

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Pleurotus ostreatus*

Jhenifer Daniela Carrillo Lara¹, Rubén Octavio Méndez Márquez², Rosalinda Gutiérrez Hernández³, Claudia Araceli Reyes Estrada⁴, Patrocinio del Pilar Miranda Delgado⁵

Resumen— Los hongos comestibles pueden ser una alternativa terapéutica para infecciones causadas por bacterias, debido a sus propiedades nutricionales-farmacológicas reportadas, un ejemplo de éstos son los basidiomicetos que han demostrado ser relevantes en la producción de metabolitos secundarios. Nuestro objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de tres extractos diferentes de *Pleurotus ostreatus*. Se obtuvieron tres extractos mediante el uso de tres solventes: Metano (M), Cloroformo (C) y Agua (A); mezclando en diferentes proporciones: Extracto 1) 3(A):1(M):1(C); Extracto 2) 2(M):2(C):1(A); y Extracto 3) A, obteniendo así tres extractos mediante un procedimiento a base de secado y macerado de la seta *P. ostreatus*, posteriormente se realizaron pruebas colorimétricas para la identificación de metabolitos secundarios. El análisis micoquímico evidenció para el extracto acuoso la presencia de compuestos Alcaloides, Azúcares Reductores, Flavonoides, Quinonas y Saponinas; para el extracto 1 se evidenció Alcaloides, Azúcares Reductores, Cumarinas, Flavonoides, Glucósidos Cardiacos y Quinonas; y por último para el extracto 2 sólo se identificó la presencia de alcaloides. La actividad antibacteriana se evaluó mediante difusión en placa, dando como resultado halos de inhibición menores a un centímetro de diámetro.

Palabras clave— Macromiceto, *Pleurotus ostreatus*, Análisis micoquímico, Antibacteriano.

Introducción

La amplia resistencia bacteriana es un fenómeno que tiene por característica la ineficacia del tratamiento farmacológico contra el microorganismo, generada principalmente por el uso inapropiado de antibióticos (Fuentes, 1993).

En la actualidad, la organización Mundial de la Salud, reporta al menos 12 familias de bacterias que han sido catalogadas como multiresistentes, entre las señaladas se incluyen Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, y Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (OMS, 2017).

Los hongos macromicetos comestibles han demostrado ser alimento con alto valor nutricional, lo que les confiere importantes aplicaciones medicinales (Valencia del Toro *et al.*, 2008; Cohen R. *et al.*, 2002), una aplicación relevante es la actividad antibacteriana, que se le atribuye a la producción de compuestos orgánicos llamados metabolitos secundarios, que tienen funciones de mecanismo de defensa contra plagas y enfermedades (Evangelista Martínez *et al.*, 2007), y pueden ser una alternativa para la obtención de nuevos biofármacos (Valencia del Toro *et al.*, 2012).

En la actualidad, las especies de *Pleurotus* han demostrado tener un importante potencial farmacológico, por ejemplo: Efecto antimicrobiano, antiviral e hipoglucemiante, además de participar en procesos de la modulación del sistema inmune, prevención de la hipertensión arterial y procesos inflamatorios (Gregori *et al.*, 2007).

Descripción del Método

Obtención de cuerpos fructíferos de Pleurotus ostreatus

Se realizó la siembra y cosecha de setas, con base a la metodología planteada por Gaitán Hernández y colaboradores en el “Manual Práctico de cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción” en 2006.

¹ Jhenifer Daniela Carrillo Lara es pasante de la Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. da_lara93@hotmail.com

² M. en C. Rubén Octavio Méndez Márquez es Docente-Investigador y Responsable del Laboratorio de Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químicas, Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Autónoma de Zacatecas. (Autor correspondiente) pacal2@hotmail.com

³ Dra. en C. Rosalinda Gutiérrez Hernández es Docente-Investigador de la Licenciatura en Nutrición de la Unidad Académica de Enfermería de la Universidad Autónoma de Zacatecas. rosalinda@uaz.edu.mx

⁴ Dra. en C. Claudia Araceli Reyes Estrada es Docente-Investigador de la Maestría en Ciencias de la Salud de la Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas. c_reyes13@yahoo.com.mx

