



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIÓLOGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS DE MAESTRIA EN FARMACOLOGIA BASICA

**EFFECTO DE METABOLITOS DE *Lactarius sp* SOBRE EL
CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATOGENAS**

Presenta:

MVZ Verónica García Quiroz

Directores de tesis

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo

Morelia, Michoacán.

Junio, 2007.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer: su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo, otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén, o si alguna vez llegan a leer esta tesis, quiero que sepan que les agradezco infinitamente el formar parte de mi.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y el D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo.

ÍNDICE GENERAL

	PAG.
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
I. ANTECEDENTES	1
I.1. RESISTENCIA DE ANTIBIOTICOS	1
A) Expulsión activa del antibiótico.	2
B) Producción de enzimas inactivantes.	3
C) Alterar el blanco molecular del fármaco	
I.2. BASIDIOMICETOS	4
I.2.1 CARACTERISTICAS PRINCIPALES	4
I.2.2 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DE BASIDIOMICETOS	6
I.2.3 GENERO LACTARIUS	9
I.2.4 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA	9
I.2.5 ESPECIE INDIGO	10
I.2.6 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA	12
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. HIPOTESIS	13
IV. OBJETIVOS	13
General	
Particulares	
V. ESTRATEGIA GENERAL	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	15
VI.1 Material Biológico	15
VI.2 Medios de cultivos	16
VI.2.1 Medio Papa-Dextrosa Agar (PDA)	16
VI.2.2 Medio LB (Luria–Bertani)	16
VI.3 Métodos	16
VI.3.1 Crecimiento de los aislados miceliares en medio con membrana de papel celofán	16
VI.3.2 Obtención de extractos	16

a) Extractos extracelulares de micelio	16
b) Extractos intracelulares de micelio y carpóforo	16
• Acuosos	
• Diversos solventes	17
VI.3.3 Cromatografía en capa fina	17
VI.3.4 Extracción de metabolitos de la sílica gel	17
VI.3.5 Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano	18
VI.3.6 Medición de halos de inhibición	18
VII. RESULTADOS	19
VII.1 METABOLITOS EXTRACELULARES	19
VII.2 EFECTO DE LOS METABOLITOS INTRACELULARES DE <i>Lactarius sp.</i>	20
VII.2.1 Extractos orgánicos	
A. Efecto de los solventes sobre el crecimiento de bacterias patógenas	20
B. Efecto de los extractos orgánicos del basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i> sobre el crecimiento de bacterias	20
C. Efecto de la extracción orgánica de micelio vegetativo LAC891 sobre bacterias patógenas.	26
D. Efecto del extracto orgánico de micelio vegetativo KM03 sobre bacterias patógenas.	29
VII.2.2 EXTRACTOS ACUOSOS	33
A) Efecto de extracto acuoso de LAC891 sobre el crecimiento de bacterias patógenas.	33
B) Efecto de extracto acuoso de Km03 sobre el crecimiento de bacterias patógenas.	35
VII.3 CROMATOGRFIA EN CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS INTRACELULARES	37
VII.4 PURIFICACION DE BANDAS	41

A. Purificación de banda de basidiocarpo de <i>Lactarius</i> <i>indigo</i>	41
B. Purificación de la banda del extracto de micelio LAC891 con AE	41
C. Purificación de la banda del extracto de micelio KM03 con Metanol	42
VIII. DISCUSION	46
IX. CONCLUSIONES	48
X. PERSPECTIVAS	49
X. BIBLIOGRAFÍA	50

INDICE DE FIGURAS

NUM.		PAG.
1	Estructuras principales de un basidio	4
2	Ciclo de vida de un Basidiomicete.	5
3	<i>Lactarius indigo</i> .	10
4	<i>Lactarius indigo</i> en diferentes municipios del estado de Michoacán.	11
5	Medición de halos de inhibición	18
6	Cromatografía en capa fina de metabolitos extracelulares de Lac26	19
7	Efecto del solvente de extracción sobre el crecimiento de las bacterias	21
8	Inhibición del crecimiento de bacterias con extractos orgánicos del basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i>	22
9	Inhibición de crecimiento de bacterias con extracto del basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i> a partir de hexano	23
10	Inhibición de crecimiento de bacterias utilizando el extracto de basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i> con AE	24
11	Inhibición de crecimiento de bacterias con extracto metanólico de basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i>	24
12	Efecto del extracto orgánico de basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i> sobre el crecimiento de bacterias patógenas.	25
13	Efecto del extracto orgánico del basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i> /micelio LAC891	26
14	Inhibición de crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos de micelio LAC891	27
15	Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas con extracto de AE del micelio LAC8911.	27
16	. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto metanólico del micelio LAC891	28
17	Efecto de los extractos con AE y metanol del micelio de LAC891	28
18	Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas con extractos	30

	orgánicos de micelio KM03	
19	Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas con extracto del micelio KM03 con hexano	30
20	Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto de micelio KM03 con AE	31
21	Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto metanólico del micelio KM03	32
22	Efecto de los extractos con Hexano y Acetato de Etilo del micelio de KMO3	32
23	Efecto de extractos con metanol y acuoso del micelio de KM03 de <i>Lactarius sp</i>	33
24	Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto acuoso de micelio LAC891	34
25	Efecto de extracto acuoso del micelio LAC891 de <i>Lactarius sp.</i>	35
26	Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto acuoso del micelio KM03	36
27	Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de basidiocarpo <i>Lactarius indigo</i>	37
28	Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de LAC891	38
29	Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de KM03.	39
30	Cromatografía en capa fina de los extractos acuosos de KM03 y LAC891	40
31	Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con banda purificada de LAC891 con metanol	42
32	Efecto de banda purificada a partir de MICELIO LAC891 con AE sobre bacterias patógenas	43
33	Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con banda purificada con metanol de micelio KM03 de <i>Lactarius sp.</i>	45
34	Efecto de banda purificada del extracto metanólico del micelio KMO3	45

INDICE DE TABLAS

NUM.		PAG.
1	Actividad farmacológica de algunos basidiomicetes.	8
2	Cepas utilizadas en este trabajo	15
3	Halos de inhibición (mm) del crecimiento en bacterias por los solventes Hexano, Acetato de Etilo y Metanol.	20
4	Halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias utilizando extractos con solventes orgánicos del basidiocarpo de <i>Lactarius indigo</i>	22
5	Halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos del micelio LAC891	26
6	Halos de inhibición (mm) del crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos del micelio vegetativo KM03.	29
7	Halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias patógenas con extracto acuoso del micelio LAC891	34
8	Medición de los halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias patógenas utilizando extractos acuosos de micelio vegetativo KM03	36
9	Halo de inhibición (mm) de la banda purificada a partir del extracto con AE de micelio LAC891	41
10	Determinación de los halos de inhibición (mm) del crecimiento de bacterias patógenas utilizando la banda purificada de micelio KM03 con metanol.	44

RESUMEN

Actualmente se ha incrementado el estudio de metabolitos secundarios producidos por hongos basidiomicetos; Jaimes (2005) reportó que un aislado miceliar silvestre del genero *Lactarius*, tenía capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas; En este trabajo se compara el efecto sobre el crecimiento de cepas patógenas de los extractos acuosos y orgánicos de carpóforo *L. indigo* y micelio de *Lactarius sp.* Para ello, se separaron los metabolitos intracelulares del micelio *Lactarius sp.* de mediante cromatografía en capa fina y se probó la actividad de las bandas recuperadas con cepas patógenas mediante ensayos en disco. Se obtuvieron los metabolitos intracelulares a partir de micelio vegetativo liofilizado, realizando una extracción sucesiva con hexano, acetato de etilo y metanol por 72h c/u, posteriormente se concentró el extracto y se probó directamente con varias cepas patógenas. Se encontró actividad antibacteriana en las cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Salmonella sp.* a diferencia de los extractos orgánicos de micelio y basidiocarpo consideramos que muestran actividad antibacteriana de amplio espectro, pues los diferentes extractos presentaron inhibición de crecimiento, aunque diferencial en cada una de las cepas. Encontramos una correspondencia positiva entre el número de bandas visualizadas en cromatografía y la actividad antibacteriana del extracto; respecto a la banda purificada, el extracto metanólico de KM03 presentó actividad antimicrobiana de amplio espectro con un efecto mayor el del extracto crudo correspondiente.

I. ANTECEDENTES

En nuestros días, la resistencia que algunas bacterias patógenas de humanos y animales han desarrollado hacia los antibióticos es considerado como un grave problema de salud pública, que involucra a todos los países del mundo, puesto que implica el fracaso de la terapéutica. La resistencia puede ser una propiedad inherente o adquirida y se ha documentado varias estrategias mediante el cual logran disminuir la acción de los agentes antibacterianos: (1) producción de enzima que degrade el fármaco, (2) alterar el blanco molecular del fármaco o (3) evitar el acceso del fármaco mediante el bombeo activo de la bomba. (Bruce et al., 2004)

Actualmente se han explorado con mayor detenimiento los metabolitos secundarios producidos por microorganismos entre ellos se encuentran los hongos basidiomicetos con componentes antibióticos y antifúngicos, mismos que constituyen una fuente inagotable para la obtención de nuevas sustancias activas dentro de la industria farmacéutica (Ruiz 2001; Staments, 2002).

I.1. BASIDIOMICETOS

I.2.1 CARACTERISTICAS PRINCIPALES

La división basidiomycota contiene cerca de 30,000 especies descritas, de las cuales el hombre le ha encontrado varios usos (Swann *et al.*, 2003). Dentro de las características principales, se encuentra la pared celular que consiste en una capa externa contiene B-glucanos solubles en agua; la segunda capa con una solubilidad alcalina con alfa 1,3 glucanos (S-glucanos) y la capa interna con una alta insolubilidad alcalina de ramas de glucano con B-1,3 y B1-6 unidas (R-glucano) en el cual las microfibras de quitina son embebidas (Yano *et al* 2004).

Asimismo, los basidiomicetos pueden ser unicelulares o multicelulares, con una reproducción sexual o asexual, este grupo son considerados como macromicetos, distinguidos por la formación de cuerpos fructíferos o sombrero (nombrado también como píleo, carpóforo o basidiocarpo). De manera particular los basidiomicetos se caracterizan por producir esporas que se forman de una célula especializada denominada basidio (Fig. 1) que es de forma clavada, en su parte terminal se encuentran estructuras en forma de pequeños cuernos denominados esterigmas y es allí donde se producen las esporas que pueden ser de dos hasta cuatro (Díaz-Barriga año).

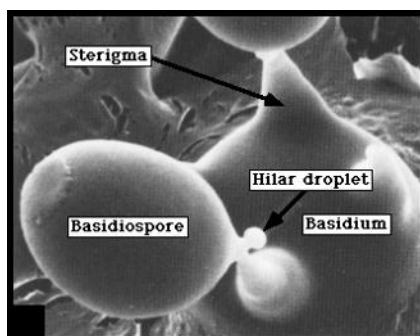


Fig.1 Estructuras principales de un basidio (tomada de Swann *et al.*, 2003)

El cariogama (fusión nuclear) y la meiosis ocurren en el basidio. Por su parte, las esporas una vez maduras caen por debajo del sombrero y se dispersan por el viento. Una vez que encuentran el sustrato apropiado, las esporas germinan y forman hilos microscópicos denominados hifas (finas fibras que contiene protoplasma) mismas que van a integrar el micelio. En basidiomicetos, es común encontrar las hifas septadas y para mantener su condición dicariontica, muchos basidiomicetos forman estructuras especiales llamadas fibulas durante la división conjugativa de los nucleolos, en la punta de una hifa en crecimiento (Rodríguez *et al.*, 2004). Existe una diferenciación de acuerdo a su función del micelio, reconociéndose así el micelio vegetativo que penetra en el sustrato para obtener los nutrientes y el micelio que se proyecta hacia el exterior de la colonia (cuerpo fructífero) en donde se produce las estructuras reproductoras, permitiendo un nuevo ciclo de vida (Fig. 2) (Bial - Arístegui, 2002).

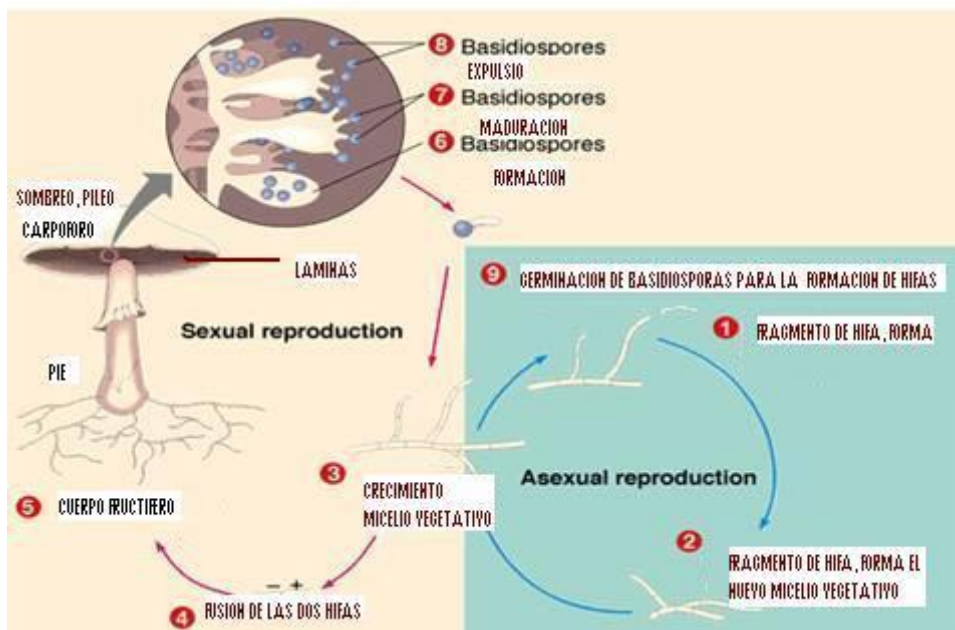


Fig. 2 ciclo de vida de un Basidiomiceto.

I.2.2 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DE BASIDIOMICETOS

Los primeros trabajos empleando basidiomicetos, citados por Brizuela *et al.*, (1998) fueron informados por Florey en 1949 y realizados por Anchel, Hervey y Wilkins en 1941, quienes examinaron extractos de cuerpos fructíferos y cultivos miceliales de más de 2 000 especies de hongos, detectando en los mismos diversas actividades antibióticas y cuyos resultados conllevaron al aislamiento e identificación de la pleuromutilina, compuesto utilizado para el tratamiento de las enfermedades producidas por micoplasmas en el ganado vacuno.

Existe una gran diversidad de basidiomicetos, que en la medicina tradicional de Japón, China, Corea, Rusia, Estados Unidos de Norteamérica y Canadá ya eran utilizados por su eficacia como antitumorales, moduladores inmunológicos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, reguladores de crecimiento, antibacterianos y antiinflamatorios (Al-Fatimi *et al.*, 2005., Borchers *et al.*, 2004., Brizuela *et al.*, 1998; José *et al.*, 2004; Wasser 2002; Ulrike *et al.*, 2005). Entre los basidiomicetos conocidos en distintas culturas por sus propiedades medicinales se encuentra *Lentinus edodes*, *Grifota frondosa* (Borchers *et al.*, 2004), *Ganoderma lucidum* (Chang y Buswell 1996; Zhu *et al.*, 1999) *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Inonotus obliquus*, y *Flammulina velutipes* (Wasser y Weis 1999), *Pleurotus*, *Auricularia*, *Tremella*, *Hericium* y *Grifola* (Chang, 1996), así como *Pleurotus florida eger* (Jose *et al.*, 2004).

En las últimas décadas, los estudios de basidiomicetos para obtener metabolitos con actividad farmacológica se han incrementado (Tabla I). Así, Kupka *et al.*, (1981) evaluaron la actividad antibacteriana de *Pleurotus hipnophilus*, encontrando que dicha actividad se debía a un compuesto sesquiterpenoide. Por su parte, Fabián *et al* (1999) aislaron un compuesto 6,9-Dihydroxy-3(15)-caryophyleno-4, 8-diona de *Marasmius* sp. Con actividad antibacteriana muy débil. Así mismo, Ramizi *et al.*, (2000) aislaron dos compuestos de *Ganoderma pfeifferi* semejantes a hidroquinonas farnesil nombradas como: ganomicina A y B, las cuales tuvieron actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Mierau *et al.* (2003) reporto actividad antibacteriana de un compuesto obtenido de *Dacrymices* sp. 32-98.

De igual forma, Fan *et al.* (2006) realizaron una revisión acerca de la actividad antibacteriana de algunos basidiomicetos, por ejemplo; un sesquiterpeno hidroquinona producido por una especie *Ganoderma pfeifferi* Bres. inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, un esteroide parecidos a 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol aislado de *Ganoderma applanatum*, quien mostró actividad débil en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas. También, ácido oxálico como un agente responsable por el efecto antibacteriano de *Lentinula edodes* contra *S. aureus*. Por su parte, Rosa *et al.* (2003) examinaron la actividad antifúngica y antibacteriana de 103 aislados (84 especies) de basidiomicetos de Brasil contra microorganismos patógenos y no patógenos y el 14% de estos aislados presentaron actividad antimicrobiana significativa generando un halo de inhibición de 12 mm de diámetro. De los aislados estudiados, dos tuvieron actividad de amplio espectro (*Phellinus* sp., *Irpex lacteus*) y ocho de ellos tuvieron actividad antibacteriana, encontrándose entre estos *Agarius* cf. *nigrecentulus*, *Irpex lacteus*, *Leucoagaricus* cf. *cinereus*, *Marasmius* cf. *bellus*, *Marasmius* sp., *Nothopanus hygrophanus*, *Pycnoporus sanguineus*). En tres de los aislados se encontró actividad antifúngica. De la misma forma, Suay *et al.* (2000) evaluaron la actividad antimicrobiana de aislados de 204 basidiomicetos colectados en España de estos, 109 tuvieron notable expresión de metabolitos antimicrobianos, significativamente superior a la de algunos grupos de hongos ascomicetes como *Pezizales* y *Xylariales*. Por otra parte, Al-Fatimi *et al.* (2005) encontraron actividad antibacteriana alta de extractos del cuerpo fructífero de *Agaricus* sp; *Coriolopsis caperata*, *Ganoderma colossus*, *Ganoderma resinaceum*, *Phellorinia herculea* y *Tulostoma obesum*. De igual forma, Ulrike *et al.*, (2005) realizaron una revisión sobre la actividad antibacteriana de especies de *Ganoderma* entre ellas *G. pfeifferi* Bres, *G. annulare*, *G. applanatum*, encontrado compuestos de naturaleza sesquiterpénica con dicha propiedad. Adicionalmente, Yoon *et al.*, (1994) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de carpóforo de *G. lucidum*. Al realizar diluciones para encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la que tuvo mayor efecto fue (0.75 mg/ml) probando estos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Shittu *et al.* (2005) identificaron Metabolitos antibacterianos de *Russula* sp. Probándolos contra *B. subtilis* NCTC 8236. Así, Zjawiony (2004) realizó una revisión sobre los

compuestos metabolitos con actividad antibacteriana de *Ganoderma lucidum*, cuyos compuestos fueron probados principalmente contra bacterias *E.coli* y *Estafilococos aureus*. Shittu *et al.* (2005) realizaron un estudio con basidiomicetos del genero *Russula* sp. and *Pycnoporus cinnabarinus*, demostraron la producción de un metabolito antibacteriano y su punto máximo de producción.

