

Gustavo Valencia del Toro¹, María Eugenia Garín Aguilar²,
Miguel Ángel Téllez Jaimes¹, Enrique Durán Páramo

¹Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, UPIBI, Instituto Politécnico Nacional. Barrio la Laguna Ticomán, D. F., CP 07340, México. ²Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Avenida de los Barrios No. 1 CP 54090, México

Antibacterial activity of *Pleurotus djamor* hexanic extracts

Abstract. Antibacterial activity of hexanic extracts from four *Pleurotus djamor* (white and pink varieties) strains was evaluated against bacterial strains of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, and *K. pneumoniae*. The antibacterial activity was determined by the disk diffusion method of Kirby Bauer, with 1.5×10^8 CFU / mL of bacterial concentration. After 16 to 18 h of incubation, white variety strains (IE200 and IE201) presented higher antibacterial activities than pink variety basidiomes (ECS127R and RP), developed inhibition halos with diameters from 12 ± 0.5 to 25.6 ± 1.2 mm and 8.3 ± 0.3 to 22.6 ± 1.4 mm, respectively.

Key words: Bacterial sensibility, mushrooms, antimicrobial activity.

Resumen. Se evaluó la actividad antibacteriana en extractos hexánicos de carpóforos de cuatro cepas de *Pleurotus djamor* (variedades blanca y rosa) contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella rhinoscleromatis* y *K. pneumoniae*. Dicha actividad se determinó por la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer, con una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL. Después de 16 a 18 h de incubación, las cepas variedad blanca (IE200 e IE2001) presentaron mayor actividad bacteriana que los basidiomas de la variedad rosa (ECS127R y RP), desarrollando halos de inhibición con diámetros de 12 ± 0.5 a 25.6 ± 1.2 mm y de 8.3 ± 0.3 a 22.6 ± 1.4 mm, respectivamente.

Palabras clave: Sensibilidad bacteriana, setas, antimicrobianos.

Received 26 August 2008; accepted 11 December 2008.

Recibido 26 de agosto 2008; aceptado 11 de diciembre 2008.

El uso medicinal de los hongos superiores tiene una gran tradición en el sureste asiático, mientras que en el hemisferio occidental su utilización farmacológica se ha incrementado significativamente a partir de las últimas décadas. En Estados Unidos, el valor comercial de los macromicetos medicinales y sus derivados fue de 1.2 billones de dólares en 1991, y se estimó en 6 billones de dólares para el año de 1999 (Chang, 1996; Wasser *et al.*, 2000). Actualmente, entre el 80 y 85 % de todos los productos medicinales derivados de los hongos

Autor para correspondencia: Gustavo Valencia del Toro
govaltor@yahoo.com.mx

proviene de los cuerpos fructíferos, los cuales son producidos comercialmente o colectados de manera silvestre (Lindequist *et al.*, 2005). Aún así, el número de especies de macromicetos investigados es relativamente baja, considerando el conocimiento del gran potencial de los micromicetos para la producción de fármacos, la experiencia en el uso etnomedicinal de los hongos superiores y la capacidad ecológica de estos organismos para producir metabolitos secundarios bioactivos (Barros *et al.*, 2007). Lo anterior permite asumir que los hongos superiores

representan un gran potencial para la producción de biofármacos.

De los géneros hasta ahora estudiados, destacan las actividades antitumorales y efectos inmunomodulatorios del género *Ganoderma* (Zhang, *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2000; Wasser, 2002). Con respecto al género *Pleurotus*, se ha informado del efecto hipoglucémico de extractos acuosos de *P. pulmonarius* (Badole *et al.*, 2006; 2007), mientras que *P. ostreatus* reduce la incidencia del tamaño de placas arterioscleróticas en conejos (Bobek y Galbavy, 1999).

Ankle (1989) y Brizuela *et al.* (1998), reportaron que la actividad antibacteriana de hongos del género *Pleurotus* se debe a compuestos de tipo acetileno; mientras que Iwalokun *et al.* (2007) indicaron que los extractos orgánicos de *P. ostreatus* tuvieron actividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, señalando a terpenoides y compuestos fenólicos como los responsables del efecto antibacteriano.

Dada la importancia que ha tenido en Latinoamérica el cultivo de *Pleurotus* y específicamente del complejo *P. djamor* (Ancona *et al.*, 2005; Cedano *et al.*, 1993; Gaitán Hernández y Salmones, 1999; López Cobá *et al.*, 2005; Salmones *et al.*, 2004), el objetivo de este trabajo fue investigar las propiedades antibacterianas de cuatro cepas de esta especie.

