



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Actividad antibacteriana del medio
extracelular de cultivos líquidos de cepas de
Ganoderma sp. e *Irpex lacteus*”**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener
el título profesional de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

José Francisco Puebla Valdés

DIRECTOR DE TESIS:
D.C. Gerardo Vázquez Marrufo

Morelia, Michoacán

Abril 2019

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología y Conservación Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la dirección del Dr. Gerardo Vázquez Marrufo.

DEDICATORIAS

A mis padres: María Guadalupe Valdés Pérez y José Luis Puebla Gutiérrez por brindarme todo el apoyo y paciencia para terminar mi carrera, por motivarme a seguir luchando por cumplir mis metas, escucharme y aconsejarme día a día para tomar las mejores decisiones de mi vida. Gracias a ustedes nada hubiera sido posible.

A mis hermanas: Nallely Puebla Valdés, Miriam Guadalupe Puebla Valdés y Aracely Puebla Valdés por ser una fuente de motivación y dedicación para alcanzar nuestras metas y ser mejor día a día.

A mi abuelita: Esperanza Pérez García por brindarme el apoyo y la formación para ser una persona de bien, por siempre estar ahí para ayudarme cuando más lo necesito.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la oportunidad para seguir mis estudios universitarios.

Al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y aprender sobre la investigación. Gracias a su orientación y asesoría para culminar mi proyecto de tesis.

A la Dra. Soledad Vázquez Garcidueñas por permitirme laborar en su laboratorio y orientarme en la experimentación de las cepas de bacterias.

A la Dra. Virginia Robinson por permitirme trabajar en su laboratorio y utilizar su rotavapor para concentrar mis extractos.

Al Dr. Andrei Rosales por apoyarme en el uso del MicroStation (Biolog, USA) y las microplacas de 96 pozos (Biolog®, USA).

A la Bióloga Myriam Berenice Marin Esquivel por ser una amiga y compañera para estar ahí cuando más lo necesitaba, por todo su apoyo y motivación para terminar mi proceso de titulación.

A mi Comité sinodal por su tiempo para la revisión de mi tesis, las sugerencias y aportes necesarios para mejorar esta tesis.

A mis colegas y amigos químicos/as por recordarme que todo el esfuerzo tiene una recompensa.

A Dios por permitirme vivir lo suficiente para aprender de la vida y darme las fuerzas para seguir adelante cuando más hace falta.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características generales del Reino Fungi	1
1.2 Grupos taxonómicos	2
1.3 Basidiomicetes	3
1.3.1 Papeles ecológicos	4
1.3.2 Relevancia biotecnológica	6
1.4 Metabolitos secundarios de Basidiomicetes	8
1.4.1 Metabolitos con actividad antioxidante	9
1.4.2 Metabolitos con actividad antitumoral	11
1.4.3 Metabolitos con actividad antiviral	13
1.4.4 Metabolitos con actividad antimicrobiana	14
1.5 Especie <i>Irpex lacteus</i>	15
1.5.1 Metabolitos y actividades farmacológicas.....	16
1.6 Género <i>Ganoderma</i>	19
1.6.1 Metabolitos y actividades farmacológicas.....	20
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Cepas de estudio	24
4.2 Medios de cultivo	25
4.3 Obtención de inóculos.....	26
4.4 Cinéticas de crecimiento	26
4.5 Obtención de concentrados extracelulares	27

4.6 Ensayos de actividad antimicrobiana en medio sólido	27
4.7 Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano empleando microplacas de 96 pozos	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Cinéticas de crecimiento en medio líquido PDB.....	29
5.2 Ensayos de inhibición en medio sólido.	30
5.3 Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano empleando placas de 96 pozos	33
6. DISCUSIÓN	47
7. RESUMEN DE RESULTADOS	55
8. CONCLUSIÓN.....	55
9. LITERATURA CITADA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	pp.
Figura 1	Estructuras químicas de los ácidos ganodéricos A, B, G y H.	21
Figura 2	Unidades poliméricas de β -(1-4)-D-glucopiranosil β -(1-3)-D-glucopiranosil. (B): Unidades poliméricas de β -(1-3)-D-glucopiranosil con ramificaciones en β -(1-6).	22
Figura 3	Cinéticas de crecimiento de las cepas silvestres <i>Ganoderma</i> sp. (CMU-01/13) e <i>Irpep lacteus</i> (CMU-84/13) en medio líquido PDB.	29
Figura 4	Ensayos de inhibición de los extractos extracelulares de <i>I. lacteus</i> (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp. (derecha) contra las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en medio sólido.	30
Figura 5	Ensayos de inhibición de los extractos extracelulares de <i>I. lacteus</i> (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp. (derecha) contra las cepas de <i>Escherichia coli</i> en medio sólido.	31
Figura 6	Ensayo de inhibición de los extractos extracelulares de <i>I. lacteus</i> (izquierda) y <i>Ganoderma</i> sp (derecha) de la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en medio sólido.	32
Figura 7	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> (cepa ATCC 14028) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpep lacteus</i> .	33
Figura 8	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> (cepa ATCC 14028) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	34
Figura 9	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> ST213 (cepa SAL109) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpep lacteus</i> .	35
Figura 10	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> ST213 (cepa SAL109) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	36
Figura 11	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> ST19 (cepa SAL04) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpep lacteus</i> .	37

Figura 12	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> ST19 (cepa SAL04) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	38
Figura 13	Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (cepa EIEC) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpex lacteus</i> .	39
Figura 14	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (cepa EIEC) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	40
Figura 15	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (cepa EPEC) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpex lacteus</i> .	41
Figura 16	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (cepa EPEC) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	42
Figura 17	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (cepa ETEC) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpex lacteus</i> .	43
Figura 18	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (cepa ETEC) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	44
Figura 19	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa PA01) en presencia del extracto extracelular de <i>Irpex lacteus</i> .	45
Figura 20	Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cepa PA01) en presencia del extracto extracelular de <i>Ganoderma</i> sp.	46

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Título	pp.
Tabla 1	Descripción de la actividad anti-oxidante de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.	11
Tabla 2	Descripción de la actividad anti-tumoral de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.	12
Tabla 3	Descripción de la actividad anti-viral de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.	14
Tabla 4	Descripción de la actividad anti-microbiana de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.	15
Tabla 5	Actividades farmacológicas de los componentes bioactivos derivados de los extractos metanólicos y de acetato de etilo extraídos del micelio de <i>Irpex lacteus</i> .	18
Tabla 6	Descripción de las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.	24
Tabla 7	Resumen de la inhibición del crecimiento en medio sólido de las cepas bacterianas de prueba por parte de los extractos extracelulares de <i>Irpex lacteus</i> y <i>Ganoderma</i> sp.	32

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
CMU	Cepario Michoacano Universitario
Mg	Miligramos
LBA	Agar Luria Bertani
MH	Medio Mueller-Hinton
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDB	Caldo Papa Dextrosa
Min	Minutos
S	Segundos
Cm	Centímetros
ml	Mililitros
ST	Secuencia Tipo
G	Gramos
L	Litros
lb/in ²	libras por pulgada cuadrada

RESUMEN

Existe una búsqueda continua para el desarrollo de nuevas estrategias y fármacos que permitan el combate contra bacterias patógenas del ser humano, debido a la emergencia y re-emergencia de enfermedades infecciosas y al desarrollo de resistencia a los antibióticos de uso común. Tanto el basidiocarpo, como el micelio vegetativo de los hongos basidiomicetes representan una fuente importante de metabolitos con actividad antimicrobiana. El micelio vegetativo posee la capacidad para secretar distintos grupos de compuestos orgánicos con actividad biológica al medio de cultivo. En el presente trabajo se analizó la actividad antibacteriana del medio extracelular proveniente de cultivos líquidos del micelio de cepas silvestres de *Ganoderma* sp. (cepa CMU-01/13) e *Irpex lacteus* (CMU-84/13), aisladas en el estado de Michoacán. Las cepas se cultivaron en medio líquido caldo dextrosa papa (PDB) a 28 °C y 120 rpm de agitación, determinándose mediante el peso seco del micelio que la fase logarítmica media (FL) de *Ganoderma* sp. fue al séptimo día de incubación, mientras que la fase estacionaria (FE) al día 14; para *I. lacteus* los días en que se alcanzaron ambas fases fueron 4 (FL) y 10 (FE). El medio de cultivo de cada fase se recuperó por filtración y se concentró en rotavapor a 1/5 del volumen original. La actividad antibacteriana se probó contra distintas cepas de *Salmonella enterica* (ATCC 14028, SAL04, SAL109), *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, EIEC) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA01), colocando sensidiscos impregnados con los concentrados en Agar Mueller-Hinton, donde previamente se inoculó a las cepas bacterianas de prueba. Después de incubar 24 h a 37 °C se midió el halo de inhibición. Los concentrados de *Ganoderma* sp. inhibieron a las 3 cepas de *E. coli* y a las cepas ATCC14028 y SAL04 de *S. enterica*. Mientras que los concentrados de *I. lacteus* inhibieron a las 3 cepas de *E. coli* y la cepa ATCC 14028 de *S. enterica*. La cepa de *P. aeruginosa* (PA01) no mostró susceptibilidad hacia los concentrados. La actividad de los extractos se evaluó en un ensayo alternativo empleando microplacas de 96 pozos, colocando los concentrados en los pozos y cultivos bacterianos de 12 h leyendo a 590 y 750 nm el crecimiento en la MicroStation (Biolog, USA) cada dos horas

durante 28 h. El extracto de la FE de *Ganoderma* sp. inhibió a todas las cepas bacterianas de prueba, mientras que el de FL no inhibió a ETEC. En el caso de *I. lacteus*, los extractos de la FE inhibieron a la mayoría de las cepas excepto a SAL04, ETEC y PA01, mientras que los extractos de la FL no inhibieron a SAL04 y PA01. Los resultados obtenidos muestran que el micelio de las dos cepas de basidiomicetes analizadas produce metabolitos extracelulares con actividad antibacteriana. Estudios posteriores son necesarios para identificar el tipo de sustancias con actividad antibacteriana secretadas por el micelio de *Ganoderma* sp. e *Irpex lacteus*.

Palabras clave: *Ganoderma*, *Irpex*, micelio, medio extracelular, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

There is a continuous search for the development of new strategies and drugs that allow the fight against pathogenic bacteria of the human being, due to the emergence and re-emergence of infectious diseases and the development of resistance to commonly used antibiotics. Both the basidiocarp and the vegetative mycelium of the basidiomycete fungi represent an important source of metabolites with antimicrobial activity. The vegetative mycelium has the ability to secrete different groups of organic compounds with biological activity to the culture medium. In the present work, the antibacterial activity of the extracellular medium from liquid cultures of the mycelium of wild strains of *Ganoderma* sp. (cepa CMU-01/13) e *Irpex lacteus* (CMU-84/13), isolated in the state of Michoacan. The strains are grown in liquid medium dextrose broth potato (PDB) at 28 ° C and 120 rpm of agitation, determined by the dry weight of the mycelium that the mean logarithmic phase (LP) of *Ganoderma* sp was on the seventh day of incubation, while the stationary phase (SP) at day 14; for *I. lacteus* the days when both phases were reached were four (LP) and 10 (SP). The culture medium of each phase was recovered by filtration and concentrated in a rotavapor to 1/5 of the original volume. The antibacterial activity was tested against different strains of *Salmonella enterica* (ATCC 14028, SAL04, SAL109), *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, EIEC) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA01), placing sensi-disk impregnated with the concentrates in Mueller-Hinton Agar, where the bacterial strains of the test were previously inoculated. After incubation for 24 h at 37 °C, the inhibition halo was measured. Concentrates of *Ganoderma* sp. inhibited the 3 strains of *E. coli* and the strains ATCC14028 and SAL04 of *S. enterica*. While the concentrates of *I. lacteus* inhibited the 3 strains of *E. coli* and the strain ATCC 14028 of *S. enterica*. The *P. aeruginosa* strain (PA01) showed no susceptibility to the concentrates. The activity of the extracts was evaluated in an alternative assay using 96 well microplates, placing the concentrates in the wells and bacterial cultures of 12 h reading at 590 and 750 nm growth in the MicroStation (Biolog, USA) every two hours for 28 h. The extract of the SP of *Ganoderma* sp. inhibited all test bacterial strains, while the LP

didn't inhibit ETEC. In the case of *I. lacteus*, extracts from the SP inhibited most of the strains except SAL04, ETEC and PA01, while extracts from the LP did not inhibit SAL04 and PA01. The results obtained show that the mycelium of the two strains of basidiomycetes analyzed produce extracellular metabolites with antibacterial activity. Subsequent studies are necessary to identify the type of substances with antibacterial activity secreted by the mycelium of *Ganoderma* sp. and *Irpex lacteus*.

Key words: *Ganoderma*, *Irpex*, mycelium, extracellular medium, antibacterial activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del Reino Fungi

En 1969, Robert Whittaker estableció el sistema de los cinco reinos, clasificando a los organismos de acuerdo al tipo de célula, nivel de organización, tipo de nutrición y tipo de reproducción; en dicha clasificación se estableció por primera vez a los hongos dentro de un Reino independiente.

El reino Fungi representa una de los más grandes acervos de biodiversidad, desempeñando funciones ecológicas cruciales en todos los ecosistemas, presentando una gran variabilidad morfológica y ciclos de vida diversos (Herrera y Ulloa, 1990; citado por Aguirre-Acosta et al., 2013). Este Reino designa a un grupo de organismos con células eucariotas y que suelen crecer como filamentos llamados “hifas” los cuales se extienden sólo en el ápice y que, por lo tanto, se dice que tienen un crecimiento apical. Las hifas, dependiendo del subgrupo taxonómico de hongos, pueden o no contener septos transversales, originando compartimentos internos que a menudo contienen varios núcleos. En otros casos, las hifas no presentan septos, de tal manera que el contenido citoplásmico presenta continuidad a lo largo de toda la célula, observándose múltiples núcleos dentro de ésta.

Los hongos son heterótrofos, ya que necesitan compuestos orgánicos preformados y moléculas con esqueletos de carbono para la síntesis celular. Absorben nutrientes simples y solubles a través de la pared y membrana celular. Tienen una pared celular rígida con un componente polisacárido, hecho de mananas, glucanas y quitina, asociado íntimamente con proteínas. Además, como característica contienen carbohidratos solubles y compuestos de almacenamiento, incluyendo manitol y otros alcoholes de azúcar, trealosa y glucógeno. Su reproducción puede ser sexual o asexual, y típicamente producen esporas. Estas esporas pueden variar en forma, tamaño y otras propiedades que se relacionan con sus diversos papeles en la dispersión o la supervivencia latente. La mayor parte de los hongos crecen entre 0 °C y 35 °C pero la temperatura óptima varía de 20 °C a 30 °C. A diferencia de las bacterias, los hongos prefieren medios ácidos

para su crecimiento, siendo un pH de 4.5 y 5 el óptimo para la mayoría de las especies investigadas.

En cuanto a la estimación de la diversidad de hongos en el planeta, los estudios realizados desde 1991 a la fecha revelan cifras muy variables que van desde 500 000 hasta 9.9 millones de especies. En 2005 O'Brien y colaboradores realizaron un análisis ambiental y de una comunidad fúngica de suelos de Carolina del Norte, EUA, revelando un incremento de especies nuevas de hongos en la zona; soportando una estimación global de 3.5 a 5.1 millones de especies de hongos. Para 2007 Müller y Schmit, sugieren utilizar la hipótesis de Hawksworth (1991) para calcular cuántos hongos hay en la tierra, pero además, sugieren utilizar otros parámetros como la distribución geográfica, endemismos, especificidad de hospederos, diversidad de micro y macrohongos sobre material vegetal en diversos hábitats y su asociación con otros organismos. Así, Hibbett y colaboradores (2011) señalaron que se necesitan 1,170 años para describir 1.4 millones de hongos basándose en Hawksworth (1991) y de 2,840 a 4,170 años para describir 3.4 a 5 millones de hongos siguiendo el criterio de O'Brien (2005). En la actualidad se siguen describiendo muchas especies nuevas de hongos macroscópicos y microscópicos, sin embargo, el saber cuáles y cuantas especies de organismos existen puede crear especulaciones o controversias. Se cree que es relevante el saber cifras acerca de las especies de hongos existentes pero también el conocimiento biológico de cada uno de estos organismos (Aguirre-Acosta et al., 2013).

1.2 Grupos taxonómicos

Con los avances continuos en la investigación de los hongos, comprendiendo estudios estructurales y ultraestructurales, bioquímicos y particularmente de biología molecular, la clasificación de estos organismos está cambiando frecuentemente y son actualmente considerados como polifiléticos (Ulloa y Hanlin, 2014). Ulloa y Hanlin (2014) al considerar a los hongos como organismos con diferentes filogenias, reconocen ocho phyla para el Reino Fungi:

- Phylum Basidiomycota
- Phylum Blastocladiomycota
- Phylum Zygomycota
- Phylum Microsporidia
- Phylum Ascomycota
- Phylum Glomeromycota
- Phylum Chytridiomycota
- Phylum Neocallimastigomycota

Aunque, Hibbett et al. (2007) previamente consideran que el Phylum Zygomycota debe de desaparecer debido a su reconocido carácter polifilético, conservando el resto de grupos.

1.3 Basidiomicetes

Los basidiomicetos (Basidiomycota) son una división del reino Fungi que incluye los hongos que producen basidios con basidiosporas. Las 30000 especies descritas de basidiomycota incluyen las conocidas setas y los hongos de sombrero (Deacon, 2006). Este phylum es el más conocido pues comprende numerosos y variados tipos de hongos que producen estructuras sexuales llamadas basidiocarpos los cuales generalmente son visibles a simple vista. Las basidiocarpos poseen una estructura denominada basidio caracterizada por ser una célula terminal en forma de clavo en la que se produce cariogamia y meiosis, produciendo generalmente cuatro esporas exógenas denominadas basidiosporas. Las basidiosporas resultantes de la cariogamia son unicelulares, uninucleadas y haploides.