TABLA 1. Actividad farmacológica de algunos basidiomicetes.

Naturaleza Química	Género/Especie	Compuesto	Actividad
Sesquiterpenos y compuestos relacionados	<i>Merulius</i> , <i>Marasmius</i>	Merulidial	Antimicrobiana
	<i>Naematoloma</i>	Naematolin	Antifúngica antiviral
	<i>Pleurotellus</i> , <i>Lentinelus</i>	Naematolon	Citotóxica
	<i>Paneolus</i>		Mutagénica
	<i>Ganoderma annulare</i>	Ac. applanoxídico	Antibacteriana
	<i>Ganoderma applanatum</i>	Esteroides parecido a 5a-ergosteerona-7,22-dien-3b-ol	Antibacteriana
Sesquiterpenos	<i>Lactarius deliciosus</i>	Ester de ácido esteárico	Actividad citotóxica
	<i>L. sanguifluus</i>	lactarioviolín	Actividad citotóxica
	<i>L. agaricales</i>	deterrol	Antibacteriana
	<i>L. deterrimus</i> Gragea		Antibacteriana
	<i>L. piperatus</i> Scop		Antibacteriana
	<i>L. salmonicolor</i>		Antibacteriana
Diterpenos	<i>Cyathus</i> , <i>Crinipellis</i>	Estriatin	Citotóxica, antifúngica
	<i>Pleuromutilin</i>	Cavipetin	Antibacteriana
Acetilenos	<i>Marasmius</i> , <i>Clitocybe</i>	Escorodonin	Antibacteriana
Glicolípidos	<i>Ustilago</i> ; <i>schizonella</i>	Schizonelina	Antibacteriana
Policetonas	<i>Merulius</i>	Ac. merulírico	Antibacteriana

I.2.3 GENERO LACTARIUS

El género *Lactarius* se caracteriza por la formación de cuerpo fructífero

y exudado de látex dependiendo del color de la especie (www.mycena.sfsu.edu). Además de las propiedades medicinales, diversas especies de este género son reportadas como comestibles y se ha documentado la capacidad para formar simbiosis micorrícicas con especies arbóreas de bosques templados (Nuytinck et al., 2004). Estas propiedades incrementan el interés en el estudio de especies del género *Lactarius*, al poseer valor farmacológico, alimenticio y ecológico.

I.2.4 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA

Con respecto a la actividad farmacológica de este género, existen algunos trabajos que documentan la presencia de metabolitos con actividad antimicrobiana. Así, Sterner *et al.* (1985) Realizo un estudio utilizaron los extractos del carpoforo de *Lactarius vellereus* en la que aislaron estructuras sesquiterpenicas con actividad antibacteriana, Por su parte, Anke *et al.* (1989) informaron que la acción antibacteriana de extractos del cuerpo fructífero de *L. delicioso*, *L. sanguifluus* y *L. deterrimus* se debía a la presencia de sesquiterpenoides, los cuales fueron activos contra *Salmonella* sp. Para el caso de *Lactarius lingnyotus* Vidari *et al.*, (1995) obtuvieron un extracto que mostró baja actividad antibacteriana contra *S. aureus*; *bacillus subtilis* y *E. coli*. Así mismo, Arnone *et al.*, (2000) realizaron una revisión de metabolitos secundarios en la que hace referencia a isolactararufin aislado de *L. rufus* asi como, a un norsesquiterpeno aislado de *L. strobilatus*. Por su parte, Basaran *et al.* (2002) evaluaron la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizando los extractos de *L. deterrimus* Grager, *L. sanguifluus*, *L. semisanguifluus*, *L. piperatus* Scop, *L. deliciosus* y *L. salmonicolor*. De igual forma, Lin y Ji-Kai (2002) identificaron el primer sesquiterpeno de tipo humulano, asi como otros compuestos de acido lactarinico aislado del cuerpo fructífero de *L. hirtipes*; Una Investigación realizada por Clericuzio *et al.*, (2002) en el cuerpo fructífero de *L. atlanticus* en la que se aislaron sesquiterpenos protoilludano nombrados como esterres de atlanticotes A, B, C y D. Conjuntamente, Krawczyk *et al.*, (2003) evaluó un compuesto obtenido de la lactarius, es un alcohol sesquiterpeno N-benzoylphenilisosenato la cual tubo actividad contra *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus* y *E. facecium*.

I.2.5 ESPECIE INDIGO



Fig. 3 *Lactarius indigo*.

Nombre Científico: *Lactarius indigo* (figura 3)

Nombre común: añil, azul, Hongo azul, oreja azul, oreja de puerco azul, ririchaka.

Características morfológicas: Esta especie puede presentar píleos de 2-6 pulgadas de ancho; estructuralmente es convexo con una depresión central y conforme madura se vuelve mas ancho; se localiza entre los meses de agosto a octubre (Miller y Halls, 1969). Además, es considerado una especie con valor culinario (Pérez *et al.*, 2006).

Distribución Geográfica: Es una especie de amplia distribución geográfica ya que ha sido encontrado en Canadá, USA, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Japón, China y México (www.fieldmuseum.org). Un estudio realizado por Montoya y Bandala en 1996, reportado por Flores *et al.*, (2005) indica que en México, se ha encontrado a *L. indigo* asociado con *Agnus jorulensis* H.B.K., *Carpinus carolineana* Walt., *Ostrya virginiana* (leche) K.Kotch., y *liquidambar macrophylla* Oester. En el caso concreto del estado de Michoacán, *L. indigo* ha sido encontrado Zinapécuaro, Uruapan, San Juan Nuevo, Tancítaro, Los Reyes, Charapan, Paracho, Cheran, Chilchota, Nahuatzen, Pátzcuaro, Tingambato, Ziracuaretiro y Villa Madero (Fig. 4)(www.semarnat.gob.mx).

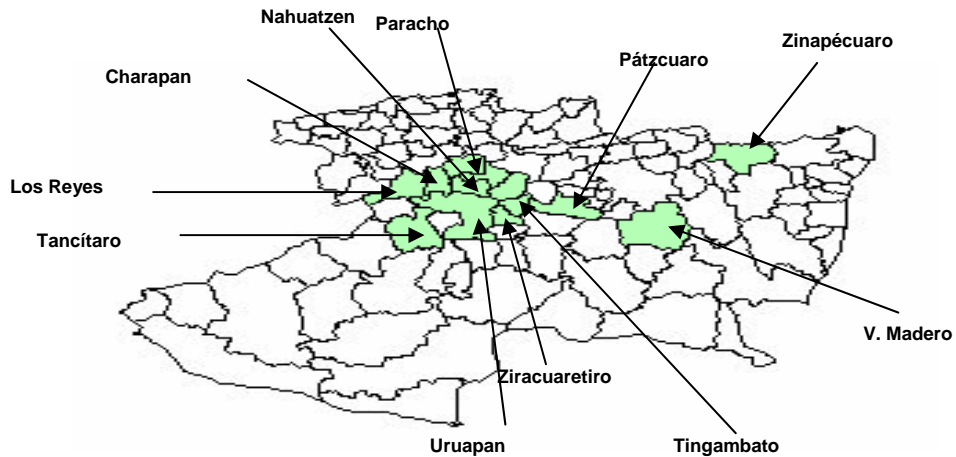


Fig.4 *Lactarius indigo* en los diferentes municipios del estado de Michoacán

Hábitat: Se desarrolla sobre la superficie del suelo, en México y en Guatemala (Flores *et al.*, 2005) ha sido informado como ectomicorrizógeno caracterizado por la presencia de redes de Karting que consisten en delgadas hifas que crecen sobre la superficie de la célula de la corteza en la que se lleva a cabo el intercambio de materiales entre planta-hongo (Brundrett 2004); además, presentan pequeñas espinas superficiales en ectomicorrizas jóvenes y en las adultas presentan pequeños gránulos (Flores *et al.*, 2005). También, crece en forma gregaria o solitaria. Habita en bosques pino-encino, entre los 2300 a 3000 metros sobre el nivel del mar (www.semarnat.gob.mx). Estos bosques mixtos son comunidades ampliamente distribuida que ocupa la mayor parte de la superficie forestal de las porciones superiores de los sistemas montañosos del país, en donde los pinos (*Pinus* spp.) predominan y son acompañados, en una proporción más baja, por encinos (*Quercus* spp.); ubicándose en diversas exposiciones y con diferentes composiciones florísticas; generalmente presentan una alta diversidad de especies vegetales (García *et al.*, 2004).

I.2.6 ACTIVIDAD FARMACOLOGICA

Los estudios para documentar el valor farmacológico y la producción de metabolitos antimicrobianos de esta especie son inexistentes. Recientemente se evaluó la actividad antimicrobiana de un aislado de *L. indigo* de la colección de basidiomicetes silvestres con la que cuenta el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Medicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. En dicho estudio se encontró que el micelio de *L. indigo* inhibía el crecimiento de cepas de *E. coli* diarreagénicas mediante sustancias excretadas al medio de cultivo (Jaimes-García, 2005). Se encontró que el patrón de metabolitos excretados por el micelio en cultivo sólido variaba en presencia de las bacterias. Sin embargo, a la fecha se desconoce la naturaleza de dichos metabolitos, así como las condiciones óptimas de expresión de estos y el mecanismo de acción, por lo que se requieren estudios adicionales que permitan conocer el potencial de *L. indigo* para obtener sustancias antibacterianas.

II. JUSTIFICACIÓN.

La búsqueda de nuevos metabolitos con actividad antibacteriana es importante debido a la resistencia de algunas cepas bacterianas patógenas de humano que han adquirido hacia antibióticos utilizados en la actualidad. Esto puede ayudar a mejorar la respuesta a los tratamientos de diversas enfermedades infecciosas. Los hongos basidiomicetos representan una fuente probada de metabolitos con actividad farmacológica, sin embargo, los estudios en ese sentido en cepas aisladas en México aun son escasos.

Por todo lo anterior la base de nuestra investigación es estudiar la respuesta de cepas patógenas ante los extractos intracelulares de micelio vegetativo de *Lactarius* sp. y basidiocarpo de *L. indigo*. Además de contrastar dicha respuesta dependiendo del extracto utilizado.

III. HIPOTESIS

Los extractos intracelulares orgánicos u acuosos de *Lactarius* sp. y *L. indigo* inhiben el crecimiento *in vitro* de bacterias Patógenas y existe una variación en dicha actividad dependiendo del extracto utilizado.

IV. OBJETIVOS

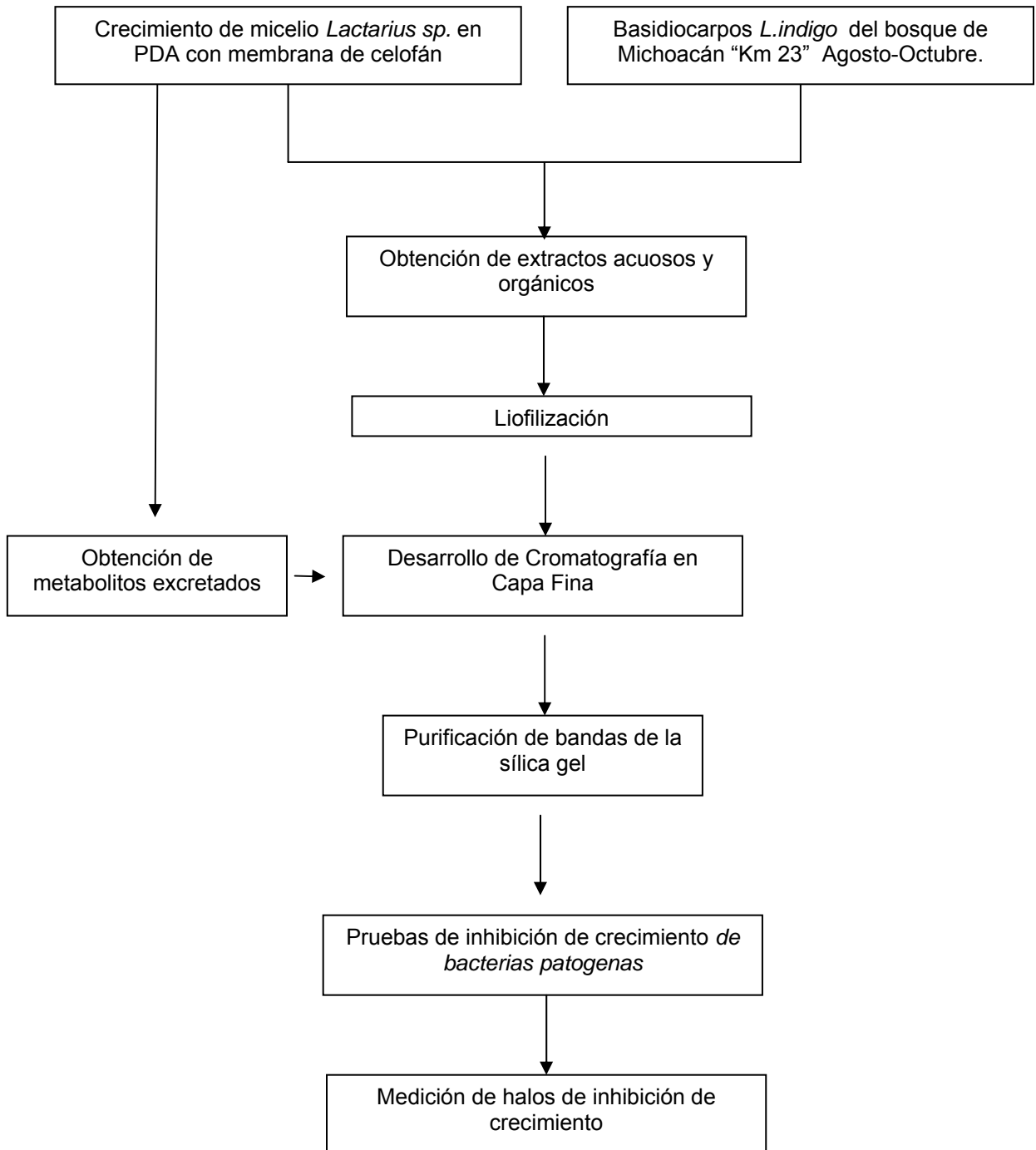
General

Estudiar el efecto de los extractos intracelulares de *Lactarius* sp y *L. indigo* sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias patógenas.

Particulares

- i) Obtener metabolitos intracelulares de micelio vegetativo *Lactarius* sp y basidiocarpo de *L. indigo*.
- ii) Evaluar la inhibición del crecimiento de los extractos orgánicos y acuosos del micelio de *Lactarius* sp y basidiocarpo de *L. indigo* sobre bacterias patógenas.

V. ESTRATEGIA GENERAL



VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

VI.1 Material Biológico

Se utilizaron los aislados miceliares de hongos que provienen del cepario del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” colectados en la sierra de Santa Rosa, municipio de Guanajuato, así como en el bosque salida a Mil cumbres Km 23 Morelia oriente Michoacán; Los basidiocarpos de *Lactarius Índigo* fueron colectados del Km 23; en octubre 2006. Se emplearon 7 aislados de cepas patógenas de Humanos 4 de ellas, son cepas de referencia (EPEC, EIEC y ETEC ST/LT) adquiridas en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE); El aislado patógeno de Animales (ATCC) Tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

CEPA	LOCALIDAD	CLAVE
	HONGOS	
	MICELIO	
<i>Lactarius SP.</i>	SR	LAC891
	KM23	Lactarius 26
	KM23	KM03
	BASIDIOCARPO	
<i>Lactarius indigo</i>	Basidiocarpo	KM03
	BACTERIAS	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		
<i>Enterobacter clocae</i>		
<i>Salmonella sp.</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>S. aureus</i> ATCC
<i>E. coli</i> enteroinvasiva		EIEC-E11
<i>E. coli</i> enteropatogenica		EPEC-0111
<i>E. coli</i> enterotoxigenica		ETEC-ST-25611
<i>E. coli</i> enterotoxigenica		ETEC-LT-H10407

SR. Bosque de Santa Rosa en Guanajuato

Km 23 Carretera Morelia- Michoacán.

VI.2 Medios de cultivos

VI.2.1 Medio Papa-Dextrosa Agar (PDA)

Este medio se prepara según las especificaciones del fabricante Bioxon; posteriormente se esteriliza por calor húmedo a 121° C (15 lb/in²) durante 15 min. Una vez esterilizado el medio se vacía en cajas de Petri estériles.

VI.2.2 Medio LB (Luria–Bertani)

Cada litro de medio contiene triptona, 10 g, extracto de levadura, 5 g y NaCl, 10 g. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH, se agrega agar bacteriológico al 2%, se esteriliza a 121° C (15 lb/pulg²) durante 15 min y se vacía en cajas de Petri estériles.

VI.3 Métodos

VI.3.1 Crecimiento de los aislados miceliares en medio con membrana de papel celofán

En una caja de Petri con medio PDA, se coloca una membrana de papel celofán previamente lavada y esterilizada, a continuación se coloca en el centro de la caja, un preinóculo miceliar del hongo en cuestión y se incuba a 28 °C hasta la fase estacionaria.

