Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 129-139.

- Tambekar, D., Khodke, M. y Khante, B. 2006. The novel antibacterials from two edible mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju*. International Journal of Pharmacology. 2(5):584-587.
- Tafur, D., Torres, J. y Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Asociación Colombiana de Infectología.12: 217-226.
- Toro, C. 2008. Mecanismos de acción y resistencia a antibióticos. Microbiología y micología, Facultad de Medicina. p. 1-31.
- Valencia del Toro, G., Garín, M., Téllez, M., Durán, E. 2008. Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*. Revista Mexicana de Micología 28: 119-123.
- Valencia del Toro, G. y Garín, M. 2010. Manual de productos naturales. UPIBI-Laboratorio de Productos Naturales.
- Valencia del Toro, G., Garín, M., Cuadros, A., Aguilar, L. y Durán, E. 2011. Actividad antibacteriana de extractos de cepas híbridas y parentales de *Pleurotus spp* (en prensa).
- Valencia del Toro, G. y Garín, M. 2011. Propiedades medicinales de los hongos comestibles (en prensa).
- Wasser, S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:258-274.

Página consultada:

[http://microbiol.udc.es/microgen/images/Pared\\_bact.pdf](http://microbiol.udc.es/microgen/images/Pared_bact.pdf).