⁵ M. en B. Patrocinio del Pilar Miranda Delgado es Docente-Investigador de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. mdppilar@hotmail.com

Obtención del extracto de *Pleurotus ostreatus*

Cosechados los cuerpos fructíferos se realizó secado en estufa Felisa II a 70°C, por un periodo de tres horas, posteriormente se pulverizó la muestra y se sometió a proceso de maceración. Se establecieron condiciones experimentales para la obtención de tres extractos, utilizando solventes de diferente naturaleza, agua destilada (A), metanol (M) y cloroformo (C), en los que se usaron las siguientes proporciones: Extracto no. 1= 3(A):1(C):1(M), Extracto no. 2= 2(M):2(C):1(A) y Extracto no. 3= Acuoso.

Manejo de los extractos

Obtenidos los extractos de *Pleurotus ostreatus*, se partió de las concentraciones madre para la preparación de diluciones seriadas (Tabla 1).

Tabla 1. Diluciones realizadas para los diferentes extractos

Extracto	Concentración Inicial (mg/ml)	Diluciones (mg/ml)			
		1	2	3	4
3(A):1(C):1(M)	98.75	49.375 mg/ml	24.68 mg/ml	12.34 mg/ml	6.17 mg/ml
2(A):2(C):1(M)	98.75	49.375 mg/ml	24.68 mg/ml	12.34 mg/ml	6.17 mg/ml
A	23.33	11.66 mg/ml	5.83 mg/ml		

A: Agua, M: Metanol, C: Cloroformo

Análisis Micoquímico

Se sometieron las muestras de extracto obtenidas a una serie de reacciones colorimétricas, para identificar la presencia de alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, glucósidos cardiacos, glucósidos cianógenos, quinonas, saponinas, taninos y sesquiterpenlactonas.

Pruebas de Susceptibilidad

Material biológico: Se usaron cepas de referencia ATCC, referente a las bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, como Gram Negativas, y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como Gram Positivas.

Vaciado en placa y extendido: Se tomó con un asa previamente esterilizada, muestra de cada bacteria a evaluar, y cada una se inoculó en un tubo con agar Métodos Estándar, se incubaron por 24 horas. Posteriormente en 4 tubos con tres mililitros de agua inyectable se le agregó muestra de los microorganismos para ser llevados al 0.5 de concentración en escala de McFarland (1.5×10^8 células por mL³) paso que se repitió en cada paso para la obtención de la misma concentración celular, a partir de ésta última preparación se tomó con un hisopo estéril y se inoculó por estría masiva en cajas Petri con agar Mueller Hinton, a las cuales se les agregaron sensidiscos impregnados de las concentraciones de extracto realizadas y una caja control con diferentes antibióticos. Se incubaron por 24 horas y se observaron para identificar la presencia de halos de inhibición.

Escala Nefelométrica McFarland: Los patrones de 0.5 de McFarland fueron utilizados para la preparación de los inóculos bacterianos, para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se preparó la muestra y se observó el cambio de turbidez, en seguida se realizaron lecturas a 625 nm en Jenway 6715 uv/vis Spectrophotometer, de esa manera se inoculó en cada paso la misma concentración celular.

Resultados

Obtención de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*

Para la obtención de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* se recolectaron los hongos de la primera cosecha, obteniendo 80 g, los cuales fueron secados posteriormente (Figura 1).



Figura 1. Cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*. A y B. Hongo en fresco; C. Hongo deshidratado.

Análisis Micoquímico

El análisis micoquímico evidenció para el extracto acuoso la presencia de compuestos alcaloides, azúcares reductores, flavonoides, quinonas y saponinas; para el extracto 3(A):1(M):1(C) se evidenciaron alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, glucósidos cardiacos y quinonas, y por ultimo para el extracto en proporción 2(M):2(C):1(A) sólo se identificó la presencia de alcaloides, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de análisis micoquímico.

