

2008A/2013B

304834291

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



Efecto Antibacterial del Caldo de Cultivo Sumergido de *Ganoderma lucidum* en Bacterias Susceptibles y Resistentes a Estreptomicina

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BARAJAS VILLEGAS LUÍS ALBERTO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ramón Reynoso Orozco

ASESOR DE TESIS:

Biol. Sergio Fausto Guerra

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Julio 2015



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. LUIS ALBERTO BARAJAS VILLEGAS.
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Efecto Antibacterial del Caldo de Cultivo Sumergido de *Ganoderma lucidum* en Bacterias Susceptibles y Resistentes a Estreptomicina.", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dr. Ramón Reynoso Orozco** y como asesor a **Biól. Sergio Fausto Guerra**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 9 de junio de 2015

COMITE DE
TITULACION


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ.
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45110. AP 39-82. Tels. (01-33) 3777- 1168 3777-1150, ext. 33118.

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: "**Efecto Antibacterial del Caldo de Cultivo Sumergido de *Ganoderma lucidum* en Bacterias Susceptibles y Resistentes a Estreptomicina**" que realizó el/la pasante **Luis Alberto Barajas Villegas** con número de código **304834291** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

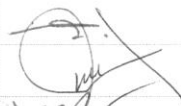



Atentamente
 Lugar y fecha.
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 30 de Junio del 2015


 Dr. Ramón Reynoso Orozco
 Director de tesis


 Biol. Sergio Fausto Guerra
 Asesor de tesis

COMITE DE
 TITULACION



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Conrado Soto Velazco		02/07/15
M en C. Rosa María Domínguez Arias		1º Julio/2015
M en C. Margarita Bonilla Moreno		02/07/2015
Supl. Biol. Sergio Fausto Guerra		02/Julio/2015

ÍNDICE	i
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ABREVIATURAS Y SIGLAS	vi
ANTECEDENTES	2
1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS	2
1.1. Taxonomía de <i>Ganoderma lucidum</i>	2
1.2. Productos obtenidos Base de <i>Ganoderma lucidum</i>	3
2. COMPONENTES ACTIVOS DE <i>Ganoderma lucidum</i>	4
2.1. Proteínas	4
2.2. Grasas	5
2.3. Vitaminas	5
2.4. Carbohidratos y Fibras	5
2.5. Minerales	6
2.6. Triterpenoides	7
3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE <i>Ganoderma lucidum</i>	10
3.1. Actividad Antineoplásica	10
3.2. Actividad Cardiovascular	11
3.3. Antienvjecimiento	11
3.4. Actividad Inmunoreguladora	12
3.5. Actividad Hepatoprotectora	13
3.6. Efecto Hipoglicemiante	13
3.7. Actividad Antimicrobiana	13
4. NUEVAS ALTERNATIVAS	14
4.1. Aplicación de las Ómicas	14
5. CULTIVO DE <i>Ganoderma lucidum</i>	15
5.1. Cultivo Tradicional	15
5.2. Cultivo Sumergido	16
6. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS	17

7. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIOTICOS, DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	18
7.1. Definición y clasificación de los antibióticos	18
7.2. Mecanismo de acción de los antibióticos	19
8. ORIGEN Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ESTREPTOMICINA	19
9. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS	20
10. RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	21
11. EFECTO ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS DE HONGOS CONTRA BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS	22
12. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Particulares	27
METODOLOGÍA	28
I. Descripción de las Cepas	28
II. Preparación del Estándar 0.5 de Mc. Farland	28
III. Reactivación de las Cepas Bacterianas	28
IV. Reto Bacteriano	28
V. Extracto de esporas	29
VI. Caldo de Cultivo para <i>G. lucidum</i>	29
VII. Caldo de Cultivo Liofilizado de <i>G. lucidum</i>	29
VIII. Cultivo en Agar Sangre	30
IX. Diagrama de Descripción de la Metodología	30
X. Análisis Estadístico	31
RESULTADOS	32

1. Caldo de cultivo sumergido	32
2. Caldo de cultivo sumergido Filtrado	33
3. Caldo de cultivo sumergido Centrifugado	34
4. Separación por Peso Molecular	35
5. Caldo de Cultivo Sumergido Contra Cepas Resistentes y/o Susceptibles a Estreptomicina	36
6. Caldo de Cultivo Sumergido Liofilizado	37
7.	8.
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	57

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme disfrutar de esta etapa lo mismo que y terminar mi sueño de ser profesionalista.

A todos los compañeros universitarios que me ayudaron y que en todo momento me brindaron su amistad.

A esta Universidad que me permitió formarme como un profesionalista más, con sueños y anhelos.

Por ultimo agradecer como parte de la Universidad a los maestros que fueron pilar fundamental para desarrollar esta investigación, a mis sinodales Dr. Conrado Soto, y las M en C Rosa María Domínguez y Margarita Bonilla, pero muy en especial al Dr. Ramón Reynoso Orozco por su paciencia y sus constantes consejos como director de tesis, a mi asesor el biólogo Sergio Fausto Guerra por su apoyo incondicional en la realización de esta obra, así como a la Dra. Elisa Cabrera Díaz quien amablemente me orientó y permitió la realización de los experimentos para este proyecto

Igualmente agradezco al director de la empresa Bio4, Pedro Ramón Ruvalcaba Cinco quien amablemente nos proporcionó la cepa para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico esta obra como signo de agradecimiento a toda mi familia lo mismo que a mi abuela María Santos Martínez, pero muy especialmente a mis padres Alberto Barajas González y Lidia Villegas Martínez por su comprensión y paciencia mostrada durante toda mi carrera y en esta etapa final de mi formación como el primer profesionalista de la familia, además de que constantemente me motivaron a ser mejor persona y ahora como profesionalista, demostrándome siempre lo orgullosos que están de mí.

Lo mismo a mi hermana Claudia Isabel, por lo muchos momentos agradables y que constantemente me motivo a seguir adelante.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

µg Microgramos

µL Microlitros

30s 30 Unidades Svedberg

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ALT Alanina Transaminasa

AST Aspartato Transaminasa

ATCC American Type Culture Collection

BCG *Bacillus* Calmette-Guerin

°C Grados Celsius o centígrados

CD Célula Dendrítica

CD8 cluster designation 8

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

col. colaboradores

FAO Organización para la Agricultura y la Alimentación

FNT α Factor de Necrosis Tumoral alfa

FA Fosfatasa Alcalina

G1 gap 1

GOT Glutámico Oxaloacético Transaminasa

g gramos

HBV Virus causante de la hepatitis (del inglés hepatitis B virus)

hr hora

IFN γ Interferón gama

IL1 β Interleucina uno beta

LDH lactato deshidrogenasa

LZ-8 Proteína Ling Zing

mL Mililitro

mm Milimetro

min. Minutos

NCCLS Siglas usadas anteriormente para el CLSI

TNF β Factor de Necrosis Tumoral beta

NK Natural Killer o células asesinas naturales

nm nanómetros

OIE Organización Mundial de la Sanidad Animal

OMS Organización Mundial de la Salud

RNA m Ácido Ribonucleico mensajero

S fase S del ciclo celular (del inglés syntesis)

UFC Unidad Formadora de Colonia

ANTECEDENTES

1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS

Históricamente, los hongos están clasificados entre las plantas inferiores en la división talofita según Linneo. Esto se debe principalmente a sus atributos estructurales sencillos, de acuerdo a su anatomía, ya que carecen de raíz, tronco, hojas, y de semillas verdaderas (Chang y Miles, 2004). Estudios basados en métodos moleculares estiman la existencia de 5.1 millones de especies de hongos (Blackwell, 2011) de estos 14,000 forman cuerpos de fructificación visibles. Se calcula que cerca de 7,000 especies poseen diferentes grados de comestibilidad, más de 3,000 especies de 31 géneros son consideradas principalmente comestibles. Solamente 200 especies han sido propagadas experimentalmente, 60 cultivadas comercialmente y cerca de 10 cultivadas a escala industrial. Además se han reportado 1,800 especies con propiedades medicinales (Chang y Miles, 2004), entre las que se encuentra *Ganoderma lucidum*. La variedad de especies y la diversidad de sus hábitats, algunos de ellos menos explorados, permiten concluir que los hongos continúan siendo una fuente rica de nuevos metabolitos (Schueffler y Anke, 2014).

El reino Fungi presenta dos divisiones dependiendo si son hongos verdaderos o afines, en los hongos verdaderos se encuentran dos clases que presentan estructuras reproductoras en el cuerpo fructífero, éstas pueden ser basidios (Basidiomicetos) o ascas (Ascomicetos).

G. lucidum pertenece al grupo de los basidiomicetos y su taxonomía se basa tradicionalmente en las características del basidiocarpo o cuerpo fructífero. Sin embargo, este tipo de clasificación genera dudas debido a la ausencia de dicha estructura en ciertos periodos del año (Moncalvo y Ryvarden, 1997), pertenece al orden *Polyporales* (Moncalvo y Ryvarden, 1997), que a su vez corresponde a la familia *Ganodermataceae* dentro de la cual se han descrito ocho géneros de los cuales *Amauroderma*, *Ganoderma*, *Haddowia* y *Humphreya* son aceptados actualmente por los especialistas dado que los límites taxonómicos entre los géneros no son claros y muchas especies continúan con posición taxonómica dudosa (Torres, 2007). Gracias a diferentes técnicas de identificación se ha logrado definir una clasificación del género *Ganoderma*, el cual fue introducido a la nomenclatura por Peter Adolf Karsten en 1881 (Lin y col., 2000), y se han logrado identificar entre 219 y 250 especies de *Ganoderma* basados en caracteres pleomórficos (Lin y col., 2000), sin embargo no se ha realizado análisis filogenético usando datos morfológicos (Torres, 2007). Este género incluye especies fitopatógenas, las cuales atacan una gran cantidad de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, causando incluso la muerte de los árboles (Seo y Kirk, 2000), no obstante pocas especies de este género actúan como saprofitas al descomponer la celulosa de los árboles dañados (Adaskaveg y col. 1991).

En la literatura se mencionan especies importantes de este género utilizadas con propósitos medicinales, entre ellas: *G. luteum*, *G. atraum*, *G. tsugae*, *G. applannatum*, *G. austral*, *G.*

capense, *G. tropicum*, *G. tenue*, y *G. sinense* (Chang y Buswell, 1999b) Este género se divide en dos subgéneros; el subgénero *Elfvigia* representado por *Ganoderma applannatum* y el subgénero *Ganoderma* el cual se encuentra caracterizado por *Ganoderma lucidum* debido a las características de la espora. Por lo tanto, la gran mayoría de la literatura se encuentra basada en *G. lucidum*, el cual goza de gran veneración en el continente Asiático desde hace 4,000 a 5,000 años (Wasson, 1968). *G. lucidum* es conocido como el hongo de la fortuna y prosperidad y es usado como hierba medicinal (Zhao y Zhang, 1994). En China es conocido con nombres como Lingzhi cuyo significado es “el hongo de la inmortalidad” o “hierba de la potencia espiritual”, mientras en Japón se nombra Reishi que significa “el hongo de los 10,000 años” (Ofodile y col., 2005; Stanley y col., 2005; Ríos, 2008). Su uso se encuentra registrado por más de dos milenios, debido a que este hongo se menciona durante la era del primer emperador de China Shih-Huang, durante 221 a 207 a. de C. (Stamets, 1993). Su valor medicinal en esta región oriental se basa en el tratamiento de enfermedades como hipertensión, ulcera gástrica, bronquitis, artritis, asma, nefritis, hepatitis, anorexia, cáncer y diabetes (Jong y Birmingham, 1992), lo que ha llevado a lograr éxito y elevando la tasa de consumidores en todo el planeta.

1.1. Productos Obtenidos a Base de *G. lucidum*.

G. lucidum a diferencia de otros hongos no se consume directamente ya que posee un sabor amargo y su consistencia es dura, su principal forma de uso es la infusión del cuerpo fructífero o de forma tópica (Ríos, 2008; Chen y col, 1998). Aunque también se prepara usando el fruto fresco o seco, cortado en trozos finos o pulverizados, se hierva en agua. El líquido resultante es amargo y también se utilizan los extractos alcohólicos con varios efectos medicinales, incluyendo propiedades antivirales (Lindequist y col., 2005).

La principal forma de comercialización de *G. lucidum* en Occidente son las cápsulas o tabletas de polvo de hongo seco y se suele encontrar en herbolarios y farmacias (Chang y col., 2009). En la década de los 90, se registraron y comercializaron internacionalmente más de 90 marcas de productos adicionados con *G. lucidum* (Lin, 2000). El consumo mundial se estima en varios miles de toneladas y el mercado crece rápidamente (Wachtel-Galor, 2011). Aunque no existen datos recientes sobre la venta de productos de *Ganoderma* en 1995 se estimó un valor de 1,628 millones de dólares anuales (Chang y Buswell, 1999 a; Wasser y Weis, 1999).

Por otro lado, han resultado ser insuficientes las colectas de campo para satisfacer la demanda de productos a base de *G. lucidum*, por esta razón, muchos países han logrado implementar técnicas y métodos para el cultivo de este hongo. Se estima que la producción mundial en el año de 1999 de *G. lucidum* fue de 6,000 toneladas, y más de la mitad provenía de la industria asiática (Lin y col., 2000). Actualmente se cultiva en más de 10

países de los cuales China ocupa el primer lugar con una producción de 4,300 toneladas anuales y le siguen Corea, Taiwán, Japón, Estados Unidos, Malasia, Vietnam, Indonesia y Sri Lanka.

China es el país que más comercializa *G. lucidum* ya que vende el hongo deshidratado y productos en forma de píldoras, té y tinturas, así como jarabes preparados con extractos de micelio y al igual lo adicionan a los vinos y a las cervezas como un aditivo medicinal y saborizante (Lin y col., 2000).

Mientras tanto en México se encuentran en el mercado un gran número de productos adicionados de *G. lucidum*, la forma más común es el café, en diversas presentaciones como café negro, café con crema, vita café y café clásico (Anónimo, 2009; Marañón, sin año). Además del café existen una gran cantidad de productos como suplementos alimenticios, gel de baño, cápsulas, shampoo, jabones y pastas dentales (Marañón, sin año; Consuprofe, 2009).

2. COMPONENTES ACTIVOS DE *Ganoderma lucidum*

G. lucidum al igual que el resto de los hongos no puede sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono por la falta de clorofila, por esta razón su biogénesis se basa en la absorción de nutrientes encontrados en el suelo y a las condiciones climáticas del medio en el que se desarrolla, no obstante generan una gran variedad de compuestos químicos (Jong y Birmingham, 1992; Wainwright, 1995; Lu y col., 2012). Se destacan *G. lucidum* y *G. applanatum* del género *Ganoderma* de las cuales se han logrado aislar más de 130 metabolitos y una serie de compuestos caracterizados por poseer algún tipo de actividad biológica (Jordan, 2004; Mohsin y col., 2011; Osińska-Jaroszuk y col., 2014). Se han aislado compuestos bioactivos a partir del micelio y cuerpo fructífero, obteniendo una gran cantidad de macromoléculas como polisacáridos, aminoácidos, proteínas, grasas, glicoproteínas y ácidos nucleicos (Shamtssyan, 2004). Tanto los metabolitos como las macromoléculas aportan diversos beneficios a la salud y como tratamiento contra la hipertensión, nefropatías, hepatitis, gastritis, artritis, insomnio, bronquitis e inmunoregulación (Liu y Zhang, 2005; Tang y Zhong, 2004; Jong y Birmingham, 1992; Yang y col., 2010; Soto y col., 2002). Algunas de estas macromoléculas aisladas de *G. lucidum* son proteínas, grasas, carbohidratos, fibras, minerales y triterpenoides.