VI.3.2 Obtención de extractos

a) Extractos extracelulares de micelio

Se obtienen presionando directamente un bloque de agar con micelio crecido hasta fase estacionaria en medio PDA, sobre una placa de sílica gel para cromatografía en capa fina y se procede como se indica en el punto VI 3.3.

b) Extractos intracelulares de micelio y carpóforo

- **Acuosos**

Se pesan 5g (peso fresco) de biomasa (micelio o basidiocarpo) y se hierven durante 45 min en agua destilada. El agua evaporada se reemplaza continuamente durante el tiempo de la extracción. Una vez terminada la extracción se filtra por una gasa estéril para desechar el residuo de biomasa y

el extracto se congela y se liofiliza. El residuo obtenido se resuspende en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL.

- **Diversos solventes**

Se pesan 250mg de micelio liofilizado, y se extraen sucesivamente con hexano (Hx) Acetato de etilo (AE) y Metanol (M) por 72h c/u, agitando a 1000 rpm a temperatura ambiente. Se recupera el extracto cada 24h con papel filtro (Obatemi *et al*; 2006) y se evapora en el rotavapor.

VI.3.3 Cromatografía en capa fina

La cámara de cromatografía, se prepara con 75 mL de una solución 2:1 de Hexano- Acetato de Etilo. Se utilizan placas de sílica-gel de 20 × 10 cm de soporte de vidrio y placas de 10 × 5 cm y 5 × 3.5 cm con soporte de aluminio, sobre todas las placas se dibujan dos líneas con lápiz, una a 1.5 cm la segunda línea se dibuja a 17 cm; para la placa de 10×20 a 7.5 cm para la placa de 10 × 5cm y a 2.5cm para la placa de 5 × 3.5 cm de distancia del borde inferior de la placa. La primera sirve de guía para aplicación de las muestras estudiadas y la segunda para retirar las láminas de sílica de la cámara de cromatografía, al alcanzar un límite de corrimiento al punto máximo. La aplicación de la muestra depende del estudio a realizar, para los metabolitos extracelulares la muestra aplicada proviene de bocados de agar de 7 mm de diámetro de micelio vegetativo obtenidos del crecimiento de las cepas de estudio sobre membrana de papel celofán y retirada con el micelio con metabolitos excretados en el medio PDA posterior al crecimiento en la fase estacionaria, los que se aplicaron directamente sobre la placa de cromatografía presionando suavemente por 5 segundos, repitiendo la operación tres veces para cada inóculo, se colocaron 5 inóculos por muestra; para los metabolitos intracelulares se toma una alícuota de 10µL de cada extracto. Una vez obtenidos los cromatogramas se procede a su visualización directa con lámpara de luz UV a las longitudes de onda de 254, 302 y 365 nm.

VI.3.4 Extracción de metabolitos de la sílica gel

De las placas preparativas de sílica gel, se raspan las bandas seleccionadas y se colocan en un matraz de 250mL, se le agregan 20mL del solvente con que se hizo la cromatografía y se agita durante 5min, posteriormente se filtra con papel filtro repitiendo la operación tres veces, una vez que se obtiene los 750mL del lavado de la sílica, se evapora y concentra en el rotavapor hasta un volumen final de 2 mL, y se procede a realizar los ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano.

VI.3.5 Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano

Se siembra la bacteria de forma masiva en medio LBA, a continuación se humedecen discos de papel filtro de 0.7cm de diámetro previamente esterilizados, con los extractos obtenidos y se colocan junto con un disco control, humedecido con etanol (utilizado durante la concentración en el rotavapor) de manera equidistante en cajas de Petri por duplicado y finalmente se incuban durante 24 h a 37° C y se observa, si existe un halo de inhibición del crecimiento.

VI.3.6 Medición de halos de inhibición

Para conocer la inhibición en mm, del halo se realizo la siguiente formula

$$I = D-d/2$$

En donde Inhibición en mm = Diámetro de halo de inhibición – diámetro de sensidisco /2 (Fig. 5)

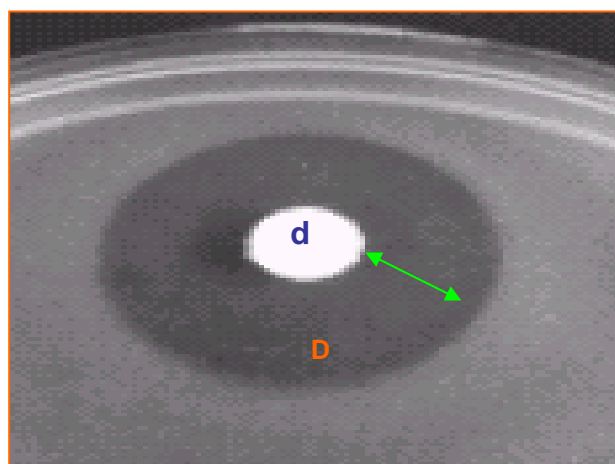


FIGURA 5. Medición de halos de inhibición

VII. RESULTADOS

VII.1 METABOLITOS EXTRACELULARES

Con el propósito de obtener y detectar los metabolitos extracelulares, se colocaron bloques de agar con micelio sobre placas de sílica como se indica en el punto VI.3.2 (a). Al colocar los inóculos de LAC26 en la placa, la sílica se desprendió de la base de vidrio; aún así se corrió la cromatografía y al observar con la lámpara de luz UV a diferentes longitudes de onda, solo se visualizó la banda de griseofulvina (control) y una mancha de fluorescencia en los sitios en donde se colocaron los inóculos, alrededor del desprendimiento de la sílica (Fig. 6). Debido a estos problemas metodológicos se decidió no obtener los metabolitos extracelulares de LAC891 y KMO3.

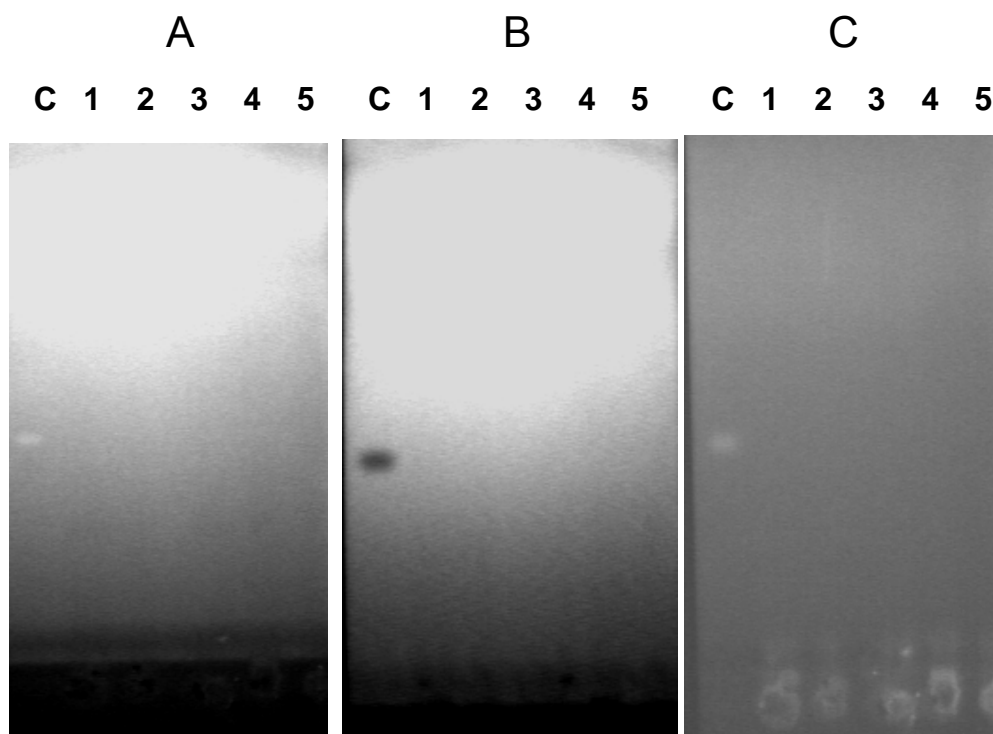


FIGURA 6. Cromatografía en capa fina de metabolitos extracelulares de Lac26 crecido a 37°C

Las placas fueron visualizadas a: A, 254nm, B, 302 nm y C, 365 nm. Carriles: C, control, 1 a 5, inóculos.

VII.2 EFECTO DE LOS METABOLITOS INTRACELULARES DE *Lactarius sp.*

VII.2.1 Extractos orgánicos

A. Efecto de los solventes sobre el crecimiento de bacterias patógenas

Para saber si los solventes que utilizamos en la extracción orgánica causaban por si solos un efecto de inhibición de crecimiento sobre las cepas probadas, se utilizaron diferentes volúmenes de cada solvente con cada una de las bacterias; y se observó que el hexano no causó inhibición del crecimiento, sin embargo al aumentar el volumen del acetato de etilo, aumentó el halo de inhibición excepto para la cepa *S. aureus*; Un aumento del volumen de metanol incrementó el halo de inhibición en todas las cepas estudiadas, (Tabla 3). En medio sólido, se observan los mismos efectos (Fig. 7).

TABLA 3. Halos de inhibición (mm) del crecimiento en bacterias por los solventes Hexano, Acetato de Etilo y Metanol.

BACTERIA	HEXANO		AE			METANOL	
	10µL	30µL	10µL	30µL	50µL	10µl	30µL
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0.5±0.0	0.5±0.0	1±0.0	1±1.4	1.75±0.70
<i>E. clocae</i>	0	0	1±0.0	1.5±1.4	2.25±0.7	1±1.4	1.5±0.0
<i>Salmonella sp.</i>	0	0	0.5±0	1±0.0	0.75±0.7	0.75±0.7	1.5±1.4
<i>S. aureus</i>	0	0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0.5±0.0	1.5±0.0
EIEC	0	0	0.5±1.4	0.5±0.0	1.75±2.1	1.5±0.0	2.5±0.0
EPEC	0	0	0.5±0.0	0.5±0.0	1.5±1.4	1±1.4	1.75±0.7
ETEC-ST	0	0	4.75±0.7	0.75±0.7	1±0.0	0.75±0.7	1.25±2.1
ETEC-LT	0	0	0.5±0.0	0.75±0.0	1.62±0.0	1.25±0.0	2.5±0.0

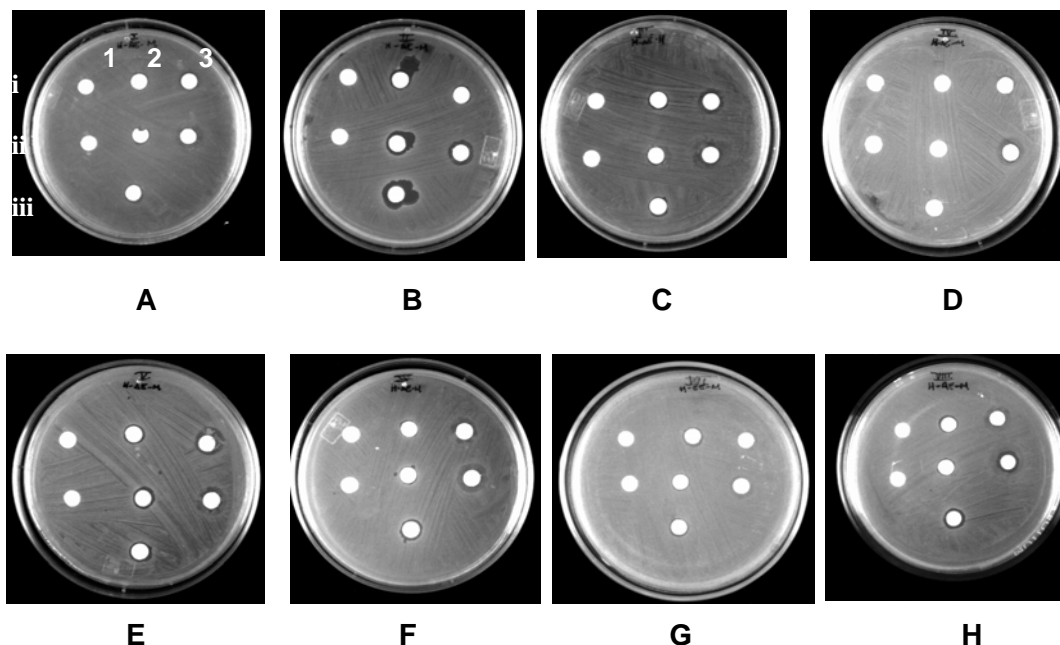


Fig. 7. Efecto del solvente de extracción sobre el crecimiento de las bacterias
Carriles: 1, Hexano; 2, acetato de etilo, 3, metanol. Filas: i, 10 µL; ii, 30 µL y iii, 50 µL. Páneles: A, *P. aeruginosa*; B, *E. cloacae* C, *Salmonella* sp; D, *S. aureus* ; E, EIEC; F, EPEC; G, ETEC-ST; H, ETEC-LT.

B. Efecto de los extractos orgánicos del basidiocarpo de *Lactarius indigo* sobre el crecimiento de bacterias

Las cepas de *E. cloacae*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, EIEC, EPEC y ETEC-ST no presentaron inhibición de crecimiento con los extractos de hexano a los tres volúmenes probados. Sin embargo, *P. aeruginosa* sí presentó un halo de inhibición con los tres volúmenes, 0.625 ± 0.17 mm con 10µL, 0.75 ± 1.06 mm con 20µL y 0.75 ± 0.35 mm con 30µL, pero la inhibición fue mayor para la cepa ETEC-LT, 3.25 ± 1.06 mm con 10µL; 3.37 ± 0.88 mm con 20µL y 4.12 ± 0.17 mm con 30µL sugiriendo una relación de dosis respuesta (Tabla 4; Fig. 8).

TABLA 4. Halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias utilizando

extractos con solventes orgánicos del basidiocarpo de *Lactarius indigo*.

BACTERIA	EXTRACCIONES ORGÁNICAS (vol)								
	Hexano			AE			Metanol		
	10µL	20µL	30µL	10µL	20µL	30µL	10µL	20µL	30µL
<i>P. aeruginosa</i>	0.62±0.17	0.75±1.06	0.75±0.35	0.37±0.17	1.63±1.58	3±3.182	1.25	1.68±0.09	0.87±1.06
<i>E. clocae</i>	0	0	0	0.25±0.35	0.68±0.26	1.25±0.00	0±0.00	1.5±0.00	2.87±1.23
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	0	0.43±0	1±0.00	0.75±0.00	2±0.00	1.6±1.41	1.25±0.70
<i>S. aureus</i>	0	0	0	1±0.00	1.375±0.53	1.375±	0.5±0.35	1.575±0.41	2.12±0.17
EIEC	0	0	0	0.5±0.35	1.5±1.06	3.25±0.70	0.5±0.70	1.5±0.35	2.62±0.17
EPEC	0	0	0	0.25±0.35	1.25±0.00	2.125±0.88	0.87±0.53	0.87±0.35	1.37±0.35
ETEC-ST	0	0	0	0±0.00	0.18±0.26	2.62±1.41	0.62±0.70	1.74±0.88	1.98±0.87
ETEC-LT	3.25±1.06	3.37±0.88	4.12±0.17	0.68±0.44	0.87±0.17	1.12±0.00	0.74±0.53	1.5±0.35	1.12±1.59

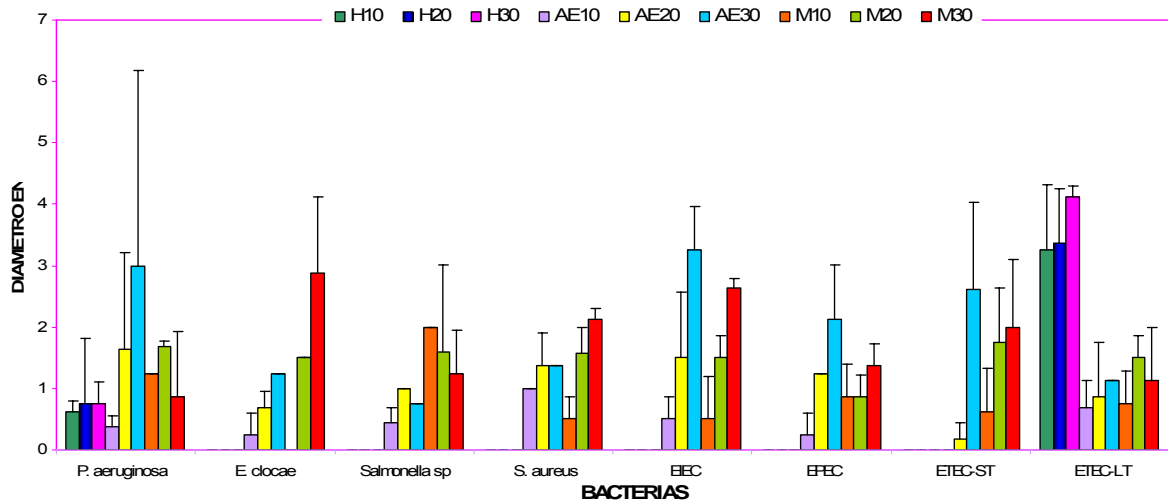


FIGURA 8. Inhibición del crecimiento de bacterias con extractos orgánicos del basidiocarpo de *Lactarius indigo*. H (hexano) AE (acetato de Etilo) y M (metanol).

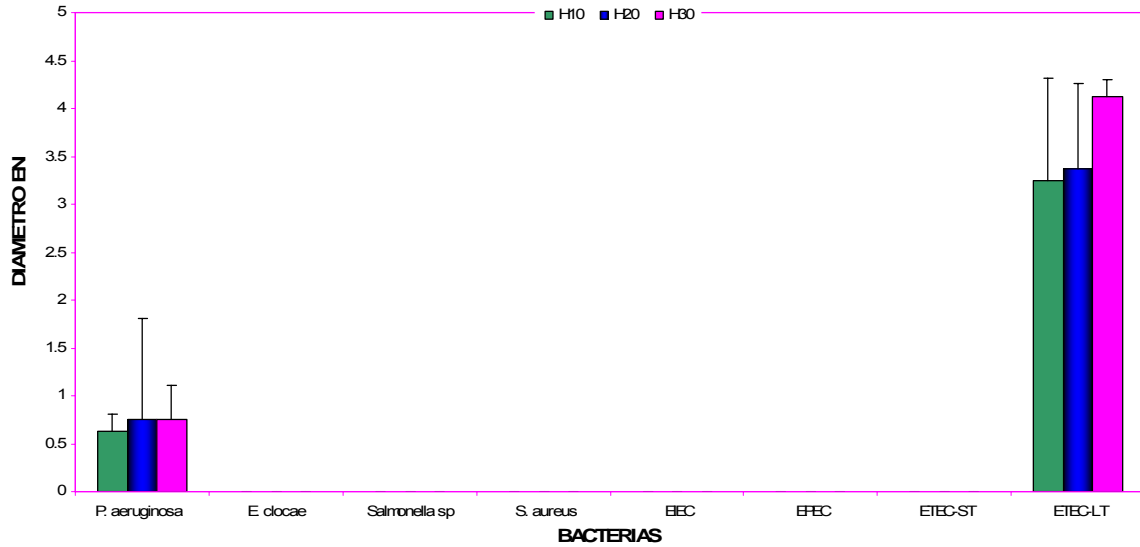


FIGURA 9. Inhibición de crecimiento de bacterias con extracto del basidiocarpo de *Lactarius indigo* a partir de hexano.