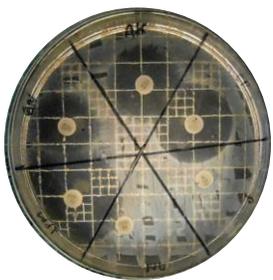
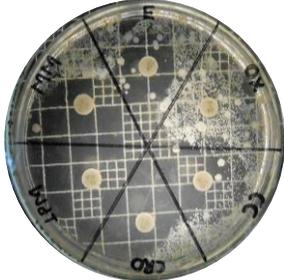
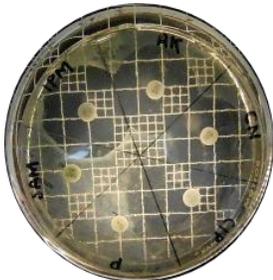
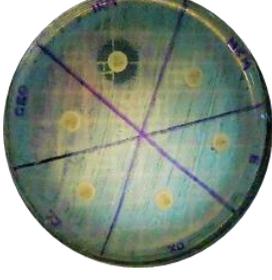
<i>Compuesto</i> (<i>Reactivo</i>)	<i>Resultados</i>		
	3:1:1	2:2:1	Acuoso
Alcaloides (Mayer/Wagner)	+	+	+
Azúcares Reductores (Fehling/Benedict)	+	-	+
Cumarinas (Erlich/NH ₄ OH)	+	-	-
Flavonoides (Shinona/NaOH)	+	-	+
Glucósidos Cardiacos (Baljet)	+	-	-
Glucósidos Cianógenos (HCl/Grignard)	-	-	-
Quinonas (NH ₄ OH/H ₂ SO ₄ /Borntrager)	+	-	+
Saponinas (H ₂ O/Rosenthaler)	-	-	+
Sesquiterpenlactonas (NH ₂ OH•HCl)	-	-	-
Taninos (Gelatina)	-	-	-

Pruebas de Susceptibilidad

Una vez obtenidos los resultados del análisis micoquímico de los extractos, se realizaron las pruebas de susceptibilidad en cada una de las cepas bacterianas. Las pruebas en cajas control, muestran que *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentan resistencia a Penicilina y Ampicilina, sin embargo para *Staphylococcus epidermidis* se observó resistencia a Oxiclina, y para *Staphylococcus aureus* solamente hay sensibilidad a Imipenem, como se pueden observar en la tabla 3.

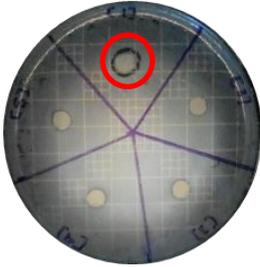
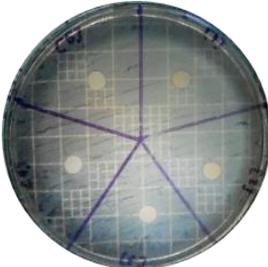
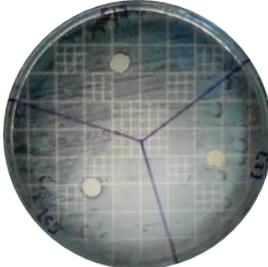
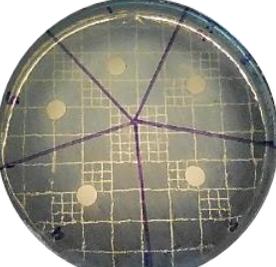
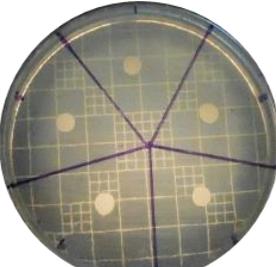
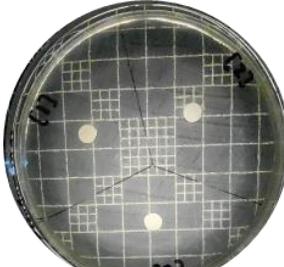
Los antibiogramas que se realizaron con las diversas concentraciones de cada extracto, muestran halos de inhibición de diámetros con un rango de 0.6 a 0.8 cm, o la ausencia total de inhibición bacteriana, como se muestra en la tabla 4.