2.1. Proteínas

Los hongos como *G. lucidum* son ricos en proteínas ya que poseen de 19-35% del total del hongo en peso seco o deshidratado, encontrando todos los aminoácidos esenciales (Chang y Miles, 1989). De *G. lucidum* se ha aislado la proteína LZ-8 (Ling Zhi-8) obtenida y purificada del micelio de *G. lucidum*, la cual posee actividad inmunoreguladora (Shiao,

2003) y mitogénica en las células de bazo de rata y leucocitos de sangre humana, puede suprimir la diabetes autoinmune en ratas hembras jóvenes no obesas (Kino y col., 1989). Se ha reportado que las proteínas fúngicas de *G. lucidum* contienen los nueve aminoácidos esenciales requeridos por el hombre, y mientras que los granos de cereal tienen bajo contenido de lisina, en los hongos es el aminoácido más abundante en conjunto con compuestos nitrogenados como lo son citrulina, glucosamina, etanolamina y ornitina (Chen y col., 2007; Chen y col., 2004).

A partir de *G. lucidum* se ha aislado una proteína antifúngica llamada ganodermina la cual inhibe el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, un hongo necrotrófico y patógeno de plantas con un rango amplio de huéspedes y muy persistente en el ambiente (Amselem, 2011). También ataca a *Fusarium oxysporum*, hongo fitopatógeno que afecta principalmente a cultivos bananeros, así como a *Physalospora piricola*, hongo fitopatógeno de amplio espectro el cual ataca las ramas y brotes de una gran cantidad de árboles (Wang y Ng, 2006).

2.2. Grasas

El contenido graso en diferentes especies de hongos varía de 1.1 a 8.3% en base a su peso seco, con un contenido promedio de 4.0% (Chang y Miles, 1989). Para el caso de *G. lucidum* se sabe que contiene diversas clases de compuestos lipídicos, incluyendo ácidos grasos libres (Lv y col., 2012), monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, esteroides y fosfolípidos (Crisan y Sands, 1978). En un estudio realizado por Chen y col., lograron aislar de esporas de *G. lucidum* ácidos grasos esenciales como el palmítico, esteárico, oleico y linoleico, todos de gran importancia nutricional (Chen y col., 2013) por su composición química.

2.3. Vitaminas

Los hongos como *G. lucidum* son fuente de vitaminas, incluyendo la tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), biotina (vitamina B8) y ácido ascórbico (vitamina C). El contenido de riboflavina en los hongos es mayor que en los vegetales. Sin embargo, la concentración de estas moléculas varía dependiendo de la especie (Mattila y col., 2001).

2.4. Carbohidratos y Fibra

Los hongos basidiomicetos contienen grandes cantidades de carbohidratos, entre el 47 y el 81% del total del peso seco. Los que se encuentran presentes son hexosas, pentosas, metil pentosas, oligosacáridos aminoazúcares y azúcares alcohol (Chang y Miles, 1989; Lu y col., 2012). Por otro lado, el contenido de fibra varía ampliamente desde el 4% hasta el 20%, según la

especie. En los hongos están presentes muchas fibras dietéticas como la quitina y glicina, las cuales absorben sustancias tóxicas y aceleran la excreción disminuyendo el tiempo de permanencia de sustancias nocivas en el intestino (Falcón y col., 2011).

Diversas investigaciones se han conducido con respecto a la presencia de glucanos en *G. lucidum* pues estos compuestos han demostrado ser sustancias capaces de disminuir los niveles de colesterol en sangre (Morigawa y col., 1986). Además, los polisacáridos del tipo de los glucanos ocupan un papel importante en el sistema inmunológico (Miyazaki y Nishijima, 1981); debido a que en diversos estudios, los glucanos han sido caracterizados como sustancias con propiedades inmunomoduladoras capaces de activar mecanismos de inmunidad natural y específica (Chang, 1996; Lei y Lin, 1992; Mizuno, 1996). En conejos previamente tratados con glucanos, se incrementa la migración de fagocitos mononucleares y granulocitos hacia la lesión inducida, así como una aceleración en la degradación de microorganismos directamente en el área afectada (Kim, 1997). Existe evidencia que señala que los glucanos por sí mismos no poseen efectos tóxicos directos sobre las bacterias. Sin embargo, estimulan células del sistema inmune, especialmente los macrófagos, por lo que son considerados sustancias que incrementan la resistencia a enfermedades (Chang, 1996; Soo, 1996). Otra propiedad confirmada de los glucanos es la anticoagulante y antitrombótica, similar a la heparina (Wagnerova y col., 1993).

Por otro lado, se ha reportado que los β glucanos presentan actividad que reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y obesidad (Simon, 1996). De igual manera poseen actividad antitumoral e inmunoestimulante (Mao y col., 1999). Debido a que inducen la maduración de los monocitos normales y leucémicos cuando son cultivados con células dendríticas, lo que sugiere un papel estimulante sobre este tipo de células más que el presentado en los fagocitos (Chen y col., 2008).

Adicionalmente, los β -1-3-D-glucanos poseen la habilidad de incrementar la resistencia del organismo a las bacterias, hongos, parásitos y virus, solos o en combinación con antibióticos, quimioterapéuticos, u otros medicamentos (Wang, 2001; Lei y Lin, 1992; Chen y col., 2004; Gao y col., 2002; Hsu y col., 2002; Sheena y col., 2003). Además, los β -1-3-glucanos tienen la habilidad de estimular la hematopoyesis (Jia, 1993), regresando el número de eritrocitos y leucocitos en el organismo a valores normales. Recientemente se reportó la presencia de un nuevo exopolisacárido aislado de cultivos estacionarios de *G. applanatum* y demostró múltiples propiedades como componente bioactivo (Osińska-Jaroszuk y col., 2014). Probablemente y dada la cercanía interespecie entre los dos individuos, *G. lucidum* produzca el mismo tipo de exopolisacárido, sobre todo si se cultiva en las mismas condiciones de *G. applanatum*.

2.5. Minerales

Los hongos son una buena fuente de minerales, mismos que obtiene el hongo del sustrato, son tomados por el micelio en crecimiento y transportados al cuerpo fructífero. Como en las plantas superiores, el mineral de mayor contenido es el potasio, seguido del fósforo, sodio, calcio y magnesio en mayor cantidad, mientras que cobre, zinc, hierro, manganeso, molibdeno y cadmio son los elementos menores. El potasio es cerca del 45% del contenido total de minerales. El magnesio es el tercer mineral luego del potasio y el fósforo. El contenido de calcio es bajo. Los hongos son una buena fuente de cobre y zinc, mientras que las cantidades de hierro y manganeso son bajas (Mattila y col., 2001). Para *G. lucidum* y a partir del cuerpo fructífero en fase logarítmica se encontró minerales como fosforo, sílice, azúfre, potasio, calcio y magnesio en mayor cantidad. Además se encuentran, hierro, sodio, zinc, cobre, manganeso y estroncio, aunque en menor cantidad (Wachtel-Galor y col., 2011).

2.6. Triterpenoides

Los triterpenoides son compuestos orgánicos que se caracterizan por poseer un esqueleto básico llamado lanosterol (Fig. 2) y que puede ser modificado por múltiples vías, lo que permite la formación de las más de 20,000 variantes que existen naturalmente (Petronelli y col., 2010). Son los compuestos amargos característicos de *G. lucidum*, compuestos altamente oxidados y aislados por primera vez por Kubota (Kubota y col., 1982). Desde entonces, se han identificado las propiedades físico-químicas de más de 150 triterpenoides encontrados en *G. lucidum*. Se dividen en 10 grupos de acuerdo a sus similitudes estructurales y sus actividades tanto biológicas como medicinales (Kim y Kim, 2002). Se han aislado del cuerpo fructífero, de las esporas y del micelio por varios procedimientos cromatográficos (Nishitoba y col., 1987; Hirotani y col., 1991). El lanosterol es un importante intermediario en la biosíntesis de esteroides y triterpenoides en microorganismos y animales. Tanto en la tabla 1 como en la figura 1 se puede observar a los 29 triterpenoides que se ha logrado aislar e identificar a partir de *G. lucidum* (Bingji y col., 2011).

El cuerpo fructífero posee más de 150 triterpenoides. (Cheng y col., 2010). Sin embargo, es importante mencionar que sus niveles varían de acuerdo con el origen del hongo, método de extracción y las características de su cultivo, así como la etapa de desarrollo en que se encuentre el hongo al momento de la determinación. Es importante mencionar que los métodos de extracción suelen alterar la concentración de sustancias obtenidas en cada técnica (Ma y col., 2003).

En protocolos de extracción con hexano y/o cloroformo se ha probado el efecto antibacterial con mezclas o compuestos aislados, a partir de la misma muestra y los resultados sugieren un efecto sinérgico de triterpenoides y compuestos esteroides, además

de asociar sus resultados con aquellos obtenidos con extractos crudos independientemente del tipo de cultivo de *G. lucidum* (Vazirian, 2014).

No.	Name	Molecular formula	Molecular w.	Refs.
1	ganopsoreric acid A	C ₃₀ H ₃₈ O ₈	526	10
2	ganoderic acid B	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516	10
3	ganoderic acid C ₁	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514	10
4	ganoderic acid E	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512	10
5	ganodermanontriol	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472	10
6	ganosporelactone A	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512	11
7	ganosporelactone B	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514	11
8	lucidumol A	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472	12
9	ganoderic acid β	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	500	12
10	lucidumol B	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458	12
11	ganodermanondiol	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456	12
12	ganoderiol F	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	454	12
13	ganoderic acid A	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516	12
14	ganolucidic acid A	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	500	12
15	ganoderic acid γ	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516	13
16	ganoderic acid δ	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516	13
17	ganoderic acid ε	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516	13
18	ganoderic acid ξ	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514	13
19	ganoderic acid η	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	532	13
20	ganoderic acid θ	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530	13
21	ganolucidic acid D	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	500	13
22	ganoderic acid C ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	518	13
23	lucidenic acid SP1	C ₂₇ H ₄₀ O ₆	460	14
24	ganoderic acid C ₆	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530	14
25	ganoderic acid G	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	532	14
26	ganoderic acid D	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514	15
27	ganoderic acid H	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	572	15
28	methyl ganoderate A	C ₃₁ H ₄₈ O ₇	530	16
29	methyl ganoderate B	C ₃₁ H ₄₈ O ₇	530	16

Tabla 1. En esta tabla se muestra el nombre de los 29 triterpenoides aislados de *G. lucidum*, y su respectiva fórmula química para cada uno de ellos, así como su peso molecular (Tomada de Bingji y col., 2011).

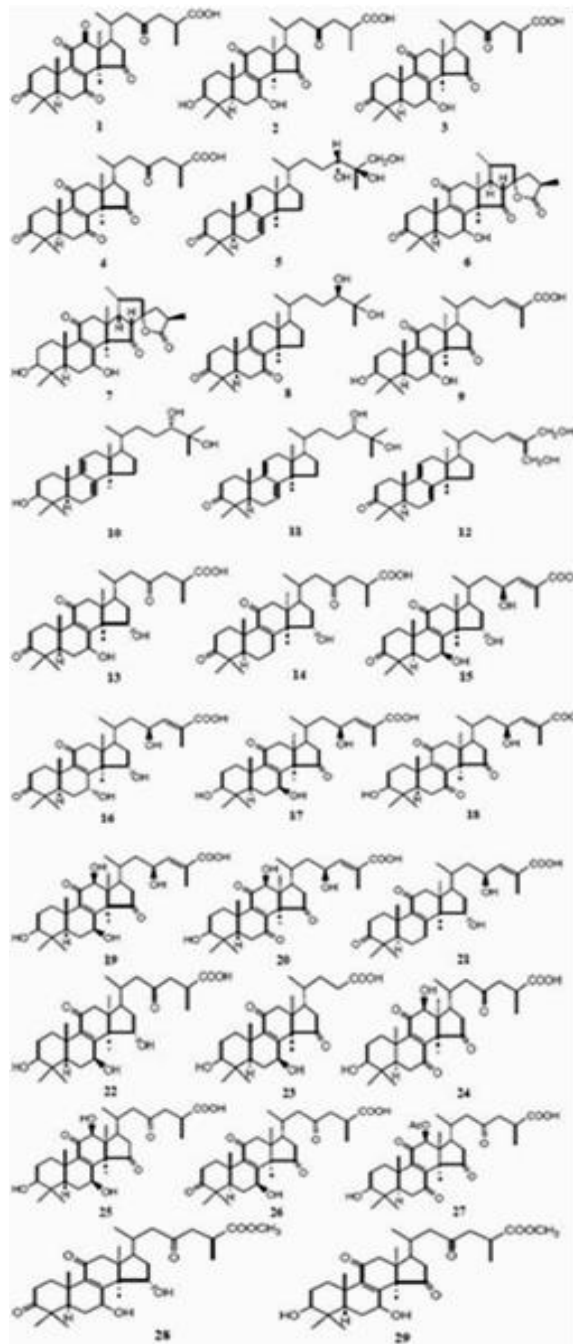


Fig. 1. Estructura química de 29 triterpenoides aislados de esporas de *Ganoderma lucidum*. Donde se observa la estructura del trans escualeno (lanosterol) a partir del cual se sintetizan los triterpenoides por oxidaciones, reducciones, desacidificaciones, ciclización o rearreglo, además de la fórmula química y peso molecular de los mismos (Tomada de Bingji y col., 2011).

De las muchas sustancias activas con propiedades farmacológicas que presentan los extractos acuosos de los hongos, o con solventes polares e incluso sus mezclas, es difícil atribuir las funciones que tienen dichas sustancias activas, de forma aislada o en asociación entre ellas.

3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE *Ganoderma lucidum*.

La investigación sobre *G. lucidum* incluye las estructuras moleculares de sus componentes bioactivos obtenidos del micelio y del cuerpo fructífero tales como polisacáridos, triterpenoides, inmunoproteínas y nucleósidos. (Mizuno y col., 1995; Boh y col., 2007). Stamets (1993) menciona que *G. lucidum* se utiliza para el tratamiento de síndrome de fatiga crónica, la degeneración del hígado y desórdenes de la sangre, así como el cáncer. En algunos casos cuando no ha resultado el tratamiento convencional contra determinadas enfermedades *G. lucidum* puede ser útil. Por ejemplo, en algunos estudios clínicos, se logran mejoras en la esclerodermia facial (Liu, 1998). Por otro lado, se considera que las preparaciones de *G. lucidum* pueden tener cierto efecto protector sobre los sistemas nervioso, inmune y endócrino en monos con SIDA o Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Lu y col., 2011).

También se ha comprobado que *G. lucidum* es un auxiliar importante por su eficacia en el tratamiento de alergias, inhibiendo la producción de histamina, por lo cual reduce la respuesta alérgica. Además que en el mal de Alzheimer, aumenta la capacidad intelectual y mejora la memoria (Wachtel-Galor, 2011).