Al realizar la determinación de inhibición del crecimiento con el extracto a base de Acetato de Etilo, se observó que todas las cepas presentaban un halo de inhibición, además, al aumentar el volumen del extracto aumentó el halo de inhibición. Para el volumen de 10µL la cepa más resistente fue ETEC-ST puesto que no mostró halo de inhibición y la más sensible fue *S. aureus* con un halo de inhibición de 1mm. Para el volumen de 20µL, ETEC-ST fue la cepa más resistente con un halo de 0.18±0.26 mm y *P. aeruginosa* fue la mas sensible con un halo de 1.63±1.58 mm. Con un volumen de 30µL la cepas mas resistente fue *Salmonella sp.* con un halo de 0.75±0.00 mm y la más sensible fue EIEC con halo de 3.25±0.70 mm (Fig. 10).

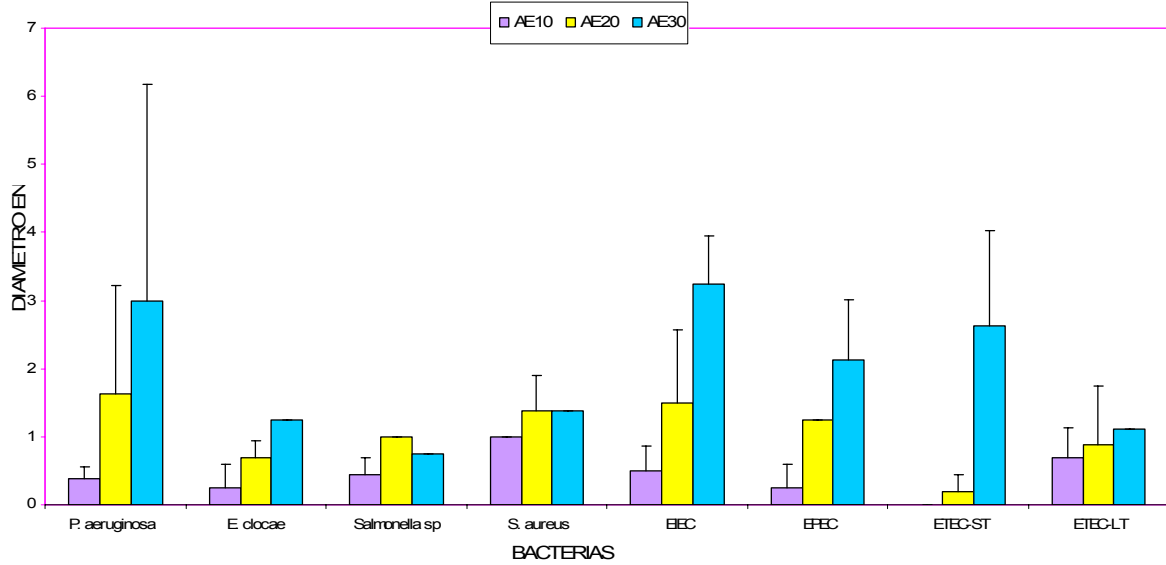


FIGURA 10. Inhibición de crecimiento de bacterias utilizando el extracto de basidiocarp de *Lactarius indigo* con AE.

Con el extracto metanólico, se observó un aumento en el halo de inhibición de crecimiento bacteriano conforme aumentó el volumen del extracto, sin embargo, difiere para cada una de las bacterias. Para el volumen de 10 μ L la cepa mas resistente fue *E. clocae* que no presentó halo de inhibición y la mas sensible a este volumen fue *Salmonella* sp; para 20 μ L la más resistente fue EPEC con 0.87 ± 0.35 mm y ETEC-ST fue la mas sensible con 1.74 ± 0.88 mm. Para el volumen de 30 μ L, *P. aeruginosa* fue la mas resistente y *E. clocae* la mas sensible (Figs. 11, 12 y 13).

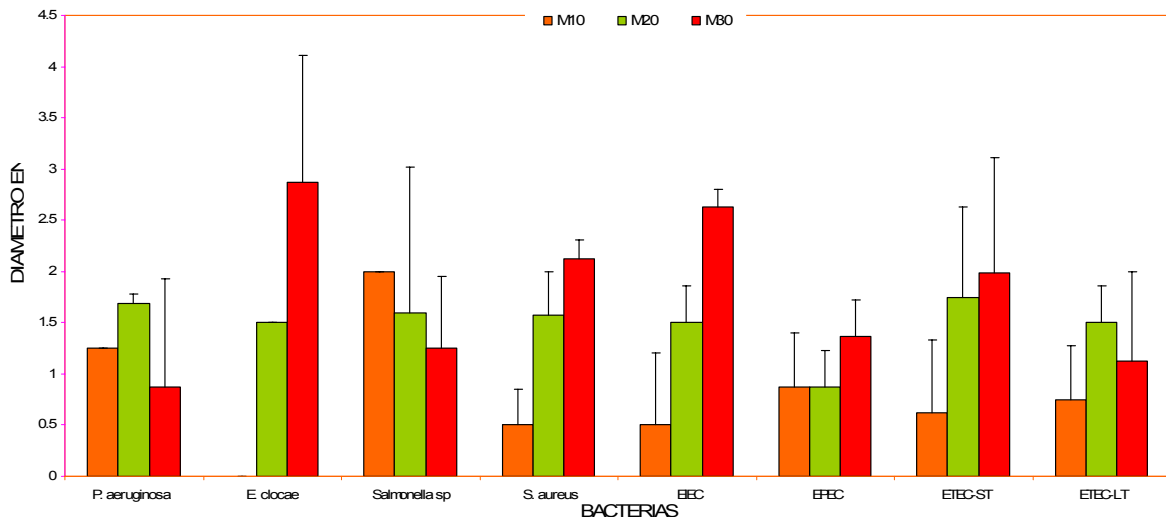


FIGURA 11. Inhibición de crecimiento de bacterias con extracto metanólico de basidiocarp de *Lactarius indigo*.

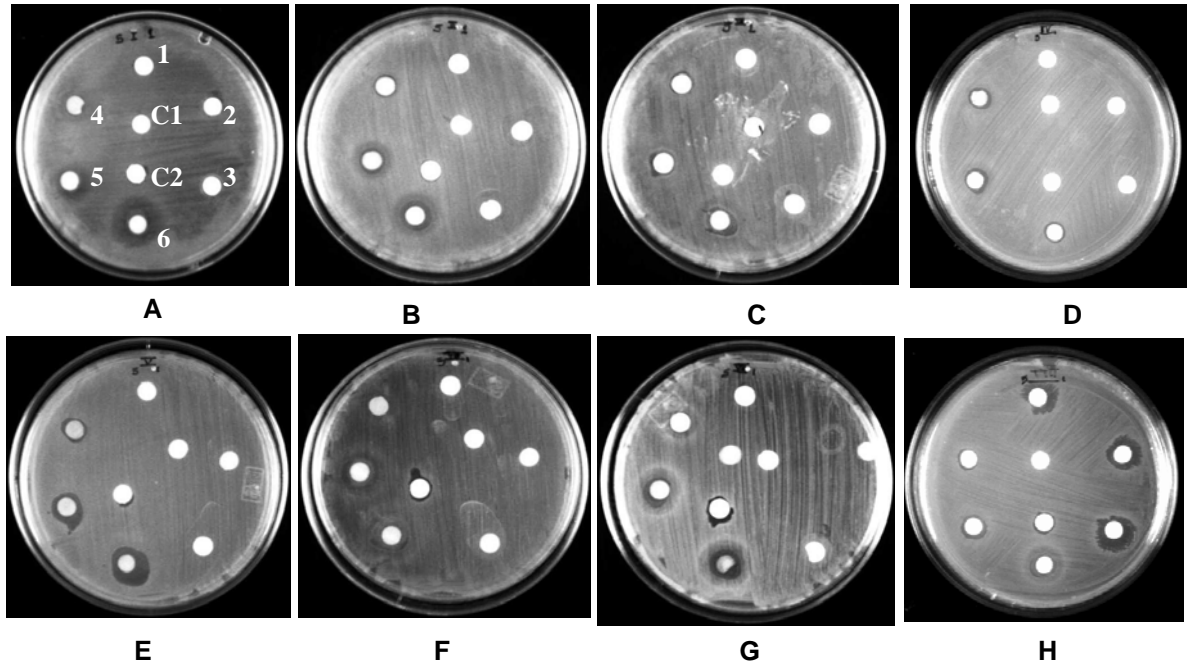


FIGURA 12. Efecto del extracto orgánico de basidiocarpio de *Lactarius indigo* sobre el crecimiento de bacterias patógenas.

Filas: C1, control hexano; C2, Control AE. Filtros 1 (10 μ L), 2 (20 μ L) y 3 (30 μ L) de extracto obtenido con hexano. Filtros 4 (10 μ L), 5 (20 μ L) y 6 (30 μ L) de extracto obtenido con AE. Páneos: A, *P. aeruginosa*; B, *E. clocae*; C, *Salmonella* sp; D, *S. aureus* ; E, EIEC; F, EPEC; G, ETEC-ST; H, ETEC-LT.

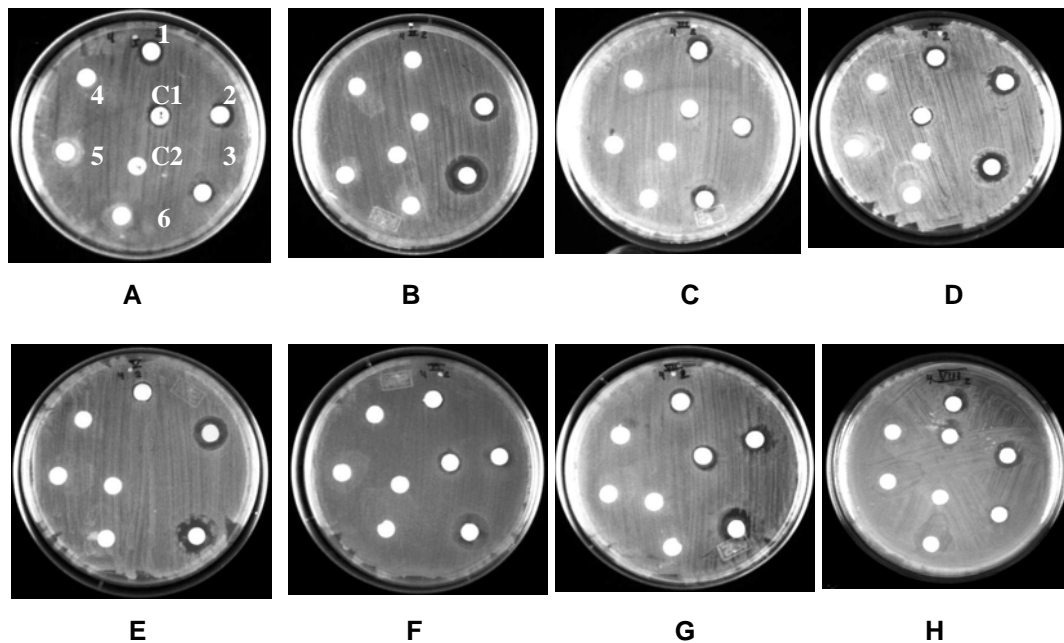


FIGURA 13. Efecto del extracto orgánico del basidiocarpio de *Lactarius indigo*/micelio LAC891.

Filas: C1, control metanol, C2, Control hexano. Filtros 1 (10 μ L), 2 (20 μ L) y 3 (30 μ L) de extracto de basidiocarpio obtenido con metanol. Filtros 4 (10 μ L) 5 (20 μ L) y 6 (30 μ L) de extracto del micelio LAC891 obtenido con hexanol. Páneos: A, *P. aeruginosa*; B, *E. clocae*; C, *Salmonella* sp.; D, *S. aureus* ; E, EIEC; F, EPEC; G, ETEC-ST; H, ETEC-LT.

C. Efecto de la extracción orgánica de micelio vegetativo LAC891 sobre bacterias patógenas.

Se determinó la inhibición de crecimiento de bacterias patógenas utilizando los diferentes extractos obtenidos del micelio LAC891 (Tabla 5). Al utilizar los extractos de micelio LAC891 con hexano, no se observó inhibición del crecimiento para ninguna de las cepas estudiadas (Fig. 13 y 14). Sin embargo, al utilizar el extracto con acetato de etilo, cada una de las cepas mostró inhibición del crecimiento, efecto que se incrementó conforme se aumentó el volumen del extracto. Así, a un volumen de 10µL la cepa *E. clocae* y ETEC-ST fueron las más resistentes puesto que no mostraron halo de inhibición, la cepa más sensible fue EPEC (1.5±0.35 mm). Para el volumen de 20µL la cepa ETEC-ST fue la más resistente pues no presentó halo de inhibición, pero EPEC fue la cepa más sensible (1.75±0.0 mm). Finalmente para 30µL, ETEC-LT fue la más resistente (1.12±0 mm) y la más sensible fue *S. aureus* (3.62 ± 0.88 mm) (Figs. 14 y 17).

TABLA 5. Halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos del micelio LAC891

BACTERIA	EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL MICELIO LAC891								
	Hexano (mm)			AE (mm)			Metanol (mm)		
	10µl	20µl	30µl	10µl	20µl	30µl	10µl	20µl	30µl
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0.75±0	1.37±0.53	2.37±0.17	1.75±2.47	3±4.24	0.62±0.88
<i>E. clocae</i>	0	0	0	0±0	1.25±0	1.68±0.26	0±0	1±1.41	2.06±0.62
<i>Salmonella</i> sp	0	0	0	0.5±0.7	1.12±0.17	1.87±0.17	1.12±0.35	1.99±0.53	2.18±0.79
<i>S. aureus</i>	0	0	0	1±0	1.12±0.53	3.62±0.88	0.5±0.35	1±0.7	0.93±0.44
EIEC	0	0	0	0.75±0	1±1.06	1.5±0.35	0.37±0.53	1.62±2.29	0.62±0.88
EPEC	0	0	0	1.5±0.35	1.75±0	1.37±0.53	1.75±0.35	2.37±1.23	2.12±0
ETEC-ST	0	0	0	0±0	0±0	2.37±0.35	0.93±0.44	1.74±0.17	2.12±0.35
ETEC-LT	0	0	0	0.75±0	1.5±1.06	1.12±0	1.68±2.38	2.24±0.17	1.87±0.53

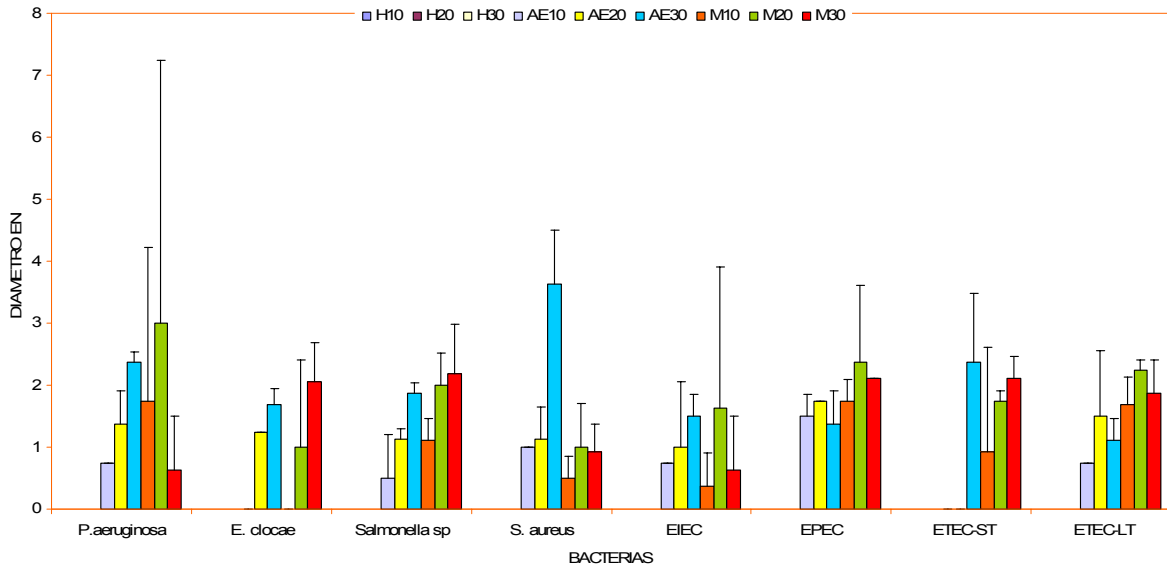


FIGURA 14. Inhibición de crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos de micelio LAC891.

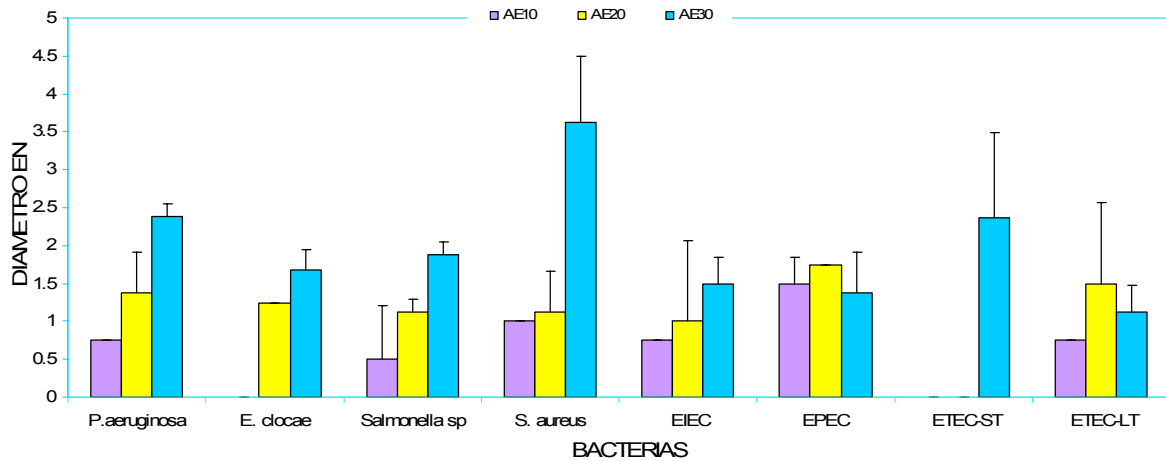


FIGURA 15. Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas con extracto de AE del micelio LAC8911.