Los basidiomycota se reproducen asexualmente por medio de artrósporas y fragmentación del micelio y sexualmente principalmente por plasmogamia de hifas monocarióticas haploides. En su ciclo sexual las basidiosporas germinan formando micelios haploides que al crecer se ponen en contacto con otro compatible produciéndose la plasmogamia. Una vez que ocurre la plasmogamia entre micelios haploides de sexo complementario, se generan micelios compuestos por

hifas septadas dicarióticas y en los que los septos impiden el paso a los núcleos de un segmento a otro. Este evento origina un micelio dicariótico a partir del cual se forma el cuerpo fructífero y en cuyo himenio se formarán los basidios. Estos basidios al principio son dicarióticos pero al sufrir cariogamia estos forman un núcleo diploide. Durante las etapas de la división meiótica en la que se generan cuatro núcleos haploides, el basidio cambia su morfología a medida de que madura, formando esterigmas, que son prolongaciones de su citoplasma, a las cuales migraran los cuatro núcleos formando la basidiospora. Estas serán luego liberadas al medio ambiente recomenzando el ciclo.

1.3.1 Papeles ecológicos

Los hongos desempeñan papeles ecológicos cruciales para el mantenimiento de la biodiversidad mundial, participando de manera relevante en los procesos vitales para el mantenimiento de los ecosistemas. Tal vez la función más evaluada y reconocida sea como descomponedores de materia orgánica no viva o en putrefacción, lo que realizan mediante una amplia gama de enzimas extracelulares que descomponen los polímeros orgánicos complejos en formas más simples. Este proceso es un paso esencial en el ciclo del carbono, el cual en conjunto a la luz solar es aprovechado por las plantas para generar nutrientes, alimentos (como glucosa, sacarosa, almidón, celulosa, etc.) y oxígeno, estos no solamente servirán para que la planta siga con su ciclo de vida sino que además será aprovechado por otros seres vivos para su propia sobrevivencia.

Además de su papel central en el ciclo del carbono y los nutrientes, los hongos también son un componente importante de las redes tróficas terrestres. El micelio fúngico es la principal fuente de carbón en una serie de redes tróficas (Wardle, 2002), y los cuerpos fructíferos de hongos pueden servir como una importante fuente de alimento para grandes vertebrados, incluidos los humanos (Peay et al., 2011).

Existen distintos tipos de asociaciones entre hongos y plantas siendo una de las más comunes las micorrizas, que son simbiosis entre las raíces de las

plantas y los hongos. Se estima que ocurren en al menos el 80% de todas las plantas vasculares, incluidas las angiospermas, gimnospermas, muchas pteridofitas y algunas briófitas (Deacon, 2006). Se cree que muchas de estas asociaciones son mutualistas, porque el hongo normalmente absorbe los nutrientes minerales del suelo y los canaliza a la planta, mientras que la planta proporciona al hongo azúcares. La dependencia de las micorrizas para nutrición mineral y la ausencia de otros hongos competencia puede alterar significativamente la estructura de la comunidad vegetal (Weber et. al., 2005; citado por Peay et al., 2011). Sin embargo, no solamente se ve afectada la comunidad vegetal, puesto que los hongos también forman simbiosis mutualistas con insectos, como las hormigas, las termitas, las avispas y los escarabajos. En este tipo de asociaciones, mientras los insectos se encargan de transportar y dispersar a los hongos, los hongos se encargan de descomponer el material vegetal que algunos insectos no pueden metabolizar a cambio de una fuente de alimento constante y un ambiente estable que generalmente no tiene patógenos (Currie et al., 2003; citado por Peay et al., 2011).

A pesar de que la mayoría de las simbiosis entre hongos y plantas son beneficiosas para ambos organismos, también hay muchos ejemplos en la que las plantas son parasitadas por hongos u hongos parasitados por plantas (Johnson et al., 1997; citado por Peay et al., 2011). Los hongos son considerados los patógenos de plantas más comunes e importantes, ya que causan pérdidas graves en los cultivos provocando la podredumbre y descomposición de frutas y vegetales. Algunos otros hongos también pueden actuar como depredadores atrapando, envenenando o parasitando y alimentándose de otros grupos de invertebrados del suelo, como pequeños insectos o incluso nematodos, ejemplos claros de este comportamiento son atribuidos a los hongos depredadores y nematófagos (Thorn y Barron, 1984; citados por Peay et al., 2011). Curiosamente, los hongos que manifiestan este tipo de comportamiento son los que se encuentran en ambientes pobres en nitrógeno, lo que sugiere que buscan nitrógeno en lugar de carbono en su depredación.

Finalmente, cabe mencionar la existencia de otro tipo de hongos llamados “hongos parásitos”, que son los que se desarrollan y llevan a cabo su existencia sobre tejidos vivos. Dentro de estos podemos encontrar a los parásitos facultativos y los parásitos obligados (León, 2004); los parásitos facultativos son capaces de causar enfermedades y que además son capaces de crecer y desarrollarse sobre materia orgánica muerta, ya sea de manera natural o en cultivos artificiales. Lo que implica que este tipo de hongos desde el punto de vista nutritivo es saprófito y ecológicamente sea parásito. Los parásitos obligados son aquellos que sólo pueden vivir a expensas del protoplasma vivo y que se desarrollan anormalmente en un medio artificial.

1.3.2 Relevancia biotecnológica

Los seres humanos a lo largo de la historia nos hemos abastecido de los recursos naturales que nos brindan los ecosistemas que nos rodean para la supervivencia, desde organismos vivos hasta organismos no vivos, todos satisfaciendo las necesidades que el hombre necesita para vivir. En el caso de los hongos y al igual que con las plantas y animales, el hombre ha aprovechado al máximo los beneficios de estos organismos y mediante investigaciones continuas ha logrado obtener un sinnúmero de usos que han facilitado la vida del hombre (Naranjo, 2014).

Dentro de las aplicaciones más destacadas de los hongos podemos encontrar su uso en la industria alimenticia y farmacéutica. En la industria alimenticia los comúnmente usados son las levaduras y mohos, las levaduras ayudan a dar estabilidad y esponjar las masas para la fabricación de productos a base de harina. Además de ayudar a la fermentación de alcohol para elaborar cervezas y vinos, fermentan lactosa para la elaboración de diversos productos lácteos como son yogurt, quesos, leche, etc. (Naranjo, 2014). Los mohos por otra parte ayudan a la fermentación. También cabe mencionar la participación de una múltiple variedad de hongos macroscópicos particularmente del grupo de los basidiomicetos que han sido aprovechados para la dieta de muchos seres

humanos como ingesta de alimentos, brindando una fuente de carbono y energía que será utilizada para realizar sus actividades diarias y principalmente su sobrevivencia.

En cuanto a la industria farmacéutica, los hongos juegan un papel muy relevante en la salud de los seres humanos. Quizá las investigaciones sobre sus actividades farmacológicas se puedan deber principalmente a cientos de registros en la que se describen sus usos terapéuticos en la medicina tradicional, y que con los cuáles han sido tratadas muchas enfermedades con resultados muy favorables. Estas actividades se deben principalmente a la acción que tienen ciertas sustancias que los mismos hongos sintetizan, de las cuales se ha demostrado una potente efectividad terapéutica al tratar o curar diversas enfermedades, a estas sustancias también se les conoce como metabolitos secundarios (León, 2004). De estos metabolitos secundarios se han logrado aislar principios activos que han servido para la creación de medicamentos entre los cuales destacan los: antibióticos, analgésicos, antioxidantes, anti-tumorales y anti-diabéticos.

Otro uso biotecnológico de los hongos se da en la agricultura, en donde han sido empleados como bio-controladores de plagas que afectan a los cultivos de vegetales, frutas y algunas plantas que son cosechadas para su comercialización y distribución en diferentes partes del mundo, provocando grandes pérdidas económicas a los agricultores que dependen de la venta de estos cultivos para sobrevivir. En la actualidad y con la creciente demanda de productos agrícolas frescos, saludables y orgánicos, muchos agricultores optan por dejar a un lado todos aquellos productos químicos sintéticos que a pesar de ser efectivos para controlar plagas también pueden ser extremadamente dañinos a la salud humana, y que por lo tanto, buscan alternativas naturales que surtan el mismo efecto positivo al controlar las plagas que dañan los cultivos.

Pero, no solo su uso como bio-controlador es relevante, también, el uso de enzimas de hongos ligninolíticos son aprovechados para la degradación de la biomasa vegetal con importancia en distintos campos de la ciencia e industria (Makela et al., 2014). Las primeras aplicaciones de las enzimas de degradación en

la industria se remontan a 1916, con el trabajo de Okada “Hidrólisis de almidón y maltosa” acompañadas de un esfuerzo de investigación creciente en su caracterización y producción. La biomasa vegetal consiste principalmente en polímeros, en particular polisacáridos y lignina, al no poder absorber estos compuestos poliméricos los hongos producen enzimas extracelulares que degradan a los polímeros a oligómeros mono y cortos (Makela et al., 2014). Debido a esta propiedad la investigación de estas enzimas ha sido impulsada por el interés social, ya que, la biomasa vegetal aparte de ser la fuente principal de carbono en la naturaleza también es la principal materia prima de muchos alimentos y otros productos que se utilizan en la vida cotidiana.

Las aplicaciones de las enzimas fúngicas en la industria durante el procesamiento de la biomasa vegetal implican la modificación o degradación de los polímeros de la planta, dando importantes usos en la panadería, pulpa, papel, alimentación animal, textiles, detergentes, bebidas, biocombustibles y bioquímicos (de Vries et al., 2011).

1.4 Metabolitos secundarios de Basidiomicetes

Algunos de los fármacos para uso en salud humana y animal, así como fungicidas agroquímicos más exitosos en el mercado se han desarrollado a partir de metabolitos secundarios de hongos. Siendo estos organismos el segundo grupo biológico más diverso, son quizá proporcionalmente los menos investigados, ya que sólo en una fracción de todas las especies de hongos descritas hasta ahora se ha demostrado la producción de metabolitos farmacológicamente importantes (Aly et al., 2011). Entre los metabolitos con actividad farmacológica descrito en hongos se incluyen antibióticos (penicilinas, cefalosporinas y ácido fusídico), agentes antifúngicos (griseofulvina, estrobilurinas y equinocandinas), agentes reductores del colesterol (meviolina, lovastatina y simvastatina), fármacos inmunosupresores (ciclosporinas), e incluso algunas micotoxinas potentes como los alcaloides del cornezuelo de centeno (Kozlovskii et al., 2013).

Los metabolitos secundarios son compuestos bioactivos de bajo peso molecular que no están implicados en los procesos metabólicos centrales de los hongos, estos surgen como intermediarios del metabolismo primario al degradar los sustratos que utilizan para su alimentación segregando enzimas extracelulares que actúan fuera del cuerpo del hongo. Estos pueden clasificarse de acuerdo a cinco principales fuentes metabólicas (Silva et al., 2012):

- Vías derivadas de aminoácidos que dan lugar a la síntesis de péptidos no ribosómicos (NRPS).
- Vía del ácido Shikimico que dan lugar a compuestos aromáticos
- Vía del acetato-malonato que da lugar a los llamados oliacetilenos o policétidos
- Vía del ácido mevalónico que da como resultado la biosíntesis de los terpenoides
- Vías de polisacáridos y péptido-sacáridos.

Tradicionalmente se creía, particularmente en Asia, que los remedios de muchas enfermedades podían ser prevenidas o tratadas utilizando como medicamentos una variedad de hongos productores de metabolitos bioactivos con potenciales actividades biológicas. En las últimas décadas, de los Basidiomicetes se han aislado compuestos interesantes de diferentes orígenes con múltiple actividad antibacteriana, antifúngica, fitotóxica, citostática, inmunosupresora y neurológica (Aly et al., 2011). Algunos de los cuales se mencionan de manera más detallada a continuación.

1.4.1 Metabolitos con actividad antioxidante

El oxígeno molecular es un elemento muy importante para las formas de vida aeróbicas existentes en la tierra ya que están asociadas con procesos de oxidación que son vitales para su supervivencia. Su consumo metabólico está implicado en el proceso bioquímico de la respiración celular el cual permite la

producción de energía; sin embargo, a partir de esta molécula se forman moléculas pequeñas altamente reactivas denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), como el superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($OH^\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Macedo-Márquez, 2012). Estas especies tienen un papel importante en la regularización de varios procesos celulares, como la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citosinas, unión de proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, canales de iones, entre otras (Macedo-Márquez, 2012).

Paradójicamente, este mecanismo vital también puede conducir a daños en las células y tejidos que causan el proceso de envejecimiento a través de la producción de radicales libres y varias especies de oxígeno reactivo (De Silva et al., 2013). Estos radicales reaccionan con componentes celulares y estructurales afectando la función normal y provocando diversos efectos perjudiciales a largo plazo.

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir reacciones en cadena de oxidación al eliminar los intermedios de radicales libres, previniendo los efectos adversos de estos mismos sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (Halliwell, 2012). En la actualidad, los estudios e investigaciones biotecnológicas enfocados en antioxidantes naturales han demostrado efectos terapéuticos favorables para controlar enfermedades crónicas y retrasar los procesos de envejecimiento en general. En particular, las propiedades antioxidantes de las setas silvestres han sido estudiadas ampliamente y que debido a su amplio contenido de fenoles, tocoferoles, ácido ascórbico y flavonoides, han dado resultados muy eficaces para tratar enfermedades crónicas relacionadas al estrés oxidativo (Ferreira et al., 2009; Mohsin et al., 2011).

A continuación se presentan algunos metabolitos secundarios extraídos de setas silvestres y que han dado como resultado una actividad anti-oxidante favorable.

1.4.2 Metabolitos con actividad antitumoral

Los tumores son considerados como masas anormales de tejido que resultan de la proliferación anormal de las células y que a su vez son causados por múltiples factores que van desde los genéticos hasta aquellos que son inducidos por agentes químicos o con altos grados de radiación (Petrova, 2012; Xu et al., 2012).

Tabla 1. Descripción de la actividad anti-oxidante de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.

Metabolito	Aislado de	Actividad	Referencias
Phellidigrin G	<i>Phellinus igniarius</i>	Inhibe la peroxidación lipídica microsomal.	Wang et al. 2005
Davallialactona	<i>Inonotus xeranticus</i>	Reduce la senescencia prematura y la inflamación sobre el estrés oxidativo de la glucosa.	Lee et al. 2008; Yang et al. 2013
Inonoblina A, B y C	<i>Inonotus obliquus</i>	Eliminación de radicales libres del anión superóxido.	Lee et al. 2007
Pulvinatal	<i>Cyathus stercoreus</i>	Eliminación de radicales libres en el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y en el 2, Radical catiónico de 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS)	Kang et al. 2007

Cabe resaltar que los tumores no tienen una manera específica de aparecer sino que pueden ocurrir en diferentes partes u órganos del cuerpo humano. A pesar de ser los responsables de una de las enfermedades con los más altos índices de muertes, el cáncer, en la actualidad con los múltiples avances en las investigaciones puede ser ya tratado alargando la vida de aquellos que sufren este mal y que en ocasiones puede llegar a desaparecer. Hoy en día los tratamientos

más utilizados para controlar esta enfermedad van desde el uso de quimioterapias hasta el uso de compuestos sintetizados artificial y naturalmente que han demostrado tener una gran eficacia para contrarrestar y prevenir la proliferación anormal de células, estos compuestos son denominados agentes antitumorales.

Los metabolitos biológicamente activos aislados de hongos proporcionan efectos favorables en el control y la prevención del desarrollo de tumores. Algunos de los principales metabolitos que han demostrado ejercer efectos citotóxicos en varias células cancerosas son los triterpenoides (tales como los ácidos ganodéricos, lucidimoles, lanostanoides, radianspenos, ganodermanondiol, ganoderiol F y ganodermanontriol) y polifenoles (como las estirilpironas) (Weng & Yen, 2010 et al.; Xin et al., 2011; Liu et al., 2012). En la Tabla 2 se presentan algunos metabolitos secundarios extraídos de hongos silvestres y que han dado como resultado una actividad anti-tumoral favorable.

Tabla 2. Descripción de la actividad anti-tumoral de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.

Metabolito	Aislado de	Actividad	Referencias
Ácido ganodérico T	<i>Ganoderma lucidum</i>	Apoptosis de células tumorales pulmonares metastásicas a través de la disfunción mitocondrial.	Tang et al. 2006
Codicepina	<i>Cordyceps sinensis</i> y <i>C. militaris</i>	Inhibición de la poliadenilación a dosis bajas y la activación de la vía de quinasa activada por Adenosin Monofosfato a dosis más altas.	Wong et al. 2010
Speciosin B	<i>Hexagonia speciosa</i>	Citotoxicidad contra líneas celulares cancerígenas.	Jiang et al. 2009
Formitosida K	<i>Fomitopsis nigra</i>	Inducir apoptosis a través de ROS dependiente de la disfunción mitocondrial.	Bhattarai et al. 2012

1.4.3 Metabolitos con actividad antiviral

Por lo general, una infección viral se da cuando el virus inserta su material genético en la célula infectada, la cual deja de cumplir las funciones que realiza y comienza a replicar al virus que poco a poco va infectando a más células hasta causar una enfermedad que en algunas ocasiones puede ser letal. En la actualidad, las infecciones virales son un problema de salud para el hombre, ya que muchas de estas son causantes de enfermedades difíciles de controlar, que continúan matando a millones de personas en todo el mundo (Kuiken et al., 2003). Además, el uso de fármacos antivirales eficaces y seguros se complica ya que como se ha mencionado los virus utilizan las células del huésped para replicarse y esto dificulta que el fármaco tenga una actividad antiviral específica que no dañe a la célula o alguna de sus funciones (De Christopher et al., 2012).

En las últimas décadas los productos naturales han sido reconocidos por su amplia diversidad estructural y una amplia variedad de actividades farmacológicas. Los metabolitos fúngicos han estimulado el interés de los investigadores por sus efectos antivirales que ejercen no sólo sus extractos crudos, sino también los compuestos aislados, estos pueden actuar inhibiendo enzimas virales y la síntesis de ácidos nucleicos virales (De Silva et al., 2013). Algunos de ellos son derivados de los triterpenoides (como el ganodermadiol, lucidadiol y ácido aplanoxídico), extractos acuosos y de etanol, fracciones de polisacáridos y enzimas propias del hongo (Rincão et al., 2012; De Silva et al., 2013).