Los cuerpos fructíferos recién cosechados de las cepas de *P. djamor* IE200 e IE201 (cepas blancas, donadas por el Instituto de Ecología A.C., Xalapa) y ECS127R y RP (cepas rosas, donadas por el Colegio de la Frontera Sur A. C., Tapachula), fueron cortados y deshidratados a temperatura ambiente por 48 horas, después fueron molidos y 100g de cada muestra se extrajeron en Soxhlet con 150 mL de hexano durante 24 h. Cada uno de los extractos se filtró y concentró a presión reducida, y se les practicó un análisis preliminar fitoquímico siguiendo la metodología propuesta por Domínguez (1988) y Harborne (1984).

Los cepas bacterianas Gram positivas usadas en el bioensayo fueron: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*

(ATCC 12398, denominada *S. aureus*1) y *S. aureus* aislamiento clínico (CINVESTAV-IPN, denominada como *S. aureus*2); mientras que las cepas Gram negativas correspondieron a *Enterobacter agglomerans* (ATCC 27155), *Shigella dysenteriae* (INDRE B2188), *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella rhinoscleromatis* y *K. pneumoniae* (ATCC 13884) Las cepas fueron donadas por el laboratorio Microbiología de las FES-Cuautitlán, y por el laboratorio de Bacteriología de la FES-Iztacala, UNAM.

La actividad antibacteriana se evaluó siguiendo el método de difusión en agar en disco de Kirby-Bauer (Koneman *et al.*, 2004). Cajas de Petri con agar Müller Hinton fueron inoculadas con una suspensión celular cuya turbidez se igualó con la del tubo 0.5 de la escala de turbidez de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL (Bailey y Scott, 2004). Sobre las cajas se colocaron discos de papel filtro (6 mm de diam.) impregnados con 20 μ L de cada uno de los extractos de hongos, previamente resuspendidos en hexano (400 mg/mL). Discos impregnados sólo con hexano sirvieron como control negativo y discos comerciales con 30 μ g de cloranfenicol como control positivo, posteriormente las cajas se incubaron a 35° C durante 16 a 18 h. El diámetro de los halos de inhibición se midió en mm incluyendo el diámetro del disco. Cada ensayo se realizó por quintuplicado y los datos se analizaron con un ANOVA de uno y dos factores para detectar diferencias entre los halos obtenidos por los extractos de las cepas de *Pleurotus*, así como, entre el efecto inhibitorio provocado en las bacterias utilizadas. Para identificar diferencias estadísticas entre extractos hexánicos y/o bacterias se utilizó la prueba, a posteriori, de comparación de medias de Duncan.

Se obtuvieron valores de extractos hexánicos en el intervalo de 10.19-16.55 mg extracto/g hongo seco, los cuales fueron mayores que los valores de 3.32 a 3.40 mg/g, reportados por Iwalokun *et al.* (2007), para los extractos etéreo y acetónico de *P. ostreatus*.

Tabla 1. Análisis preliminar fitoquímico de extractos de las cepas de *P. djamor*

Grupo Químico ¹	Cepas			
	IE200	IE2001	ECS127R	RP
Alcaloides (Mayer)	-	-	-	-
Azúcares	+	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	-
Flavonoides	++	+	+	+
Quinonas	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-
SesquiterpenLactonas	+	+	+	+
Taninos	-	-	-	-

¹Presencia (+ ó ++ [para color más intenso]) o ausencia (-) del grupo químico.

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis preliminar fitoquímico de los extractos crudos, se detectaron azúcares, flavonoides y sesquiterpenlactonas; para los extractos orgánicos de *P. ostreatus* se ha reportado la presencia de azúcares, terpenoides, taninos, glucósidos, así como, compuestos fenólicos (Iwalokun *et al.*, 2007). Con respecto a este trabajo se observan similitudes en la presencia de azúcares y terpenoides, sin embargo, aunque los compuestos fenólicos incluyen al grupo de los flavonoides, estos autores no detectaron su presencia.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los halos de inhibición generados por los extractos hexánicos de los carpóforos de las cuatro cepas de *Pleurotus*. Se presentaron