Al utilizar el metanol como solvente de extracción, las cepas *E. cloacae*, *Salmonella sp.*, *S.aureus* y ETEC-ST mostraron un comportamiento de inhibición creciente conforme se aumentó el volumen del extracto y las cepas *P. aeruginosa*, EIEC y EPEC y ETEC-LT aumentaron su inhibición al pasar de 10 μ L a 20 μ L de extracto, pero la inhibición disminuyó en el volumen 30 μ L (fig.8). La cepa que no presentó halo de inhibición al volumen 10 μ L fue *E. cloacae* y las más sensibles fueron *P. aeruginosa* (1.75 ± 2.47 mm) y EPEC (1.75 ± 0.35 mm). Para el volumen de 20 μ L las cepas más resistentes fueron *E. cloacae* (1 ± 1.41 mm) y *S. aureus* (1 ± 0.7 mm), mientras que *P. aeruginosa* fue la

mas sensible (3 ± 4.24 mm). Finalmente para el volumen de $30\mu\text{L}$ *P. aeruginosa* (0.62 ± 0.88 mm) y *EIEC* (0.62 ± 0.88 mm) fueron las cepas mas resistentes y *ETEC-ST* (2.12 ± 0.35 mm) fue la mas sensible (Fig. 16).

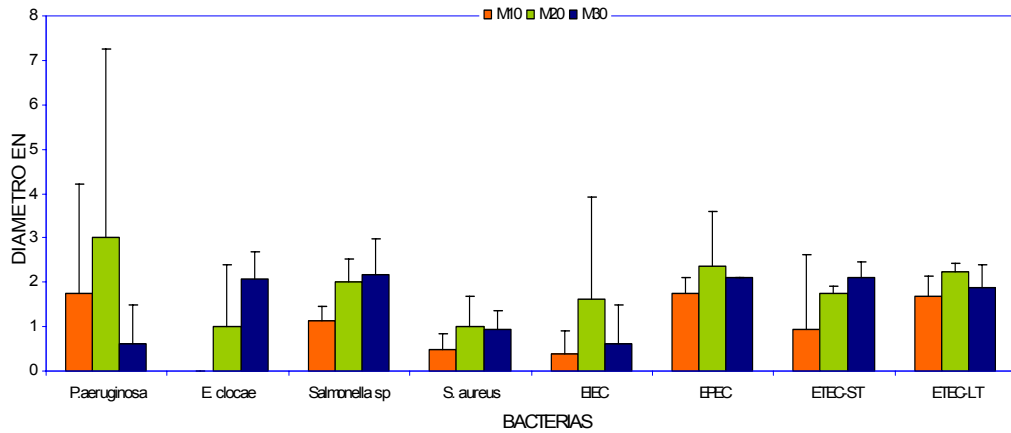


FIGURA16. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto metanólico del micelio LAC891.

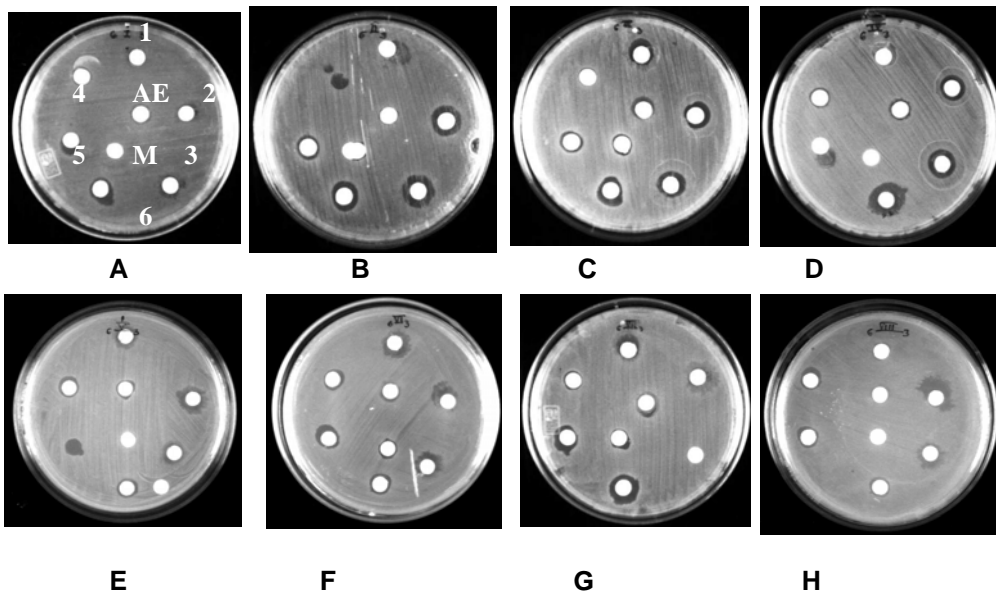


FIGURA 17. Efecto de los extractos con AE y metanol del micelio de LAC891.
M, control metanol, AE, Control acetato de etilo. Filtros: 1 ($10\ \mu\text{L}$), 2 ($20\ \mu\text{L}$) y 3 ($30\ \mu\text{L}$) extracto con Acetato de Etilo. Filtros 4 ($10\ \mu\text{L}$) 5 ($20\ \mu\text{L}$) y 6 ($30\ \mu\text{L}$) extracto con metanol. Páneles: A, *P. aeruginosa*; B, *E. cloacae* C, *Salmonella* sp; D, *S. aureus* ; E, *EIEC*; F, *EPEC*; G, *EIEC-ST*; H, *EIEC-LT*.

D. Efecto del extracto orgánico de micelio vegetativo KM03 sobre bacterias patógenas.

Para determinar el efecto de los extractos obtenidos del micelio vegetativo de KM03, se obtuvo el diámetro del halo de inhibición en mm (Tabla 6, fig. 18).

TABLA 6. Halos de inhibición (mm) del crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos del micelio vegetativo KM03.

BACTERIA	EXTRACTOS ORGANICOS DEL MICELIO KM03								
	HEXANO (mm)			AE (mm)			METANOL (mm)		
	10µl	20µl	30µl	10µl	20µl	30µl	10µl	20µl	30µl
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0.25±0.0	0.25±0.00	0.62±0.53	1±0.70	0.56±0.08
<i>E. clocae</i>	0.5±0.7	0.5±0.70	0.5±0.70	0±0.00	0.25±0.35	0.125±0.17	0.75±0.35	1.5±0.00	1.25±0.00
<i>Salmonella</i> sp.	0.75±0.70	1.37±0.17	2.37±0.17	1.25±0.35	2±0.35	2.31±0.62	1.13±0.72	1.26±0.55	1.02±0.32
<i>S. aureus</i>	1.87±0.53	2.25±0.35	2.25±0.35	0.5±0.70	0.75±0.35	1±0.00	0.26±0.02	0.25±0.00	0.25±0.00
EIEC	0.5±0.00	0	0	0.75±0.00	1±0.35	0	0.62±0.88	0.5±0.35	0.12±0.17
EPEC	0	0	0	0.5±0.35	0.75±0.00	0.75±0.00	0.75±0.35	0.75±1.06	1.24±0.17
ETEC-ST	0	0	0	0	0	1.12±0.00	0.62±0.00	0.37±0.35	0.43±0.61
ETEC-LT	0	0	0	0.62±0.88	0.62±0.88	0.18±0.35	0	0.18±0.26	0.12±0.17

El extracto obtenido con hexano no causó halo de inhibición en las cepas *P. aeruginosa*, EPEC, ETEC-ST y ETEC-LT a ninguno de los tres volúmenes trabajados. Sin embargo, el efecto sobre *Salmonella* sp indica que existe un crecimiento de diámetro gradual conforme aumenta el volumen del extracto. Para *E. clocae* el efecto fue el mismo en los tres volúmenes y en el caso de *S. aureus* no se observan diferencias entre el volumen 20 µL y el de 30 µL. Finalmente, EIEC solo presenta halo de inhibición al volumen 10 µL. Así mismo, la cepa que fue más sensible a los efectos del extracto los volúmenes de 10 µL y 20 µL fue *S. aureus*, presentando un halo de 1.87±0.53 mm y 2.25±0.35 mm respectivamente y finalmente para el volumen 30 µL el halo de inhibición de crecimiento fue de 2.37±0.17 mm (Fig. 19).

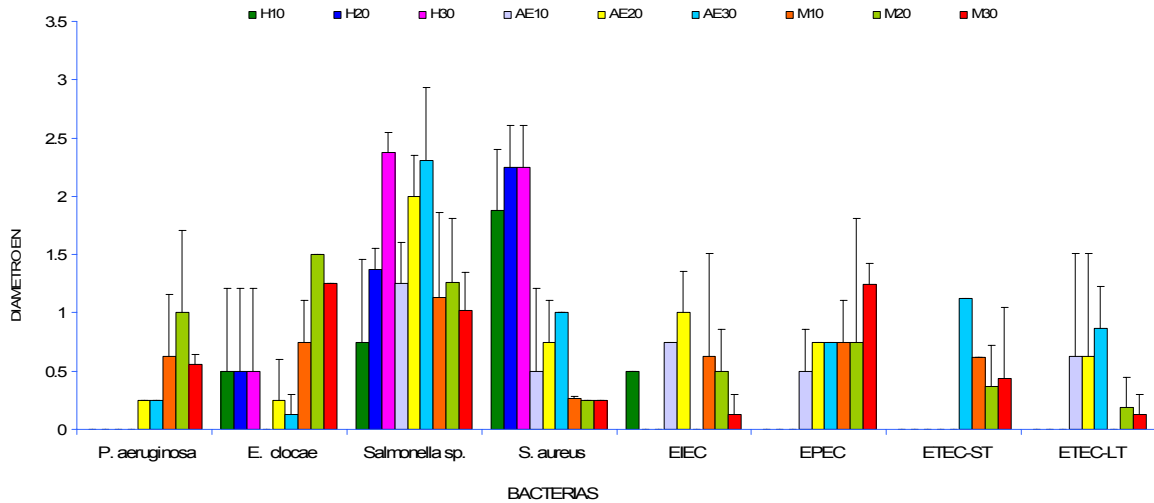


FIGURA 18. Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas con extractos orgánicos de micelio KM03.

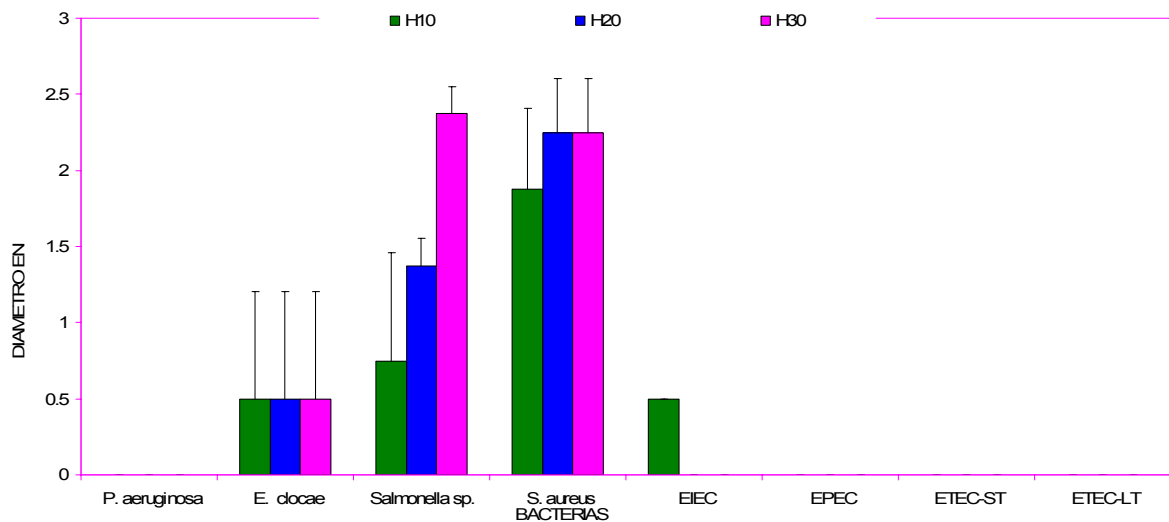


Figura 19. Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas con extracto del micelio KM03 con hexano.

La inhibición con el extracto a partir de AE en *Salmonella sp* y *S. aureus*, es sucesiva al aplicar los tres vol. del extracto; a diferencia de las cepas *P. aeruginosa* y EPEC, el halo de inhibición es constante en el vol.20µL-30 µL; sin embargo, *E. cloacae* disminuye el halo de inhibición al vol.30 µL. Por otra parte, en el volumen de 10 µL las cepas mas resistentes fueron *P. aeruginosa*, *E. cloacae* y ETEC-ST puesto que no presentaron halo de inhibición de crecimiento. Para el volumen de 20 µL ETEC-ST y para el volumen de 30µL EIEC no presentaron halo de inhibición de crecimiento. La

cepa de *Salmonella sp.* fue la mas sensible con 1.25 ± 0.35 mm, 2 ± 0.35 mm y 2.31 ± 0.62 mm para los volúmenes 10 μ L, 20 μ L y 30 μ L, respectivamente (Figs. 20 y 22).

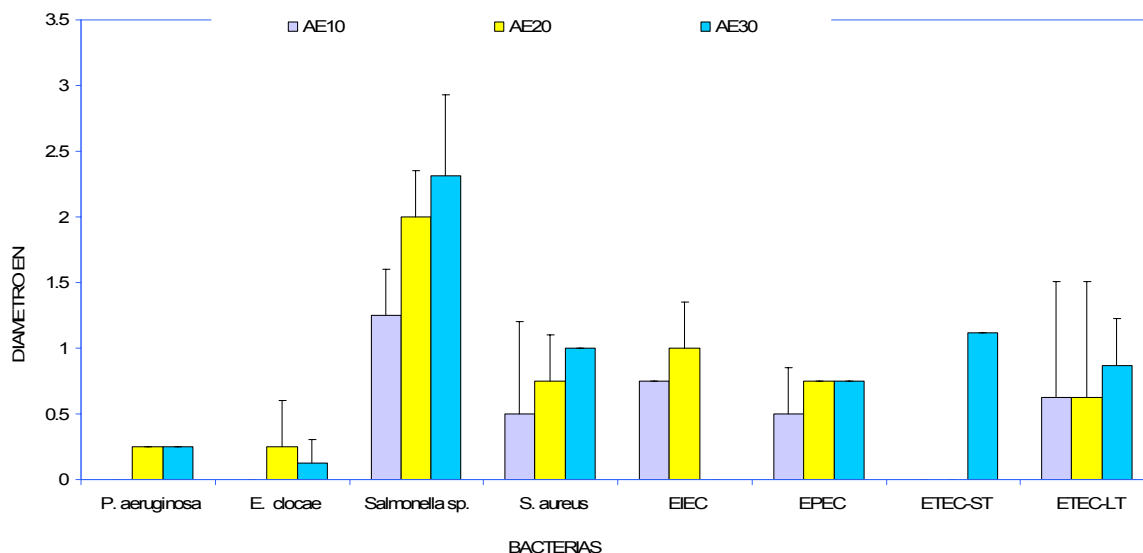


FIGURA 20. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto de micelio KM03 con AE.

Con el extracto metanólico de KM03, las cepas EPEC y ETEC-ST mostraron un aumento gradual del halo de inhibición conforme aumentó el volumen del extracto. Sin embargo para el resto de las cepas se observa una disminución en el diámetro del halo de inhibición al llegar al volumen de 30 μ L. Para el volumen de 10 μ L ETEC-LT no presentó halo de inhibición y la cepa mas sensible fue *Salmonella sp.* con 1.13 ± 0.72 mm. Para el volumen de 20 μ L ETEC-LT fue la más resistente con 0.18 ± 0.35 mm y para 30 μ L fue EIEC con un halo de 0.12 ± 0.17 mm. Para los volúmenes de 20 y 30 μ L la cepa mas sensible fue *E. clocae* (fig. 21 y 23).

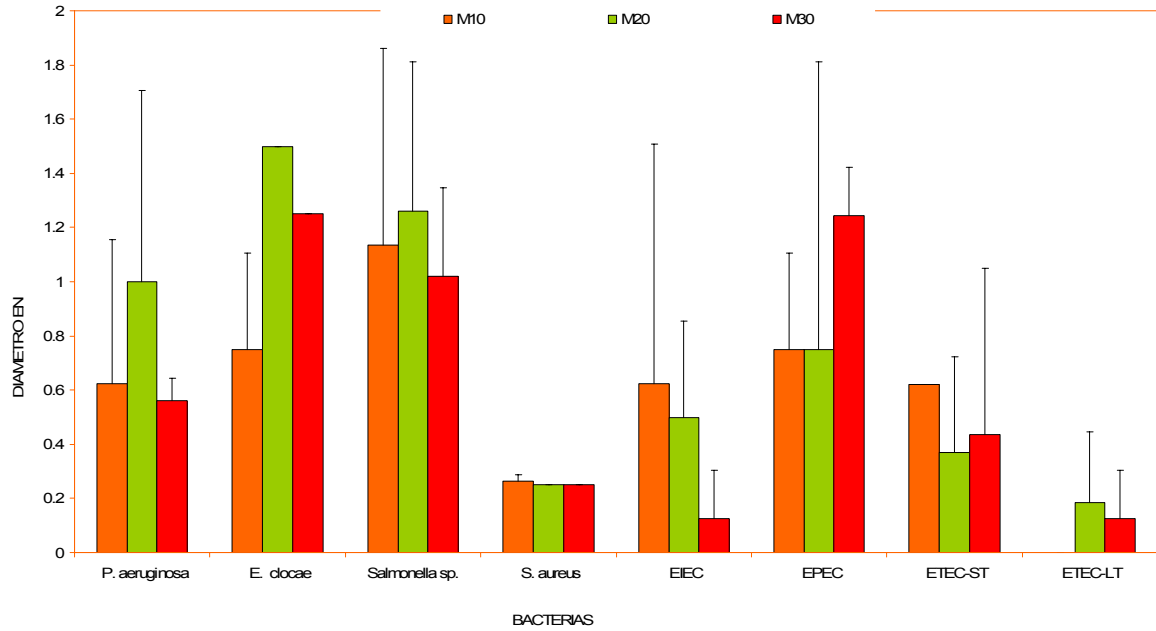


FIGURA 21. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto metanólico del micelio KM03.