En la Tabla 3 se presentan algunos metabolitos secundarios extraídos de hongos silvestres y que han dado como resultado una actividad anti-viral favorable.

Tabla 3. Descripción de la actividad anti-viral de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.

Metabolito	Aislado de	Actividad	Referencias
Dimetilguanosina	<i>Cordyceps militaris</i>	Inhibición de la proteasa del VIH-1	Jiang et al. 2011
Ácido Lucidenico O, Ganoderiol y Ácido Ganodérico.	<i>Ganoderma lucidum</i>	Anti-VIH-1 e inhibidores de la proteasa del VIH-1	Min et al. 1998
Epicocina E y H	<i>Cordyceps sinensis</i>	Inhibición sobre la replicación de VIH-1 en células C8166	Guo et al. 2009
Extractos acuosos y de etanol con fracciones de polisacáridos	<i>Lentinula edodes</i>	Actividad anti-viral contra la replicación del poliovirus y virus de herpes bovino.	Rincão et al. 2012

1.4.4 Metabolitos con actividad antimicrobiana

Un agente antimicrobiano es una sustancia que inhibe el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos o protozoos (De Silva et al., 2013). Además, los hongos son fuentes ricas de antibióticos naturales, por ejemplo, los glucanos de su pared celular que no solo son bien conocidos por su actividad inmunomoduladora, sino que además, tienen metabolitos secundarios derivados de los glucanos que combaten bacterias y hongos. Un ejemplo bien conocido es el del antibiótico aislado del hongo *Clitopilus passeckerianus* el cuál debido a su eficacia bactericida y con múltiples investigaciones llevó al descubrimiento de retapamulin con propiedades farmacológicas mejoradas y desarrollado como medicamento antibiótico (Nagabushan, 2010).

El renovado interés en el hallazgo de compuestos antimicrobianos naturales a partir de hongos han dado como resultado numerosos extractos que probaron tener una actividad positiva inhibiendo el crecimiento de microorganismos

patógenos, especialmente aquellas bacterias que han desarrollado multi resistencia a varios antibióticos y que han dificultado el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Boucher et al., 2009).

En la Tabla 4 se describen algunos metabolitos secundarios extraídos de setas silvestres y que han dado como resultado una actividad anti-microbiana favorable.

Tabla 4. Descripción de la actividad anti-microbiana de algunos metabolitos secundarios aislados de diversos hongos.

Metabolito	Aislado de	Actividad	Referencias
Ácido astraodorico A y B	<i>Astraeus pteridis</i>	Actividad anti-microbiana in vitro contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i> .	Centko et al. 2012.
Coprinol.	<i>Coprinus sp</i>	Actividad bactericida contra la multirresistencia de bacterias Gram positivas	Johansson et al. 2001.
Plectasin	<i>Pseudoplectania nigrella</i>	Actividad anti-microbiana contra bacterias Gram positivas incluyendo <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Mygind et al. 2005.
Ganomicin A y B	<i>Ganoderma pfeifferi</i>	Actividad anti-microbiana contra varias bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.	Mothana et al. 2000.

1.5 Especie *Irpex lacteus*

Irpex lacteus surgió como un basidiomiceto de podredumbre blanca cuyo grupo de hongos comprende entre 1600 y 1700 especies que se caracterizan por tener la capacidad de despolimerizar y mineralizar lignina (Novotny et al., 2009). La investigación de los basidiomicetes de podredumbre blanca comenzó en la

década de 1980 cuando *Phanerochaete chrysosporium* demostró tener una gran capacidad de biodegradar diversos contaminantes ambientales y se convirtió en un modelo de la investigación de biodegradación.

Los primeros estudios realizados a *I. lacteus* estuvieron relacionados a la actividad celulolítica y proteolítica; sin embargo, desde la década de 1990, Leštan y Lamar (1996) demostraron su potencial de degradación. Un análisis filogenético basado en secuencias de DNA ribosómico mitocondrial han mostrado que *I. lacetus* tiene relación con *Oxyporus latermarginatus* y *Hexagonia hydroides* (Ko y Jung 1999; Binder et al., 2005), hongos que por sus características saprotróficas guardan estrecha relación con *I. lacteus* clasificándolo así en el reino Fungi, división Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Polyporales y a la familia Steccherinaceae.

Esta especie fúngica normalmente crece en zonas templadas del norte, a menudo encontrado en América del Norte y Europa. Fructifica en ramas muertas, troncos de árboles de hoja caduca y ocasionalmente en coníferas muertas durante todo el año, causando podredumbre blanca. Sus basidiocarpos son anuales resupinados de 10-40 mm de ancho, blanquecino, aterciopelado y peludo, su poro superficial va de blanco a crema y tubos que se rompen en dientes aplastados de hasta 6 mm de largo (Novotny et al., 2009).

A pesar de que *I. lacteus* es más aprovechado en la industria textil y papelera, ya que funge como uno de los principales degradadores de materia orgánica y otros contaminantes, también ha mostrado una gran eficacia en el campo farmacéutico al producir ciertos metabolitos con características farmacológicas y bioquímicas útiles para su aplicación en el tratamiento y prevención de enfermedades humanas.

1.5.1 Metabolitos y actividades farmacológicas

Debido a que los trabajos de investigación de *I. lacteus* están más enfocados al potencial biotecnológico de sus enzimas degradadoras, ha sido muy poco el estudio que ha tenido su actividad farmacológica. Sin embargo, algunos

estudios utilizando extractos de cultivo crudos aislados de basidiomicetos y en los que se ve implicado *I. lacteus* demuestran que tienen altas probabilidades de tener actividades anti-fúngicos, anti-bacteriales y anti-tumorales.

En 2003 Rosa y colaboradores realizaron un estudio con 103 extractos de acetato de etilo de cultivos obtenidos de 84 especies de basidiomicetos colectados de diferentes ecosistemas brasileños, probando su actividad anti-fúngica y anti-bacteriana. El extracto de *I. lacteus*, fue el más activo, siendo capaz de inhibir el crecimiento de hongos patógenos como *Candida albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, así como de las especies bacterias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y *Staphylococcus aureus*. En dicho estudio no se identificaron las moléculas responsables de la actividad antimicrobiana. También se ha documentado que *I. lacteus* produce un compuesto nematocida conocido como 5-pentil-2-furaldehído (Hayaschi, 1981; citado por Rosa et al., 2003), el cuál aparte de eliminar nematodos tiene la capacidad de ser bactericida y fungicida. Otra investigación similar fue la que realizó Alves y colaboradores (2012), quienes utilizaron diversos basidiomicetos para aislar extractos del micelio y que mediante los métodos de micro dilución, difusión en disco y difusión radial, pudo obtener valores de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC), concentraciones que inhiben el 50% de crecimiento (IC₅₀) y zona interna de diámetro (IZD), estos valores representan la efectividad que tienen los extractos del micelio para inhibir el crecimiento bacteriano. Alves y colaboradores (2012) reportan que los extractos del micelio de *I. lacteus* demostraron actividad anti-bacteriana en contra de bacterias Gram-positivas como: *B. cereus* y *S. aureus*; y de bacterias Gram-negativas como: *E. coli* y *S. enterica* serotipo Typhimurium. Sin embargo, solo reporta que esta actividad anti-bacteriana se debe a un extracto de acetato de etilo proveniente del micelio con un amplio espectro de actividad.

Chaudhary (2015) profundizó más en la investigación de la actividad farmacológica de *I. lacteus* y realizó el primer estudio en el que determinaba la actividad anti-microbiana de los extractos metanólicos y extractos de acetato de etilo obtenidos del micelio, así como la identificación de los componentes

bioactivos mediante un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y su actividad farmacológica. Como resultado se obtuvieron los componentes bioactivos derivados de los extractos metanólicos y de acetato de etilo que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividades farmacológicas de los componentes bioactivos derivados de los extractos metanólicos y de acetato de etilo extraídos del micelio de *Irpex lacteus*.

Componente bioactivo	Fórmula molecular	Actividad
Aza fenantreno, 2-metil-3-(2-feniletílico)	C ₂₂ H ₁₇ N	Actividad anti-bacteriana y anti-tumoral
2-secoandrosta-1, 4, 6-triene-17,19-diol, 2 cyano-4-metil-diacetato	C ₂₅ H ₃₃ NO ₄	Reprime la replicación viral de células infectadas con VIH y actividad anti-tumoral.
Ciclohexasiloxano dodecametil	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	Actividad anti-microbiana, inmunomoduladora y anti-tumoral
Cicloheptasiloxano	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si ₇	Actividad anti-microbiana, inmunomoduladora y anti-tumoral
Ácido Gentisico	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃	Actividad anti-fúngica
Ácido ftálico, butil-2-etil-hexil éster	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	Actividad anti-bacterial
Ácido 9,12-Octadecadienoico, éster de metilo	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	Actividad anti-inflamatoria, hipocolesterolémica, anti-cancerígena, hepatoprotectora y anti-histaminica
Ácido propanoico, 2-(3-acetoxi-4, 4, 14-Trimetil-landrost-8-en-17-il)	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	Actividad analgésica, Anti-diabético, anti-oxidante, anti-inflamatorio, anti-tumoral, anti-espasmódico y vasodilatador
Ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexanoico	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	Actividad anti-diabética, anti-cancerígena y anti-asmático.

1.6 Género *Ganoderma*

Las especies de *Ganoderma* son algunas de las cuales se tiene mayor conocimiento y uso en cuanto a sus propiedades medicinales. El primer registro data de hace más de 2000 años en la medicina tradicional oriental, su principal uso era para regular el sistema inmune y promover la longevidad (Wagner et al., 2003). Sin embargo, también se destaca por su importancia ecológica al degradar lignina y celulosa de la madera.

Taxonómicamente y a pesar de que su clasificación basada en caracteres morfológicos se dificulta debido a su amplia variación en su fenotipo, la última propuesta de clasificación basada en las filogenias de múltiples secuencias establecidas por la “AFTOL” (Assembling the fungal tree of life), *Ganoderma* pertenece al reino Fungi, división Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Polyporales y a la familia Ganodermataceae (Hibbet et al., 2007). Su distribución se da a nivel mundial y se presenta durante todo el año, se caracteriza por presentar basidiomas o cuerpos fructíferos estipitados o sésiles, la superficie del píleo presenta una cutícula gruesa, opaca pruinosa o brillante lacada. El contexto es de color pardo claro a oscuro, suave y esponjoso, o fibroso y duro. Su himenóforo es de color blanco a crema, con 4 a 7 poros por milímetro y tubos dispuestos en una o varias capas. Con hifas generativas hialinas o amarillentas y con fíbulas; las hifas esqueléticas pueden ser ramificadas, hialinas o pardas y sin septos. Sus basidios son ampliamente elipsoidales y abruptamente estrechos en la base, cistidios ausentes. Las basidiosporas son ampliamente elipsoidales, con ápice aplanado o truncado y poro germinal (Ryvarden et al., 2004). En el género *Ganoderma* se reconocen especies con propiedades farmacológicas y bioquímicas similares ampliamente caracterizadas. Gao y Zhou (2003), reportan componentes farmacológicos de *Ganoderma*, aislados de su cuerpo fructífero, micelio y esporas, por medio de cromatografías, bioensayos y procedimientos bioquímicos. Se han aislado más de 180 sustancias químicas, destacando polisacáridos, triterpenos, nucleósidos, ergosteroles, ácidos grasos, proteínas y oligoelementos.

1.6.1 Metabolitos y actividades farmacológicas

Las investigaciones de *Ganoderma* y su diversidad de compuestos activos aislados, muestran numerosos efectos farmacológicos y medicinales, tales como anti-tumorales, inmunomoduladores, anti-virales, anti-hepatotóxicos, anti-diabéticos, etc. Dichos efectos se atribuyen principalmente a los terpenoides y polisacáridos que han sido encontrados y aislados del basidiocarpo. Wagner (2003), Liu (2007), Ko (2008), Keypour (2009) y Yang (2009) reportan ensayos con triterpenos aislados de *G. lucidum*, *G. sinences*, *G. tsugae*, *G. capense*, *G. applanatum* y *G. australe*, demostrando su actividad anti-oxidante, anti-tumoral, anti-microbiana y anti-inflamatoria. Estos triterpenos contienen grupos funcionales oxigenados en un esqueleto tipo lanostano, de los cuáles los más sobresalientes son los ácidos ganodérico A, B, G y H (Figura 1), ganodérmico y lucidénico. A pesar de que sus mecanismos de acción aún no son muy conocidos, estos actúan inhibiendo la angiogénesis mediada por citocinas, estimulan la citotoxicidad e inhiben la migración de las células cancerígenas, y aumentan la apoptosis de células tumorales. Suelen presentar una respuesta anti-oxidante frente a la oxidación inducida por pirogalol en membrana de eritrocitos, en la peroxidación lipídica en microsoma hepático y en la disminución del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria de neuronas corticales expuestas a hipoxia y reoxigenación (Nahara et al., 2016).

Alves et al. (2012) demuestra que los terpenoides Ganomicin A y B aislados de *Ganoderma*, así como, extractos metanólicos y extractos de acetona no identificados, actúan con actividad anti-bacteriana al inhibir el crecimiento de algunas bacterias Gram-positivas (como *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *S. aureus*) y bacterias Gram-negativas (como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp.)

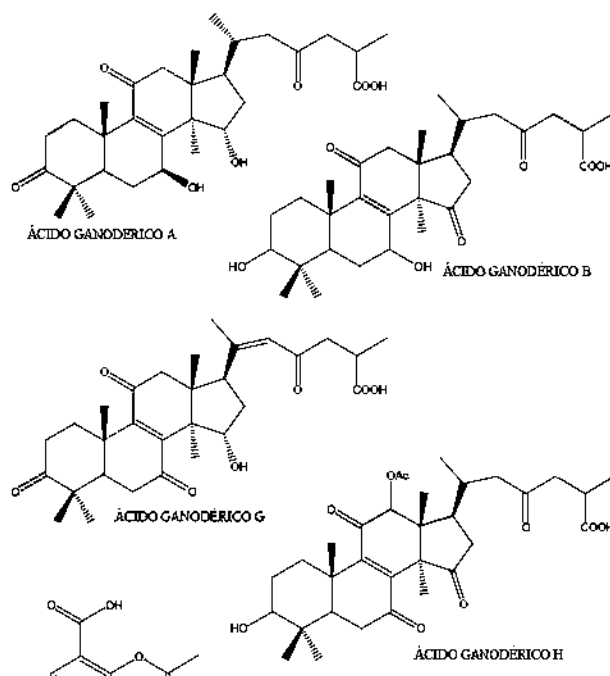


Figura 1. Estructuras químicas de los ácidos ganodericos A, B, G y H (Tomado de Nahara et al., 2016).

En cuanto a los polisacáridos, Chen et al. (2009) y Zhao et al. (2010) reportan que estos metabolitos derivados de glucosa muestran una fuerte actividad anti-microbiana, anti-tumoral e inmunomoduladora. Entre los más destacados y con mayor uso biotecnológico están las β -glucanas que son homopolisacáridos lineales de glucosa unidos a través de enlaces β -(1-3) y β -(1-4). La estructura macromolecular y el tipo de enlaces de la cadena principal y de sus ramificaciones depende de la fuente de la β -glucana (Pizarro et al., 2014). Por ejemplo, las β -glucanas de avena y cebada (figura 2 A) están compuestas de cadenas no ramificadas con enlaces β (1-3) y β (1-4), mientras que las β -glucanas de levaduras y hongos (figura 2 B) están compuestas de cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-3) y cadenas laterales unidas por enlaces β (1-6) (Volman et al., 2008).

Los efectos farmacológicos mencionados pueden deberse a que las β -glucanas actúan como estimulantes de receptores del sistema inmune innato que se encuentran en las membranas de los enterocitos, células M y células

dendríticas, aumentando así la actividad fagocítica de los macrófagos y la actividad anti-microbiana de las células mononucleares y neutrófilos (Pizarro et al., 2014). Además, previenen la progresión de ciertos tipos de cáncer al actuar de forma sinérgica con los anticuerpos monoclonales y la quimioterapia estimulando la inmunidad e incrementando la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas.

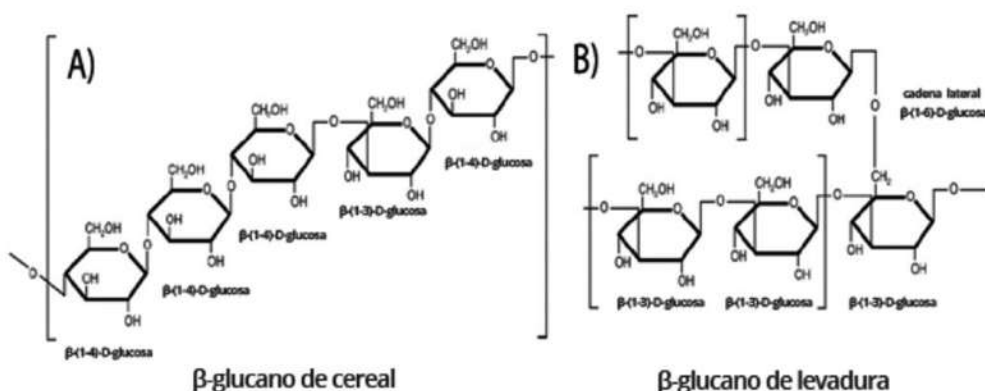


Figura 2. (A): Unidades poliméricas de β -(1-4)-D-glucopiranosil β -(1-3)-D-glucopiranosil. (B): Unidades poliméricas de β -(1-3)-D-glucopiranosil con ramificaciones en β -(1-6) (Tomado de Pizarro et al., 2014).

2. HIPÓTESIS

El medio extracelular de cultivos líquidos de cepas silvestres de *Ganoderma* sp. e *Irpex lacteus* aisladas en el estado de Michoacán tiene actividad antibacteriana contra aislados clínicos de bacterias patógenas del ser humano.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana del medio extracelular de cultivos líquidos de cepas silvestres de *Ganoderma* sp. e *Irpex lacteus*.