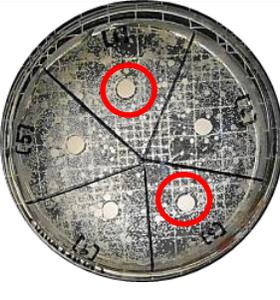
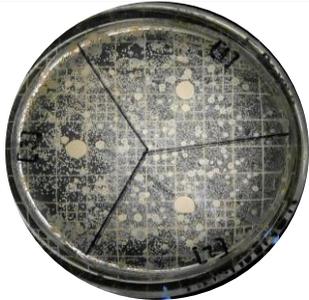
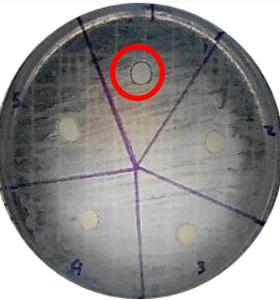
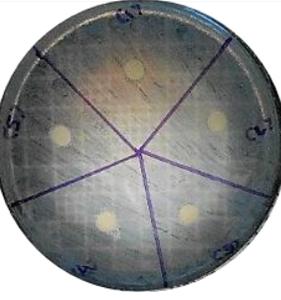
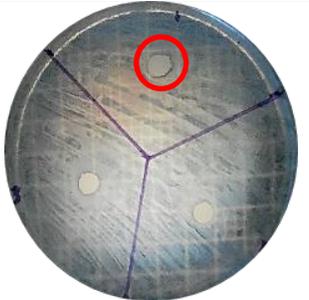
Tabla 3. Antibiogramas control para bacterias Gram Negativas y Gram Positivas.

Gram Negativas		Evidencia fotográfica	Gram Positivas		Evidencia fotográfica
<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Amikacina (AK)	S		Oxiciлина (OX)	R	
Gentamicina (CN)	S		Clindamicina (CC)	S	
Ciprofloxacino (CIP)	S		Ceftriaxona (CR)	S	
Penicilina (P)	R		Imipenem (IPM)	S	
Ampicilina (SAM)	R		Meropenem (MEM)	S	
Imipinem (IPM)	S		Eritromicina (E)	S	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Amikacina (AK)	S		Oxiciлина (OX)	R	
Gentamicina (CN)	S		Clindamicina (CC)	R	
Ciprofloxacino (CIP)	S		Ceftriaxona (CR)	R	
Penicilina (P)	R		Imipenem (IPM)	R	
Ampicilina (SAM)	R		Meropenem (MEM)	R	
Imipinem (IPM)	S		Eritromicina (E)	R	

S= Susceptibilidad, R=Resistencia.

Tabla 4. Antibiogramas para bacterias Gram Negativas y Gram Positivas.

Gram Negativas	Extracto 3:1:1	Extracto 2:2:1	Extracto Acuoso
<i>Escherichia coli</i> Se observa halo de inhibición sólo para extracto 3:1:1 en concentración 1= [98.75 mg/mL]. Para extracto 2:2:1 y acuoso, podemos observar resistencia bacteriana.			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Se puede observar que a cada concentración de extracto utilizado, se presenta resistencia bacteriana.			

Gram Positivas	Extracto 3:1:1	Extracto 2:2:1	Extracto Acuoso
<p><i>Staphylococcus epidermidis</i></p> <p>Se aprecian halos de inhibición con la concentración 1= [98.75 mg/mL] y 3= [24.68mg/mL] para extracto 3:1:1, sin embargo para extracto 2:2:1 y acuoso se presenta resistencia bacteriana.</p>			
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>Se aprecia que a las concentraciones 1= [98.75 mg/mL] de extracto 3:1:1 y 1= [23.33 mg/mL] de extracto acuoso se presentan halos de inhibición. Para extracto 2:2:1</p>			

Consideraciones Finales

Autores como Iwalocun y colaboradores en 2007, reportan concentraciones mínimas inhibitorias para *Pleurotus ostreatus* que van desde los 5 y 50 mg/ml, por lo que se decidió trabajar con concentraciones mínimas de 5.83 mg/ml, concentraciones medias de 49.37 mg/ml y máximas de 98.mg/ml.

Los reportes con actividad antibacteriana para macromicetos de éste género mencionan inhibición bacteriana de relevancia, al ser cepas de hongo híbridas, por lo que se puede atribuir que los resultados obtenidos no coincidan con la literatura reportada (bibliografía).

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana no fueron eficaces, ya que podemos ver resistencia por cada uno de los microorganismos con la metodología de difusión en agar.