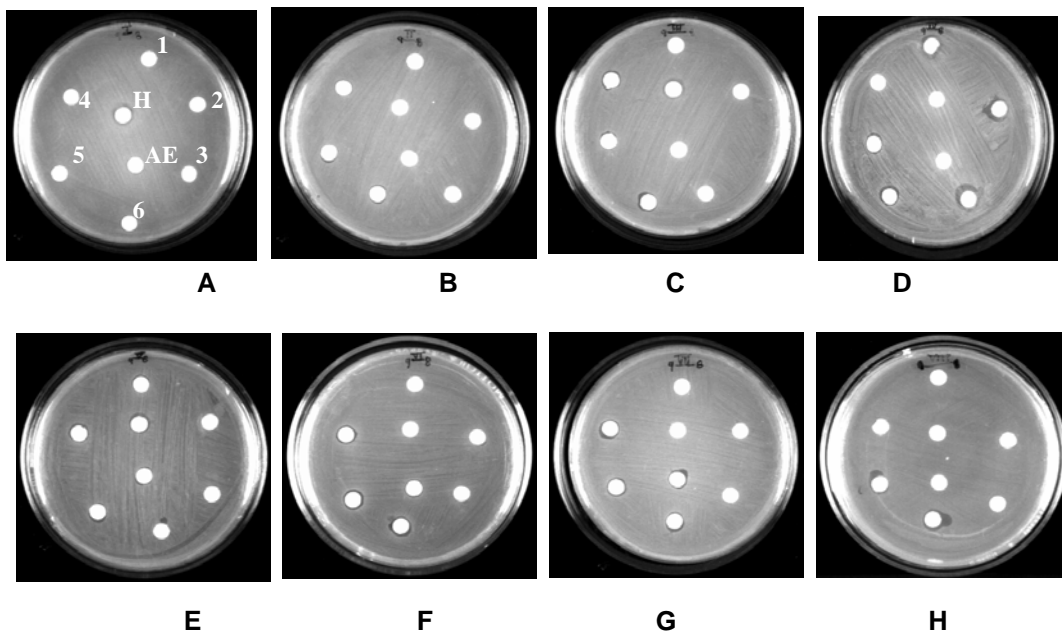


FIGURA 22. Efecto de los extractos con Hexano y Acetato de Etilo del micelio de KMO3. H, control hexano, AE, Control Acetato de Etilo, Filtros 1 (10 μ L) 2 (20 μ L) y 3 (30 μ L), extracto con Acetato de Etilo. Filtros 4 (10 μ L) 5 (20 μ L) y 6 (30 μ L), extracto con Metanol. Páneos: A, *P. aeruginosa*; B, *E. cloacae*; C, *Salmonella* sp.; D, *S. aureus*; E, EIEC; F, EPEC; G, ETEC-ST; H, ETEC-LT.

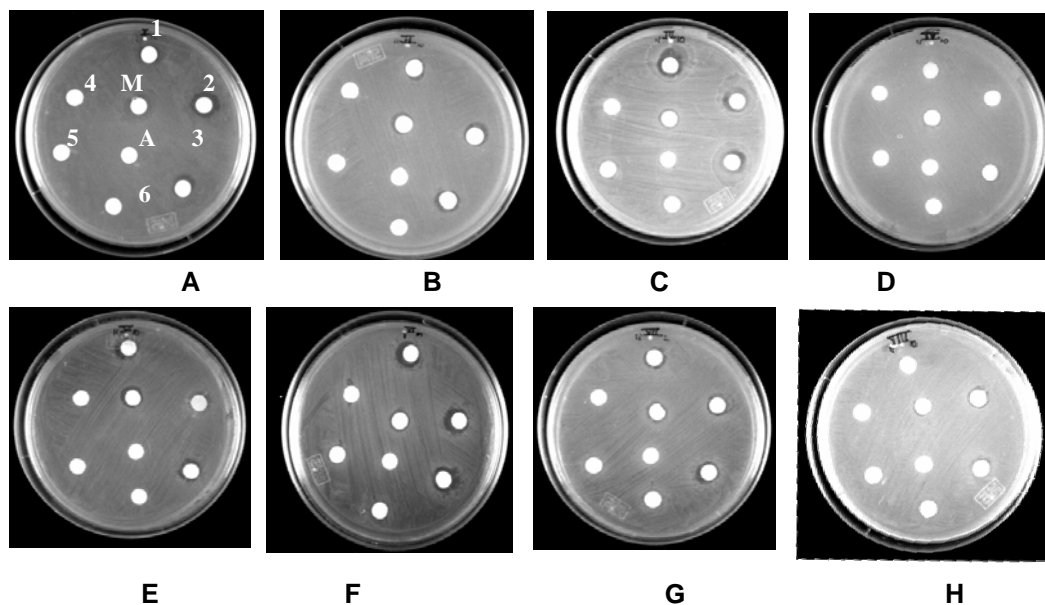


FIGURA 23. Efecto de extractos con metanol y acuoso del micelio de KM03 de *Lactarius sp.* M, control metanol, A, Control Agua dd. Filtros 1 (10 μ L) 2 (20 μ L) y 3 (30 μ L), extracto con Metanol. Filtros 4 (10 μ L), 5 (20 μ L) y 6 (30 μ), extracto acuoso. Páneos: A, *P. aeruginosa*; B, *E. cloacae* C, *Salmonella sp*; D, *S. aureus*; E, EIEC; F, EPEC; G, ETEC-ST; H, ETEC-LT.

VII.2.2 EXTRACTOS ACUOSOS

A. Efecto de extracto acuoso de LAC891 sobre el crecimiento de bacterias patógenas.

En relación a la extracción acuosa, se probaron volúmenes de 10 a 60 μ L, y se observó que *P. aeruginosa* presentó un halo de inhibición con 10 μ L el cual disminuyó en el volumen desde los 20 μ L (0.25 ± 0.35 mm), para volver a incrementar a los 50 μ L 0.5 ± 0.70 mm (Tabla7, Fig 23).

TABLA 7. Halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias patógenas con extracto acuoso del micelio LAC891.

BACTERIA	Extracto acuoso (vol)					
	10µL	20µL	30µL	40µL	50µL	60µL
<i>P. aeruginosa</i>	0.5±0.7	0.25±0.35	0.25±0.35	0	0.5±0.70	0
<i>E. clocae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0.25±0.35	0.25±0.35	0.37±0.53	0	0	0
EIEC	0	0	0	0	0	0
EPEC	0	0	0	0	0	1.75±2.47
ETEC-ST	0	0	0	0	0	0
ETEC-LT	0	0	0	0	0	0

De igual forma, *S. aureus*, muestra un el mismo diámetro de inhibición en los volúmenes de 10 y 20 µL (0.25±0.35 mm), incrementado ligeramente a los 30 µL (0.37 ± 0.53 mm), y desapareciendo a los volúmenes de 40, 50 y 60 µL. Para el resto de las cepas no se observa efecto de inhibición de crecimiento (Fig. 25).

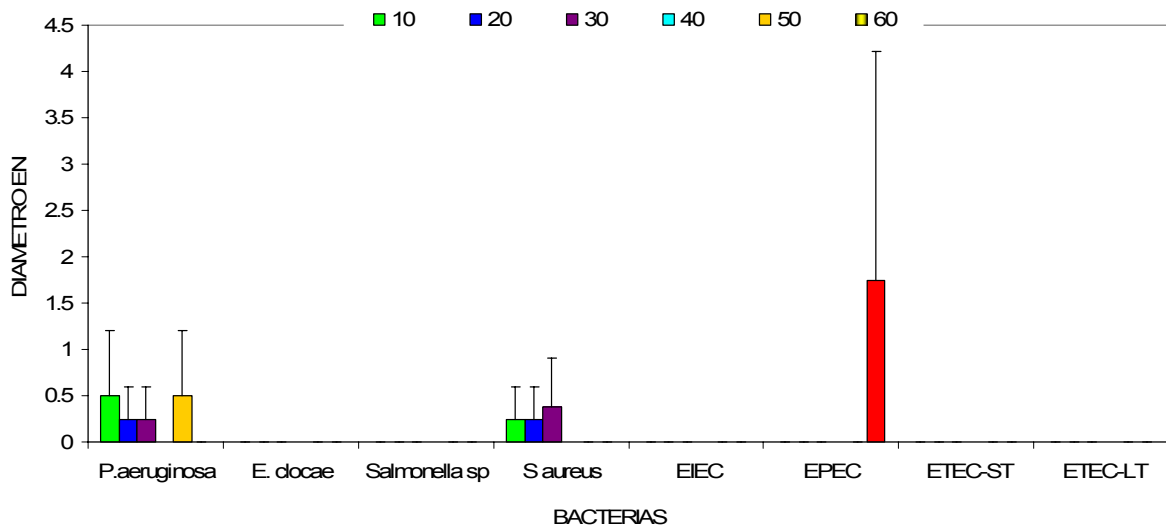


FIGURA 24 Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto acuoso de micelio LAC891

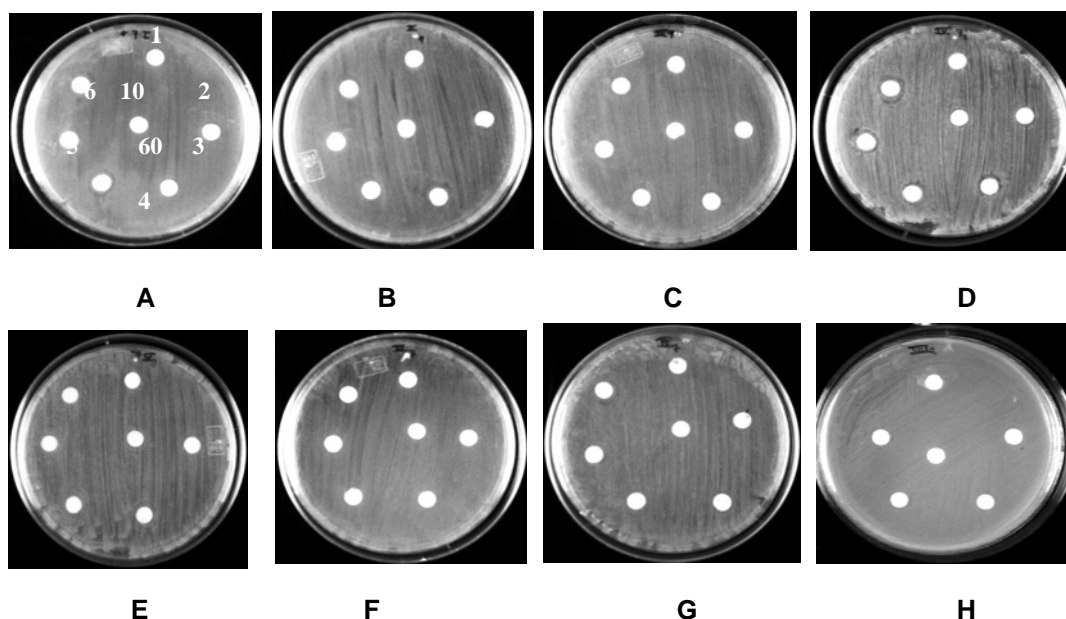


FIGURA 25. Efecto de extracto acuoso del micelio LAC891 de *Lactarius sp.*
Filtros 10 y 60 control de agua. Filtros 1 (10 μ L), 2 (20 μ L), 3 (30 μ L), 4 (40 μ L), 5 (50 μ L) y 6 (60 μ L), extractos acuosos. Páneles: A, *P. aeruginosa*; B, *E. cloacae* C, *Salmonella sp*; D, *S. aureus* ; E, EIEC; F, EPEC; G, ETEC-ST; H, ETEC-LT.

B. Efecto de extracto acuoso de micelio KM03 sobre el crecimiento de bacterias patógenas

Después de obtener el liofilizado del extracto acuoso, este se resuspendió en el mínimo volumen posible de agua y se probó directamente sobre las bacterias patógenas utilizando volúmenes 10, 20 y 30 μ L en los ensayos. Para *P. aeruginosa* el diámetro de halo de inhibición a 10 y 20 μ L es 0.5 ± 0.70 mm y para el volumen de 30 μ L es de 1 ± 1.41 mm. Así mismo, para *Salmonella sp* en los volúmenes de 20 y 30 μ L se observan halos de 0.25 ± 0.35 mm y 0.5 ± 0.70 mm, respectivamente. Sin embargo, el resto de las bacterias no muestran halo de inhibición (tabla 6), como se puede ver en los datos representados tanto gráficamente, como en medio sólido (Figs. 23 y 26).

TABLA 8. Medición de los halos de inhibición (mm) de crecimiento de bacterias patógenas utilizando extractos acuosos de micelio vegetativo KM03

Extracto acuoso del micelio KM03			
BACTERIA	10µl	20µl	30µl
<i>P. aeruginosa</i>	0.5±0.70	0.5±0.70	1±1.41
<i>E. clocae</i>	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp.	0	0.25±0.35	0.5±0.70
<i>S. aureus</i>	0	0	0
EIEC	0	0	0
EPEC	0	0	0
ETEC-ST	0	0	0
ETEC-LT	0	0	0

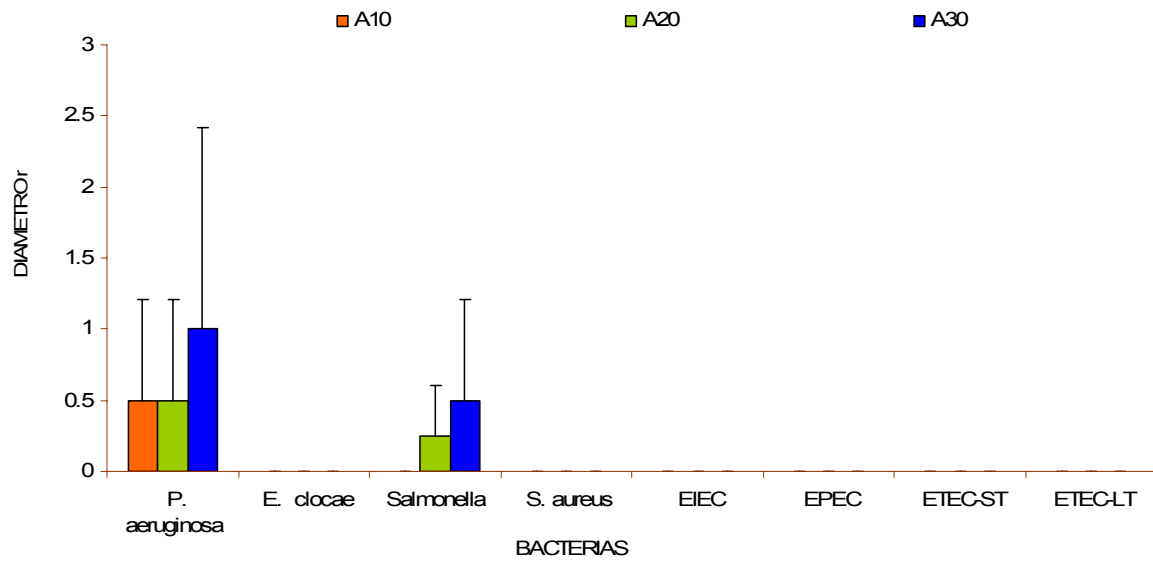


FIGURA 26. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con extracto acuoso del micelio KM03.

VII.3 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS

INTRACELULARES

Para separar los metabolitos de los extractos orgánicos y acuosos se realizaron cromatografías en capa fina. Se probaron dos fases móviles, la primera fue a base de Tolueno/ Acetato de Etilo/ Acido Fórmico, pero no se observo alguna banda, es por ello que se cambio la fase móvil con: Hexano/ AE; Primero se corrió la placa con los extractos orgánicos del basidiocarpo de *Lactarius indigo*. Se observo que los extractos con hexano y metanol no mostraron banda; sin embargo, el extracto con AE se observaron cuatro bandas las mismas, que se encuentran encimadas, sus Rf's fueron 0.35, 0.48, 0.62 y 0.71 y la λ de 365 nm (Fig. 27).

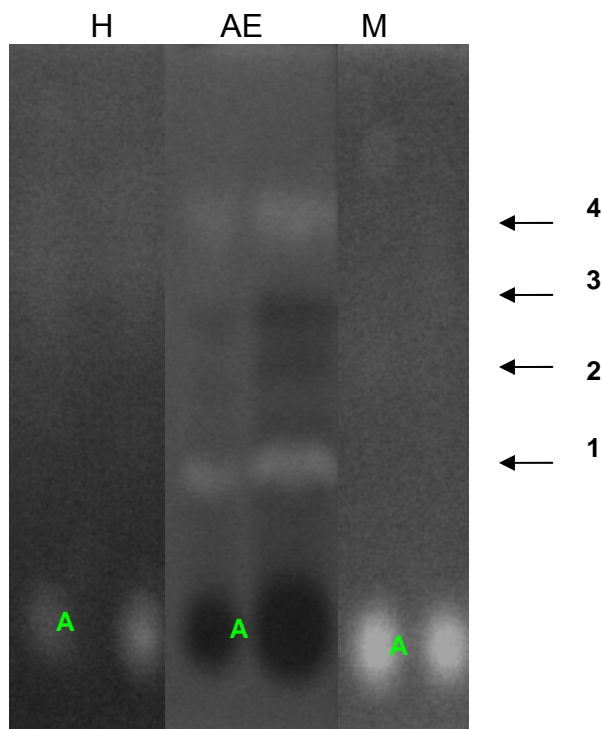


FIGURA 27. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de basidiocarpo *Lactarius indigo*. $\lambda=365\text{nm}$; A (punto de aplicación). Bandas: 1, Rf= 0.35; 2 Rf =0.48; 3, Rf =0.62 y 4 Rf =0.71.