diferencias estadísticas en los diámetros alcanzados por los extractos de las cepas blancas IE200 e IE201 ($F_{(16,7)}=16$, $p<0.0001$ y $F_{(16,7)}=40$, $p<0.0001$ respectivamente) en las 8 cepas bacterianas, formándose tres grupos y teniendo un mayor efecto tóxico contra *E. agglomerans* y *K. pneumoniae*, en esta última bacteria muy cercano al halo de inhibición obtenido por el antibiótico cloranfenicol. La inhibición de crecimiento se presentó tanto en bacterias Gram positivas (G+) como Gram negativas (G-). La cepa blanca IE200 presentó los mayores halos de inhibición contra todas las cepas bacterianas trabajadas, incluso con la especie *K. pneumoniae* duplicó la inhibición obtenida por la cepa IE201, por lo que independientemente de que ambas cepas sean de la misma especie, el efecto antibacteriano fue diferente en cada una de ellas. Será necesario determinar la concentración mínima inhibitoria para tener la certeza de que existe un mayor efecto tóxico de los componentes que se encuentran presentes en los extractos de ambas cepas, así como, la elucidación de los compuestos químicos presentes en ambos extractos. También se obtuvieron diferencias significativas en los halos de inhibición provocados por los extractos hexánicos de los carpóforos de las cepas rosas ECS127R y RP ($F_{(8,3)}=66.6$, $p<0.0001$ y $F_{(8,3)}=33.7$, $p<0.0001$, respectivamente), no obstante, únicamente presentaron halos de inhibición contra las bacterias *E. agglomerans*, *S. aureus* y

Tabla 2. Diámetros de los halos de inhibición presentados por las bacterias en contacto con los extractos hexánicos de las cepas de *P. djamor*

Bacteria	Halo de inhibición (mm) ¹				
	IE200	IE2001	ECS127R	RP	Cloranfenicol
<i>E. agglomerans</i>	23.3 0.3 ^c	22.6 1.4 ^d	14.0 0.5 ^c	14.6 0.8 ^c	43.6 0.3
<i>B. subtilis</i>	14.0 0.0 ^a	10.3 0.8 ^b	-	-	31.8 0.8
<i>S. aureus</i> 1	12.0 0.5 ^a	9.6 0.3 ^b	8.3 0.3 ^b	10.6 0.3 ^b	29.6 0.3
<i>S. aureus</i> 2	14.0 0.5 ^a	9.3 0.3 ^a	7.0 0.0 ^a	7.3 0.3 ^a	26.0 0.5
<i>Y. enterocolitica</i>	12.6 0.3 ^a	8.3 0.3 ^a	-	-	31.0 0.5
<i>K. pneumoniae</i>	25.6 1.2 ^c	12.0 0.5 ^b	-	-	29.0 0.0
<i>K. rhinoscleromatis</i>	16.0 3.2 ^b	9.6 0.8 ^a	-	-	25.6 0.8
<i>S. dysenteriae</i>	18.3 0.3 ^b	16.0 0.5 ^c	9.3 0.3 ^b	9.6 0.3 ^b	21.3 0.3

¹Promedio de cinco repeticiones. el error estándar de la media (ESM). Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p<0.05$).

S. dysenteriae. Los diámetros de los halos de inhibición de las cepas rosas fueron menores a los obtenidos con las cepas blancas. De nuevo, se presentó una mayor inhibición de crecimiento bacteriano en *E. agglomerans*.

El ANOVA de dos factores indicó diferencias estadísticas significativas para el factor hongo ($F_{(64,3)}=822.6$, $p<0.0001$) y el factor bacteria ($F_{(64,7)}=131.5$, $p<0.0001$). El extracto hexánico de los carpóforos de la cepa IE200 presentó el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias G(+) y G(-). También, se determinó que las bacterias mayormente afectadas por los extractos hexánicos utilizados fueron *E. agglomerans* y *S. dysenteria*.

En estudio previo realizado con extractos etéreos y acetónicos de *P. ostreatus* se reportaron halos de inhibición para las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus* de 7.1-7.8 mm y 7.0-7.5 mm, respectivamente y para *K. pneumoniae* entre 7.0-7.1 mm (Iwalokun *et al.*, 2007), mientras que para los extractos hexánicos utilizados en este trabajo se obtuvieron valores de 10.3-14.0 mm y 7.0-14.0 mm, para *B. subtilis* y *S. aureus*, respectivamente, destacándose una mayor inhibición con las cepas blancas; mientras que para *K. pneumoniae* los halos de inhibición variaron de 12.0 a 25.6 mm. Estos resultados colocan a las cepas IE200, IE201 como fuentes potenciales de compuestos bioactivos.

Como era de esperarse, el antibiótico cloranfenicol presentó mayores halos de inhibición que los extractos hexánicos de los hongos, considerando que los compuestos activos puros tienen mayor actividad antibacteriana que los extractos crudos.

El preliminar fitoquímico mostró la presencia de flavonoides y sesquiterpenoides en los extractos hexánicos de las cuatro cepas trabajadas, los flavonoides han sido reconocidos como metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana de extractos de los basidiomicetos comestibles *Lactarius deliciosus*, *Sarcodon imbricatus* and *Tricholoma portentosum* (Barros *et al.*, 2007). La cepa IE200 presentó una respuesta más intensa a la prueba para

flavonoides que las demás cepas (Tabla 2), lo que podría relacionarse con el mayor halo de inhibición presentado por esta cepa contra todas las bacterias utilizadas.