3.2 Objetivos específicos

- i. Determinar las fases exponencial y estacionaria de crecimiento de las cepas de estudio en medio PDB.
- ii. Evaluar la capacidad antibacteriana *in vitro* de concentrados extracelulares obtenidos de la fase exponencial y estacionaria de las cepas de estudio.
- iii. Contrastar los resultados de actividad antibacteriana de los concentrados obtenidos de las cepas de estudios entre dos ensayos distintos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas de estudio

Se estudiaron dos cepas silvestres de las especies *Ganoderma* sp. (CMU-01/13) e *Irpex lacteus* (CMU-84/13), que forman parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU) del Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Como microorganismos de prueba se utilizaron siete cepas bacterianas patógenas del ser humano, tres del género *Salmonella*, tres del género *Escherichia* y una del género *Pseudomonas*, que integran parte del Cepario del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana (Tabla 1).

Tabla 6. Descripción de las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.

Código	Especie	Procedencia	Información adicional
ATCC 14028	<i>Salmonella enterica</i>	Cepa de referencia	Serotipo Typhimurium
SAL04	<i>Salmonella enterica</i>	Ciudad Hidalgo, Mich.	Serotipo Typhimurium. Aislada de una muestra de queso fresco en el año 2009. El genotipo es ST19.
SAL109	<i>Salmonella enterica</i>	Zamora, Mich.	Serotipo Typhimurium. Aislada de una muestra de carne de res en el año 2009. El genotipo es ST213.
EPEC 0111	<i>Escherichia coli</i>	No determinada	<i>Enteropatógena</i>
ETEC 25611	<i>Escherichia coli</i>	No determinada	<i>Enterotoxigénica</i>
EIEC E11	<i>Escherichia coli</i>	No determinada	<i>Enteroinvasiva</i>
PA01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico de Melbourne Australia (Holloway, 1955)	Multirresistente

4.2 Medios de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Se empleó el medio PDA (Bioxon, USA) el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se suspendieron 19.5 g de medio en 1 L de agua destilada mezclando perfectamente hasta disolver el medio, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras por pulgada cuadrada de presión por 15 min. Este medio se utilizó para conservar las cepas de estudio así como la obtención de inóculos para los ensayos de cinética de crecimiento.

Caldo Papa Dextrosa (PDB)

Se utilizó el medio PDB (Difco, USA) el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se suspendiendo 24 g de medio en 1 L de agua destilada mezclando perfectamente hasta disolver el medio, posteriormente se esterilizó de la manera previamente descrita. Este medio se empleó para realizar cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio.

Agar Luria Bertani (LBA)

Este medio se utilizó para la resiembra y mantenimiento de las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo, así como para la obtención de inóculos de colonias aisladas mediante la técnica de estriado por cuadrantes. El medio se preparó suspendiendo 15 g de Agar Bacteriológico (BD Bioxon® USA), 10 g de Triptona, 10 g de NaCl y 5 g de Extracto de Levadura en 1 L de agua destilada mezclando perfectamente hasta disolver los componentes (Sambrook y Russell, 2001). Posteriormente se esterilizó de la manera previamente descrita.

Caldo Luria Bertani

Este medio se empleó para los ensayos de inhibición y como medio para la lectura de las placas de 96 pozos®. Se preparó de la manera previamente descrita para el medio LBA, omitiendo el agar. Se esterilizó como se indicó anteriormente.

Agar Mueller-Hinton

El medio Mueller-Hinton con Agar Bacteriológico se empleó para realizar los ensayos de susceptibilidad de las cepas bacterianas de prueba contra de los extractos concentrados de las cepas fúngicas de estudio. Este medio se preparó de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se suspendieron 17 g de Agar Bacteriológico (BD Bioxon®, USA) y 21 g del concentrado del medio MH, el cual contiene 2 g de extracto de carne bovino, 17.5 g de hidrolizado de caseína y 1.5 g de almidón. Se mezcló perfectamente hasta disolver el concentrado y se esterilizó de la manera previamente descrita.

4.3 Obtención de inóculos

Las cepas de los hongos de estudio se sembraron en cajas Petri de 9.0 cm de diámetro con medio PDA y se incubaron durante 3-4 días a 24 °C hasta que el micelio cubrió $\frac{3}{4}$ de la placa. Los inóculos cilíndricos para las cinéticas de crecimiento y la obtención de extractos se obtuvieron del borde de la colonia empleando un sacabocados de 6 mm de diámetro interno.

4.4 Cinéticas de crecimiento

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio PDB, los cuales se inocularon con 5-6 inóculos con micelio de cada cepa obtenidos de la manera anteriormente descrita. Los matraces así inoculados se incubaron con agitación durante 15 días a 24 °C. Cada 24 h los cultivos se filtraron en vacío empleando papel Whatman No. 1 para retener la biomasa producida. Los filtros empleados se habían puesto previamente a peso constante, secado a 60 °C durante 12 h, determinando el peso de cada uno. Los filtros con la biomasa micelial retenida se secaron en un horno durante 24 h a 80 °C, posteriormente se colocaron en un desecador durante 30 minutos y se pesaron. El peso seco del micelio cada 24 h se determinó mediante la diferencia en peso del filtro con

biomasa menos el peso seco del filtro solo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.5 Obtención de concentrados extracelulares

Los extractos extracelulares de los hongos se obtuvieron realizando el mismo procedimiento descrito en las cinéticas de crecimiento, pero con un volumen de 50 ml de medio PDB por cada matraz Erlenmeyer. Los filtrados en vacío se obtuvieron de los días en los que las cinéticas de crecimiento mostraron la fase exponencial media y la fase estacionaria de cada cepa de estudio. Se recuperaron aproximadamente 50 mL de este proceso de filtración y se concentraron con un rota vapor para eliminar la mayor cantidad de solvente acuoso, reduciendo el volumen a 5 mL. Finalmente, los extractos concentrados se esterilizaron por filtración empleando membranas 0.25 micras de poro (Millipore®, USA) y se guardaron a -20 °C.

4.6 Ensayos de actividad antimicrobiana en medio sólido

Se elaboraron sensidiscos de papel Whatman No. 1 con un diámetro de seis milímetros y se esterilizaron a 121 °C (15 lb/in²) durante 15 minutos. Los sensidiscos así esterilizados se impregnaron gota a gota con los extractos concentrados de los hongos de estudio hasta alcanzar un volumen de 150 µL por cada sensidisco. Las cepas bacterianas de prueba se sembraron en medio LBA, estriando por cuadrantes y se incubaron 24 h a 37 °C. Se resembraron 2-3 colonias aisladas obtenidas de dichos cultivos en 10 mL de medio LB hasta alcanzar un 98% de transmitancia. Con un hisopo estéril se tomó un inóculo del cultivo bacteriano y se resembró en Agar Mueller-Hinton mediante un estriado masivo. Los sensidiscos se colocaron sobre el medio así inoculado y se incubó a 37 °C durante 24 h. Al término de la incubación se observaron y, en su caso, se midieron los halos de inhibición alrededor. Cada ensayo se realizó por triplicado.

4.7 Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano empleando microplacas de 96 pozos

Para estos ensayos se utilizaron inóculos de cultivos bacterianos en medio LB a una densidad de 52% T ($\pm 2\%$). Se utilizó una micropipeta multicanal para colocar el extracto concentrado de cada cepa de estudio en microplacas de 96 pozos (Biolog®, USA). Se probaron 20, 40, 60 y 80 μL de extracto extracelular y el volumen de todos los pozos de la microplaca se llevó a 160 μL añadiendo en cada caso el volumen necesario de medio LB. Las placas se incubaron a 37 °C realizando lecturas a 590 y 750 nm a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 28 h posteriores a la incubación, en el equipo MicroStation (Biolog, USA), utilizando el programa Microlog3™ Release 4.20. Con los datos obtenidos se construyeron cinéticas de crecimiento de cada una de las concentraciones de extracto probadas en las distintas cepas bacterianas de estudio. Cada ensayo se realizó por triplicado.

5. RESULTADOS

5.1 Cinéticas de crecimiento en medio líquido PDB

La figura 1 presenta las cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio. En el caso de *Ganoderma sp*, la fase exponencial se da a partir del séptimo día de incubación y se extiende hasta el día 13, con el comienzo de la fase estacionaria. Para *I. lacteus*, la fase exponencial se da desde el segundo día de incubación y termina en el octavo, momento en que inicia la fase estacionaria. La producción máxima de biomasa es mayor para *I. lacteus* que para *Ganoderma sp*. al término del tiempo de incubación.

Con base en las cinéticas de crecimiento obtenidas, se decidió obtener los extractos extracelulares del *I. lacteus* en los días cuatro y 10 de incubación; mientras que en el caso de *Ganoderma sp.*, se obtuvieron los extractos en los días siete y 14 de incubación. De esta manera se tenían extractos extracelulares de las fases exponencial y estacionaria de las cinéticas de crecimiento de cada cepa de estudio.

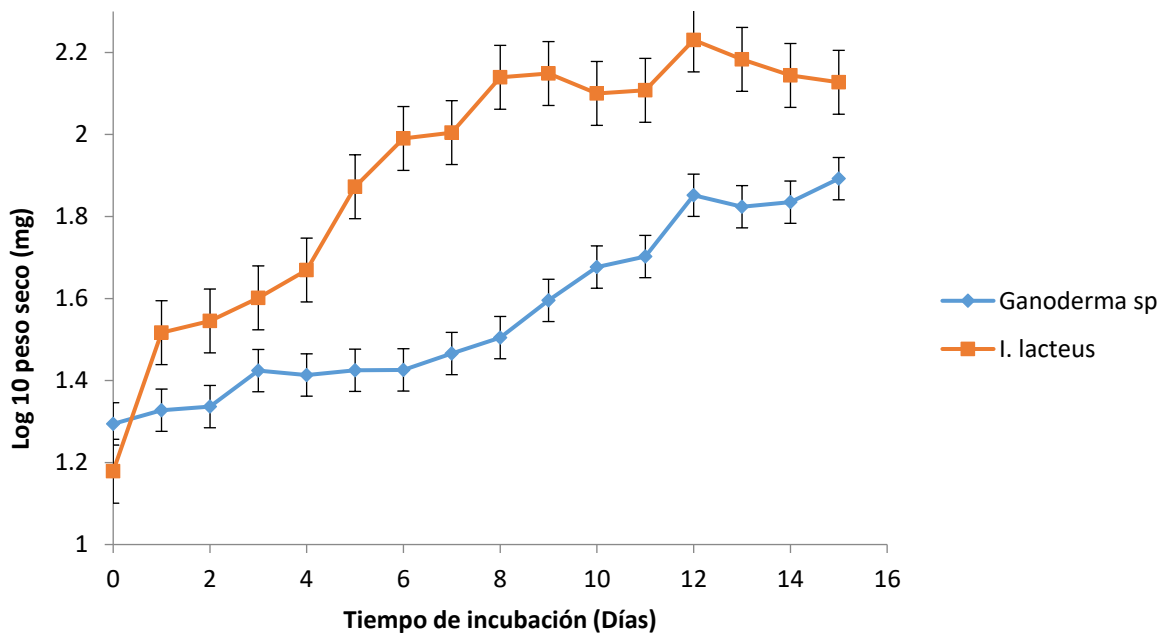


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de las cepas silvestres *Ganoderma sp.* (CMU-01/13) e *Irpex lacteus* (CMU-84/13) en medio líquido PDB. Las cepas se incubaron a 24 °C y 120 rpm de agitación.

5.2 Ensayos de inhibición en medio sólido.

Las cepas de *S. enterica* de prueba mostraron una sensibilidad diferencial a los extractos extracelulares de los hongos de estudio. Así, la cepa ATCC 14028 presentó una inhibición significativa a los extractos de ambas especies tanto de la fase exponencial como estacionaria (Figura 4). La cepa del genotipo ST19 solo mostró una inhibición marginal del crecimiento para los extractos de los dos puntos de la cinética de crecimiento de *Ganoderma* sp., y la cepa genotipo ST213 no presentó sensibilidad a ninguno de los extractos (Figura 4).



Figura 4. Ensayos de inhibición de los extractos extracelulares de *I. lacteus* (izquierda) y *Ganoderma* sp. (derecha) contra las cepas de *Salmonella enterica* en medio sólido. Se muestran los resultados para las cepas ATCC 14028 (panel superior), SAL04 (panel de en medio) y SAL109 (panel inferior). Se muestra en cada caso el sensidisco control (C) con medio LB, así como sensidiscos con extracto concentrado de cada cepa en los días de cultivo indicados de la fase logarítmica (E4 y E7) y estacionaria (E10 y E14) en cada caso.

Los genotipos de las cepas de *E. coli* mostraron una mayor sensibilidad a los extractos extracelulares de los hongos de estudio tanto en la fase logarítmica como en la fase estacionaria (Figura 5). Cabe resaltar que en todos los casos los extractos extracelulares de *Ganoderma* sp. muestran una mayor efectividad a los que se presenta en los extractos extracelulares de *I. lacteus*.



Figura 5. Ensayos de inhibición de los extractos extracelulares de *I. lacteus* (izquierda) y *Ganoderma* sp. (derecha) contra las cepas de *Escherichia coli* en medio sólido. Se muestran los resultados para las cepas Enteroinvasiva (panel superior), Enterotoxigénica (panel de en medio) y Enteropatógena (panel inferior). Se muestra en cada caso el sensidisco control (C) humedecido únicamente con medio de cultivo LB, así como sensidisos con extracto concentrado de cada cepa en los días de cultivo indicados de la fase logarítmica (E4 y E7) y estacionaria (E10 y E14) en cada caso.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* no presentó sensibilidad a ninguno de los extractos extracelulares de los hongos de estudio (Figura 6).



Figura 6. Ensayo de inhibición de los extractos extracelulares de *I. lacteus* (izquierda) y *Ganoderma* sp. (derecha) de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en medio sólido. Se muestra en cada caso el sensidisco control (C) únicamente con medio LB, así como sensidiscos con extracto concentrado de cada cepa en los días de cultivo indicados de la fase logarítmica (E4 y E7) y estacionaria (E10 y E14) en cada caso.

Tabla 7. Resumen de la inhibición del crecimiento en medio sólido de las cepas bacterianas de prueba por parte de los extractos extracelulares de *Irpex lacteus* y *Ganoderma* sp.

Cepa bacteriana	Halo de inhibición (cm) de los extractos			
	<i>Irpex lacteus</i>		<i>Ganoderma</i> sp.	
	Día 4	Día 10	Día 7	Día 14
<i>Salmonella enterica</i>				
ATCC 14028	2.6	1.7	2.5	2.7
SAL04	0	0	1.1	1.1
SAL109	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>				
EIEC	2.7	2.3	3.1	3.1
ETEC	3.7	1.7	2.7	2.5
EPEC	3.2	3.5	3.5	3.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
PA01	0	0	0	0

5.3 Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de 96 pozos.

Se evaluó la inhibición del crecimiento de las distintas cepas bacterianas de prueba en medio líquido empleando microplacas de 96 pozos como se describe en Materiales y Métodos. La cepa ATCC14028 de *S. enterica* mostró una inhibición significativa del crecimiento con 80 y 60 μ L del extracto de *Irpex lacteus* de las dos

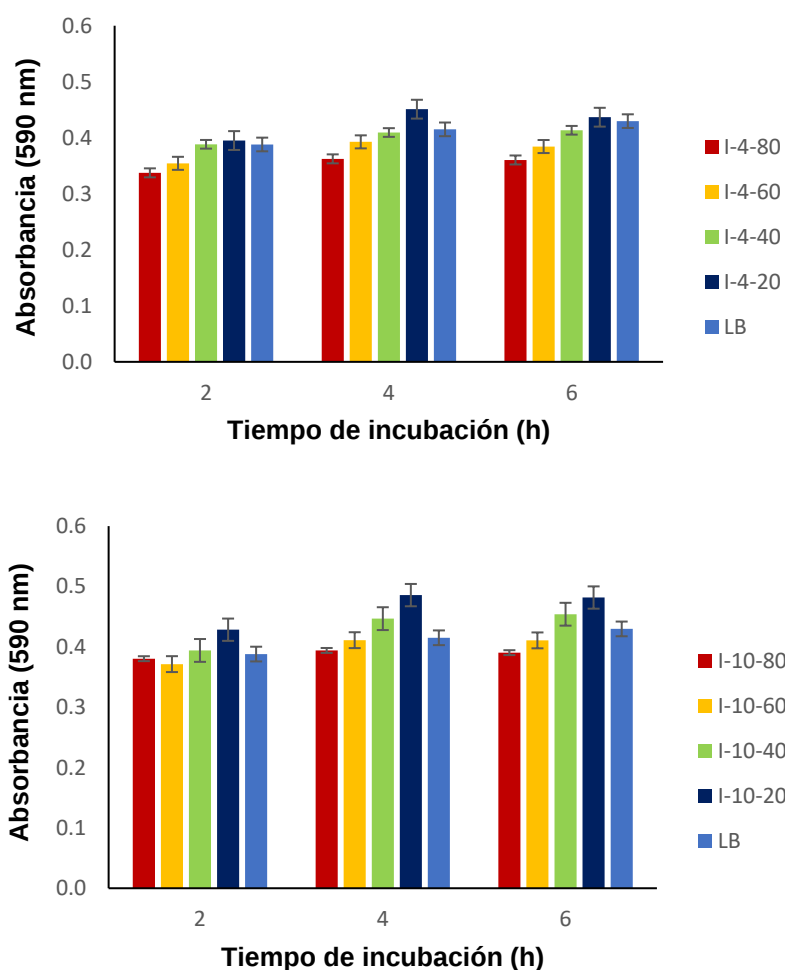


Figura 7. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* (cepa ATCC14028) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

fases de crecimiento, aunque dicha inhibición fue más evidente para el extracto de la fase exponencial, particularmente a las 6 h de incubación en presencia del extracto (Figura 7). De manera interesante, en los ensayos con 20 y 40 μL del extracto parece haber una inducción del crecimiento bacteriano, aunque las diferencias no son significativas con respecto al control.