Los extractos alcohólicos de *G. lucidum* inducen el reposo del crecimiento celular y la apoptosis de manera selectiva sobre las células tumorales (Oliveira y col., 2014). En líneas celulares como las provenientes de cáncer de mama se detiene el ciclo celular y se induce la apoptosis (Wu y col., 2012; Oliveira y col., 2014). Los triterpenos son responsables de la acción antiinflamatoria, hipolipemiente, antihipertensiva y hepatoprotectora (Shiao. 2003; Zhang y Tang., 2008; Zhu y col., 1999; Boh y col., 2007). Por otro lado, *G. lucidum* o Reishi produce un efecto antifibrótico en el hígado, rebajando el colágeno del mismo, de tal manera que normaliza la estructura hepática alterada y reduce los niveles de Aspartato Transaminasa (AST) que también se conoce como Glutámico Oxaloacético Transaminasa (GOT), así como los niveles de Alanina Transaminasa (ALT), Lactato Deshidrogenasa (LDH), fosfatasas alcalinas y bilirrubina total (Lin y col, 1995; Yang y col., 2006).

3.1. Actividad Antineoplásica

Se ha reportado que *G. lucidum* posee propiedad antitumoral debido a que fortalece el sistema inmunológico; al aumentar el nivel de monocitos, macrófagos, linfocitos T (Chang y col., 2009), citosinas (Hua, 2007), interleucinas lo que favorece la actividad del Factor de

Necrosis Tumoral (TNF) y el Interferón gama (Nonaka y col., 1995). Se ha probado que incrementa la actividad de las células NK o asesinas naturales y las CD8 (del inglés “cluster designation”) o citotóxicas reduciendo la capacidad del tumor para llevar a cabo la metástasis. Además, los polisacáridos del extracto acuoso de *G. lucidum* presentan actividad antitumoral al suprimir la tumorigénesis, la viabilidad, la invasión y la metástasis de varios tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo* (Chen y col., 2010). Además, dichos polisacáridos no poseen toxicidad o es muy reducida en las células normales y durante los tratamientos con quimio y radioterapia (Li y col., 2011), lo que le confiere especificidad en su participación. A partir de resultados obtenidos en un trabajo alternativo, se sabe que macrófagos y linfocitos T activados liberan citocinas especialmente el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y el Interferón gama (IFN γ), entre otras citosinas (Ji y col., 2011 Chung y col., 2001; Faisal y col., 2013). Por otro lado, para la especie de *G. applanatum* se ha reportado efecto citostático en células tumorales, a partir de polisacáridos de la cubierta celular de cultivos sumergidos (Osińska-Jaroszuk y col., 2014). Lo que promueve aún más a desarrollar investigaciones con este tipo de cultivo.

3.2. Actividad Cardiovascular

Los extractos de *G. lucidum* son utilizados para tratar algunos padecimientos como la hipertensión e hipercolesterinemia (Chughtai y col., 2013). Dado que *G. lucidum* aumenta la contractilidad cardíaca, disminuyendo la presión sanguínea e incrementando la resistencia de los músculos cardíacos a la hipoxia (Lin y Wang, 2006). Además, de prevenir la formación de coágulos de sangre evitando daño al corazón y posibles infartos al miocardio en conjunto con el α -tocoferol (Sudheesh y col., 2013); por lo que favorece en la arritmia cardíaca, al facilitar la circulación sanguínea de las arterias coronarias, ya que previene el daño irreversible en cardiomiocitos durante la isquemia y la reperfusión cardíaca (Lasukova y col., 2008). Probablemente estas evidencias explican el aumento de la capacidad vital del organismo e inhibiendo la fatiga (Lee y Rhee, 1990; Chu y col., 2012; Wang y col., 2012b).

3.3. Antienvjecimiento

En el antiguo texto chino Shen Nong Ben Jing volumen 1 se afirma que *G. lucidum* es útil para aumentar la energía vital, previniendo la pérdida de memoria, refresca el cuerpo y la mente, evitando así el envejecimiento y aportando para hacer una mejor vida futura (Lin, 2000; Li y col., 2005). Estas propiedades de anti-envejecimiento dependen de la inhibición del ciclo celular y apoptosis (Gan y col., 1998), de una manera tan equilibrada que es difícil explicar dicho fenómeno de forma integral. Además favorece al aumento en la reparación de las mutaciones genéticas (Chen y col., 1998; Wang y col., 2012a), que actualmente se sabe que asocian al genoma celular y al mitocondrial (Trifunovic y col., 2004), aunque

existen pocos trabajos que exploren los efectos de *G. lucidum* para el envejecimiento celular. Sin embargo en un modelo de ratón para la enfermedad de Huntinton, comúnmente conocida como mal de San Vito, considerada una degeneración neuronal constante, progresiva e ininterrumpida hasta el final de la enfermedad que suele coincidir con el final de su vida por demencia y muerte. En dicho modelo, así como modelos *in vitro*, se ha demostrado que los constituyentes activos de *G. lucidum* tienen un potente efecto inductor del Factor de Crecimiento Nervioso en astrocitos primarios, además en medio condicionado con extracto de *G. lucidum* se observó un incremento en la biogénesis mitocondrial en células PC12, lo que podría explicar cuando menos parcialmente sus efectos anti-envejecimiento (Chen y col, 2012c).

3.4. Actividad Inmunoreguladora

Los mayores efectos inmunomoduladores de las sustancias activas de *G. lucidum* incluyen actividad mitogénica y activación de las células inmunológicas efectoras, tales como linfocitos, macrófagos y células asesinas, lo que resulta en la producción de citocinas, incluyendo interleucinas (ILs), TNF (Chung y col., 2001) e Interferón (Faisal y col., 2013; Liao y col., 2013). Existe evidencia que indica que los β -D-glucanos de los hongos medicinales inducen respuestas biológicas mediante su unión al receptor de complemento tipo tres o CR3 (Zhu y Lin, 2006), integrina α M β 2, o CD11b/CD18 (Cao y Lin, 2002) en las células efectoras (Gao y col., 2002). El complejo ligando-receptor se internaliza, desencadenando una serie de eventos moleculares como la activación del factor de la transcripción nuclear NF-KB, implicado en gran número de respuestas celulares (Batbayar y col., 2011). También se han observado efectos antiinflamatorios de polisacáridos de *G. lucidum*, en células de músculo liso y en la aorta torácica de ratones, lo que podría ser utilizado en la prevención de enfermedades vasculares, así como en la respuesta inflamatoria (Liang y col., 2014). Sin embargo, los efectos terapéuticos de *G. lucidum*, como los anticancerígenos y antiinflamatorios, se han asociado con sus efectos inmunomoduladores (Lin y Zhang, 2004; Kuo y col., 2006; Chen y col., 2004). Está demostrado que la capacidad antitumoral y la inmuno-modulación se da por glucanos y/o proteínas inhibitorias del ciclo celular en las células tumorales (Lin y col., 1995; Wang y col., 1997; Cong y col., 2014), por la inhibición de la ADN polimerasa (Mizushina y col., 1998a; Mizushina y col, 1998b), o la inhibición de la modificación post-traduccional de oncoproteínas (Lee y col., 1989). De tal manera que se han aislado un grupo complejo de polisacáridos que se reportan como estimulantes del sistema inmunológico, aumentando la producción de monocitos, macrófagos y citocinas (Liao y col., 2013). Los polisacáridos de alto peso molecular aumentan los niveles de IL1 β , IL2, e IL6; ya que tienen actividad preventiva contra virus (Li y col., 2005; Lin, 2001; Zhang y col., 2014), además de efecto hipoglicemiante (Hikino y col., 1985).

3.5. Actividad Hepatoprotectora

G. lucidum se utiliza para el tratamiento de hepatopatías crónicas de diversas etiologías con pocos o sin ningún efecto colateral, posteriormente se descubrió que los polisacáridos y triterpenoides son los principales responsables (Gao y col., 2002). Existe evidencia en estudios con ratas, en los que se indica que polisacáridos de *G. lucidum* podrían prevenir efectivamente el daño hepático producido por el consumo de alcohol (Lin y col., 2000). Los triterpenoides aislados de *G. lucidum* también mostraron efectos protectores contra el daño hepático inducido por *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (Wang, 2001). Además, el ácido ganodérico A, inhibe la replicación del virus de la hepatitis B (HBV) en células del hígado (Qun-Li y Wang, 2006). Por otro lado, en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, donde se usa el tetracloruro de carbono como agente hepatotóxico, se obtiene un efecto favorable sobre los radicales oxidantes y disminución de los niveles sanguíneos de TNF- α , causantes del daño hepático e inducidos por el tetracloruro de carbono. Dichos mecanismos antihepatotóxicos se asocian a proteoglicanos aislados del micelio de *G. lucidum* (Yang y col, 2006).

3.6. Efecto Hipoglucemiante

Tradicionalmente *G. lucidum* se usa para el tratamiento de la diabetes en la medicina china; sin embargo, *in vivo* no se ha esclarecido ni su potencia antidiabética, ni los mecanismos que subyacen para lograr tal efecto (Wang y col., 2012a). Además, los extractos crudos de *G. lucidum*, *G. tropicum* y *G. tsugae* muestran actividad hipoglucemiante, así como de liberación de insulina tanto *in vivo* como *in vitro* (Lin y col., 2000). Los polisacáridos aislados de *G. lucidum* presentan un efecto hipoglicémico en diversos estudios, lográndolo a través de la liberación de insulina facilitando el influjo de calcio en las células pancreáticas (Zhang y Lin, 1999). Por otro lado se caracterizó al proteoglicano FYGL (de Fudan-Yueyang-*Ganoderma lucidum*), el cual presenta un efecto antihiperглиcémico importante (Wang y col., 2012a; Teng y col., 2011) y que podría explicar los beneficios obtenidos en este padecimiento.

3.7. Actividad Antimicrobiana

Es importante mencionar que en hongos como *G. lucidum* la producción de sustancias durante su desarrollo depende de las condiciones de su cultivo debido a que es diferente para cada etapa del crecimiento (Osińska-Jaroszuk y col., 2014). Por lo que es difícil adjudicar determinada actividad a un metabolito en particular (Vazirian y col., 2014). En Japón, por ejemplo, el contenido de ácido ganodérico es un criterio de calidad para la utilización de extractos de hongos para experimentos antibacteriales (Zhao y col., 2011). Se han realizado trabajos de monitoreo antimicrobial para *Pseudomonas syringae*, *Bacillus subtilis* y *Cladosporium herbarum*, utilizando extracciones a partir de mezclas de solventes

con *G. lucidum*, los aislados que se obtienen a partir del cultivo micelial permiten atribuir su actividad antimicrobiana a fenoles, terpenoides y alcaloides (Ofodile y Bikomo, 2008). Los extractos de hongos como *G. lucidum* así como sus derivados no solo han demostrado actividad antimicrobiana, también los metabolitos secundarios extracelulares como secreciones miceliales presentan actividad antivírica (Zhang y col., 2014). Por otro lado, los exudados del micelio de este tipo de hongos tienen actividad antimicrobiana y antiparasítica contra *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la malaria (Chen y col., 2004). Los polisacáridos de la pared celular de *G. lucidum* y sus triterpenoides también han mostrado actividad antimicrobiana; como el caso de zeylasterona que actúa contra *Staphylococcus aureus* (De León y col., 2010) y *Bacillus subtilis* (De León y Moujir, 2008). Los triterpenoides de *G. applanatum* exhiben actividad antibacteriana principalmente contra bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Gerber y col., 2000), mientras que otros estudios con Basidiomicetos indican que poseen compuestos no identificados con potentes efectos antibacteriales contra Gram positivas (Lee y col., 1989). Así mismo, en trabajos con extractos de hongos del género *Ganoderma* se muestra actividad contra organismos Gram negativos, *in vitro* (Yoon y col., 1994). En general se acepta que los triterpenoides del hongo en cuestión son los principales constituyentes antibacteriales (Yihuai y col., 2003; Ofodile, 2006). Sin embargo, sería muy aventurado aseverarlo sin las pruebas suficientes, dada la gran cantidad de metabolitos secundarios que se encuentran en los distintos extractos obtenidos (Ofodile y col., 2011; Vazirian y col., 2014). Recientemente se han reportado diversos trabajos en los cuales se comprueba algunos de los efectos antibacteriales del género *Ganoderma* como el ácido austrálico, el cual mostró una actividad sobre especies de hongos y bacterias como *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por otro lado, dichos compuestos que son de tipo fenólico se han utilizado como desinfectantes o antisépticos, dependiendo del compuesto que se trate (Albino y col., 2007).

4. NUEVAS ALTERNATIVAS

4.1. Aplicación de las Ómicas

Un abordaje diferente, para estudiar las sustancias activas producidas por *G. lucidum* en cultivos artificiales, está representado por los estudios que tratan de indagar las secuencias de nucleótidos para identificar genes (genómica) y sus transcritos (estudio de los transcriptomas) o de sus productos (proteómica) y así evitar la determinación y caracterización de tan basta y variada cantidad de moléculas producidas por el hongo con probable actividad antimicrobiana. Si se determina la expresión génica, el transcriptoma y el proteoma de un individuo, es posible facilitar la determinación de los productos generados en las distintas vías metabólicas (metabolómica), así como muchos otros aspectos de los sistemas biológicos (Chen y col., 2012a). Los estudios realizados con

secuenciación y ensamblaje de distintas porciones del genoma muestran una expresión preponderante y relacionada con la biosíntesis de triterpenoides y principalmente con la vía de síntesis de ácido ganodérico (Liu y col, 2012a), lo que confirma los resultados obtenidos por las pruebas bioquímicas, aunque, obviamente apenas se inicia la carrera para elaborar mapas completos que expliquen funcionalmente la participación de las sustancias por describir y su aplicación por parte del hombre. Sin embargo, los resultados sugieren una tendencia a producir en mayor cantidad a los triterpenoides, que también son considerados como sustancias activas como inhibidores de bacterias. En la metabolómica se pretende llevar a cabo análisis hacia el total de metabolitos, a partir de una muestra dada. En el caso de *G. lucidum* se realizan dichos estudios para desarrollar procesos que permitan controlar de calidad y establecer, a partir de los resultados, para discriminar las distintas fuentes del hongo (Wen y col., 2010). La meta es lograr procedimientos de control de la calidad, dado el impacto que sus productos tienen a nivel del mercado mundial.

5. CULTIVO DE *Ganoderma lucidum*

5.1. Cultivo Tradicional

La distribución de *G. lucidum* es muy irregular en la naturaleza y debido a la creciente demanda como hierba medicinal se hace uso de diversos medios para cultivarlo (Chang y Buswell, 2008). Existen diferencias en las condiciones de cultivo para el género *Ganoderma* (Mayzumi y col., 1997), debido a la preferencia según la región geográfica por ejemplo, en el sur de China, *G. lucidum* negro es el más popular, mientras que en Japón se prefiere el rojo. Las condiciones de calor y humedad le permiten prosperar, y muchas variedades silvestres se encuentran en las regiones subtropicales del oriente. Desde la década de 1970, el cultivo de *G. lucidum* se ha convertido en una fuente importante de setas. El cultivo artificial se consigue utilizando sustratos tales como grano, aserrín, troncos de madera (Chang y Buswell 1999a; Wasser y col., 2005; Boh y col., 2007), y los residuos de corcho (Riu y col., 1997), bagazo de maguey tequilero y de caña de azúcar (Soto-Velazco y col., 2002) todos como desperdicio de las actividades cotidianas de la población humana.