Finalmente, considerando que los terpenoides aislados de hongos han sido implicados como el fitoconstituyente responsable de su actividad antibacteriana (Iacobellis *et al.*, 2005; Iwalokun *et al.*, 2007), así como los sesquiterpenoides guaiana aislados de los cuerpos fructíferos del género *Lactarius* (Anke *et al.*, 1989), es probable que la presencia de sesquiterpenlactonas en los extractos hexánicos de los carpóforos de las cepas de *Pleurotus* contribuyan en la actividad antibacteriana encontrada, sin embargo, será necesario llevar a cabo la elucidación de los compuestos presentes en dichos extractos.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto SIP 20082396 del IPN y proyecto CONACYT 90032.

Literatura citada

- Ancona, L., S. Medina Peralta, G. Cetz Zapata, 2005. Preferencia en el consumo de *Pleurotus djamor* en Baca, Yucatán, México. *Revista Mexicana de Micología* 20: 41-44.
- Anke, H., O. Bergendorff, O. Sterner, 1989. Assays of the biological activities of guaiane sesquiterpenoids isolated from the fruit bodies of edible *Lactarius* species. *Food and Chemical Toxicology* 27 (6): 393-397.
- Anke T., 1989. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Progress in Industrial Microbiology* 27: 51-66.
- Badole, S.L., S.N. Shah, N.M. Patel, P.A. Thakurdesai, S.L. Bodhankar, 2006. Hypoglycemic activity of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.-Champ in alloxan induced diabetic mice. *Pharmaceutical Biology* 44 (6): 421-425.
- Badole, S.L., N.M. Patel, P.A. Thakurdesai, S.L. Bodhankar, 2008. Interaction of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.-Champ. with glyburide in alloxan induced diabetic mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5 (2): 159-164.
- Bailey, W.R., G.E. Scott, 2004. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana, Buenos Aires, pp. 236-239.
- Barros L., R.C. Calhelha, J.A. Vaz, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, L.M. Estevinho, 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research Technology*. 225(2): 151-156.
- Bobek, P., S. Galbavy, 1999. Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung* 43(5): 339-342.

- Brizuela, M.A., L. García., L. Pérez, M. Mansur, 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.
- Cedano, M., M. Martínez, C. Soto, L. Guzmán-Dávalos, 1993. *Pleurotus ostreatorroseus* (Basidiomycotina, Agaricales) in Mexico and its growth in agroindustrial wastes. *Cryptogamic Botany* 3: 297-302.
- Chang, S.T., 1996. Mushroom research and development—equality and mutual benefit. In: Royse DJ (ed.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania, State University, United States, pp. 1-10.
- Domínguez, A. X., 1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México, D.F.
- Harbone, J.B., 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall, London.
- Gaitán-Hernández, R., D. Salmones, 1999. Análisis de la producción de cepas de *Pleurotus djamor*. *Revista Mexicana de Micología* 15: 115-118.
- Iacobellis, N.S., P. Cantore, F. Capasso, F. Senatore, 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (1): 57-61.
- Iwalokun, B. A., U.A. Usen, A.A. Otunba, D.K. Olukoya, 2007. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology* 6 (15): 1732-1739.
- Koneman, W.M., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenber, W.C. Winn, 2004. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana, Buenos Aires, pp. 565-620.

- Lindequist, U., H.J.T. Niedermeyer, J. Wolf-Dieter, 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2 (3): 285-299.
- López Cobá, E.H., M.L. Ancona, P. S. Medina, 2005. Cultivo de *Pleurotus djamor* en laboratorio y en una casa rural tropical. *Revista Mexicana de Micología* 21: 93-97.
- Salmones, D., L. Mestizo Valdéz, R. Gaitán-Hernández, 2004. Entrecruzamiento y evaluación de la producción de las variedades de *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Revista Mexicana de Micología* 18: 21-26.
- Lin, B.Z., M.Y. Wang, Q. Liu, Q.M. Che, 2002. Effects of total triterpenoids extract from *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst. (Reishi Mushroom) on experimental liver injury models induced by carbon tetrachloride or d-galactosamine in mice. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4 (4): 337-342.
- Wasser, S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3): 258-274.
- Wasser S.P., E. Nevo, D. Sokolov, S. Reshetnikov, M. Timot-Tismenetsky, 2000. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2 (1): 1-19.
- Zhang, J., G. Wang, H. Li, C. Zhuang, T. Mizuno, H. Ito, H. Mayuzumi, H. Okamoto, J. Li, 1994. Antitumor active protein-containing glycans from the Chinese mushroom songsshan lingzhi, *Ganoderma tsugae* mycelium. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58 (7): 1202-1205.