Esta misma cepa de *S. enterica* también fue significativamente sensible a los extractos de *Ganoderma* sp. de ambas fases de crecimiento del hongo, en los ensayos en los que se emplearon volúmenes de 60 y 80 μL (Figura 8). No obstante, en el caso del ensayo con 60 μL la inhibición solo fue significativa hasta las 6 h de incubación en presencia del extracto, mientras que con un volumen de 80 μL la inhibición se observó en todos los tiempos de incubación del extracto de ambas fases de crecimiento del hongo.

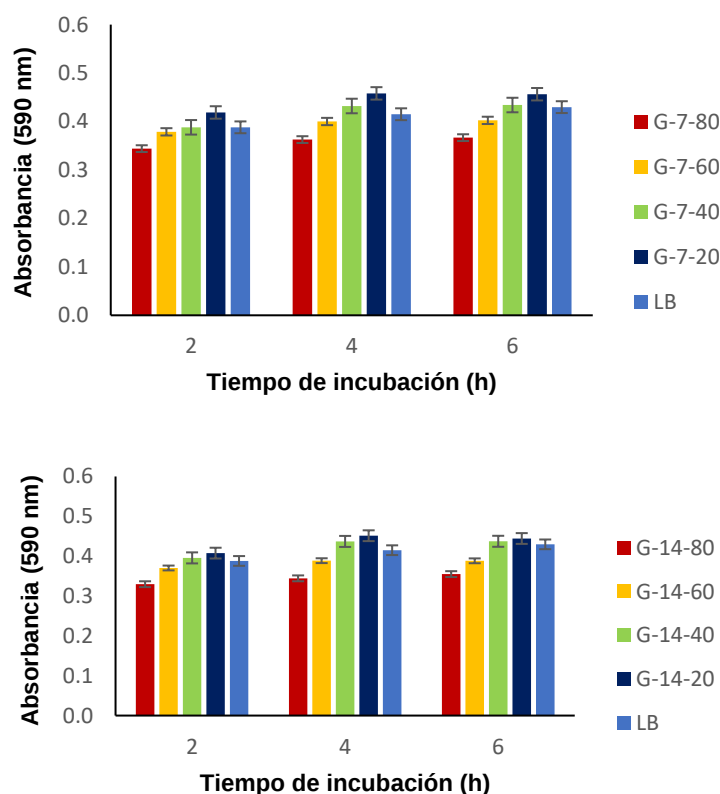


Figura 8. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* (cepa ATCC14028) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

La cepa de *S. enterica* genotipo ST213 no mostró sensibilidad ninguno de los volúmenes del extracto de fase exponencial de *I. lacteus* (Figura 9, panel superior), ni en ninguno de los volúmenes del extracto de fase estacionaria a las 2 y 4 h de incubación (Figura 9, panel inferior). Sin embargo, los extractos de la fase estacionaria inhibieron significativamente el crecimiento del patógeno en los volúmenes de 60 y 80 μ L a las 6 horas de incubación (Figura 9, panel inferior).

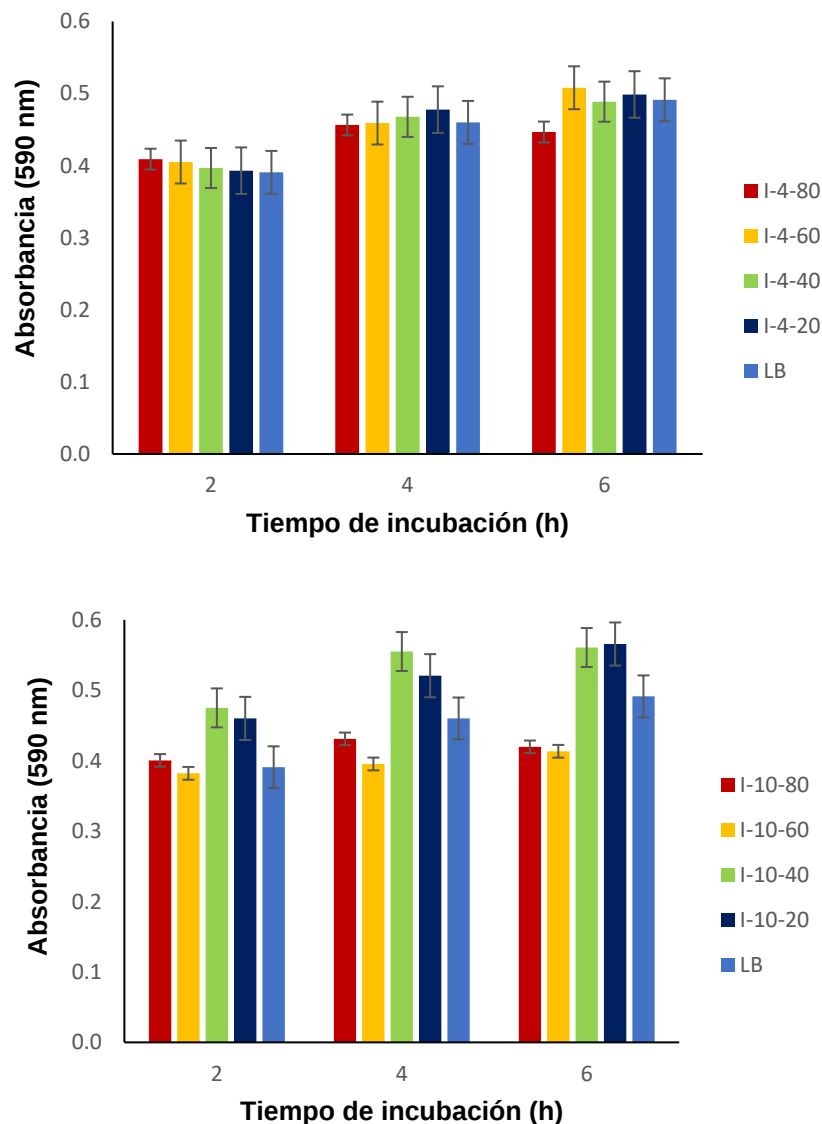


Figura 9. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* ST213 (cepa SAL109) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

El extracto de la fase de crecimiento exponencial de *Ganoderma* sp. no inhibió el crecimiento de *S. enterica* genotipo ST213 en los volúmenes probados (Figura 10, panel superior), mientras que el extracto de la fase estacionaria del hongo lo hizo a los volúmenes de 60 y 80 μ L (Figura 10, panel inferior), en ambos casos a las 6 horas de cultivo.

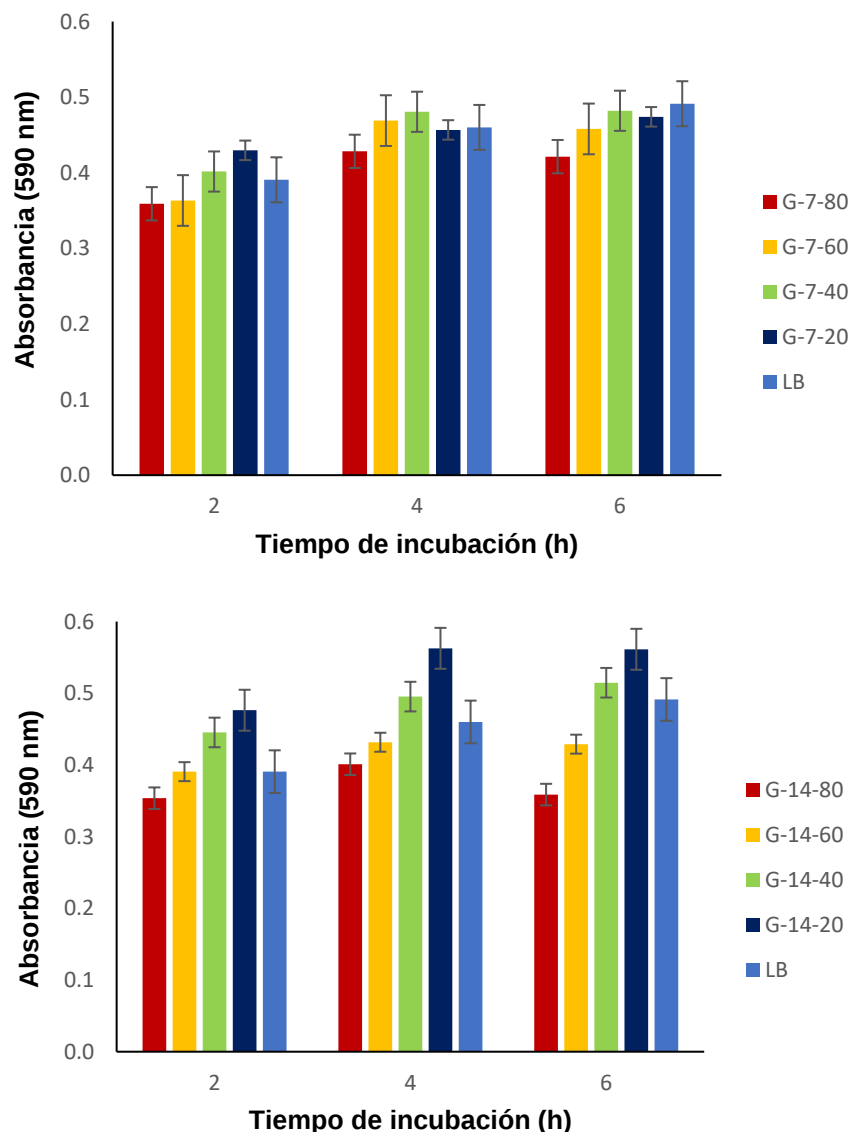


Figura 10. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* ST213 (cepa SAL109) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

De manera interesante, en el caso de la cepa ambiental del genotipo ST19 de *S. enterica* se obtuvieron resultados contrastantes sobre el crecimiento del patógeno, dependiendo del volumen de extracto agregado. A un volumen de 20 μ L se observa una estimulación significativa del crecimiento de la bacteria con respecto

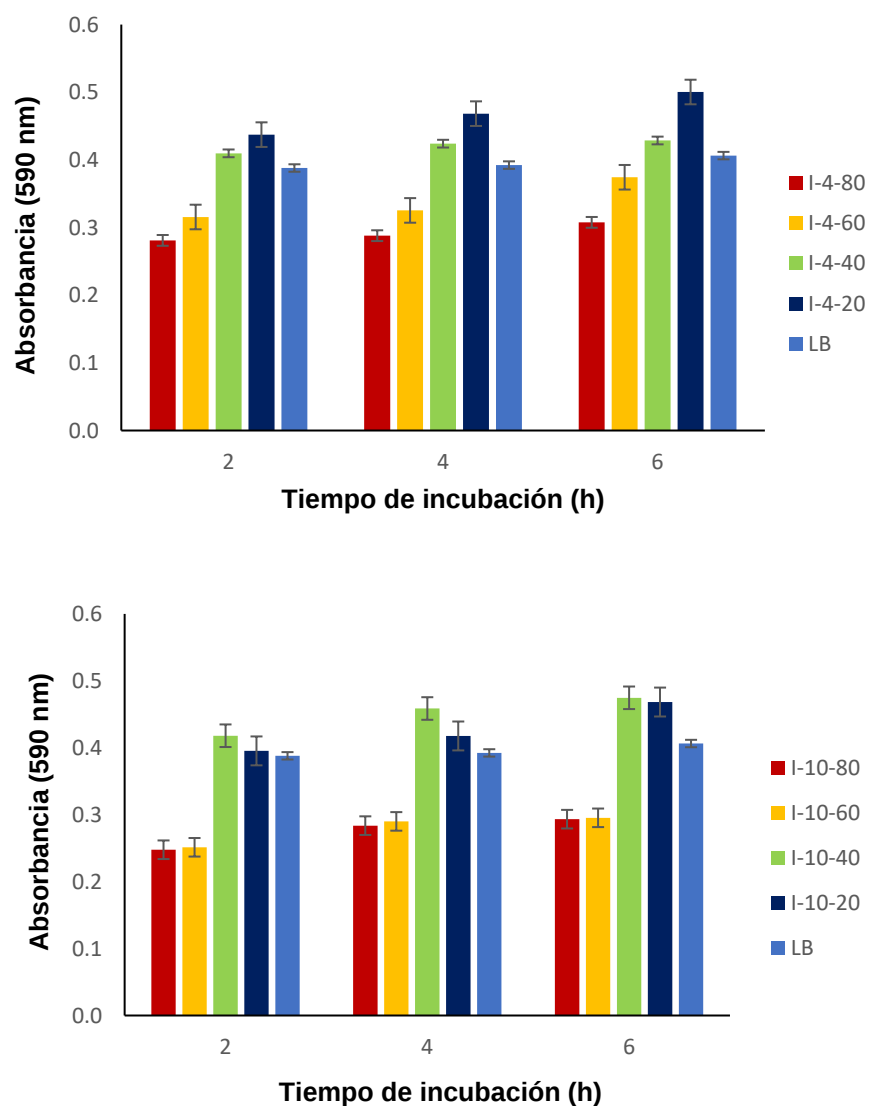


Figura 11. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* ST19 (cepa SAL04) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

al medio control después de 4 y 6 horas de incubación, cuando se prueban el extracto de la fase de crecimiento exponencial de *I. lacteus* (Figura 11, panel superior). Con 80 μ L de este mismo extracto la inhibición es significativa en todos los tiempos de incubación, mientras que con 60 μ L solo lo es a los dos primeros tiempos de medición. Estos mismos efectos contrastantes sobre el crecimiento de la bacteria son más marcados cuando se prueba el extracto de la fase estacionaria del hongo. En este caso, los volúmenes de 60 y 80 μ L inhiben significativamente el crecimiento bacteriano en los tres tiempos de medición, mientras que el volumen de 40 μ L estimula el crecimiento a las 4 y 6 h de incubación, y el de 80 μ L en este último punto de medición (Figura 11, panel inferior).

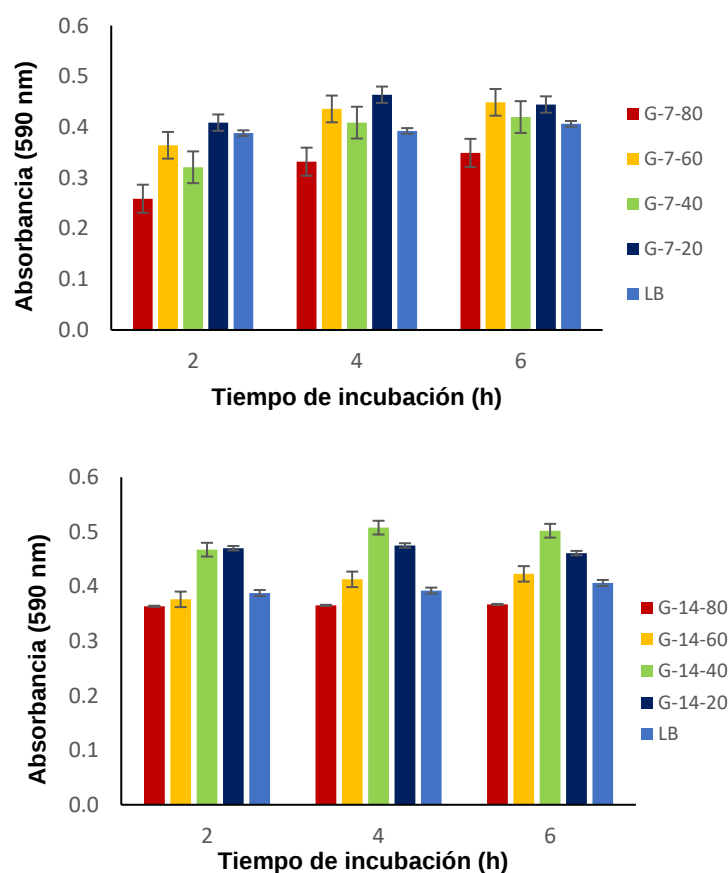


Figura 12. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* ST19 (cepa SAL04) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

En el caso del extracto de la fase exponencial de *Ganoderma* sp., la estimulación del crecimiento bacteriano solo es significativa en el volumen de 20 μ L a las 4 h de incubación, mientras que la inhibición con 80 μ L lo es en todos los tiempos de incubación (Figura 12, panel superior). En el caso de extracto de la fase estacionaria se mantiene esta última tendencia para el mismo volumen, mientras que la estimulación del crecimiento es significativa para los volúmenes de 60 y 80 μ L, en todos los tiempos de incubación (Figura 12, panel inferior).

Cuando se analizó la cepa EIEC de *E. coli*, esta presentó una estimulación del crecimiento con respecto al control en presencia del extracto de *I. lacteus*, particularmente en los volúmenes de 20 y 40 μ L de ambas fases de crecimiento del hongo, a las 4 y 6 h de incubación (Figura 13). Los otros dos volúmenes del extracto no mostraron cambios significativos con respecto al control.

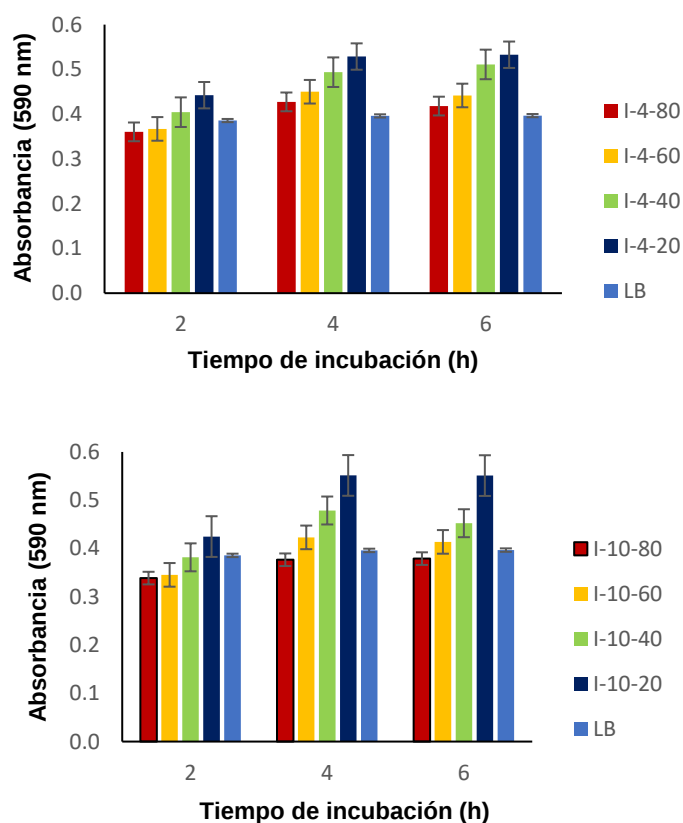


Figura 13. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteroinvasiva (cepa EIEC) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

En el caso de los extractos de la fase exponencial del crecimiento de *Ganoderma* sp., el efecto sobre la cepa EIEC fue estimulatorio del crecimiento para los volúmenes de 20 y 40 μ L, a los tiempos de incubación de 4 y 6 h (Figura 14). Los volúmenes de 60 y 80 μ L de la fase logarítmica no presentaron efecto sobre el patógeno, pero los correspondientes de la fase estacionaria inhibieron su crecimiento significativamente (Figura 14).