Existen reportes sobre los inicios del cultivo de hongos benéficos en nuestro país como una alternativa para su producción, que tuvieron lugar en un rancho cercano a Texcoco, Estado de México en 1933. Aunque entre dichos hongos no se encuentra *G. lucidum* y ninguna de las especies crecen directamente en el suelo, se utilizó un sustrato especial para su cultivo. Además de que dichos hongos no compiten con las plantas por espacio ni por nutrientes en las plantaciones, y sí se pueden cultivar en sustratos orgánicos, crudos o compostados. Estos sustratos suelen ser generalmente desperdicios agrícolas e industriales, considerados como inútiles, y son reciclados para producir un alimento para los hongos (Lin y col.,

2000). Algunos de estos sustratos son utilizados para el crecimiento de *G. lucidum* porque es un descomponedor primario y que además es importante mantener la humedad, para un mejor desarrollo de metabolitos (Lin y col., 2000). En humedad posee 70-95% de agua, dependiendo de las condiciones medioambientales y 10-13% de humedad en seco (Chang y Miles, 1989).

Existe otro método de cultivo natural utilizado comúnmente en China, en el cual se inoculan trozos de árboles y se dejan reposar sobre el suelo o se entierran superficialmente; los trozos son colocados en un sitio naturalmente húmedo. Se reduce la iluminación y la evaporación cubriendo el cultivo con tela de sombra, lo cual crea un ambiente propicio para el desarrollo del cuerpo fructífero. Típicamente pasan entre seis meses y dos años antes de que se inicie una producción sustancial y continua, durante cuatro a cinco años. El contenido óptimo de humedad de los troncos es de alrededor del 45 al 55% (Chang y Buswell, 1999b). Sin embargo y además de estos tipos de cultivo se han buscado alternativas que son más rentables en cuanto a la producción de hongos, utilizando sustratos sólidos y líquidos (Lin y col., 2000).

5.2 El Cultivo Sumergido

Debido a que el cultivo tradicional del cuerpo fructífero de *G. lucidum* toma meses, ha llevado a que el cultivo de micelio adquiera gran importancia, por la demanda e importancia del control de calidad (Sanodiya y col., 2009). Es importante tomar en cuenta diversos parámetros en el cultivo micelial sumergido como lo son: temperatura, pH, velocidad de agitación, la purificación y aislado de sustancias bioactivas (Wachtel-Galor y col., 2011). El cultivo sumergido de hongos como *G. lucidum* ha recibido una gran atención como alternativa prometedor y reproducible en la producción eficiente de micelio, sustancias bioactivas y metabolitos (Berovich y col., 2003; Domínguez-López, 2012; Osińska-Jaroszuk y col., 2014). Sin embargo, se requiere de equipo, material y reactivos que favorezcan a su crecimiento, utilizando velocidades de agitación y una fuente de energía que puede ser tanto glucosa como sacarosa además de un pH regulado. Este tipo de cultivo de hongos tiene un potencial industrial significativo, pero su éxito a escala comercial depende por un lado de aumentar los rendimientos del producto, y por otro lado de desarrollar sistemas de producción innovadores que aborden los problemas asociados a esta técnica de cultivo para hongos. A pesar de los esfuerzos de muchos investigadores para mejorar la producción de metabolitos bioactivos a partir de setas, algunos aspectos fisiológicos y de ingeniería llegan a resultar insuficientes (Elisashvili, 2012). En el caso de cultivos sumergidos, se han logrado estandarizar condiciones de cultivo adicionando sustancias para mejorar la producción como el aceite de maíz, con el cual se logra una mejor producción de polisacáridos (Huang y col., 2009; Zhong y Tang, 2004). Sin embargo, es importante mantener una luz controlada en los cultivos ya que permite lograr

una mayor producción de polisacáridos y ácido ganodérico (Zhang y Tang, 2008). A pesar del gran número de estudios sobre las propiedades de sustancias aisladas de hongos, se requiere de más investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de extractos del cultivo sumergido, debido al potencial mostrado tanto en extractos del cuerpo fructífero, como cultivos sumergidos adicionados con distintos aditivos. Es común encontrar cultivos suplementados con peptona que se utiliza como fuente de carbono, pero no se encuentran reportes en cultivos para hongos que sean suplementados con tiamina, aunque sí para cultivos vegetales en donde se considera un cofactor esencial para el metabolismo de carbohidratos y además por estar directamente involucrado en la biosíntesis de algunos aminoácidos (De Klerk, 2007).

En el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA se desarrolla un cultivo sumergido de *G. lucidum*, a partir de un medio elaborado con agar extracto de malta, en caja de Petri hasta cubrir la superficie con el micelio. Mismo que posteriormente se inocula en matraces Erlenmeyer, con un medio estéril de dextrosa sulfatada enriquecido con tiamina y peptona como fuente de carbono. Enseguida se inoculan fragmentos de agar y micelio que se mantiene en agitación constante durante 15 días para obtener el caldo del cultivo, que se filtra para eliminar la parte sólida. De dicha fuente, en el presente estudio, se realizan las pruebas correspondientes para probar la actividad antimicrobiana. Se debe tomar en cuenta que las condiciones de cultivo modifican los tipos y cantidades de sustancias producidas por el hongo (Malarvizhi y col., 2003) y no existen trabajos previos que adicionan tiamina al medio para su desarrollo y además, que prueben su efecto antibacteriano.

6. CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares, presentan un tamaño de entre 0.5 y 5 μm , y diversas formas incluyendo esferas, bastones y espirales. Las bacterias son procariontas y no presentan orgánulos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento. Son los organismos más abundantes del planeta. Los resultados de estudios de consenso estiman que el número de especies de bacterias en el mundo va de 10^7 a 10^9 (Schlossy Handelsman, 2004). Son ubicuas, encontrándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior (Fox, 2002).

Por definición un antibiótico es una sustancia producida por microorganismos, pueden ser bacterias u hongos, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden incluso llegar a destruirlos y por lo tanto, muchas bacterias producen sustancias antibacterianas. El más claro ejemplo podría ser el género *Streptomyces* que se caracterizan por poseer un metabolismo secundario (rutas metabólicas no requeridas para la supervivencia) complejo.

Los individuos pertenecientes a dicho género producen numerosos antibióticos de uso clínico como estreptomina, ácido clavulánico, neomicina, cloranfenicol, etc. De tal manera que se podrían citar varias especies de bacterias como *Bacillus polymixa* que produce a la polimixina E y que se considera de espectro reducido, dada su efectividad contra determinados tipos de bacterias.

7. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

7.1 Definición y Clasificación de los Antibióticos

Los antibióticos se pueden definir como un producto del metabolismo microbiano capaz de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos y que además es efectivo a bajas concentraciones. Actualmente se conocen más de 5000 antibióticos de los cuales alrededor del 75% son producidos por el género *Streptomyces*.

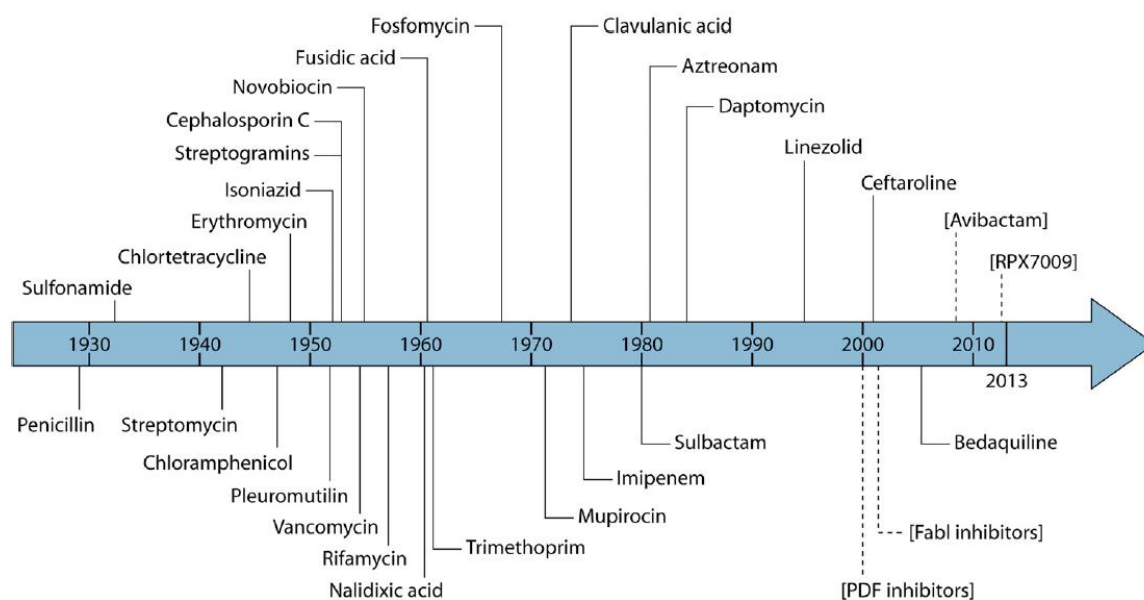


Fig. 2. Desarrollo de los antibióticos expuesta en una línea del tiempo. Tomada de Pucci y Bush, 2013.

Basados en su estructura química, los antibióticos se pueden clasificar en los siguientes grupos: β -lactámicos, macrólidos, tetraciclina, polipeptídicos, polienos y los aminoglicósidos los cuales consisten en azúcares aminorados y un anillo llamado aminociclitol. El antibiótico más conocido es la estreptomina, la cual producida por *Streptomyces griseus* (Pucci y Bush, 2013; Vignoli y Seija., 2002; Sumano y Ocampo 2006).

7.2. Mecanismo de Acción de los Antibióticos

En general, los antibióticos deben su toxicidad selectiva a su capacidad de inhibir una reacción bioquímica específica y esencial. Para que el antibiótico ejerza su acción es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias y alcance la concentración necesaria, dependiendo del blanco de ataque por parte de los antibióticos (Calderwood y Moellering, 1988; Bowman y Raud, 1987). Según su mecanismo de acción los antibióticos se clasifican en:

Antibióticos bacteriostáticos: los cuales pueden interrumpir la síntesis de proteínas, interferir en la síntesis de la pared celular bacteriana, o inhibir enzimas que participan en la síntesis de ácido fólico bacteriano, sin embargo no producen muerte celular, ejemplo de estos antibióticos son los macrólidos, tetraciclinas y el cloranfenicol (Lin y col., 2000).

Antibióticos bactericidas: poseen un efecto letal causando la muerte bacteriana destruyendo las paredes bacterianas por medio de la lisis celular (Lin y col., 2000). Por ejemplo los β -lactámicos, aminoglicósidos, los polipéptidos y los polienos. Este tipo de antibióticos realizan su efecto por diversos medios como lo son: 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular. La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano y las células, debido a su crecimiento, están continuamente sintetizando nuevo peptidoglicano así como transportándolo a su destino en la pared celular (Johnson y col., 2013). Varios antibióticos reaccionan con las enzimas que se requieren para completar este proceso que origina el desarrollo de puntos frágiles en la pared celular, debido a la síntesis deficiente de peptidoglicano, lo que provoca que sea osmóticamente frágil, generando la lisis celular (Cho y col., 2014). 2) Alteración sobre la membrana plasmática. Una célula con la membrana dañada muere invariablemente por insuficiencia metabólica o incluso lisis a pesar de que no está en crecimiento, debido a que esta estructura es vital para todas las células. Algunos antibióticos alteran esta estructura modificando la permeabilidad y causando un efecto lítico. Desgraciadamente, estos antibióticos son tóxicos para los humanos (Park y Hahm, 2005). 3) Inhibición de la síntesis proteica. La mayor parte de los inhibidores de la síntesis proteica reaccionan con el complejo ribosoma-mRNA (Moazed y Noller, 1987), aunque las células humanas también tienen ribosomas, su diferencia en tamaño y estructura de los ribosomas de los procariotas (80S y 70S, respectivamente), es suficiente para que estos antimicrobianos logren una acción selectiva frente a bacterias (Wang y col., 2010).

8. ORIGEN Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ESTREPTOMICINA

La estreptomycin generó un gran suceso en la década de 1940, dado que mostró su capacidad para controlar y curar la tuberculosis, considerada entonces una enfermedad mortal o que amenazaba la vida de los pacientes (Cole, 2014). Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos, como bacterias, hongos, actinomicetos o bien, sintetizados artificialmente este tipo de sustancias

suprimen el crecimiento de otros microorganismos o pueden destruirlos por medio de la lisis celular. Se clasifican por su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Calderwood y Moellering, 1988; Bowman y Raud, 1987).

Su uso como agente farmacológico en el tratamiento de infecciones comienza en China hace más de 2,500 años, utilizando la cáscara enmohecida de la soya en el tratamiento de carbunco, forúnculos e infecciones similares (Sande y Mandell, 1982). Entre 1939 y 1943 Waksman logró aislar del hongo *Streptomyces griseus* y en 1944 Shatz, Bugie y Waksman descubren la estreptomicina (Cordiés y col., 1998).

La estreptomicina se encuentra en el grupo de los aminoglucósidos por poseer aminoazúcares, unidos a un anillo aminociclitol mediante enlaces glucosídicos, Este tipo de antibiótico es bactericida y de espectro reducido, por lo que resulta ser específico y dirigido a bacilos aerobios Gram negativos (Mediavilla, 1997). Participa en la inhibición de la síntesis de las proteínas en las bacterias (Broek, 1989). Su modo de acción radica en el ribosoma bacteriano que es más pequeño que el de los mamíferos; el antibiótico generalmente se une a los ribosomas bacterianos y bloquea la interacción con RNA mensajero (RNAm), aunque este bloqueo en ocasiones es reversible. En el caso de los aminoglucósidos, éstos se unen a la subunidad ribosomal 30s en el RNAr 16S y producen la acumulación de complejos iniciales de la síntesis proteica, produciendo una lectura errónea del código para el RNAm, por lo que se comportan como bactericidas (Cordiés y col., 1998).

En el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos perteneciente al Departamento de Salud Pública del CUCBA. Se cultivan cepas de *Salmonella ssp.* obtenidas a partir de muestras de carne que se expende al público, y previamente fueron determinadas como susceptibles y resistentes a estreptomicina. Dichas cepas se utilizaron para el presente estudio y forman parte de un cepario que se resguarda en dicho laboratorio. Sin embargo existen los péptidos antimicrobianos los cuales sustancias sintetizadas por organismos y que poseen efecto sobre diferentes microorganismos (Nikaido y Vaara, 1985).

9. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

En la actualidad tiene gran auge la investigación de pequeños péptidos con actividad antimicrobiana. Sin embargo, no hay que olvidar que los mismos antibióticos como la polimixina es un decapeptido cargado positivamente en 5 grupos químicos y con un ácido graso en su porción terminal (Nikaido y Vaara, 1985). Los péptidos catiónicos antimicrobianos son una de las defensas corporales del huésped contra microorganismos invasores (Wei y col., 2007). Dichos péptidos tienen actividad antimicrobial de amplio espectro, incluyendo actividad antifúngica, antibacterial y antiviral (Gordon y col., 2005). Los péptidos catiónicos antimicrobianos presentan poca o nula toxicidad hacia las células de mamíferos, y una baja tendencia para desarrollar resistencia, por lo que se han convertido en un prometedor y novedoso grupo de antibióticos (Hancock y Lehrer, 1998).

Recientemente ha crecido el interés por expresar péptidos antimicrobianos en plantas, principalmente para satisfacer la demanda de nuevos agentes antimicrobianos en medicina (Holásková, 2015) y debido al aumento de registros de resistencia bacteriana.

10. RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Las bacterias desarrollan principalmente dos tipos de resistencia para evadir los efectos de los antibióticos, una es natural en la cual bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas, mientras que la resistencia adquirida se desarrolla de manera genética y se transmite por medio de un plásmido. Este tipo de resistencia es la que constituye un problema en el ámbito clínico debido a que se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en pacientes infectados con microorganismo resistentes que anteriormente eran sensibles (Fernández y col., 2003). Como ejemplo podemos citar a *Pseudomonas aeruginosa* que presenta resistencia natural a muchos de los antimicrobianos de uso clínico, inclusive la mayoría de las penicilinas, las cefalosporinas de primera y segunda generación, y muchas de la tercera, las tetraciclinas, el cloranfenicol, el cotrimoxazol, la rifampicina, los aminoglucósidos, los macrólidos, las lincosamidas, las fluoroquinolonas, las sulfamidas y la trimetoprima. Por otro lado, desarrolla con facilidad mutaciones cromosómicas y adquiere material genético exógeno que le confiere resistencia a compuestos habitualmente activos (Gamero-Delgado y col., 2007). Entre los mecanismos de resistencia desarrollados por *P. aeruginosa* se encuentran enzimas que degradan a los antibióticos (SEIMC, 2002) como: β -lactamasas, oxacilinasas, carbenicilinasas, cefamicinasas, carbamepenemasas, alteración de los sitios de unión a penicilina, cefalosporinasas cromosómicas desreprimidas, mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación en DNA-girasas, inactivación enzimática plasmídica y alteraciones de la permeabilidad (Gamero-Delgado y col., 2007).

En general, las bacterias han mostrado diferentes métodos de acción para contrarrestar el efecto de los antibióticos algunos de los mecanismos de resistencia incluyen: modificaciones en el blanco o antibiótico, expresión de enzimas que degradan al antibiótico y el rescate de la biogénesis de precursores de peptidoglicanos (De Smet y col., 1999; McCoy y col., 2003; Jiang y col., 2011). Si analizamos los mecanismos desarrollados por las bacterias para inactivar o eludir la acción de los fármacos tenemos por ejemplo al que evita el efecto de fosfomicina, misma que actúa reduciendo la concentración de precursores para peptidoglicanos, sin embargo existen otro tipo de estrategias adicionales involucradas (Chen y col., 2012 a ; Noda y col., 2004), como una familia de siete proteínas llamadas Mur (de la A a la G), que son consideradas excelentes blancos para desarrollar inhibidores que poseen actividad antibacteriana (Nikolaidis, 2014).

11. EFECTO ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS DE HONGOS CONTRA BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

El grupo de Kwon reporta que *G. lucidum* gracias a que estimula el sistema inmune, ayuda a contrarrestar el problema generado a partir de la resistencia a antibióticos por parte de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, dado que son bacterias que poseen una gran capacidad metabólica y de adaptación (Kwon y Lu, 2006). Además, *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias Gram negativas más persistentes en cuanto a resistencia a antibióticos sintéticos, sin embargo, muestra susceptibilidad a extractos de *G. lucidum* (Ofodile y col., 2011). En medios con fermentación sumergida de *G. lucidum* se ha reportado dicha actividad asociada a la producción de metabolitos del ácido ganodérico (Fang, 2002; Zhong y Tang, 2004). Por otro lado, resulta interesante determinar el contenido de constituyentes bioactivos que se producen tanto de material retirado de la madera muerta como en las diferentes etapas de crecimiento del hongo, lo que permitiría iniciar toda una línea de investigación para suplementar alimentos con los extractos de hongos y su aplicación en pacientes con enfermedades como gastroenteritis, bronquitis, infecciones del tracto urinario, de pulmón o del tracto respiratorio, por mencionar algunas (Ofodile y col., 2011).

En estudios con *G. lucidum* se identificaron hidroquinonas y triterpenoides que inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a meticilina, entre las que se encuentran algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, a dichas sustancias se les dio el nombre de ganomicinas (Mothana y col., 2000). Por esta razón se adquiere más interés la determinación, caracterización y actividad antibacteriana de los extractos de *G. lucidum*. Según el grupo de Vazirian (2014) se han realizado pocos estudios sobre el efecto antibacteriano de los compuestos purificados de *G. lucidum* y se propone que el efecto obtenido a partir de extractos crudos es resultado de la mezcla de distintas sustancias extraídas, dado que las sustancias aisladas no reflejan el mismo potencial (Vazirian, 2014).

12. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La propagación de bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos es un problema importante reconocido por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2012). El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos no es fenómeno nuevo, es una situación cada vez más problemática debido a la frecuencia con la que los nuevos fenotipos de resistencia surgen entre muchos patógenos bacterianos e incluso entre organismos comensales. Un número de métodos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana (en inglés Antimicrobial Susceptibility Testing) están disponibles para determinar la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Aunque existe una variedad de métodos, el objetivo de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* es proporcionar un predictor confiable, de cómo las bacterias

responden ante el tratamiento, así como a los antibióticos. Este tipo de información ayuda al profesional de la salud a elegir el antibiótico apropiado para el tratamiento de infecciones, contribuye al desarrollo de políticas para el uso de antimicrobianos y prevé la vigilancia epidemiológica. Los datos de vigilancia epidemiológica proporcionan una base para elegir el adecuado tratamiento empírico o tratamiento de primera línea y sirven para detectar la aparición y/o la propagación de cepas bacterianas resistentes. La selección de un método para un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana se basa en muchos factores, tales como los datos de validación, factibilidad, flexibilidad, automatización, costo, reproducibilidad, precisión, y la preferencia individual como lo sugiere la Organización Mundial Para la Salud Animal (en inglés World Organization For Animal Health) (OIE, 2012).

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés, anteriormente conocido como NCCLS), es una organización internacional, interdisciplinaria, sin fines de lucro, normativa y educativa, que promueve la formulación y aplicación de normas y recomendaciones por consenso voluntario en la comunidad que presta atención a la salud. El Instituto es reconocido en todo el mundo por la aplicación de un proceso de consenso único en la formulación de normas y recomendaciones para las pruebas realizadas en muestras de pacientes y las cuestiones relacionadas con la atención sanitaria.

La prueba de micro dilución en caldos aprobada por el CLSI para el efecto antibacteriana de sustancias con potencial antibacterial está estandarizada para probar antibióticos en forma de soluto o de polvo, por lo que reporta los resultados en una relación peso/peso. Esta es la razón por la que el presente estudio se maneja basándose en dicha prueba, solo que no se utiliza el extracto en polvo sino en forma líquida, de la siguiente manera. A partir de una solución madre, la cual contiene un caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*, se realizan diluciones seriadas 1:2 y se llevan a cabo las pruebas para la susceptibilidad a antibióticos, tomando como control positivo a la estreptomina, hasta encontrar la concentración mínima inhibitoria del caldo de cultivo de *G. lucidum* ensayado.

El presente trabajo tiene como propósito principal probar la actividad antibacteriana del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* contra cepas bacterianas susceptibles y resistentes a estreptomina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido motivo del desarrollo de investigaciones con el fin de reducirla. Este tipo de resistencia se agrava cuando se trata de bacterias patógenas, por lo que se propone una alternativa para el uso del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*. Las condiciones de cultivo *in vitro* para dicho hongo proporcionan gran variedad de sustancias bioactivas con potenciales aplicaciones médicas. Actualmente se reporta el efecto antibacteriano a base de extractos de este hongo en diferentes condiciones de cultivo. Sin embargo, es importante realizar estudios que prueben el efecto del caldo de dicho cultivo sumergido, que se desarrolla en el Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA. Además, es necesario probar su potencial antibacterial en cepas certificadas y las que han probado resistencia a antibióticos en este caso a estreptomina, con el fin de proporcionar una nueva alternativa para el control de bacterias principalmente patógenas.

JUSTIFICACIÓN

La producción de extractos obtenidos del cultivo sumergido a partir del micelio de *G. lucidum* suplementado con tiamina, desarrollado en el Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA, requiere de estudios que prueben su actividad antibacteriana, debido a su potencial benéfico y representa una alternativa para el control de diferentes grupos de bacterias incluyendo patógenas, para así contribuir al desarrollo de tratamientos contra infecciones bacterianas.

HIPÓTESIS

El caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* presenta efecto antibacterial contra cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, así como cepas de *Salmonella* previamente determinadas como susceptibles y las que son resistentes a estreptomicina.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Estudiar las propiedades antimicrobianas del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*, que se produce en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA.

2. Objetivos Particulares

1. Probar la actividad antimicrobiana del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* contra cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, así como cepas de *Salmonella* previamente determinadas en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos perteneciente al Departamento de Salud Pública del CUCBA, como susceptibles y resistentes a estreptomina.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria del caldo cultivo sumergido de *G. lucidum*, contra cepas de bacterias, certificadas como, así como resistentes y susceptibles a la estreptomina.
3. Determinar la actividad antimicrobiana del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* centrifugado, filtrado, liofilizado y separado según su peso molecular contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, así como cepas de *Salmonella* previamente determinadas en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos como susceptibles y resistentes a estreptomina.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos, del Departamento de Salud Pública. El caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología perteneciente al Departamento de Botánica y Zoología, todos forman parte del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad de Guadalajara.

I. Descripción de las Cepas

En este experimento se utilizaron las siguientes cepas ATCC (American Type Culture Collection): *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Además se manejaron cepas de *Salmonella spp.*, que forman parte del cepario del laboratorio de Inocuidad Alimentaria previamente aisladas de alimentos y que en estudios previos mostraron resistencia a distintos antibióticos, entre los que se encuentra la estreptomina.

II. Preparación del Estándar 0.5 de Mc. Farland

La escala del Mc. Farland consiste en una serie de diluciones que se utilizan para determinar por comparación de turbidez la concentración bacteriana en los caldos nutritivos. Para la preparación del estándar 0.5 de Mc. Farland se utilizaron 0.5 ml de cloruro de bario (BaCl_2) y 9.5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), en un tubo estéril y se homogenizó durante 5 mins. Se tomó lectura en el espectrofotómetro a 625 nm de longitud de onda y se obtuvo una lectura de absorbancia de 0.08 a 0.13, que equivale a 1.5×10^8 UFC/ml. Se comparó a simple vista el tubo con el inóculo y el estándar de Mc. Farland y se utilizó una tarjeta de fondo blanco con líneas negras de contraste para comparar la turbidez de los dos tubos.

III. Reactivación de las Cepas Bacterianas

Para la reactivación de la cepa a probar se seleccionaron colonias aisladas y morfológicamente similares e identificadas previamente en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos. Se inocularon en caldo soya tripticasa, se agitaron en “vórtex” (Genie) y se incubaron durante 24 hrs a 37°C , este proceso se llevó a cabo durante tres días consecutivos y por lo que se obtienen tres cultivos, uno para cada día. El último inóculo en suspensión bacteriana, homogéneo se compara con el tubo que tiene el reactivo de Mc. Farland. Todo el proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo mechero.

IV. Reto Bacteriano

El reto consistió en realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana basados en las recomendaciones del CLSI para determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), con algunas modificaciones y como control positivo se probó un tubo con 1,240 µg/mL de Estreptomicina, así mismo en otro tubo se probó la viabilidad de las bacterias colocándolas sin antibiótico y sin caldo de cultivo sumergido. Las bacterias enfrentadas al caldo total de cultivo sumergido de *G. lucidum*, se inocularon en tubos de 13x100 mm que contenían 3 ml de caldo Mueller-Hinton (MH) esterilizado, y que previamente se le adicionaron volúmenes correspondientes a 10 diluciones seriadas 1:2 de la solución del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*. Mismo que se recibió de forma líquida a partir de los cultivos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología, pertenecientes al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. El caldo se utilizó completo o total, así como sus distintas diluciones y para distintos procesos de separación: mediante filtración con membrana de 0.22 µ de tamaño del poro; centrifugado a 2,500 rpm durante 10 min y mediante una separación en cartuchos AMICON (Millipore, Francia) que permiten separar las moléculas a partir de 3,000 Daltones. Después de cultivar las bacterias se mezclaron con el caldo de cultivo sumergido, durante 24 hrs a 35 °C. Para estimar las UFC se procedió a realizar la comparación de turbidez con la escala de Mc. Farland a los tubos con las cepas que se utilizaron en el reto, posteriormente se inoculó las bacterias en tubos que contenían el caldo de cultivo sumergido diluido 1:2, utilizando un tubo para cada una de las 10 concentraciones. Se homogenizaron por agitación en vortex (Genie) durante unos segundos, se incubaron a 35°C por 24 hrs a 35°C. Se comprobó el crecimiento bacteriano en los tubos de caldo MH por su turbidez y se consideró inhibición del crecimiento en aquellos tubos que no presentaban dicha turbidez. De dichos tubos se sembraron las bacterias en agar sangre en las pruebas de confirmación de los resultados.

V. Extracto de Esporas

A partir de esporas de *G. lucidum* se realizaron pruebas con un extracto acuoso, que se preparó mezclando las esporas a razón de 1 gr/mL de agua. Se dejaron reposar 24 hrs a 4 °C y se centrifugaron a 2,500 revoluciones por minuto durante 10 minutos y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo el reto con las bacterias.

VI. Caldo de Cultivo para *G. lucidum*

Por otro lado, se probó la actividad antibacteriana del caldo donde se cultiva el hongo, en las mismas condiciones en que se probó el caldo de cultivo después de desarrollar el micelio y que se reporta en la sección de resultados.

VII. Caldo de Cultivo Liofilizado de *G. lucidum*

Finalmente se realizó el reto bacteriano al liofilizado de caldo de cultivo sumergido, mismo que se procesó en liofilizadora (Labconco, modelo 4.5) y se utilizó a razón de 1,240 µgr/mL de agua y sus diluciones en forma descendente, hasta 7 diluciones.

VIII. Cultivo en Agar Sangre

De los tubos en donde se colocó el inóculo, más el caldo total del cultivo sumergido de *G. lucidum*, y que no presentaron turbidez después de la incubación, se inoculó una alícuota en agar sangre. El cultivo en agar sangre se incubó a 35 °C durante 24 hrs para confirmar si existe o no la presencia de bacterias sobrevivientes en los tubos de caldo MH y donde no se apreció turbidez a simple vista. De tal manera que los resultados obtenidos mostraron las cantidades del caldo de cultivo sumergido en el que se encuentra inhibición total del crecimiento bacteriano.

IX. Diagrama de Descripción de la Metodología

En este diagrama se muestra paso a paso los procesos a los que se sometieron las bacterias y el caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*, según se explica en la Metodología.