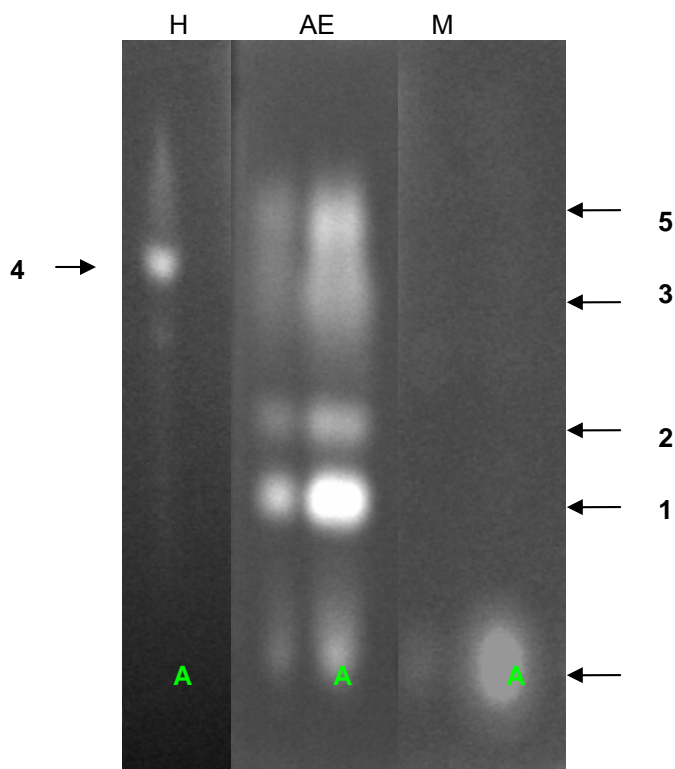


FIGURA 28. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de LAC891 tomadas λ 365nm, A (punto de aplicación). Bandas: 1, Rf 0.2; 2, Rf =0.25; 3, Rf =0.57; 4 Rf =0.62 y 5 Rf=0.82.

La fase móvil que se utilizó para los extractos de micelio de LAC891 fue Hexano/AE. En la extracción con hexano se observa una banda con un Rf de 0.62, mientras que en AE se observan 4 bandas perfectamente separadas con Rf's de 0.2, 0.25, 0.57 y 0.82 y en el extracto con metanol no se observó ninguna banda. Al observar esta placa de cromatografía se decidió trabajar con la banda del extracto directo de AE (Fig. 28).

Respecto a los extractos obtenidos a partir del micelio de KM03 de *Lactarius sp.* en la placa de cromatografía se observan dos bandas, la primera con un Rf de 0.33 y la segunda de 0.43. En los tres extractos se observa el mismo patrón de bandas, pero en el carril de AE estas son muy débiles. Para el caso de el extracto con hexano, la inhibición del crecimiento de bacterias solo se observó débilmente en algunas de las cepas, por lo que se decidió trabajar con una de las bandas a partir del extracto con metanol Fig.29.

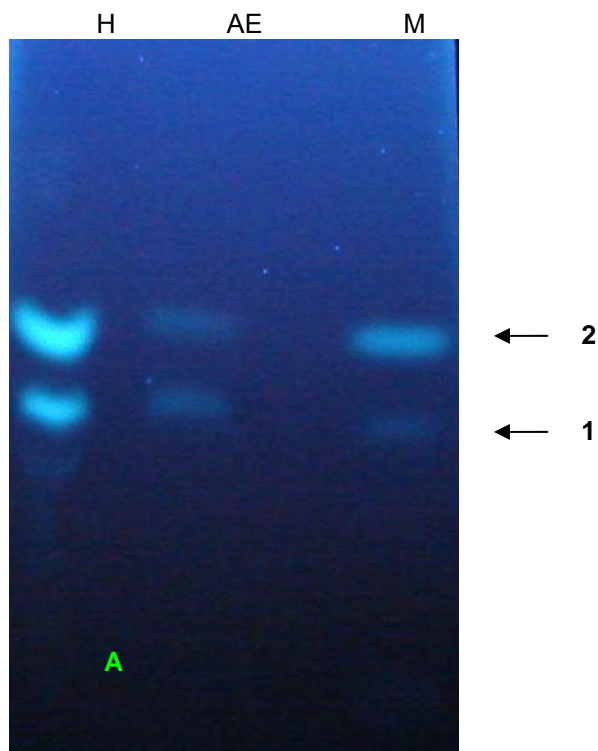


FIGURA 29. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de KM03.

$\lambda=365\text{nm}$, A punto de aplicación. Bandas: 1, Rf= 0.33 y 2, Rf= 0.43.

Finalmente, en las extracciones acuosas, se observó una débil inhibición de crecimiento para dos de las cepas trabajadas en ambos micelios. Se corrió placa de cromatografía en la cual se notó la presencia de una banda, con $R_f = 0.43$ en ambas extracciones (Fig. 30).

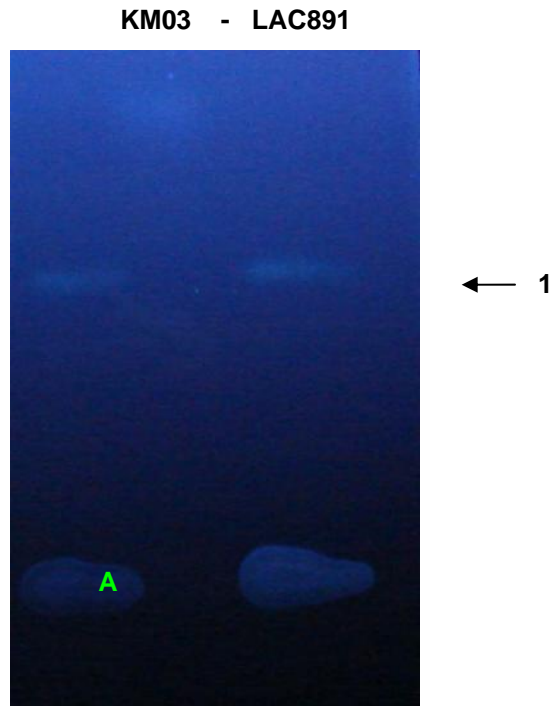


FIGURA 30. Cromatografía en capa fina de los extractos acuosos de KM03 y LAC891
 $\lambda = 365\text{nm}$. A, punto de aplicación. Bandas: 1, $R_f = 0.43$.

VII.4 PURIFICACION DE BANDAS

Después de los ensayos en los que se probaron directamente los extractos crudos sobre las bacterias y habiendo corrido las placas de cromatografía, se determinó purificar las bandas visualizadas para realizar ensayos de inhibición de crecimiento sobre las bacterias patógenas estudiadas.

A. Purificación de banda de basidiocarpo de *Lactarius indigo*

No se realizó puesto que al observar la cromatografía se encontraron bandas y manchas a la misma distancia, por lo que era necesario emplear otra fase móvil para lograr su completa separación.

B. Purificación de la banda del extracto de micelio LAC891 con AE

Para este extracto se decidió purificar la banda número 2 con un Rf de 0.25 puesto que fue una de las más intensas al momento de observarlas en las diferentes frecuencias de luz UV. Una vez purificada se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano a volúmenes de 10-50 μ L (tabla 9).

TABLA 9. Halo de inhibición (mm) de la banda purificada a partir del extracto con AE de micelio LAC891

BACTERIA	10 μ l	20 μ L	30 μ l	40 μ l	50 μ l
<i>P. aeruginosa</i>	0.75 \pm 0.00	0.75 \pm 0.00	0.62 \pm 0.88	0.87 \pm 0.17	1.5 \pm 0.00
<i>E. clocae</i>	0.25 \pm 0.35	0.75 \pm 0.35	0.62 \pm 0.17	0.5 \pm 0.35	0.87 \pm 1.23
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0
EIEC	0.75 \pm 0.00	0.62 \pm 0.53	0.75 \pm 0.00	1.25 \pm 0.35	1.68 \pm 1.32
EPEC	0.25 \pm 0.00	0.5 \pm 0.35	0.75 \pm 0.00	0.87 \pm 0.17	0.5 \pm 0.35
ETEC-ST	0	0	0.62 \pm 0.70	1.24 \pm 0.17	1 \pm 0.00
ETEC-LT	0.87 \pm 0.17	0.62 \pm 0.17	1.24 \pm 0.53	1.93 \pm 0.44	1.06 \pm 1.23

Los resultados obtenidos muestran un comportamiento diferente en cada una de las bacterias estudiadas. Para el caso concreto de *Salmonella* y *S. aureus* no se observó halo de inhibición a ninguno de los 5 volúmenes ensayados. Para *P. aeruginosa* se midieron halos de inhibición de 0.75 ± 0 , 0.62 ± 0.88 , 0.87 ± 0.17 y 1.5 ± 0.00 mm para volúmenes de 20, 30, 40 y 50 μ L, respectivamente. Para la cepa EIEC se encontraron halos de inhibición de 0.62 ± 0.53 , 0.75 ± 0.00 , 1.25 ± 0.35 y 1.68 ± 1.32 mm en volúmenes de 20 a 50 μ L correspondientemente. Para estas dos últimas cepas, el aumento de volumen del extracto purificado muestra un aumento del diámetro de inhibición de crecimiento. Para EPEC, ETEC-ST y ETEC-LT el diámetro de inhibición muestra en aumento conforme aumenta el volumen, pero al llegar a 50 μ L se presenta una reducción del diámetro de inhibición (figs. 31 y 32).

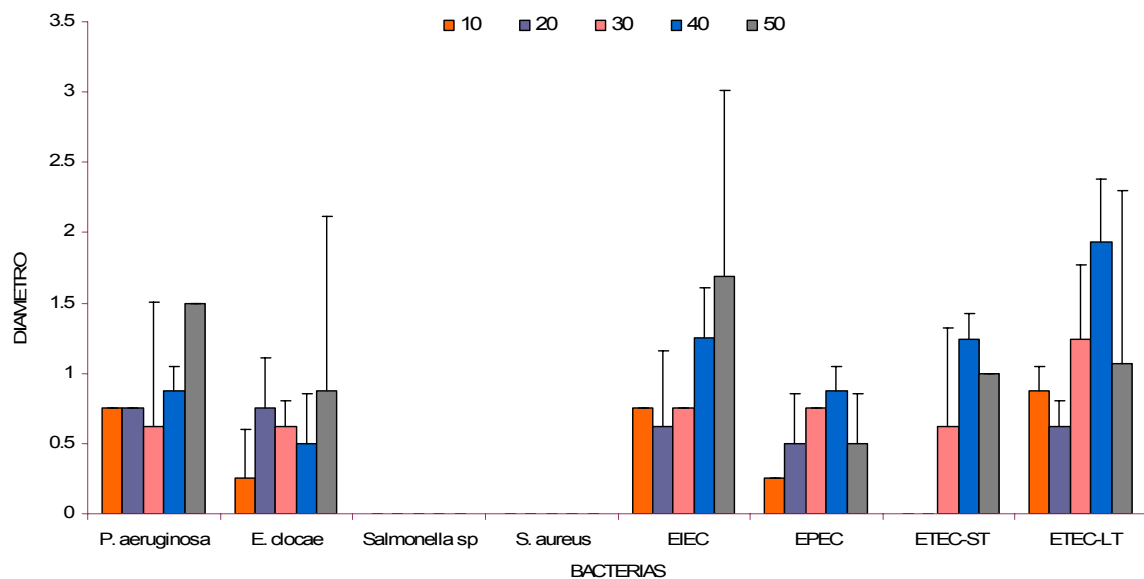


FIGURA 31. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con banda purificada de LAC891 con metanol.

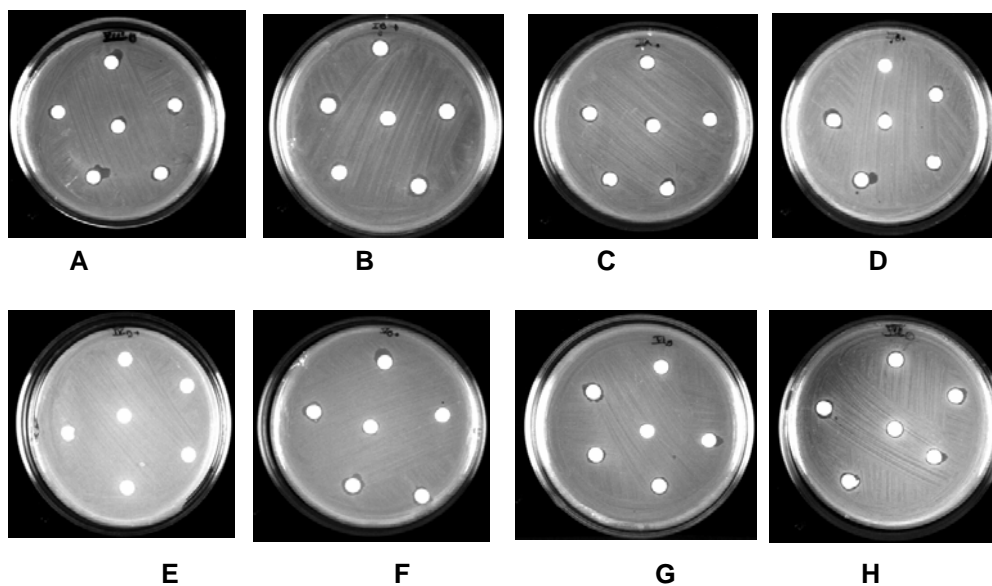


FIGURA 32. Efecto de banda purificada a partir de MICELIO LAC891 con AE sobre bacterias patógenas.

Filtros: 1 (10 μ L) 2 (20 μ L) y 3 (30 μ L), 4 (40 μ L), 5 (50 μ L) y 6 (60 μ L). Páneles: A, *P. Aeruginosa*; B, *E. clocae* C, *Salmonella* sp.; D, *S. aureus* ; E, EIEC; F, EPEC; G,ETEC-ST; H , ETEC-LT.

C. Purificación de la banda del extracto de micelio KM03 con Metanol

El diámetro de inhibición del crecimiento bacterias empleando de la banda II purificada de micelio KM03 se evaluó con 5 volúmenes diferentes, en esta ocasión en todas las bacterias se observó inhibición aunque el comportamiento es distinto entre ellas (Fig. 33 y tabla 10).

TABLA 10. Determinación de los halos de inhibición (mm) del crecimiento de bacterias patógenas utilizando la banda purificada de micelio KM03 con metanol.

Efecto de banda purificada obtenida del extracto con metanol de micelio KM03					
BACTERIA	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl
<i>P. aeruginosa</i>	1.75±1.06	2±1.41	2.62±0.00	1.62±0.00	1.62±0.00
<i>E. clocae</i>	1±0.00	1.75±0.35	1.5±0.35	1.37±0.17	0.75±0.00
<i>Salmonella</i> sp.	1.12±0.00	0.87±0.35	0.75±0.70	0.75±0.70	1.5±1.06
<i>S. aureus</i>	0.75±0.00	1.25±0.00	0.75±0.00	1±0.35	1.25±0.00
EIEC	1.25±0.00	1.75±0.70	1.75±0.00	1±1.06	1±0.35
EPEC	0.5±0.70	1.25±0.35	0.87±0.35	0.37±0.35	0.87±0.35
ETEC-ST	0.37±0.35	1.88±0.37	0.68±0.96	0.87±0.70	1.87±0.70
ETEC-LT	1.12±0.35	1.87±0.70	1.25±0.00	1±0.35	0.37±0.53

El mayor diámetro de inhibición se presenta en la bacteria *P. aeruginosa* alcanzando su máximo a un volumen de 30 µL (2.62±0.00 mm), para posteriormente reducir su diámetro de inhibición en 40-50µl a 1.62±0.00 mm. *Salmonella* sp. muestra el menor diámetro de inhibición de crecimiento, a concentraciones de 20, 30 y 40 µL con 0.87±0.35, 0.75±0.70 y 0.75±0.70 mm, respectivamente.

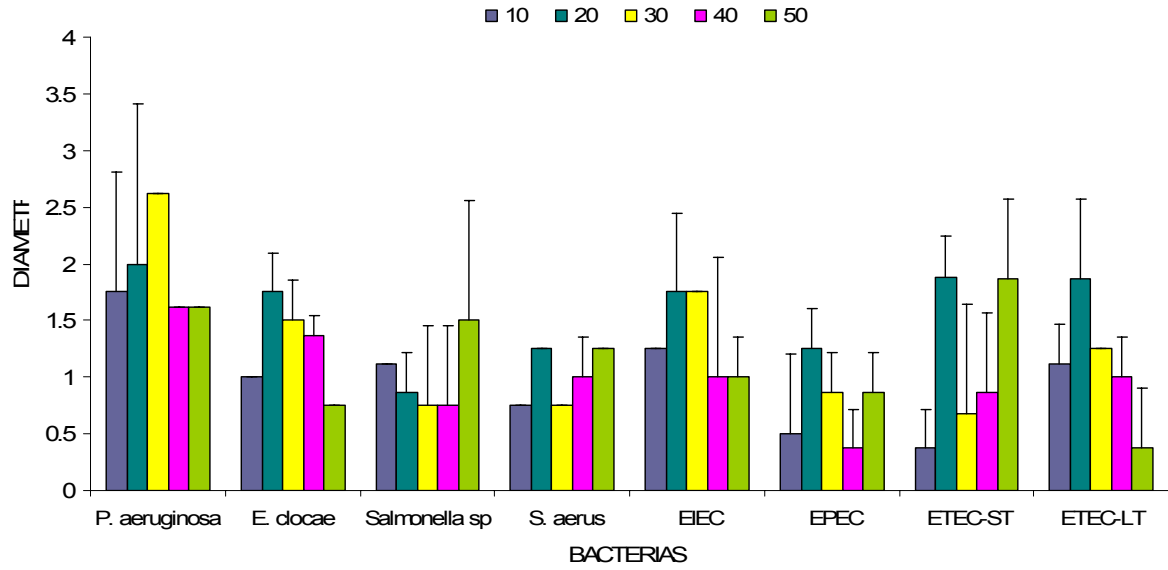


FIGURA 33. Inhibición de crecimiento en bacterias patógenas con banda purificada con metanol de micelio KM03 de *Lactarius* sp.