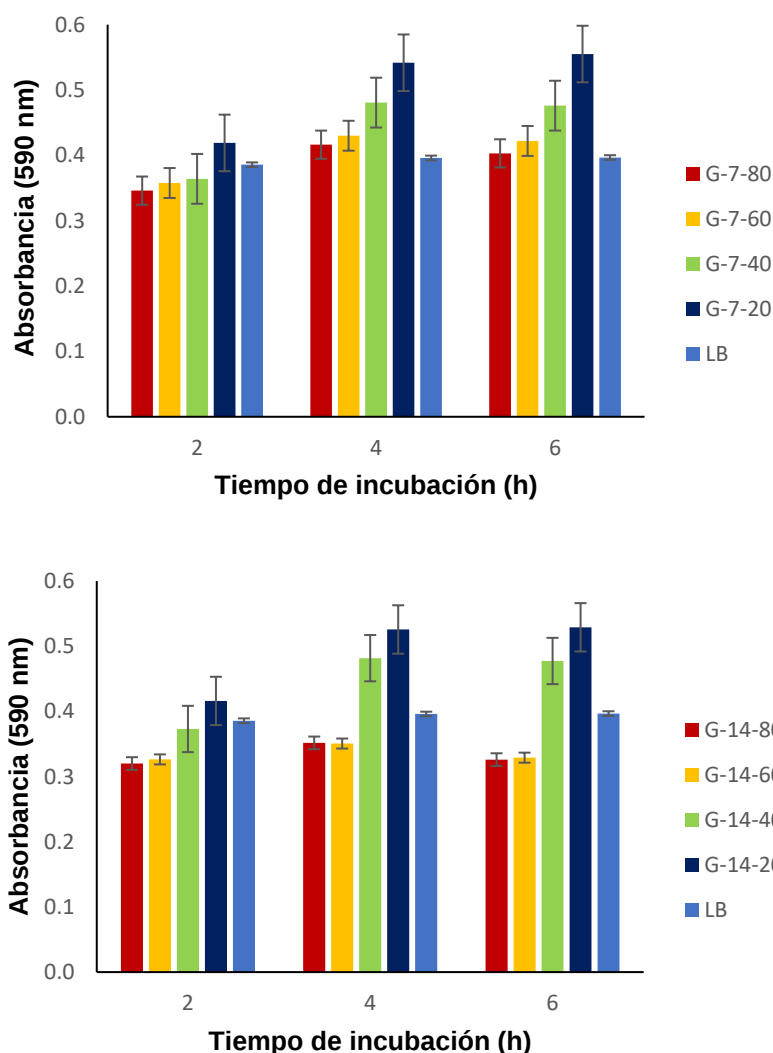


Figura 14. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteroinvasiva (cepa EIEC) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

En el caso de la cepa de EPEC de *E. coli*, esta mostró sensibilidad significativa a los volúmenes de 40, 60 y 80 μ L del extracto de ambas fases de crecimiento del de *I. lacteus*, en todos los tiempos de incubación (Figura 15). Únicamente el volumen de 40 μ L de la fase exponencial a las 6 h de incubación y el volumen de 20 μ L de ambos extractos en todos los tiempos de incubación no mostraron efecto sobre el patógeno.

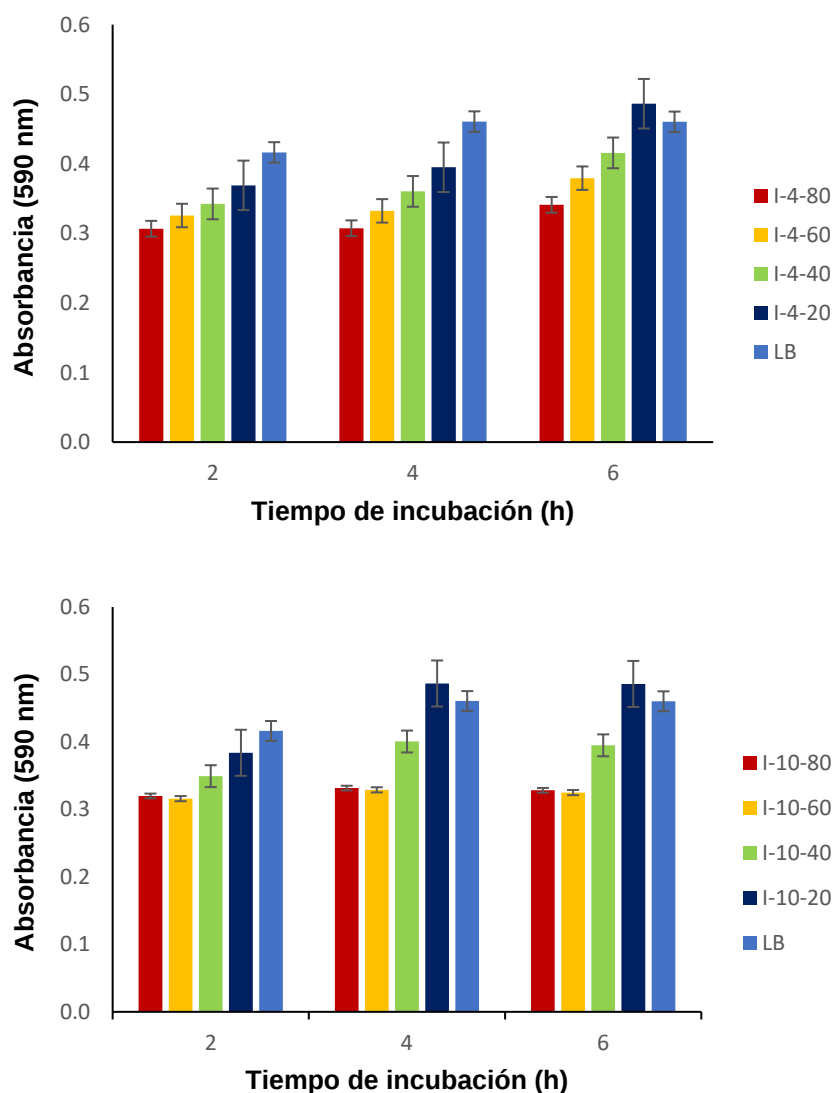


Figura 15. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena (cepa EPEC) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

En el caso de los extractos de *Ganoderma* sp., la cepa EPEC de *E. coli* muestra una inhibición significativa del crecimiento para todos los volúmenes empleados del extracto de ambas fases de crecimiento del hongo en todos los tiempos de medición, salvo para el volumen de 20 μ L del extracto de fase estacionaria, en los dos últimos tiempos de medición (Figura 16).

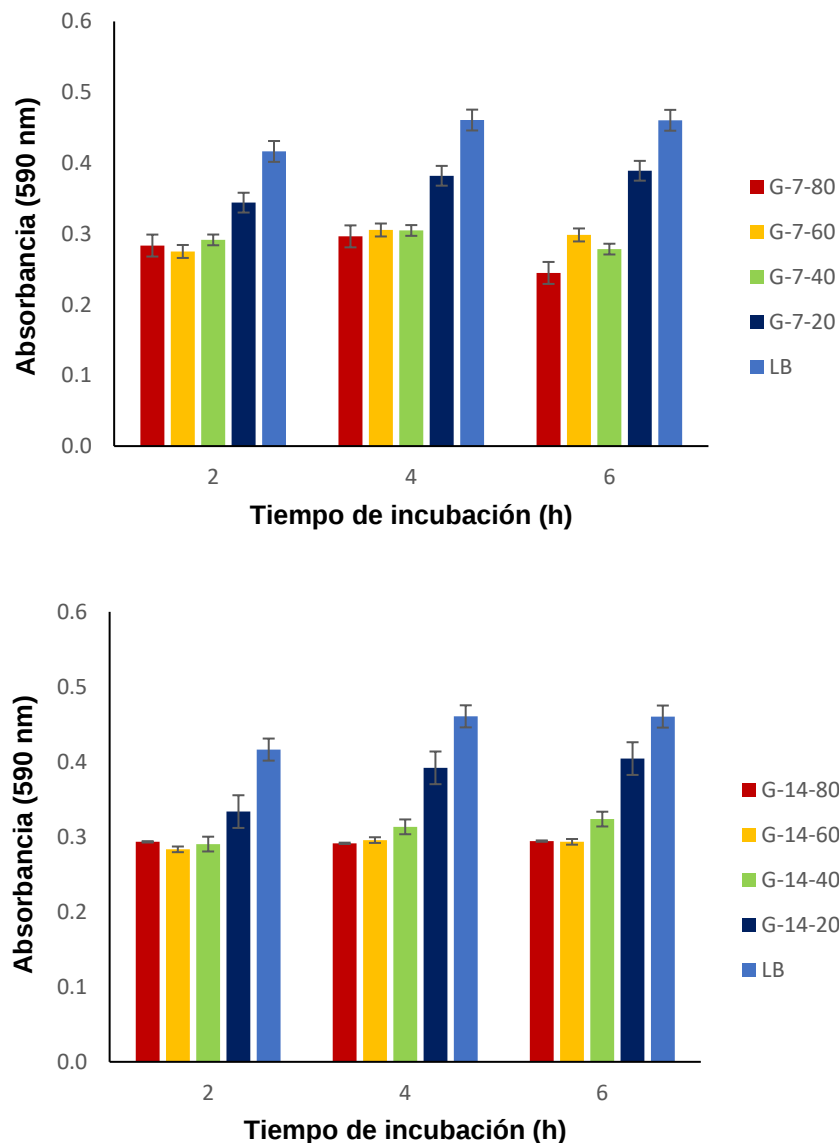


Figura 16. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena (cepa EPEC) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

La cepa ETEC de *E. coli* mostró una estimulación significativa del crecimiento en presencia de los volúmenes de 20 y 40 μ L del extracto de la fase logarítmica de *I. lacteus*, en las 4 y 6 h de incubación; presentándose el mismo efecto con 20 μ L del extracto de la fase estacionaria para los tres tiempos de medición (Figura 17). La inhibición significativa del crecimiento de esta cepa bacteriana se observó en presencia 80 μ L ambos extractos en los tres tiempos de medición.

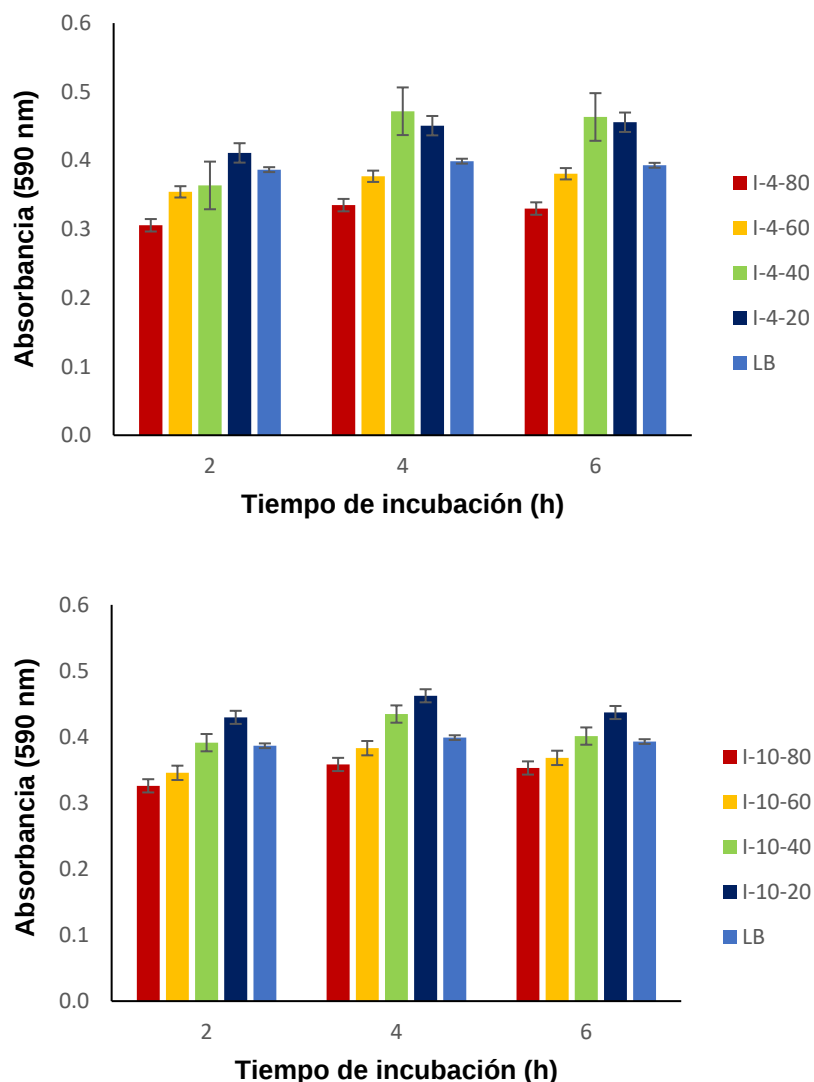


Figura 17. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enterotoxigénica (cepa ETEC) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

De manera similar a las observaciones de los extractos de *I. lacteus* sobre la cepa ETEC, el volumen de 20 μ L de *Ganoderma* sp. estimula el crecimiento bacteriano prácticamente en todas las condiciones de medición, salvo a las 2 h de incubación con el extracto de la fase estacionaria (Figura 18). El volumen de 40 μ L del extracto de ésta última fase tiene el mismo efecto a las 4 y 6 h de incubación. Nuevamente, al igual que en el caso de *I. lacteus* el volumen de 80 μ L de ambos extractos inhibe en todos los tiempos de incubación y el de 60 μ L en la mayoría de los tiempos evaluados.

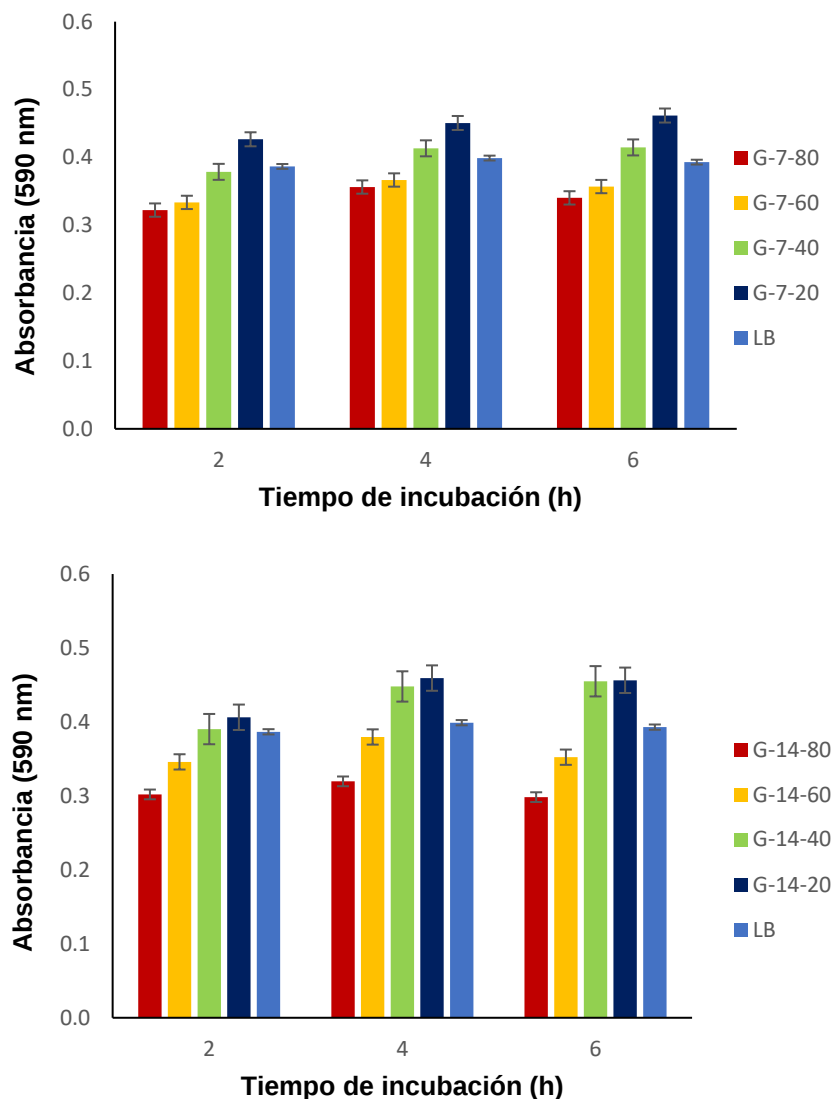


Figura 18. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enterotoxigénica (cepa ETEC) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

La cepa bacteriana de *P. aeruginosa*, la única de gram positiva evaluada, no mostró sensibilidad a ninguno de los volúmenes de los extractos de ambas fases del crecimiento de *I. lacteus* (Figura 19). Aún más, los volúmenes de 20 y 40 de ambos extractos estimularon significativamente el crecimiento del patógeno en los dos últimos tiempos de medición. Mientras que los volúmenes de 60 y 80 μ L de la fase estacionaria mostraron dicho estímulo en los dos últimos tiempos de medición (Figura 19, panel inferior).