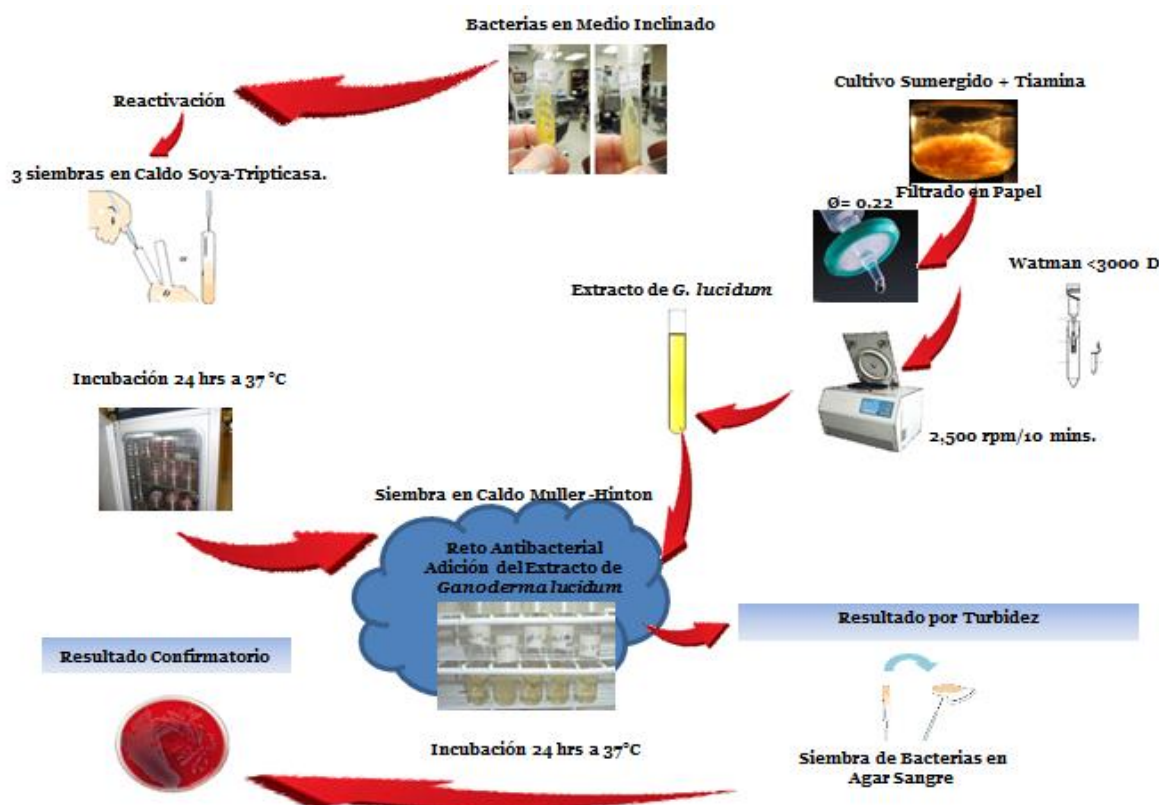


Fig. 3. Diagrama de Flujo de la Metodología utilizada en el presente trabajo.

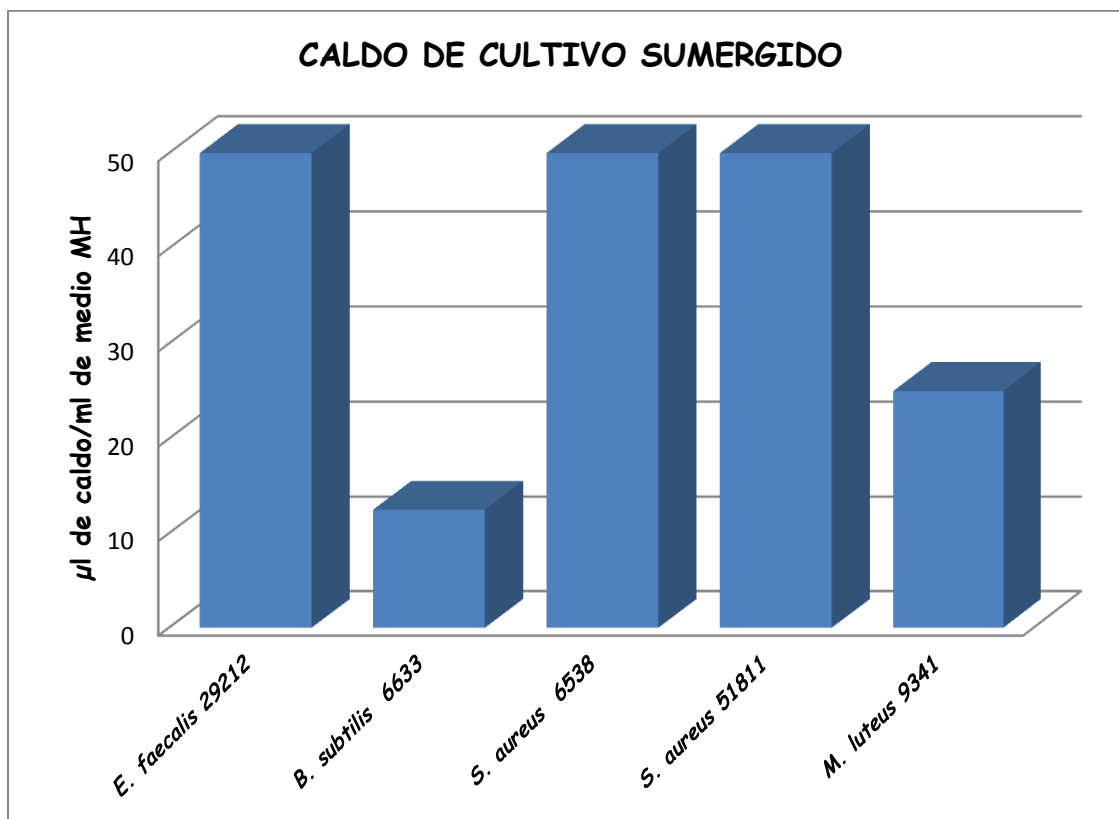
X. Análisis Estadístico

Para la comparación de los resultados obtenidos se utilizó T de “Stúdent” para pruebas pareadas, comprobando que los resultados seguían una distribución normal.

RESULTADOS

1. Caldo de Cultivo Sumergido

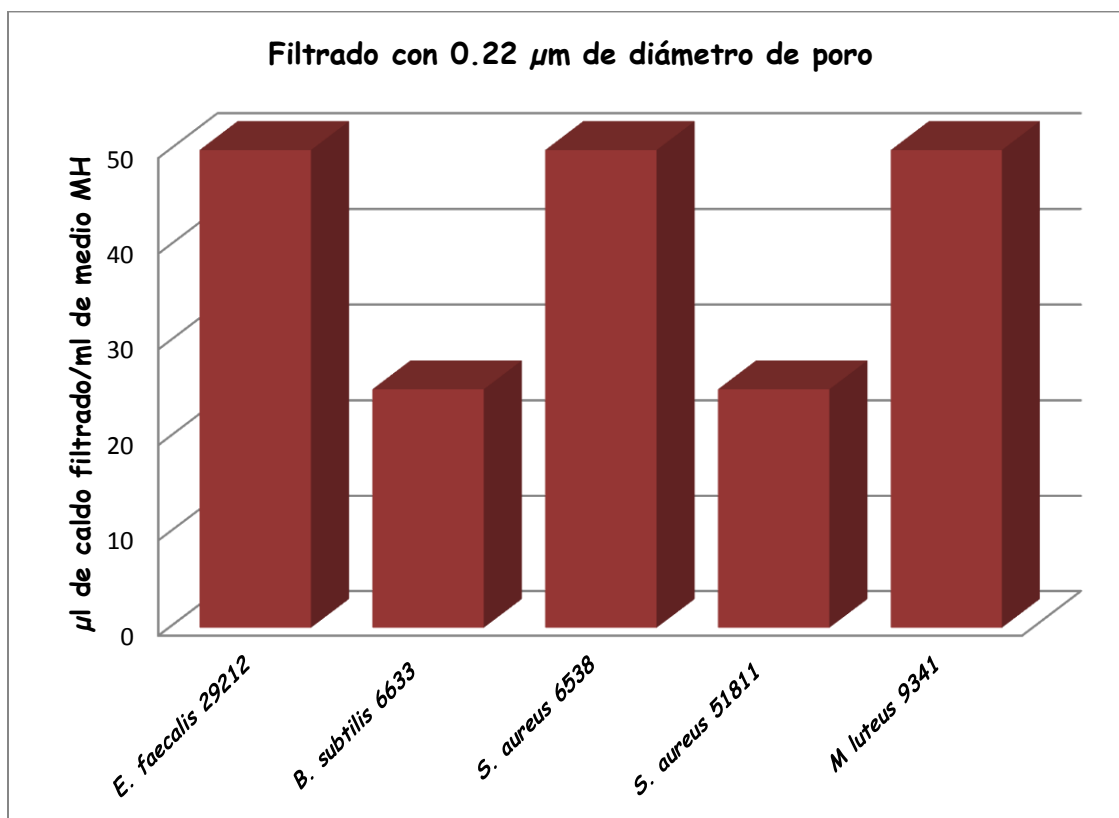
Los resultados presentados en la gráfica 1 muestran la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*, en la que tienen un efecto antibacteriano sobre las cepas ATCC como lo son 50 μ L del caldo de cultivo sumergido en 1 mL de caldo de cultivo bacteriano para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 51811 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, mientras que para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 fue de 25 μ L de extracto en 1 mL de caldo de cultivo bacteriano MH.



Gráfica 1. Se muestra la CMI obtenida en los experimentos, donde se reta a las cepas bacterianas certificadas contra el caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*, según se menciona en la sección de metodología.

2. Caldo de Cultivo Sumergido Filtrado

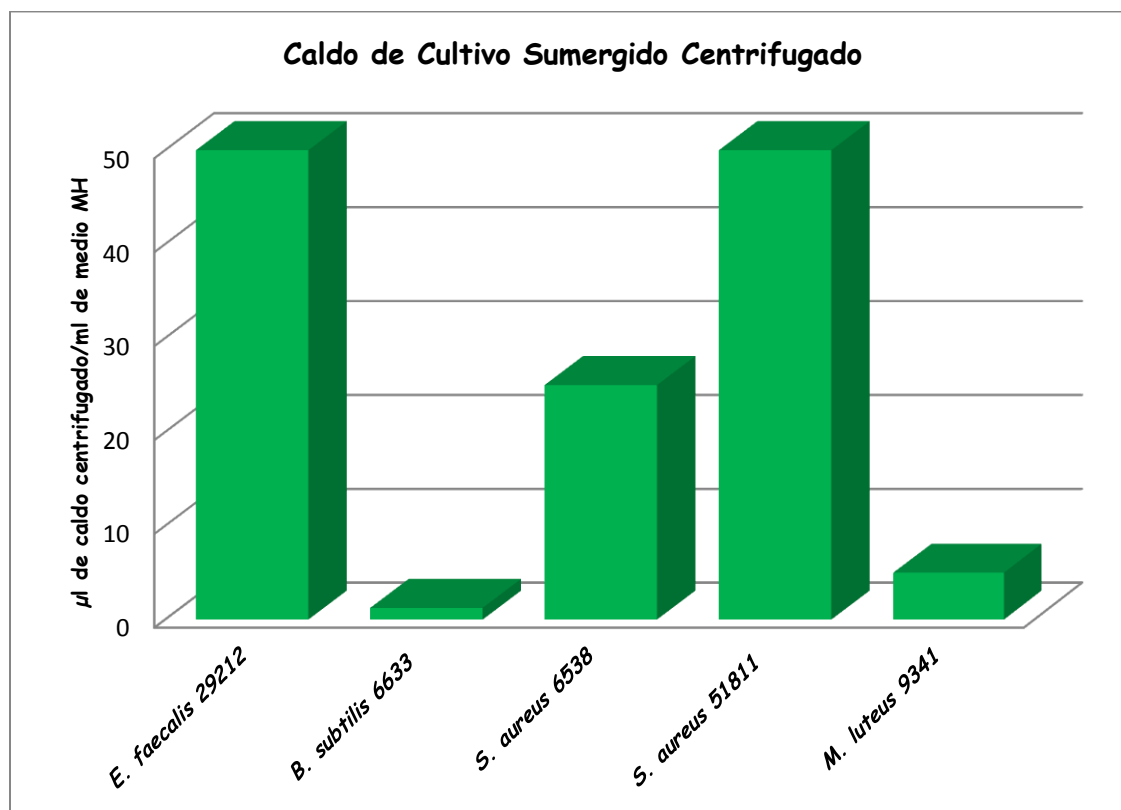
En la gráfica 2 se presenta la reproducibilidad de los resultados para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, como se observa para el experimento caldo de cultivo sumergido, con 50 μ L del extracto filtrado. Además, este tipo de tratamiento logra una CMI a 25 μ L del caldo de cultivo sumergido filtrado para las cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Sin embargo, para *Micrococcus luteus* ATCC 9341, donde la CMI se elevó al doble, respecto al caldo de cultivo sumergido, o sea 50 μ L de volumen del caldo MH, donde se llevó a cabo el reto bacteriano con el filtrado del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* y que se obtuvo después de pasarlo por una membrana de 0.22 μ m de diámetro de poro (Millipore, Francia).



Gráfica 2. Se muestra la CMI obtenida en los experimentos, donde se reta a las cepas bacterianas certificadas contra el caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* filtrado mediante membrana de nitrocelulosa con 0.22 μ m de diámetro, según se menciona en la sección de metodología.

3. Caldo de Cultivo Sumergido Centrifugado.

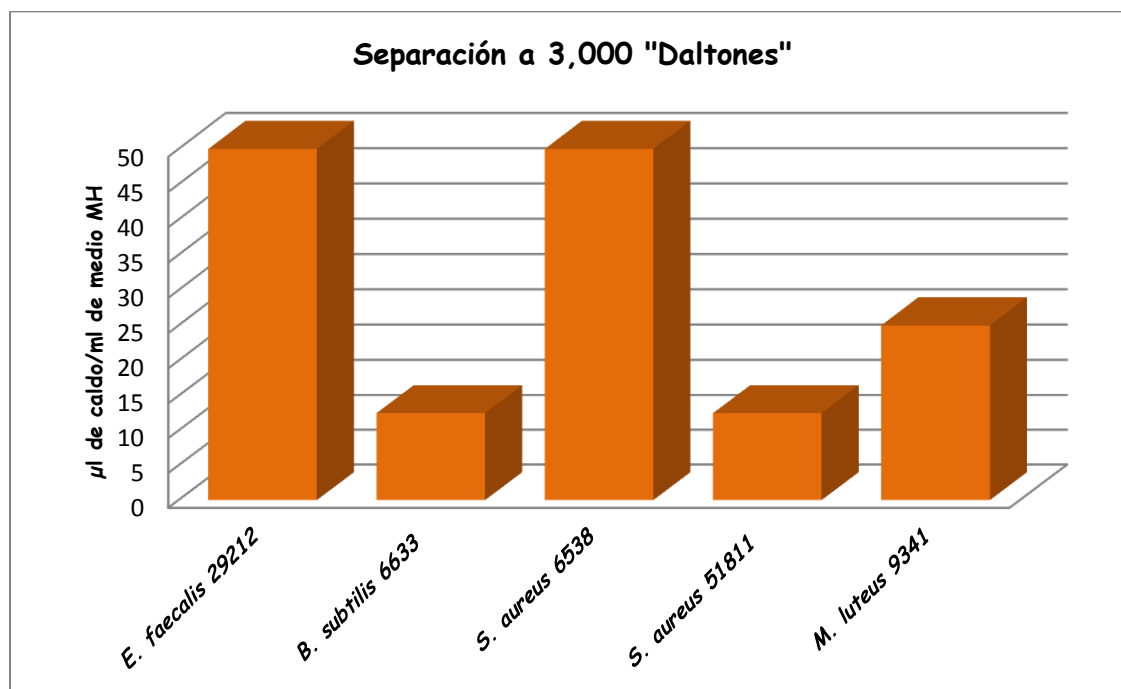
Los resultados obtenidos con el caldo de cultivo sumergido centrifugado muestran que *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 51811 son eliminadas con 50 μ L del mismo. Además, se observa la CMI más baja del presente trabajo con 1.25 μ L del centrifugado para *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Adicionalmente, se obtuvo una CMI con la mitad del caldo de cultivo sumergido centrifugado para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, respecto a las dos pruebas anteriores, donde se probó el caldo de cultivo sumergido, así como su filtrado. De manera similar se alcanza una CMI con sólo 5 μ L, cuando se utiliza caldo de cultivo sumergido centrifugado, para la cepa de *Micrococcus luteus* ATCC 9341, ver Gráfica 3.