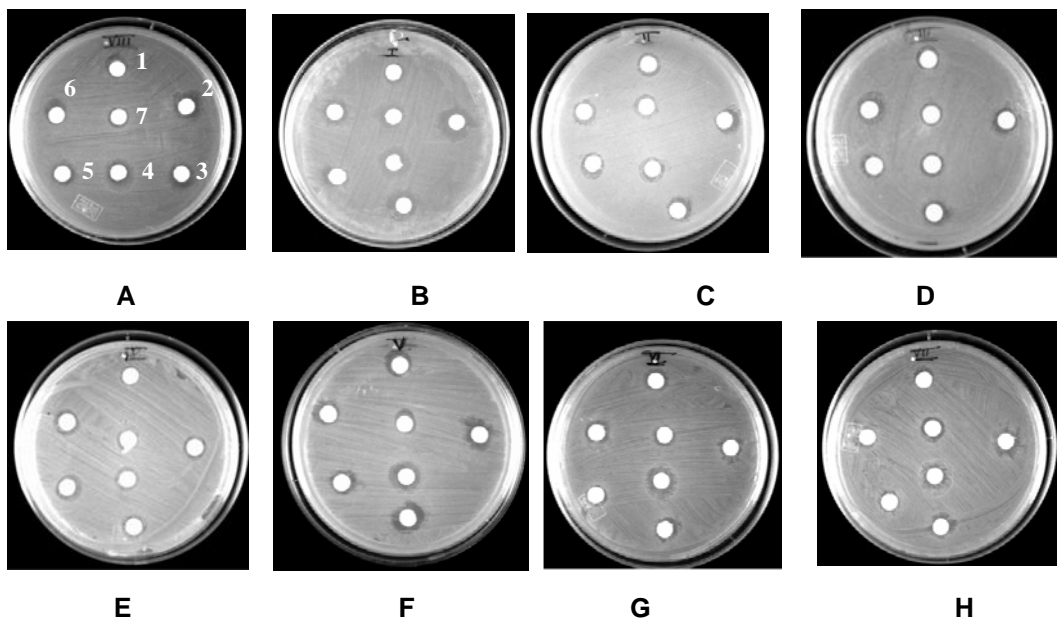


FIGURA 34. Efecto de banda purificada del extracto metanólico del micelio KMO3
Filtros: 7 control metanol; 1 (10 μ L), 2 (20 μ L), 3 (30 μ L), 4 (40 μ L), 5 (50 μ L) y 6 (60 μ L).
Páneos: A, *P. aeruginosa*; B, *E. cloacae* C, *Salmonella* sp.; D, *S. aureus* ; E, EIEC; F, EPEC;
G,ETEC-ST; H ETEC-LT.

VIII. DISCUSION

Los metabolitos secundarios de basidiomicetos son una fuente probada con actividad farmacológica. Se han realizado estudios en varias especies (Zjawiony J.K. 2004), entre ellas el género *Lactarius*, con el objeto de evaluar el potencial antibacteriano (Anke *et al.* 1989, Vidari *et al.*, 1995; Basaran *et al.*, 2002, Clericuzio *et al.*, 2002; Lin y Ji-Kai, 2002, y Krawczyk *et al.*, 2003). Todos estos trabajos han sido realizados con basidiocarpos sin embargo en el presente trabajo, nosotros no solo obtuvimos actividad antibacteriana de extractos con acetato de etilo y metanol de basidiocarpos de *Lactarius indigo* sino también de micelios aislados de estos basidiocarpos (Fig. 8, 14 y 18). La extracción con hexano del basidiocarpo de *L. indigo*, mostró inhibición para *P. aeruginosa* y ETEC-LT. Así mismo, el extracto del micelio KM03 inhibió el crecimiento de *E. clocae*, *Salmonella* sp, *S. aureus* y EIEC. Con estos resultados no solo se confirma que el género *Lactarius* presenta actividad antibacteriana, lo que coincide con lo reportado para *Lactarius deliciosus* (Suay *et al.*, 2000), aunque el procedimiento que ellos utilizaron para obtener su extracto metanólico fue diferente al nuestro, además se sugiere que dependiendo del método de extracción estamos obteniendo diferentes antibióticos con actividad dirigida hacia determinadas especies bacterianas. De igual forma se corroboran los resultados obtenidos con anterioridad con el aislado LAC891, de inhibición del crecimiento por medio de una confrontación directa hongo-bacteria en cepas diarreagénicas de *E. coli* (Jaimes, 2005).

Es importante mencionar que un aumento en el volumen de los extractos del micelio LAC891 con acetato de etilo, incrementaron el halo de inhibición de *P. aeruginosa*, *E. clocae*, *Salmonella* sp, *S. aureus*, EIEC, EPEC y ETEC-LT; el mismo comportamiento se observó para el extracto metanólico con *P. auroginosa*, *E. clocae*, *Salmonella*, *S. aureus* y EIEC. Sin embargo, el extracto con hexano no provocó inhibición de crecimiento de ninguna de las 8 bacterias estudiadas. El mismo comportamiento se observó con el extracto metanólico del micelio KM03 mientras que el extracto con hexano solo inhibió a *Salmonella* sp (Fig. 18).

El extracto metanólico del basidiocarpo de *Lactarius indigo* mostró mayor inhibición del crecimiento que el extracto de hexano y AE (Fig. 8).

El hexano y el metanol, por si solos inhibieron el crecimiento bacteriano,

de ciertas cepas (Tabla 3 y Fig. 7).

A diferencia del extracto orgánico, el extracto acuoso presento una débil inhibición de crecimiento de algunas bacterias patógenas, el extracto acuoso del micelio LAC891 mostró actividad contra *P. aeruginosa* (Tabla 7, Fig. 25 y 26). El extracto acuoso del micelio KM03, inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* (Tabla 8).

Los resultados de inhibición del crecimiento en las bacterias utilizadas en este trabajo, sugieren que existe diferencia en los metabolitos obtenidos, ya que los extractos orgánicos muestran mayor capacidad de inhibición que los extractos acuosos.

Con respecto a la cromatografía en capa fina, se realizó para ambos extractos intracelulares orgánicos y acuosos; con el propósito de separar los metabolitos, en un inicio se empleo como fase móvil a base de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico, pero los metabolitos no lograron separarse así, que cambiamos la fase móvil por hexano: acetato de etilo. Algunas de las bandas que encontramos coincidieron entre ellas, por ejemplo, la extracción orgánica con AE de basidiocarpo *L. indigo* coincidió con la del micelio LAC891 con un Rf 0.62. Así mismo, la extracción orgánica de KM03 con H, AE y M coincidió con la banda de la extracción acuosa de KM03 y LAC891 con un Rf. de 0.43.

No se trabajó con las bandas que se encontraron con los extractos orgánicos del basidiocarpo de *L. indigo* por que se observaron manchas y era necesario probar otra fase móvil. En contraste, se purificó la banda de Rf 0.25 el extracto de AE del micelio LAC891, ya que era la mas definida y fluorescente, posteriormente se aplicó el extracto purificado sobre las bacterias patógenas, y se observó inhibición de crecimiento en seis cepas, pero no en *Salmonella* sp y *S. aureus*. Aquí también se observó que al aumentar el volumen del extracto, aumentaba el halo de inhibición de crecimiento bacteriano (fig. 31). Para el caso del extracto metabólico del micelio KM03, se purificó la banda de Rf 0.43 y encontramos que la inhibición del crecimiento fue mayor que el que mostró la banda purificada de LAC891, ya que inhibió el crecimiento de las ocho cepas, además el halo de inhibición fue mayor (Fig.33).

IX. CONCLUSIONES

Los extractos acuosos presentaron una actividad antimicrobiana limitada, en contraste con lo reportado para otras especies de macromicetos silvestres.

Los resultados muestran una actividad antimicrobiana diferencial entre los extractos de micelio y los de basidiocarpo.

Se presentó una correspondencia positiva entre el número de bandas visualizadas en cromatografía y la actividad antimicrobiana del extracto.

La banda purificada del extracto metanólico de KM03 presentó actividad antimicrobiana de amplio espectro con un efecto mayor el del extracto crudo correspondiente.

X. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos apoyan la realización de estudios mas finos que permitan identificar los principios activos en los extractos de *L. indigo*.

La obtención de actividad antimicrobiana en extractos de micelio es importante la obtención a futuro de grandes cantidades de extracto, ya que *L. indigo* no puede ser fructificado *in Vitro*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Fatimi M, Wurster M, H Kreisel y Linderquist U. 2005. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of selected basidiomycetes from Yemen. 60 (10):776-80.
- Andrade S.S., Sader H.L, Jones R.N, Pereira A.S, Pignatari A.C.C y Gales A.C. 2006. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(7): 741-748
- Arnone A., De Gregorio C., Mele A., Nasini G. Y Vajna de Pava O. 2000. Secondary mould metabolites. Part 58. Modifications in basic conditions and Michael additions of the protoilludane sesquiterpene tsugicoline A; some implications for the biogenesis of other sesquiterpenoids produced by Basidiomycetes. *J.Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 745-751.
- Anke H., O., Bergendorff, O. S. 1989. Assays of the biological activities of guaiane sesquiterpenoids isolated from the fruit bodies of edible *Lactarius* species. *Food Chem Toxicol.* 27(6):393-7.
- Bial Aristegui. 2002. El reino de los hongos. *Rev Iberoam Micol:*1-4.
- Benavides P. L., Aldama O. A.L. y Vázquez H.J. 2005. Surveillance of antibiotic utilization and bacterial resistance profiles in tertiary level hospitals in Mexico City. *Salud pública Méx.* 47: 3. 219-226
- Borchers A.T., Keen L.C. y Gershwin E. 2004. Mushrooms, Tumors and immunity: An Update. *Exp Biol Med:* 229(5):393-406.
- Brizuela M. A; L. García, L. y M. Mansur. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol.* 15: 69-74
- Bronzwaer S.L.A.M., Cars O., Buchholz U., Mölsted S., Goettsch W., Veldhuijzen K.I., Kool J.L., Sprenger M.J.W., Degener J.E y Participantes de EARSS. 2002. A European Study on the Relationship between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance. *Emerging Infectious Diseases.* 8:3.278-282.
- Bruce A., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.. 2004. *Molecular Biology of the Cell.* Ed. Omega.
- Brundrett Mark. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79:437-495.

- Chang R. 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev.* 54 (11 Pt 2):S91-3
- Chang S.T y Buswell J.A 1999. Mushroom nutraceuticals. *World journal of microbiology & biotechnology.* 12. 473-476.
- Clericuzio M., Mella M., Toma L., Vita Finzi P. Y Vidari G. 2002. Atlanticones, New Protoilludane Sesquiterpenes from the Mushroom *Lactarius atlanticus* (Basidiomycetes). *European journal of Organic chemistry.* 6. 988-994
- Díaz-Barriga Vega Horalia. Año. Hongos Macromicetos Comestibles, Venenosos, Medicinales y Destruyores de la Madera, de la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca, Sierra Chincua, Michoacán, México. Pág. 16.
- Dulger B., Yilmaz F. y Gucin F. 2002. Antimicrobial Activity of Some *Lactarius* Species. *Pharmaceutical Biology.* 40.4.304.8468.
- Fabian K, Anke T y Sterner O.1999. 6,9-Dihydroxy-3(15)-caryophyllen-4,8-dione--a new antibiotic from a *Marasmius* species. *Z Naturforsch* 54(7-8):469-73.
- Fan L., Pan H., Socol A.T., Pandey A. y Socol C.R. 2006. Advances in Mushrooms Research in the Last Decade. *Food Technol. Biotechnol.*44 (3) 303-311.
- Fernández R. F, López H. J, Ponce M. L, Manchado B. C. 2003. Resistencia bacteriana. *Rev Cub Med Mil.* 32(1):44-48.
- Flores A.R., Díaz E. G. y Honrubia G.M. 2005. Mycorrhizal Synthesis Of *Lactarius Indigo* (Schw.) Fr. Whit five Neotropical Pine species. *Mycorrhiza.* 15, 563-570.
- García A. Abel., Mendoza C. José Juan y Necedal Jorge .2004. Asociaciones vegetales de los bosques del Municipio de Guanaceví, Durango. *Madera y Bosques* 10(1):21-34.
- Jaimes- García J. 2005. Búsqueda y caracterización de metabolitos con actividad farmacológica en basidiomicetes silvestres. Tesis de Maestría.
- Jaramillo V. E. L.1996. Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. *Colombia Med* 27:2, 69-76
- Jose N, Ajith TA, Janardhanan KK .2004. Methanol extract of the oyster

- mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytother Res.* 18(1): 43-46.
- Krawczyk E, Luczak M, Kobus M, Banka D, Daniewski W. 2003. Antiviral activity of N-benzoylphenylisoserinates of *Lactarius* sesquiterpenoid alcohols in vitro. *Planta Med* 69(6):552-554.
- Kupka J., T. Anke, B. Max Giannetti and W. Steglich. 1981. Antibiotics from basidiomycetes XIV. Isolation and biological characterization of hypnophilin, pleurotellol, and pleurotellic acid from *Pleurotellus hypnophilus* (Berk.) Sacc. Springer-Verlag GmbH. Vol. 130 (3): 223 – 227.
- Lactarius indigo* (Schw.) Fr. An eastern North American - eastern Asian disjunct milkcap) en línea, Disponible en: www.fieldmuseum.org/research_collections/botany/botany_sites/US-China_macrofungi/fungi.html Fecha de consulta:
- Lin H y Ji-Kai L. 2002. The First Humulene Type Sesquiterpene from *Lactarius hirtipes*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen · www.znaturforsch.com
- Mierau V., Anke T. y Sterner O. 2003. Dacrymenone and VM 3298-2 New Antibiotics with Antibacteria and antifungal activity. Verlag der zeitschrift für Naturforschung tübingen. www.znaturforsch.com
- Miller Howard A Andlowell K. Halls. 1969. Fleshy Fungi 'Commonly Eaten By Southern Wildlife. S.E.F.E.S. Library. Southern Forest Experiment Station Forest Service U. S. Department of Agriculture. Southern Forest Experiment Station Forest Service U. S. Department of Agriculture.
- Nacional Antimicrobial Resistente Monitoring System. (NARMS). 2000 Annual Report. (en línea) <http://www.cdc.gov/narms/annual/2002/2002ANNUALREPORTFINAL.pdf> . 2 de Febrero de 2007.
- Nuytinck j., Verbeken A. Rinaldini C.A., Leonardo M., Pacioni G., Comandini O. 2004. Characterization of *Lactarius tesquorum* ectomycorrhizae on *Cistus* sp. and molecular phylogeny of related European *Lactarius* taxa. *Mycologia* 96(2) pp272-282.
- Pérez S.E., Esqueda M., Herrera T. y Coronado M. 2006. New records of Agaricales from Sonora. México. *Rev. Mexicana de Biodiversidad* 77:23-

33.

- Ramizi A.A. M., Rolf J., Wolf-Dieter J. Y Ulrike L. 2000. Ganomycins A and B, New Antimicrobial Farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J.Nat.Prod.*, 63(3), 416-418.
- Rosa L.H., Gomes M. M. K; Jacob C.C; Capelari M., Rosa C.A., y Zani C.L. 2003. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(7): 970-972.
- Rodriguez T.A., Xoconostle C.B y Valdez M. 2004. Molecular Ecology of Ectomycorrhizal Fungi. *Rev. Fitotec.Mex.* 27 (3):267-278.
- Ruiz H. J. 2001. El asombroso reino de los hongos. Avance y perspectiva. 20: 275-281.
- SEMARNAT. Especies con Usos No Maderables en Bosques de Encino, Pino y Pino-Encino. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/LactariusIndigo.html>. Fecha de consulta: Mayo 2006.
- Siu L. K. 2002. Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria. *J. Microbiol Immunol Infect.* 35: 1-11.
- Sharma R, Sharma CL, Kapoor B. 2005. Antibacterial resistance: Current Problems and Possible solutions. *Indian J Med Sci.* 59: 120-129.
- Shea K.M.2003. Antibiotics Resistance: What is the impact of Agricultural Uses of Antibiotics on Children's Health?. *Pediatrics* 112:253-258.
- Shittu, O.B., Alofe, F.V., Onawunmi G.O., Ogundaini A.O. y Tiwalade T.A.2005. Mycelial Growth and Antibacterial Metabolite Production by Wild Mushrooms *African Journal of Biomedical Research.* 8 (3): 157-162 .
- Stamets Paul. 2002. Novel Antimicrobials from Mushrooms. *HerbalGram.*54:28-33 American Botanical Council.
- Sterner O., Bergman R. Kihlberg J y Wickberg B. 1985. The Sesquiterpenes of *Lactarius Vellereus* and their role a proposed chemical defense system *journal of Natural Products* 48(2): 279.
- Suay I., F. Arenal, F. J. Asensio, A. Babilio, M. A. Cabello, M. T. Díez, J.B. García, A. González del Val, J. Gorrochategui, P. Hernández, F. Peláez and M. F. Vicente. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. [http://www.springerlink.com/\(pu2falz5aca4pn55muprtp45\)/app/home/cont](http://www.springerlink.com/(pu2falz5aca4pn55muprtp45)/app/home/cont)

- [ribution.asp?referrer=parent&backto=issue,4,11;journal,35,57;linkingpublicationresults,1:100234,1](#)
- Swann E. and Hibbett D.S. 2003. Basidiomycota. The Club Fungi. Version 18 September 2003. <http://tolweb.org/Basidiomycota/20520/2003.09.18> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Ulrike Lindequist, Timo H. J. Niedermeyer and Wolf-Dieter Jülich. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM* 2(3):285-299.
- Vidari G. , Vita –Finzi P y Zancocchi A.M.1995. Bioactive tetraprenylphenol from *Lactarius lignyotus*. *Journal of natural products*. 58(6) 893-896.
- Wals C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 406 (6797):775-81.
- Wasser SP, Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 19(1):65-96.
- Wasser S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60(3):258-274.
- Yano S, Rattanakit N, Wakayama M y Tachiki T. 2004. A Chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycetes-lytic Enzyme Preparation produce by *Bacillus circulans* KA-304. *Biotechnol. Biochem.*668(6) 1299-1305.
- Yoneyama H. y Katsumata R. 2006. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for novel Antibiotic Development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(5): 1060-1075.
- Yoon SY. Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. 1994. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Arch Pharm Res.* 17(6):438-442
- Zjawiony k.j. 2004. Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi. *J. Nat. Prod.* 67, 300-310
- Zhu M., Chang Q., Wong K. L., Chong S.F y Li C.R. 1999. Triterpene Antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytother. Res.*13, 529-531.