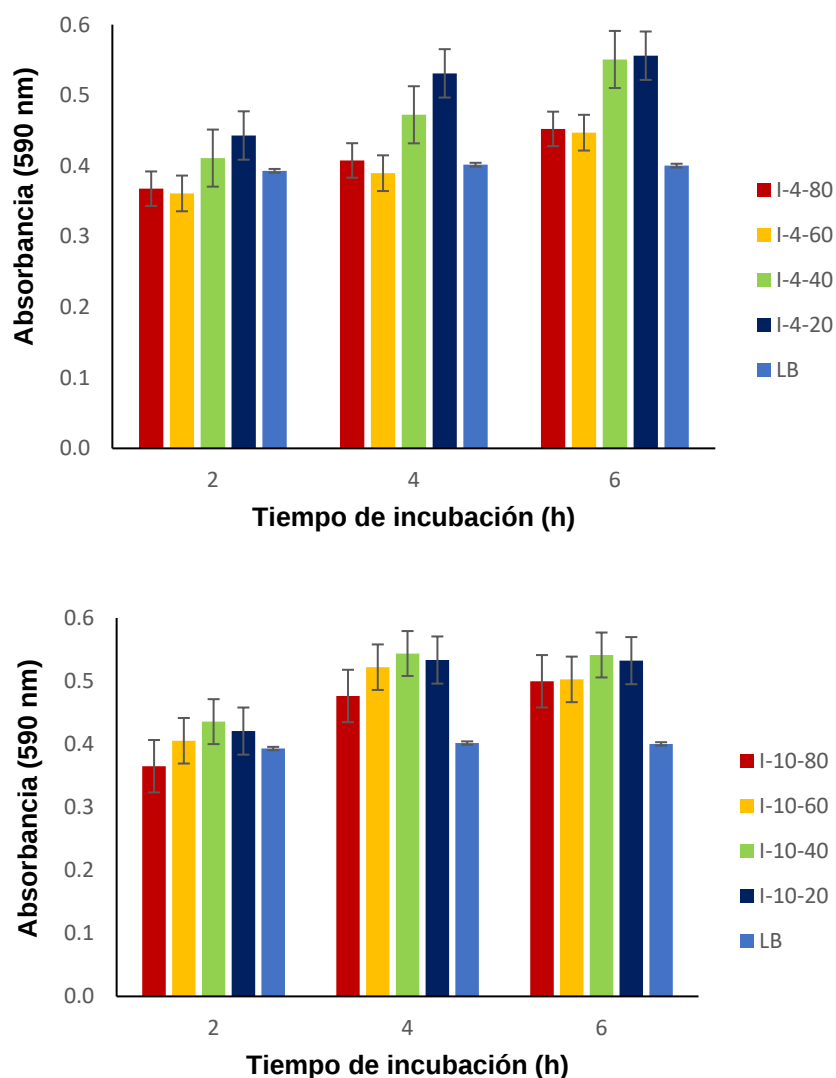


Figura 19. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA01) en presencia del extracto extracelular de *Irpex lacteus*. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

En contraste, en el caso de los extractos de *Ganoderma* sp. se observa una respuesta heterogénea de *P. aeruginosa*, dependiendo del volumen y la fase de crecimiento del hongo. Así, el volumen de 80 μ L del extracto de ambas fases de crecimiento del hongo muestra una inhibición del crecimiento significativa del patógeno en la mayoría de los tiempos de incubación evaluados (Figura 20). Lo cual es particularmente evidente en el extracto de la fase estacionaria (Figura 20, panel inferior). Este efecto inhibitorio también se observa para los volúmenes de 40 y 60 μ L del extracto de fase estacionaria, a las 2 h de incubación.

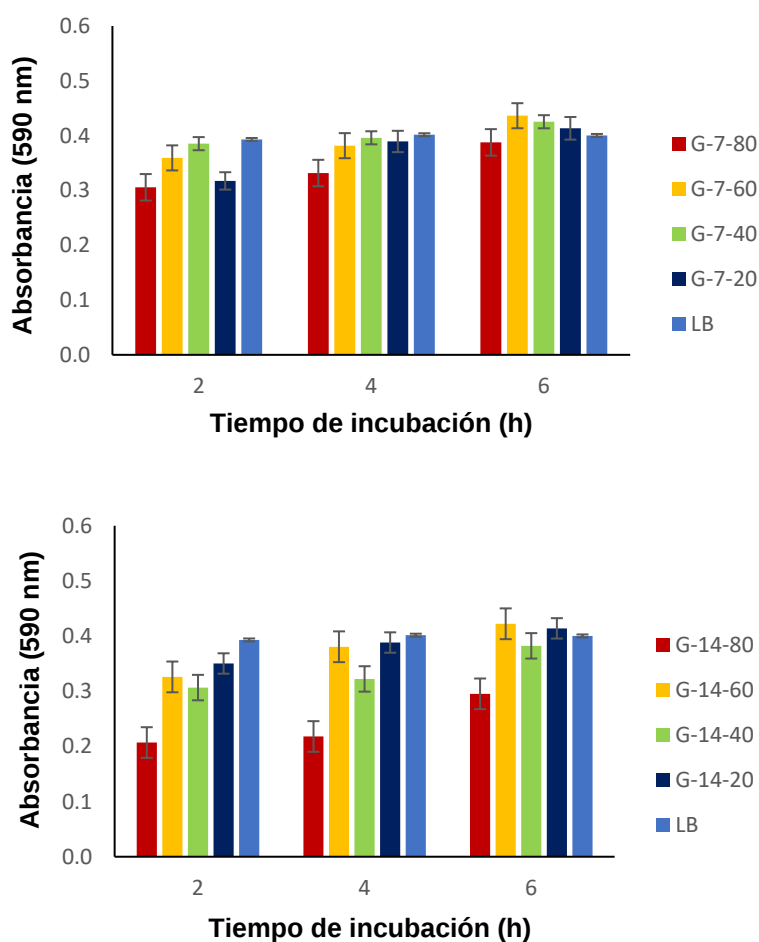


Figura 20. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA01) en presencia del extracto extracelular de *Ganoderma* sp. Se muestran los valores de absorbancia del cultivo control (LB) y con la adición de distintos volúmenes del extracto de la fase exponencial (4 días, panel superior) y la fase estacionaria (10 días, panel inferior) de crecimiento del hongo. Los valores de cada tiempo se determinaron por triplicado en microplacas de 96 pozos y se leyeron en la Microstation Biolog® como se describe en Materiales y Métodos.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos acuosos de *Ganoderma* sp. e *Irpelex lacteus*. Con la finalidad de conocer en qué etapa del crecimiento del micelio de las cepas de basidiomicetes estudiadas se obtenía una mayor actividad antimicrobiana, se construyeron las cinéticas de crecimiento en el medio de estudio para la producción de metabolitos extracelulares. Se encontró que los concentrados extracelulares de las fases exponenciales y estacionarias de *Ganoderma* sp., presentaron mayor actividad antimicrobiana que los concentrados de las fases exponenciales y estacionarias de *I. lacteus*.

En los estudios iniciales de asociación entre la cinética de crecimiento y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, se observó que algunos hongos iniciaban la producción de dichos metabolitos al término de la fase exponencial de crecimiento y el inicio de la fase estacionaria (Betina et al., 1995). No obstante, al mismo tiempo se observó que el micelio de algunos hongos producía metabolitos con actividad biológica durante la fase logarítmica de crecimiento (Betina et al., 1995). En general, los estudios recientes sobre la producción de metabolitos secundarios fúngicos generalmente no evalúan las cinéticas de crecimiento de las cepas de estudio, particularmente en trabajos en los que se emplean basidiomicetes. Estudios recientes con el micelio de hongos de distintos grupos taxonómicos muestra resultados variables en relación a la fase de crecimiento en la que se encuentran actividades antimicrobianas en el micelio o medio extracelular. En el caso del micelio del basidiomicete *Polyporus tricholoma*, se encontró que la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* por parte de extractos orgánicos del medio extracelular es mejor en la fase estacionaria que en la fase logarítmica de crecimiento (Thomé-Vieira et al., 2008). De manera contrastante, el micelio del ascomicete *Penicillium citrinum*, produce el metabolito citrinina durante toda la fase logarítmica de crecimiento, con un pico de producción en la fase de disminución del crecimiento y otro en la entrada a la fase estacionaria, disminuyendo posteriormente su síntesis (Kozlovskii et al., 2000).

Estos antecedentes, y los resultados obtenidos en el presente trabajo, revelan la importancia de evaluar las fases del ciclo de crecimiento en las que la producción de una actividad farmacológica, particularmente antimicrobiana, es máxima. Dicho conocimiento permite la optimización de resultados en las actividades buscadas.

En este trabajo se encontró que los concentrados extracelulares de la fase exponencial del medio en el que creció el micelio de *I. lacteus* fueron más activos que los de la fase estacionaria, contra la cepa de *Salmonella enterica* ATCC 14028 y las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, enterotoxigénica y enteropatogénica. Aunque son pocos los trabajos realizados en ese sentido, previamente se ha documentado la actividad antimicrobiana del extractos acuosos y orgánicos de medio extracelular en el que creció micelio de *I. lacteus*. Así, el extracto de acetato de etilo del micelio cultivado en medio a base de glucosa peptona y extracto de malta inhibe el crecimiento de *E. coli*, *S. enterica* serotipo Typhimurium y *S. aureus*, pero no fue activo contra *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae* (Rosa et al., 2003). También se han caracterizado terpenoides denominados irpexanas obtenidos del micelio, los cuales muestran actividad citotóxica contra células COS-7 pero no inhiben el crecimiento de bacterias ni de hongos, además, el medio de cultivo de donde se obtuvo el micelio no presentó actividad antimicrobiana (Silberborth et al., 2000).

El extracto de acetato de etilo del medio extracelular a base de glucosa, peptona y extracto de malta en el que se creció micelio de *I. lacteus* es activo contra el parásito *Leishmania amazonensis* (Rosa et al., 2009). Recientemente se obtuvieron azafilonas y sesquiterpenos tipo tremulano producidos por *I. lacteus* en co-cultivo con el hongo endófito *Nigrospora oryzae* en medio líquido a base de papa y dextrosa (Zhou et al., 2018). Uno de los terpenos obtenidos, denominado conocanol B, resultó con actividad exacerbada (concentración mínima inhibitoria de 16 µg/ml) contra el micelio del mismo hongo inductor, pero solo inhibió el crecimiento de la bacteria *B. subtilis* a concentraciones significativamente altas (concentración mínima inhibitoria de 512 µg/ml). Hasta donde se pudo documentar

en el presente trabajo, estos son los únicos reportes en relación a la actividad antimicrobiana de extractos o metabolitos extracelulares en dicha especie.

En el presente trabajo se determinó la actividad del medio extracelular de la fase exponencial y estacionaria de *Ganoderma* sp. contra las cepas de *Salmonella enterica* (ATCC 14028, ST19 y ST213), *Escherichia coli* (Enteroinvasiva, Enteropatógena y Enterotoxigénica) y *Pseudomonas aeruginosa* mostrando que las dos fases fueron efectivas contra las cepas de *Salmonella enterica* ST19 y ATCC 14028 y las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva, enterotoxigénica y enteropatógena. Los resultados aquí encontrados son similares a algunos estudios reportados en la literatura con extractos del medio extracelular del cultivo líquido de cepas de *Ganoderma* spp. Así, en uno de los primeros estudios realizados en el medio extracelular de cultivos de *Ganoderma* spp. se encontró que extractos metanólicos de un medio a base de sacarosa, harina de maíz y extracto de levadura en el que habían crecido distintas cepas de *G. lucidum*, *G. pfeifferi* y *G. resinaceum* resultó activo contra *Bacillus subtilis*, pero ninguno de los extractos de dichas inhibió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecium*, *Mycobacterium smegmatis* o *Staphylococcus aureus* (Suay et al., 2000). Tampoco se encontró actividad de los extractos contra los hongos filamentosos *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se ha documentado que extractos acuosos del micelio y concentrados del medio extracelular de *G. applanatum* y *G. lucidum* tienen actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Krupodorova et al., 2016). En dicho estudio el micelio de ambas especies se cultivó en medio líquido a base de glucosa, peptona y extracto de levadura (GPL), así como en medio suplementado con harina de amaranto (HA). De manera interesante, las dos especies mostraron patrones de inhibición diferentes, dependiendo del medio de cultivo. Así, los extractos acuosos del micelio de *G. applanatum* cultivado en ambos medios no presentó actividad antibacteriana, mientras que los concentrados del medio de cultivo no mostraron actividad contra *E. coli*, pero sí contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, es decir, únicamente contra bacterias Gram positivas. En

contraste, los extractos y concentrados de *G. lucidum* mostraron resultados variables dependiendo del medio de cultivo y la bacteria de prueba. Mientras que el extracto acuoso del micelio cultivado en el medio HA fue activo contra todas las bacterias de prueba, el extracto acuoso del micelio cultivado en medio GPL solo fue activo contra *B. subtilis*. El concentrado del cultivo del medio GPL solo fue activo contra *B. subtilis*, mientras que el concentrado del medio HA solo fue activo contra *E. coli*.

Se ha documentado que los polisacáridos extracelulares de *G. applanatum* son activos contra *S. aureus* y *Vibrio fischeri*, pero no contra *E. coli* (Osińska-Jaroszuk et al., 2014). También, el medio extracelular de *G. applanatum*, *G. carnosum* y de cuatro cepas distintas de *G. lucidum* cultivadas en medio a base de glucosa, peptona y extracto de levadura, resultó activo contra bacterias Gram positivas y negativas, así como contra hongos filamentosos, aunque con variaciones en las especies bacterianas y fúngicas susceptibles para cada concentrado extracelular (Ćilerdžić et al., 2016). Entre los patógenos de prueba, las bacterias *E. coli* y *Enterococcus faecalis*, así como los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* fueron las más susceptibles a la actividad antimicrobiana del medio extracelular de *Ganoderma* spp. Mientras que las especies bacterianas más resistentes fueron *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, y en el caso de los hongos fueron *Aspergillus niger* y *Penicillium cyclopium*. De las especies de *Ganoderma* estudiadas, los medios extracelulares de *G. applanatum* y *G. carnosum* fueron los que menos especies de bacterias y hongos inhibieron, mientras que las cepas de *G. lucidum* mostraron diferencias en su capacidad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de los medios extracelulares es atribuida en dicho trabajo a la presencia de fenoles y flavonoides (Ćilerdžić et al., 2016).

El hecho de que tanto en el presente trabajo como en estudios previos se encuentre que *P. aeruginosa* es una de las especies más difíciles de inhibir puede deberse a que en esta bacteria se encuentra entre las que más genes que codifican para sistemas *AcrB/Mex-type* RND (*resistance-nodulation-cell* división) presentan (Stover et al., 2000), los cuales son sistemas de eflujo responsables de

la mutiresistencia a antibióticos. La presencia de al menos 10 genes codificantes para dichos sistemas ha sido particularmente reportada para la cepa PA01 aquí evaluada (Stover et al., 2000). No obstante, los ensayos en microplacas en los que se empleó el extracto de la fase estacionaria de *Ganoderma* sp. si lograron inhibir del crecimiento del patógeno, particularmente el ensayo con 80 µl. Así, este resultado muestra que la cepa de dicho basidiomicete aquí estudiada puede ofrecer metabolitos para el control de patógenos difíciles de inhibir.

Al crecer micelio de *G. lucidum* en un medio líquido optimizado para la producción de fenoles a base de sacarosa, extracto de levadura y aceite de oliva, se encontró que los extractos clorofórmicos y etanólicos del filtrado extracelular en los que solo se detectó la presencia de fenoles tipo esteroides, fueron activos contra cepas patógenas de *Aspergillus* spp. (Zárate-Chaves et al., 2013). En contraste, los mismos tipos de extractos provenientes tanto del micelio cosechado en dichos cultivos, como de basidiocarpos, los cuales contenían además de esteroides, terpenoides, lactonas, flavonoides, cumarinas, cetonas y lactonas, fueron menos efectivos, o no presentaron actividad inhibitoria contra las mismas cepas de hongos. Esto muestra que la obtención de extractos o concentrados extracelulares del medio de cultivo con actividad hacia ciertos patógenos es más efectiva que la obtención del basidiocarpo o del micelio, de donde es más común realizar estudios de sustancias con actividad antimicrobiana.

Tanto el concentrado acuoso como el orgánico (cloroformo : metanol, 9:1) de medio extracelular a base de glucosa, peptona y extracto de levadura en el que se cultivó micelio de *Ganoderma* sp. y *G. carnosum* fueron activos contra *E. coli* (Yamaç y Bilgili, 2006). Además, salvo el extracto orgánico proveniente del cultivo de *Ganoderma* sp., los otros extractos también inhibieron a *S. aureus*, y los dos tipos de extractos de la misma cepa fueron activos contra *B. subtilis*. Sin embargo, ninguno de los extractos de ambas cepas fueron activos contra *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus epidermidis*. No obstante, extractos orgánicos del basidiocarpo de la misma cepa de *G. carnosum* obtenidos con cinco solventes distintos, únicamente fueron activos contra *S. aureus* y *S. epidermidis*. Este resultado

muestra que medios de cultivo relativamente simples pueden utilizarse para obtener metabolitos extracelulares que presentan mejor actividad antimicrobiana que los extractos obtenidos del basidiocarpo.

En otro análisis se probaron 10 medios de cultivo distintos en los se realizaron modificaciones cualitativas y cuantitativas de las fuentes de N y C, para optimizar la actividad antibacteriana de extractos orgánicos del medio extracelular en el que se creció a *G. lucidum* (Paliya et al., 2014). Los extractos de prácticamente todos los medios analizados fueron activos en menor o mayor medida contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis*. El medio que combinó maltosa como fuente de C, con nitrato de amonio, cloruro de amonio y peptona de soya como fuentes de N, fue el que presentó los extractos con máxima actividad antimicrobiana. Esta misma combinación de fuentes de C y N puede probarse en las cepa de *Ganoderma* sp. aquí estudiada, con la finalidad de evaluar si se incrementa la actividad antimicrobiana observada en el presente trabajo.