Gráfica 3. Se muestra la CMI obtenida en los experimentos, donde se reta a las cepas bacterianas certificadas contra el caldo de cultivo sumergido de cultivo sumergido de *G. lucidum* y que fue centrifugado a 2,500 revoluciones por minuto, durante 10 mins, siguiendo el procedimiento que se menciona en la sección de metodología.

4. Separación por Peso Molecular

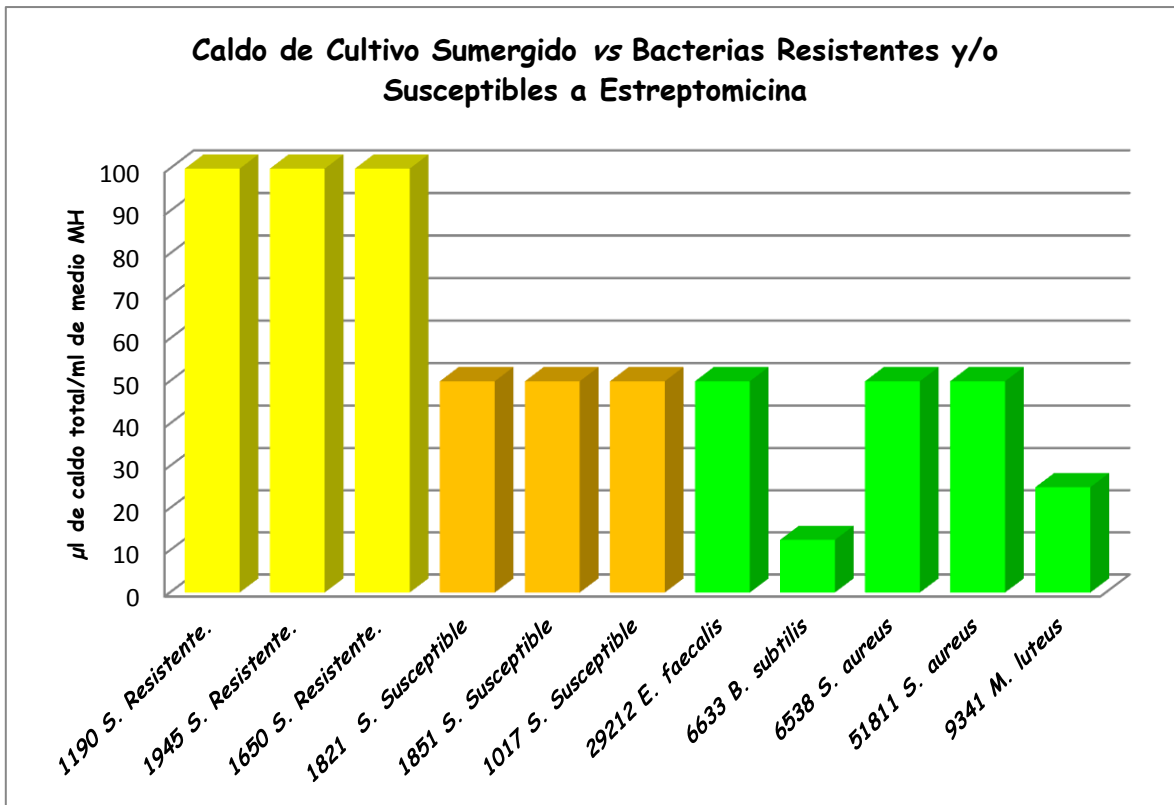
Para probar el efecto antibacteriano de las moléculas menores a 3,000 “Daltones”, así como las de mayor peso molecular, se probó la fracción del caldo de cultivo sumergido que no pasó la membrana del cartucho AMICON y los resultados no mostraron actividad contra las bacterias probadas (datos no presentados), mismas que fueron susceptibles a la fracción correspondiente a moléculas con peso molecular menor a 3,000 “Daltones”. En la gráfica número 4 destacan los resultados obtenidos para *Bacillus subtilis* ATCC 6633, así como para *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, donde se logra una CMI con sólo 12.5 µL de las moléculas que atravesaron la membrana para 3,000 “Daltones”. Sin embargo, no es así para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, donde volvemos a una CMI con 50 µL del caldo de cultivo sumergido. Por otro lado, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 con un efecto bactericida a partir de 25 µL del líquido que pasó a través de la membrana AMICON (Millipore, Francia).



Gráfica 4. Se muestra la CMI obtenida en los experimentos, donde se reta a las cepas bacterianas certificadas contra el caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* y que fue centrifugado para separar las moléculas, a partir de 3,000 “Daltones” de peso molecular, según se menciona en la sección de metodología.

5. Caldo de Cultivo Sumergido Contra Cepas Resistentes y/o Susceptibles a Estreptomicina

En la exposición del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* se puede apreciar, en la gráfica número 5, un efecto antibacteriano en todas las cepas de bacterias probadas. La gráfica muestra como las cepas resistentes a Estreptomicina de la especie *Salmonella* con asignación numérica 1190, 1945 y 1650 inhiben su crecimiento con 50 μ L de caldo de cultivo sumergido, en un mL del medio MH utilizado para la prueba. De manera similar los resultados se reproducen para las cepas susceptibles al antibiótico de prueba, asignadas con los números 1821, 1851 y 1017, pero con sólo 25 μ L del caldo de cultivo sumergido. Además, se puede apreciar la reproducibilidad que confirma los resultados para las cepas certificadas y que se corrieron junto con el experimento para cepas resistentes y susceptibles.



Gráfica 5. Se muestra la CMI obtenida en los experimentos donde se reta a las cepas bacterianas certificadas, así como aquellas de *Salmonella* resistentes y susceptibles a estreptomicina, contra el caldo de cultivo sumergido *G. lucidum*, según se menciona en la sección de metodología.

6. Caldo de Cultivo Sumergido Liofilizado

Cuando se probó el caldo de cultivo sumergido liofilizado del extracto total del cultivo sumergido de *G. lucidum*, se percibe la pérdida del efecto antimicrobiano, contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6548, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 las cuales habían mostrado ser susceptibles al caldo de cultivo sumergido en forma líquida, estos datos no se presentan en gráfica por mostrar efecto negativo (datos no presentados).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas experimentales mostraron que el caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* se encontró su efectividad a partir de una concentración de 50 μL (5% del volumen total en el medio de cultivo bacteriano), en todas las cepas de prueba, este resultado es similar al encontrado por Albino, 2007, en el cual investigó el efecto antimicrobiano por medio del método de micro dilución del extracto austrálico de *G. lucidum*, que mostró susceptibilidad de cepas como *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Echerichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Albino 2007). También coincide con lo reportado por Zuluaga (2007), el cual menciona que existe actividad bactericida del extracto etanólico de *G. lucidum* sobre una bacteria Gram positiva como lo es *S. aureus* y una gram negativa con *E. coli*. (Zuluaga 2007).

Tratando de separar los distintos componentes bioactivos para probar su efecto antibacterial, se utilizaron métodos de separación de moléculas como fue centrifugación, filtrado por membrana de 0.22 nm, y filtrado con cartuchos (Amicon 3, Millipore, Francia) de 3,000 Daltones. Se encontró un efecto antibacteriano con menor cantidad de extracto, lo que indica que las moléculas que proporcionan dicho efecto son de bajo peso molecular y que se conserva su estructura química, al menos para inhibir el desarrollo bacteriano. Según reportes previos dichas moléculas en este tipo de cultivo corresponden a alcaloides, terpenoides y de naturaleza fenólica (Ofodile y col., 2011; Yihuai y col., 2003; Ofodile, 2006; Yoon y col., 1994; Chai y col., 1997; Yihuai y col., 2003), así como algunos metabolitos secundarios que inclusive muestran efecto contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos sintéticos como lo mencionan Patrick y col. (1998) y Ryan y Ray, (2004). En el caso de los triterpenoides de *G. lucidum* son los principales metabolitos secundarios, de los cuales se conocen aproximadamente 316, todos con estructura tipo lanostano tetracíclico y difíciles de elucidar dada su similitud. La mayoría de los triterpenoides de *Ganoderma* exhiben un extenso rango de actividades biológicas en las que incluyen la actividad antimicrobiana, misma que de forma aislada se le adjudica a un solo compuesto, de entre los 316 estudiados con ^{13}C -Resonancia Magnética Nuclear, contra *Micobacterium tuberculosis* H37Ra (Xia y col., 2014). Es importante enfatizar en los resultados que sugieren un efecto sinérgico entre triterpenoides y compuestos esteroides, además de los obtenidos con extractos crudos independientemente del tipo de cultivo de *G. lucidum* (Vazirian, 2014). Las limitantes para lograr su obtención a escala de laboratorio son su baja abundancia, los procedimientos complejos de extracción y purificación, además de la preparación de los triterpenoides de alta pureza a partir de *G. lucidum* (Xia y col., 2014).

Las distintas técnicas de separación utilizadas en esta investigación tratan de separar los distintos grupos de moléculas, que en conjunto o no pueden presentar efecto antibacteriano,

queda para estudios futuros la caracterización de dichas sustancias y su posible sinergismo. El efecto antibacteriano de diversas moléculas encontrado en el presente estudio coincide con lo reportado por De León (2010), en el cual demuestra el efecto del triterpenoide Zeylasterona aislado de *Maytenus blepharodes*, sobre *S. aureus*, utilizando la técnica de micro dilución en caldo.

Las pruebas con el liofilizado del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* mostraron resultados negativos al efecto antibacteriano (datos no presentados). Esto se puede explicar debido a la disminución en el contenido de agua que altera las interacciones moleculares, lo cual puede perder el efecto antibacteriano mostrado por el extracto crudo esta aseveración coincide con lo publicado por Suhnel y col., (2009). Por esta razón no resulta factible aplicarlo a las pruebas establecidas por la CLSI, debido a que recomienda que se utilicen sustancias solidas como son polvos (CLSI, 2009). Otra explicación para este fenómeno es lo que menciona Valentão y col., (2002) quien demostró que el cambio de concentración, mediante la liofilización, puede llevar a resultados contradictorios, por ejemplo en la capacidad antioxidante de sustancias de origen natural. Probablemente se deba establecer otro tipo de procedimiento para el caso del caldo de cultivo sumergido liofilizado de *G. lucidum*, aunque no se encuentre efecto a partir de 1,240 µg/ml del medio, y que también se analizó, como lo refiere la prueba de CLSI.

CONCLUSIONES

- El caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* presenta actividad antimicrobiana contra las cepas ATCC, así como cepas de *Salmonella* previamente identificadas en el Laboratorio de Toxicología Alimentaria del Departamento de Salud Pública del CUCBA como susceptibles y/o resistentes a estreptomina.
- La Cantidad o Concentración Mínima Inhibitoria del caldo de cultivo sumergido para *G. lucidum*, de todas las cepas probadas en el presente trabajo es de 1.25 a 50 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de medio de cultivo y según el método de separación.
- El rango de CMI del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum* contra cada cepa de bacterias resistentes y/o susceptibles a la estreptomina se encuentra entre 10 μL y 100 μL , respecto a 1 mL de volumen de medio de cultivo bacteriano.
- Existe actividad antimicrobiana del caldo de cultivo sumergido de *G. lucidum*, desde 1.25 μL del centrifugado, 25 μL del extracto filtrado y 10 μL del caldo de cultivo sumergido con peso molecular menor a 3,000 “Daltones”, contra las cepas ATCC empleadas en el presente trabajo *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Adaskaveg JE, Blanchette RA, y Gilbertson RL. 1991. Decay of Date Palm Wood by White-Rot and Brown-Rot Fungi. *Canadian J Bot.* 69: 615-629.

Albino EF, Monache FD, Yunes RA, Paulert R. y Junior AS. 2007. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma austral.* *Brazilian J of Pharmacognosy.* 17(1): 14-16.

Amselem J, Cuomo ChA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Arnaud Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier JM, Que´villon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anthouard V, Ross E, Beever I, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, Brault B, Chen Z, Choquer M, Colle´mare J, Cotton P, Danchin E, Da Silva C, Gautier A, Giraud C, Giraud T, Gonzalez C, Grossetete S, Idener UG, Henrissat B, Howlett BJ, Kodira Ch, Kretschmer M, Lappartient A, Leroch M, Levis C, Mauceli E, Neuve´glise C, Oeser B, Pearson M, Poulain J, Poussereau N, Quesneville H, Rasclé Ch, Schumacher J, Se´gurens B, Sexton A, Silva E, Sirven C, Soanes DM, Talbot NJ, Templeton M, y Yandav Ch. 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics.* 7 (8). e1002230.

Anónimo. 2009. Morelia, Michoacán, México, http://morelia.olx.com.mx/cafe-lingzhi-ganoderma-saludable-iid-62825398#resultset_static_pos_10

Batbayar S, Kim MJ, y Kim HW. 2011. Medicinal mushroom Lingzhi or Reishi, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst., beta-glucan induces Toll-like receptors and fails to induce inflammatory cytokines in NF-kappaB inhibitor-treated macrophages. *Int J Med Mushrooms.* 13(3):213-25.

Berovich M, Habijanac J, Zore I, Wraber B, Hodzar D, Boh B, y Pohleven F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J. Biotechnol.* 103: 77-86.

Bingji M, Wei R, Yan Z, Jinchuan M, Yuan R, y Chun-Nan W. 2011. Triterpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. *N Am J. Med Sci.* 3(11):495-498.

Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3. 5.1 million species. *Am J Bot.* 98: 426-438.

Boh B, Berovic M, Zhang J, y Zhi-Bin L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev.* 13:265-301.

Bowman WC, y Raud M. 1987. Farmacología: bases químicas y patológicas. 2 ed. La Habana: *Editorial Científico-Técnica.* 13:6-16.

- Broek P, 1989. Antimicrobial drugs, microorganism and phagocytes. *Rev Infect Dis.* 2: 213-8.
- Calderwood S, y Moellering D. 1988. Principios de tratamiento antiinfeccioso. En: Stein LH. Medicina interna. 2 ed. La Habana: *Editorial Científico-Técnica*:1469-1486.
- Chai H, Wang F, Zhang Z, y Yang Y. 1997. Constitution from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karst. *Zhongguo Zhongyao Zazhi Chinese J of Mat. Med.* 22:552-553.
- Chang R, 1996. Potential Application of *Ganoderma* Polysaccharides in the Immune Surveillance and Chemoprevention of Cancer. 153-160 En: Royse, D.J (ed). Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the Second International Congress
- Chang ST, y Miles PG. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact, (second ed), *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Chang S, y Buswell J. 1999a. Mushroom nutraceuticals. *World J. of Microbiol and Biotechnol.* 12: 473-476.
- Chang ST, y Buswell JA. 2008. Safety, quality control and regulational aspects relating to mushroom nutraceuticals. Proc. 6th Intl. Conf. Mushroom Biology and Mushroom Products: 188–195.
- Chang ST, y Miles PG. 1989. Edible mushrooms and their Cultivations. *CRC Press Inc.*, Boca Raton, Florida.
- Chang YH, Yang JS, Yang JL, Wu CL, Chang SJ, Lu KW, Lin JJ, Hsia TC, Lin YT, Ho CC, Wood WG, y Chung JG. 2009. *Ganoderma lucidum* Extracts Inhibited Leukemia WEHI-3 Cells in BALB/c Mice and Promoted an Immune Response *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(12):2589-2594.
- Chen LW, Horng LY, Wu CL, Sung HC, y Wu RT. 2012a. Activating mitochondrial regulator PGC-1 α expression by astrocytic NGF is a therapeutic strategy for Huntington's disease. *Neuropharmacology.* 63(4):719-32.
- Chen TQ, Li KB, He XJ, Zhu PG, y Xu J. 1998. Micro-morphology, chemical components and identification of log-cultivated *Ganoderma lucidum* spore. Lu M, Gao K, Si HF, Chen MJ. Proc '98 Nanjing Intl Symp Science & Cultivation of Mushrooms. 214. Nanjing, China. JSTC-ISMS.
- Chen S, Zhao S, Mcdermott PF, Schroeder CM, White DG, y Meng J. 2004. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella serovars* and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Probes.* 19: 195–201.