Conclusiones

En esta investigación los resultados del análisis micoquímico sugieren la utilidad de los extractos Acuoso y 3:1:1 en mayor proporción para ser probados en cultivos bacterianos al igual que el extracto 2:2:1 en menor proporción, por la presencia de compuestos de alcaloides y flavonoides, ya que éstos favorecen una actividad antibacteriana (Valencia del Toro, *et al.*, 2012).

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana muestran halos de inhibición de diámetros no mayor a un centímetro, por lo que la utilización de reactivos, instrumentos y equipos especializados pueden ser una opción para medir con mayor precisión el grado de inhibición y el alcance antibacteriano que los extractos puedan tener.

La resistencia bacteriana es un motivo importante para la búsqueda de nuevas alternativas en la fabricación de biofármacos, los cuales deben tener como objetivo, combatir la problemática de los microorganismos que presentan farmacoresistencia.

Es fundamental dar continuidad a esta clase de estudios para contar con un mayor conocimiento sobre los compuestos presentes en los basidiomicetos y su posible utilización nutricional-farmacológica.

Referencias

- Cano-Estrada Araceli, Romero-Bautista Leticia. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. Rev. chil. Nutr. 43(1): 75-80. 2016.
- Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushroom of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiol Biotechnol.; 8:37-45. 2002.
- Fuentes, J. "Resistencia Bacteriana." Iatreia 6(1): 46-50, 1993.
- Gaitán-Hernández G, Salmones D, Pérez Merlo R, Mata G, Manual práctico de cultivo de setas; aislamiento, siembra y producción. 1°ed Instituto de ecología A.C. 2007.
- Gregori A, Svagel M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. Food technol. Biotechnol. 45:238-249. 2007.
- Iwalokum BA, Usen UA, Otunba AA, Olukoya DK. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. Afr. J. Biotech. 6: 1732- 1739, 2007.
- Valencia del Toro G, Garín Aguilar ME, Tellez Jaimes MÁ y Duran Paramo E. Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*. Rev. Mex. Mic vol.28 2008.
- Valencia del Toro G, Garín Aguilar ME, Cuadros Moreno A, Aguilar Doroteo L, Durán Páramo E. Actividad antibacteriana de extractos de cepas híbridas y parentales de *Pleurotus spp* En: En: Hongos comestible y medicinales en Iberoamérica. 1ª ed. José Sánchez-Gerardo Mata editores. México, 2012.

Notas Biográficas

Jhenifer Daniela Carrillo Lara es pasante de la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo del Área de Ciencias de la Salud por la Universidad Autónoma de Zacatecas.

El **M. en C. Rubén Octavio Méndez Márquez** es Químico Farmacéutico Biólogo por la Universidad Autónoma de Zacatecas (mención honorífica, 2003), Maestro en Ciencias por la Universidad de Guanajuato (2005), y actualmente Responsable del Laboratorio de Microbiología del Programa Académico de Químico Farmacéutico Biólogo y Docente Investigador de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

La **Dra. Rosalinda Gutiérrez Hernández** es Ingeniera Química por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas y Doctora en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular (julio del 2006) por esta misma institución. Actualmente es Docente-Investigadora del Programa de Licenciatura en Nutrición, de la Unidad Académica de Enfermería de la Universidad Autónoma de Zacatecas; Profesora PROMEP Perfil Preferente; Integrante del Cuerpo Académico en Consolidación.

La **Dra. Claudia Araceli Reyes Estrada** es Médica Cirujana por la Facultad de Medicina por la Universidad Juárez del Estado de Durango (2001), Internado Rotatorio y Servicio Social en Durango. Inicio de estudios de posgrado de Doctorado Directo en Agosto de 2004 en el Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología Médica y Molecular, de la Universidad Autónoma de Zacatecas, obteniendo el grado el 28 de Enero de 2011 con Mención Honorífica. También fue galardonada por el promedio más alto de su generación (2010), UAZ. Actualmente es Profesora en la Unidad Académica de Medicina Humana de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

La **M. en B. Patrocinio del Pilar Miranda Delgado** es Química Farmacéutica Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Zacatecas y Maestra en Ciencias Biológicas (2010). Integrante de la Sociedad Mexicana de Micología desde 2014 y actualmente Docente investigador de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas, además de ser encargada de la colección micológica.