De manera interesante, tanto los extractos clorofórmicos y hexánicos del basidiocarpo de *G. lucidum*, como esteroides y triterpenoides purificados de dichos extractos son inactivos contra *E. coli* y *P. aeruginosa*, pero si presentan actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis* y el hongo *C. albicans* (Vazirian et al., 2014). Estos resultados de inhibición son semejantes a los previamente descritos para concentrados acuosos y extractos orgánicos del medio extracelular en donde ha crecido micelio de *Ganoderma* spp. Esto sugiere que algunos metabolitos secundarios extracelulares generados por el micelio y los producidos en el basidiocarpo de *Ganoderma* spp. puede ser de la misma naturaleza química, con actividades antimicrobianas similares, dependiendo de las condiciones de fructificación y cultivo.

En el presente trabajo se encontró que el medio extracelular de *I. lacteus* no presentó actividad contra *P. aeruginosa*, lo cual concuerda con estudios previos que han mostrado la ausencia de actividad de extractos de micelio sobre dicha especie (Rosa et al., 2003). Esto indica que *I. lacteus* no produce metabolitos extracelulares ni intracelulares capaces de inhibir a dicho patógeno. Los

resultados obtenidos también concuerdan con estudios previos respecto a la capacidad de extractos intracelulares de *I. lacteus* para inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. enterica* (Rosa et al., 2003). No obstante, tanto para el caso de los extractos de *I. lateus* como para el de *Ganoderma* sp., es la primera vez que se muestra una inhibición diferencial del crecimiento entre diferentes genotipos del serotipo Typhimurium de *S. enterica*. Así, el extracto de fase estacionaria de *I. lacteus* mostró una mayor inhibición de la cepa de genotipo ST19 (cepa SAL04) de *S. enterica* que el resto de extractos de ambos basidiomicetes. Aunque las cepas ATCC14028, también genotipo ST19, y la de genotipo ST213 (cepa SAL109), también mostraron inhibición del crecimiento, hubo diferencias significativas entre estas. De la misma manera, es la primera vez que se prueban extractos extracelulares de la misma especie de basidiomicete contra diferentes patotipos de *E. coli*. Encontrándose en este caso que la cepa EPEC es más susceptible a los extractos fúngicos que los otros dos patotipos (ETEC, EIEC) de *E. coli*, particularmente a los de *Ganoderma* sp. Tanto los resultados con los diferentes genotipos de *S. enterica* como los obtenidos con los patotipos de *E. coli* muestran que es necesaria la búsqueda de metabolitos con actividad contra variantes específicas de un patógeno particular, ya que el resultado con una cepa de referencia o de un genotipo/patotipo particular no garantiza que el metabolito se active contra otras variantes.

En el presente trabajo se utilizaron microplacas de 96 pozos para determinar la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de los concentrados extracelulares obtenidos. Dicho sistema utiliza la lectura automatizada de la absorbancia a distintas longitudes de onda de microplacas de 96 pozos, lo que permite el análisis de un gran número de muestras de manera simultánea. El sistema de microplacas de 96 pozos para el análisis de actividades antimicrobianas se ha empleado previamente en extractos acuosos y orgánicos de basidiocarpos (Bala et al., 2011, 2012; Dogan y Arslan, 2015). Aunque se ha reportado el uso de dicho método para evaluar la concentración mínima inhibitoria contra cepas de *S. aureus* por parte de extractos de acetato de etilo del micelio de basidiomicetes, los resultados se registraron mediante la determinación a simple

vista de la turbidez de los micropozos, sin leer en espectrofotómetro (Ferreira-Silva et al., 2017). Por lo que en este trabajo se documenta por primera vez el uso de placas de 96 micropozos para el análisis de actividad antimicrobiana de extractos extracelulares del micelio de hongos basidiomicetes. La técnica aquí empleada debe de seguirse optimizando con el objetivo de evaluar cuantitativamente la concentración mínima inhibitoria de dichos extractos hacia distintos tipos de bacterias patógenas.

La determinación de actividad antimicrobiana empleando el ensayo de sensidiscos sigue siendo útil tanto para determinar la sensibilidad a antibióticos de aislados clínicos, como para evaluar el efecto de extractos de fuentes naturales sobre el crecimiento bacteriano (Balouri et al., 2016). En general, en este trabajo, los resultados obtenidos de ambos ensayos, sensidisco y microplacas, dieron resultados congruentes. No obstante, mientras que en el caso de los ensayos con sensidiscos de *Ganoderma* sp. no se observó inhibición de *P. aueruginosa*, los ensayos en microplaca si mostraron un efecto inhibitorio contra dicha bacteria. Estas diferencias pueden deberse a la presencia de metabolitos que no difunden adecuadamente en el agar, pero que si se disuelven en medio acuoso mostrando su actividad. Por lo anterior, es recomendable en ensayos futuros de cepas silvestres de hongos de Michoacán continuar la aplicación de ambos ensayos e incorporar otros ensayos de difusión o bioautografías en cromatografía de placa fina (TLC) (Balouri et al., 2016).

7. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Las cepas de *Ganoderma* sp. e *Irpex lacteus* analizadas producen sustancias antimicrobianas que son secretadas al medio de cultivo.
2. Los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por el micelio de las cepas fúngicas de estudio son solubles en agua y termoestables.
3. La mayor actividad antimicrobiana del concentrado de la fase estacionaria de *Ganoderma* sp. puede deberse a la presencia de una mayor diversidad de compuestos orgánicos con actividad biológica o bien a una mayor concentración de los compuestos activos.
4. Los extractos mostraron inhibición deferencial contra distintos genotipos de *S. enterica* y patotipos de *E. coli*.

8. CONCLUSIÓN

La hipótesis propuesta se cumple, ya que el medio extracelular en el que se cultivaron las cepas de estudio presentó actividad antibacteriana.

9. LITERATURA CITADA

Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. (2013). Biodiversity of Fungi in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 76-81.

Alves JM, Ferreira ICFR, Días J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. (2012). *A Review on* antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 78: 1707-1718.

Aly AH, Debbab A, Proksch P. (2011). Fifty years of drug discovery from fungi review. *Fungal Diversity*. 50: 3-19.

Bala N, Aitken EA, Fechner N, Cusack A, Steadman KJ. (2011). Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical Biology*. 49(5): 492-500.

Bala N, Aitken EA, Cusack A, Steadman KJ. (2012). Antimicrobial potential of Australian macrofungi extracts against foodborne and other pathogens. *Phytotherapy Research*. 26(3): 465-469.

Balouiri M., Sadiki M, Ibensouda SK. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71-79.

Betina V. (1995). Differentiation and secondary metabolism in some prokaryotes and fungi. *Folia Microbiologica*. 40(1): 51-67.

Bhattarai G, Lee YH, Lee NH, Lee IK, Yun BS, Hwang PH, Yi HK. (2012) Fomitocide-K from *Fomitopsis nigra* induces apoptosis of human oral squamous cell carcinomas (YD-10B) via mitochondrial signaling pathway. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 35(10): 1711–1719.

CentkoRM, Ramón-García R, Taylor T, PatrickBO, Thompson CJ, Miao VP, Andersen RJ. (2012) Ramariolides A–D, antimycobacterial butenolides isolated from the mushroom *Ramaria cystidiophora*. *Journal of Natural Products*. 75: 2178–2182.

Chaudhary R, Tripathy A. (2015). Isolation and identification of bioactive compounds from *Irpex lacteus* wild fleshy fungi. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 7(7): 424-434.

Chin SK, Law CL, Cheng PG. (2011) Effect of drying on crude ganoderic acids and water soluble polysaccharides content in *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 38–43.

Ćilerdžić J, Kosanic M, Stajić M, Vukojević J, Ranković B. (2016). Species of genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) fermentation broth: a novel antioxidant and antimicrobial agent. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 18(5): 397–404.

Deacon JW. (2006). *Fungal Biology* 4th edition, Blackwell Publishing Ltd, 256-321.
DeChristopher BA, Loy BA, Marsden MD, Schrier AJ, Zack JA, Wender PA. (2012). Designed synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs in vitro. *Nature Chemistry*. 4: 705–710.

De Silva DD, Rapior S, Sudarman E, Stadler M, Xu J, Alias SA, Hyde KD. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethanopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*. 62: 1-40.

De Vries RP, Battaglia E, Coutinho PM, Henrissat B, Visser J. (2011). Hemi-Cellulose degrading enzymes and their encoding genes from *Aspergillus* and *Trichoderma*. In: Hofrichter M. (eds) *Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, 10: 341–355.

Doğan HH, Arslan E. (2015). Biological activities and DNA interactions of *Amanita ovoidea*. *Pharmaceutical Biology*. 53(9): 1386-1390.

Ferreira IC, Barros L, Abreu RM. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medical Chemistry* 16(12): 1543–1560.

Ferreira-Silva V, Gusmão NB, Gibertoni TB. (2017). Antibacterial activity of ethyl acetate extract of Agaricomycetes collected in Northeast Brazil. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*. 7(4): 267-274.

Guo H, Sun B, Gao H, Chen X, Liu S, Yao X, Liu X, Che Y. (2009) Diketopiperazines from the Cordyceps -colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Natural Products*. 72(12): 2115–2119.

Halliwel B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* 70(5): 257–265.

Hawksworth DL. (2001). The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111(5): 509-547.

Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson RH. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*. 25: 38-47.

Holloway, BW. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 13(3): 572-581.

Jiang MY, Zhang L, Liu R, Dong ZJ, Liu JK. (2009) Speciosins A-K, oxygenated cyclohexanoids from the basidiomycete *Hexagonia speciosa*. *Journal of Natural Products*. 72(8): 1405–1409.

Jiang Y, Wong JH, Fu M, Ng TB, Liu ZK, Wang CR, Li N, Qiao WT, Wen TY, Liu F. (2011) Isolation of adenosine, isosinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine*. 18(2–3): 189–193.

Johansson M, Sterner O, Labischinski H, Anke T. (2001) Coprinol, a new antibiotic cuparane from a *Coprinus* species. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 56(1–2): 31–34.

Kang HS, Jun EM, Park SH, Heo SJ, Lee TS, Yoo ID, Kim JP. (2007) Cyathusals A, B, and C, antioxidants from the fermented mushroom *Cyathus stercoreus*. *Journal of Natural Products*. 70(6): 1043–1045.

Kozlovskii AG, Zhelifonova VP, Vinokurova NG, Ozerskaya SM. (2000). Effect of microelements on the biosynthesis of secondary metabolites by the fungus *Penicillium citrinum* Thom VKM F-1079. *Microbiology (Russia)*. 69(5): 536-540.

Kozlovskii AG, Zhelifonova VP, Antipova TV. (2013). Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 49(1): 1–10.

Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, Osterhaus A. (2003). Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Current Opinion in Biotechnology*. 14(6): 641–646.

Krupodorova TA, Barshteyn VY, Zabeida EF, Pokas EV. (2016). Antibacterial activity of macromycetes mycelia and culture liquid. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44(3): 246-253.

Lee YG, LeeWM, Kim JY, Lee JY, Lee IK, Yun BS, Rhee MH, Cho JY. (2008) Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells. *British Journal of Pharmacology.* 154(4): 852–863.

Lee IK, Kim YS, Jang YW, Jung JY, Yun BS. (2007) New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 17(24): 6678–6681.

Liu GQ, Wang XL, Han WJ, Lin QL. (2012). Improving the fermentation production of the individual key triterpene ganoderic acidMe by the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* in submerged culture. *Molecules.* 17: 12575–12586.

Macedo-Márquez A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 15(2): 97-103.

Makela Miia R, Donofrio N, de Vries Ronald P. (2014). Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genetics and Biology.* 72: 2-9.

Masatoshi Hayashi, Kojiro Wada, Katsura Munakata. (1981). New nematocidal metabolites from a fungus, *Irpex lacteus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 1527-1529.

Min BS, Nakamura N, Miyashiro H, Bae KW, Hattori M. (1998) Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their activity against HIV-1 protease. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 46(10): 1607–1612.

Mohan E, Cowden C, Baas P, Dawadi A, Frankson T, Helmick K, Hughes E, Khan S, Lang A, Machmuller M, Taylor M, Witt A. (2014). Mycorrhizal fungi mediation of terrestrial ecosystem responses to global change (mini-review). *Fungal Ecology*. 10(1): 1-17.

Mohsin M, Negi P, Ahmed Z. (2011). Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* from central Himalayan hills of India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 13(6): 535–544.

Mothana RA, Jansen R, Jülich WD, Lindequist U. (2000) Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products*. 63(3): 416–418.

Müller GM, Schmit JP. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*. 16: 1-5.

Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, Raventós D, Buskov S, Christensen B, De Maria L, Taboureaux O, Yaver D, Elvig-Jørgensen SG, Sørensen MV, Christensen BE, Kjærulff S, Frimodt-Møller N, Lehrer RI, Zasloff M, Kristensen HH. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*. 437: 975–980.

Nagabushan H. (2010). Retapamulin: a novel topical antibiotic. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*. 76(1): 77–79.

Nahara E, Sánchez A, Portillo A, Villareal LJ, Rico R, Soria IE. (2016). Los hongos como fuente de recursos farmacológicos: *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* y *Pleurotus ostreatus*, *Temas de Ciencia y Tecnología*. 20(58): 55-36.

Naranjo Montoya JD. (2014). *Caracterización morfológica y molecular del género Ganoderma en zonas protegidas y ciudades del Valle del Cauca*, Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrícolas, Coordinación general de Posgrados, Palmira, 2014.

Novotny C, Cajthaml T, Svobodova K, Susla M, Sasek V. (2009). *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential. *Folia Microbiologica*. 54(5): 375-390.

O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. (2005). Fungal community analysis by largescale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 5544-5550.

Osińska-Jaroszuk M, Jaszek M, Mizerska-Dudka M, Błachowicz A, Rejczak TP, Janusz G, Wydrych J, Polak J, Jarosz-Wilkolazka A, Kandefer-Szerszeń M. (2014). Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. *BioMed Research International*. 2014: ID 743812. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/743812>.

Paliya BS, Chaudhary HS, Verma S, Prasad S. (2014). Optimization of fermentation media composition of *Ganoderma lucidum* for improved production of antioxidant and antimicrobial compounds. *Pharmacognosy Communications*. 4(1): 35-41.

Peay KG, Kennedy P, Bruns T. (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience*. 58(9): 799.

Petrova RD. (2012). New scientific approaches to cancer treatment: can medicinal mushrooms defeat the curse of the century? *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 14(1): 1–20.

Pizarro S, Ronco AM, Gotteland M. (2014). β -glucans: what types exist and what are their health benefits? *Revista Chilena de Nutrición*. 41(3): 439-446.

Rincão VP, Yamamoto KA, Ricardo NMPS, Soares SA, Meirelles LDP, Nozawa C, Linhares REC. (2012). Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*. 9: 37.

Rincão VP, Yamamoto KA, Ricardo NMPS, Soares SA, Meirelles LDP, Nozawa C, Linhares REC. (2012) Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*. 9: 37.

Rosa LH, Gomes KM, Jacob CC, Capelari M, Rosa CA, Zani CL. (2003). Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(7): 967-974.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Silberborth S, Erkel G, Anke T, Sterner O. (2000). The irpexans, a new group of biologically active metabolites produced by the basidiomycete *Irpex* sp. 93028. *The Journal of Antibiotics*. 53(10): 1137-1144.

Silva S, Martins S, Karmali A, Rosa E. (2012). Production, purification and characterisation of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(9): 1826–1832.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406(6799): 959-964.

Suay I, Arenal F, Asensio FJ, Basilio A, Cabello MA, Díez MT, García JB, González del Val A, Gorrochategui J, Hernández P, Peláez F, Vivente F. (2000).

Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. Antonie van Leeuwenhoek. 78(2): 129-140.

Tang W, Liu JW, Zhao WM, Wei DZ, Zhong JJ. (2006) Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. Life Sciences. 80: 205–211.

Thomé-Vieira GR, Liebl M, Tavares LBB, Paulert R, Smânia Júnior A. (2008). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. Brazilian Journal of Microbiology. 39(3): 561-568.

Ulloa M, Hanlin RT. (2014). Illustrated dictionary of mycology, Second Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota. 782 p.

Vazirian M, Faramarzi MA, Ebrahimi SES, Esfahani HRM, Samadi N, Hosseini SA, Asghari A, Manayi A, Mousazadeh A, Asef MR, Habibi E, Amanzadeh Y. (2014). Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) and its main compounds. International Journal of Medicinal Mushrooms. 16(1): 77-84.

Wang Y, Mo SY, Wang SJ, Li S, Yang YC, Shi JG. (2005) A unique highly oxygenated Pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione derivative with antioxidant and cytotoxic activities from the fungus *Phellinus igniarius*. Organic Letters. 7(9): 1675–1678.

Wagner R, Mitchell DA, Sasaki GL, De A Amazonas MAL, Berovi M. (2003). Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. Food Technology and Biotechnology. 41(4): 371–382.

Wardle DA. (2002). Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components. Princeton (NJ): Princeton University Press.

Weng CJ, Yen GC. (2010). The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis. Clinical and Experimental Metastasis. 27: 361–369.

Wong YY, Moon A, Duffin R, Barateig AB, Meijer HA, Clemens MJ, de Moor CH. (2010) Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction. Journal of Biological Chemistry. 285: 2610–2621.

Xu TT, Beelman RB, Lambert JD. (2012). The cancer preventive effects of edible mushrooms. Anticancer Agents in Medicinal Chemistry. 12(10): 1255–1263.

Yamaç M, Bilgili F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. Pharmaceutical Biology. 44(9): 660-667.

Yang TK, Lee YH, Paudel U, Bhattarai G, Yun BS, Hwang PH, Yi HK. (2013) Davallialactone from mushroom reduced premature senescence and inflammation on glucose oxidative stress in human diploid fibroblast cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(29): 7089–7095.

Zárate-Chaves CA, Romero-Rodríguez MC, Niño-Arias FC, Robles-Camargo J, Linares-Linares M, Rodríguez-Bocanegra MX, Gutiérrez-Rojas I. (2013). Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. Brazilian Journal of Microbiology. 44(1): 215-223.

Zhou QY, Yang XQ, Zhang ZX, Wang BY, Hu M, Yang YB, Zhou H, Ding ZT. (2018). New azaphilones and tremulane sesquiterpene from endophytic *Nigrospora oryzae* cocultured with *Irpex lacteus*. Fitoterapia. 130: 26-30.