- Chen T, Wu Y, Wu J, Wang H, Mao F, y Wu J. 2013. Fatty acids, essential oils, and squalene in the spore lipids of *Ganoderma lucidum* by GC-MS and GC-FID. *Chemistry of Natural Compounds*. 49: 143-144.
- Chen XP, Wang WX, Li SB, Xue JL, Fan LJ, Sheng ZJ, y Chen YG. 2010. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effects on cervical cancer cells. *Carbohydr. Polym.* 80:944–948.
- Chen Y, Xie MY, Li WJ, Zhang H, Nie SP, y Wang YX. 2012c. An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from Lingzhi (*Ganoderma atrum*). *Food Science and Biotechnology*. 21:191–198.
- Chen YL, Hu CS, y Lin FY. 2007. Salvianolic acid B attenuates cyclooxygenase-2 expression in vitro in LPS-treated human aortic smooth muscle cells and *in vivo* in the apolipoprotein-E-deficient mouse aorta, *J Cellular Biochemistry*. 98:618–631.
- Chen Y, Zhu SB, Xie MY, Nie SP, Li W, y Li C. 2008. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal Chim Acta*. 623(2):146-156.
- Cho H, Uehara T, y Bernhardt TG. 2014. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*. 4; 159(6):1300-11.
- Chughtai B, Kavalier E, Lee R, Te A, Kaplan SA, y Lowe F. 2013. Use of Herbal Supplements for Overactive Bladder. *Rev Urol*. 15(3):93-96.
- Chu TTW, Benzie IFF, Lam CWK, Fok BSP, Lee KKC, y Tomlinson B. 2012. Study of potential cardioprotective effects of *Ganoderma lucidum* (Lingzhi): results of a controlled human intervention trial. *British J Nutri*. 107:1017–1027.
- Chung WT, Lee SH, Kim JD, Park YS, Hwang B, Lee SY, y Lee HY. 2001. Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. *J Biosci Bioeng*. 92(6):550-5.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Document m39-a3. Analysis and presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; *Approved Guideline, Third Edition*. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- Cole ST. 2014. Who will develop new antibacterial agents?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 369(1645):20130430.

Cong WR, Xu H, Liu Y, Li QZ, Li W, y Zhou XW. 2014. Production and functional characterization of a novel fungal immunomodulatory protein FIP-SN15 shuffled from two genes of *Ganoderma* species. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(13):5967-75.

CONSUPROFE, 2009. Oaxaca, Oaxaca, México.

http://oaxacadejuarez.olx.com.mx/consuprofe-quiere-que-disfrutes-de-una-bebida-deliciosa-como-cocozi-con-ganoderma-iid-54158312#resultset_static_pos_15

Cordiés L, Machado AR, y Hamilton ML. 1998. Principios Generales de la Terapéutica Antimicrobiana. *Acta Médica*. 8(1):13-27.

Crisan EV, y Sands A. 1978. Nutritional value, in The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. *Academic Press*. New York:137–168.

De León L, y Moujir L. 2007. Activity and mechanism of the action of zeysterone against *Bacillus subtilis*. *J of Applied Microbiology*. 104 (2008):1266–1274.

De Klerk GJ. 2007. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. En: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. George EF., Hall MA. y De Klerk GJ. Editores. Springer:115–173.

De León L, López MR, y Moujir L. 2010. Antibacterial properties of zeysterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*. 165:617–626.

De Smet KAL, Kempell KE, Gallagher A, Duncan K, y Young DB. 1999. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomycin resistance of recombinant MurA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 145:3177–3184.

Elisashvili V. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products. *Int J Med Mushrooms*. 14(3):211-39.

Faisal FY, Radwan J, Perez M, y Haque A. 2013. Apoptotic and Immune Restoration Effects of Ganoderic Acids Define a New Prospective for Complementary Treatment of Cancer. *J Clin Cell Immunol*. Suppl 3:004.

Falcón MR, Barrón JM, Romero AL, y Domínguez FM. 2011. Efecto adverso en la calidad proteica de los alimentos de dietas con alto contenido de fibra dietaria. *Rev Chil Nutr* 38:369-375.

Fang. Z. 2002. Submerged Fermentation of Higher Fungus *Ganoderma lucidium* for the Production of Valuable Bio-active Metabolites-Ganoderic and Polysaccharides. *Biochemical Engineering J*. 10:61-65.

- Fernández F, López J, Ponce LM, y Machado C. 2003. Resistencia Bacteriana Hospital Militar Central "Dr. Luis Díaz Soto". *Rev Cubana Med Milit.* 32(1):44-8.
- Fox A. 2002. Chemical markers for bacteria in extraterrestrial samples. *Anat Rec.* 268(3):180-5.
- Gamero-Delgado MC, García-Mayorgas AD, Rodríguez F, Ibarra A, y Casal M. 2007. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap.* 20(2):230-233.
- Gan KH, Fann YF, Hsu SH, Kuo KW, y Lin CN. 1998. Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *J of Natural Products.* 61:485-487.
- Gao YH, Zhou SF, Chen GL, y Ye XH. 2002. A phase 1/H Study of *Ganoderma lucidum* extract in patient with chronic hepatitis B. *Int J Med Mushrooms.*4:323-327.
- Gerber AL, Amania A, Monache D, Bianchi NJ, y Smania FA. 2000. Triterpenes and sterol from *Ganoderma australe*. Pat (Aphyllophoromycetidae). *I J M M.* 2:203-312.
- Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res.* 30(7):505-515.
- Hancock RE, y Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16(2):82-88.
- Hikino H., Konno C., Mirin Y. y Hayashi T. 1985. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Médica.* 51:339-340.
- Hirotsu M, Furuya T, y Shiro M. 1991. Cryptoporic acids H and I, drimane sesquiterpenes from *Ganoderma neo-japonicum* and *Cryptoporus volvatus*. *Phytochemistry.* 30:1555-1559.
- Holásková E, Galuszka P, Frébort I, y Öz MT. 2015. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Adv.* pii: S0734-9750(15)00057-9.
- Hsu MJ, Lee S, y Lin WW. 2002. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/akt signaling pathway. *J. Leukoc Biol.* 72:207-16.

- Hua KF. 2007. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance CD14 endocytosis of LPS and promote TLR4 signal transduction of cytokine expression. *J Cell Physiol.* 212(2):537–550.
- Huang HCh, Chen ChI, Hung ChN, y Liu YCh. 2009. Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture. *Bioprocess Biosyst Eng.* 32:217–224.
- Ji Z, Tang Q, Zhang J, Yang Y, Liu Y. y Pan YJ. 2011. Immunomodulation of bone marrow macrophages by GLIS, a proteoglycan fraction from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. *Int J Med Mush.* 13(5):441-8.
- Jia YF, Zhou XB, Meng H, y Zhang LX. 1993. Effects of Lingzhi on hemopoietic system in mice-inmunopharmacological study. In the research on *Ganoderma* (part 1). Zhu S. y Mori M. (eds). *Shangai Med. U. Press*, Shangai: 284-288.
- Jiang S, Gilpin ME, Attia M, Ting YL, y Berti P. 2011. Lyme disease enolpyruvyl-UDP-glcNAc synthase: fosfomycin-resistant MurA from *Borrelia burgdorferi*, a fosfomycin-sensitive mutant, and the catalytic role of the active site Asp. *Biochemistry.* 50:2205–2212.
- Johnson JW, Fisher JF, y Mobashery S. 2013. Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci.* 1277:54-75.
- Jong SC, y Birmingham JM. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* 37:101-134.
- Jordan K. 2004. Biologically active compounds form Aphyllophorales (Polypore) fungi. *J of Nat. of Prod.* 67(2):300-310.
- Kim RS. 1997. Suppressive effects of *Ganoderma lucidum* on proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *Mol Cell.* 7(1):52-55.
- Kim HW, y Kim BK. 2002. Recent advances on the biologically active triterpenoids of *Ganoderma lucidum*. In: *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics*. Lin ZB:10-19.
- Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, Shimizu K, y Tsunoo H. 1989. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, lingzhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *Biol. Chem.* 264(1):472-478.
- Kubota T, Asaka Y, Miura I, y Mori H. 1982. Structure of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Helv. Chim. Acta.* 65:611–619.

- Kuo MC, Weng CY, Ha CL, y Wu MJ. 2006. *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF-kappaB. *J Ethnopharmacol.* 103:217–222.
- Kwon D, y Lu CD. 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(5):1615-22.
- Lasukova TV, Arbuzov AG, Maslov LN, y Burkova VN. 2008. *Ganoderma lucidum* extract in cardiac diastolic dysfunction and irreversible cardiomyocytic damage in ischemia and reperfusion of the isolated heart. *Patol Fiziol Eksp Ter.* (1):22-5.
- Lee KS, Lee MW, y Le JY. 1989. Study soon the antimicrobial activity of *Poriacocos*. *J Mycology Korean.* 10:27-31.
- Lee SY, y Rhee HM. 1990. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 38(5):1359-64.
- Lei LS, y Lin ZB. 1992. Effects of *Ganoderma* polysaccharides on T cells subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response. *Acta Pharmaceutica-Sinica.* 27(5):331-335.
- Li Z, Liu J, y Zhao Y. 2005. Possible Mechanism Underlying the Antiherpetic Activity of a Proteoglycan Isolated from the Mycelia of *Ganoderma lucidum in vitro*. *J Biochem Mol Biol.* 38(1):34-40.
- Li FL, Zhang YM, y Zhong ZJ. 2011. Antihyperglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on streptozotocin-induced diabetic mice. *Int. J. Mol. Sci.* 12:6135–6145.
- Liang CJ, Lee CW, Sung HC, Chen YH, Chiang YC, Hsu HY, Tseng YC, Li CY, Wang SH, y Chen YL. 2014. *Ganoderma lucidum* Polysaccharides Reduce Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-1 β Expression in Cultured Smooth Muscle Cells and in Thoracic Aortas in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 305149.
- Liao SF, Liang CH, Ho MY, Hsu TL, Tsai TI, Hsieh YS-Y, Tsai CM, Li ST, Cheng YY, Tsao SM, Lin TY, Lin ZY, Yang WB, Ren CT, Lin KI, Khoo KH, Lin CH, Hsu HY, Wu CY, y Wong CH. 2013. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes. *PNAS.* 110(34):13809–13814.
- Lin FC, Yang XM, y Wang ZW. 2000. Conference Title: Science and cultivation of edible fungi. Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of

Edible Fungi, Maastricht, Netherlands. Editor Griensven LJLD Van. 2000. Volume 2. Editorial CRC Press; University of California, Riverside. ISBN 90-5809-145-7.

Lin JM, Lin CC, Chen MF, Takashi Ujiie T. y Takada A. 1995. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J of Ethnopharmacology*. 47(1):33–41.

Lin SC. 2000. Medicinal Fungi of China-Production and Products Development. Beijing, Beijing, China: *Chinese Agricultural Press*. China.

Lin Z, y Wang P. 2006. The pharmacological study of *Ganoderma* spores and their active components. *J of Pekin Univ. (Health Sciences)*. 38(5):541-547.

Lin ZB. 2001. Pharmacological effects of *Ganoderma lucidum*; in Modern Research of *Ganoderma lucidum*. Lin ZB. (ed.):219-283.

Lin ZB, y Zhang HN. 2004. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacol Sin*. 25:1387-1395.

Lindequist U, Niedermeyer THJ, y Jülich WD. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2(3):285-99.

Liu D, Gong J, Dai W, Kang X, y Huang Z. 2012a. The Genome of *Ganoderma lucidum* Provide Insights into Triterpenes Biosynthesis and Wood Degradation. *PLoS One*. 7(5):e36146.

Liu GQ, y Zhang KC. 2005. Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* Karst. A new understanding. *J Integrative Plant Biology*. 4:129–135.

Liu X, Xu SP, Wang JH, Yuan JP, Guo LX, Li X, y Huang XN. 2007. Characterization of *Ganoderma* spore lipid by stable carbon isotope analysis: Implications for authentication. *Anal Bioanal Chem*. 388:723-731.

Lu J, Qin JZ, Chen P, Chen X, Zhang YZ, y Zhao SJ. 2012. Quality Difference Study of Six Varieties of *Ganoderma lucidum* with Different Origins. *Front Pharmacol*. 3:57.

Lu Y, Wu X, Chen S, Yuan J, Lai C, Bao L, Sun L, y Lu W. 2011. Effectiveness of *Ganoderma lucidum* preparation in treating simian acquired immune deficiency syndrome. *Acta Acad Medicinae Sinicae*.:318-324.

Lv GP, Zhao J, Duan JA, Tang YP, y Li SP. 2012. Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chem Cent J*. 6(1):1-10.

- Ma L, Wu F, y Chen RY. 2003. Analysis of triterpene constituents from *Ganoderma lucidum*. *Acta Pharm Sin.* 38:50–52.
- Mao T, van De Water J, Keen CL, Stern JS, Hackman R, y Geshwin ME. 1999. Two mushrooms, *Grifola frondosa* and *Ganoderma lucidum*, can stimulate cytokine gene expression and proliferation in human T lymphocytes. *Int J Immunother.* 15(1):13-22.
- Marañón G.B. sin año, <http://www.dxnganodermalucidum.com/#!lista-de-precios/c1qcc>
- Mattila P, Konko K, Eurola M, Pihlava J, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, y Piironen V. 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food Chem.* 49:2343-2348.
- Mayzumi F, Okamoto H, y Mizuno T. 1997. Cultivation of Reishi. *Food Rev Int.* 13:365–73.
- McCoy A, Sandlin RC, y Maurelli AT. 2003. *In vitro* and *in vivo* functional activity of chlamydia MurA, aUDP-N-Acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. *J Bacteriol.* 185:1218–1228.
- Mediavilla A. 1997. Antibióticos aminoglucósidos y glucopéptidos. En: Florez J. 3ra. ed. *Farmacología humana*. Barcelona: MASSON S.A:1107-1122.
- Miyazaki T, y Nishijima M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharmacol Bull.* 29:3611–3616.
- Mizuno T, Wang G, Zhang J, Kawagishi H, Nishitoba T, y Li J. 1995. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Rev. Int.* 11:151–166.
- Mizuno T. 1996. A development on anti-tumor polysaccharides from mushroom fungi. *FFI J.* 167:69-85.
- Mizushima Y, Hanashima L, Yamaguchi T, Takemura M, Sugawara F, y Saneyoshi M. 1998a. A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun.* 249:17–22.
- Mizushima Y, Watanabe I, Togashi H, Hanashima L, Takemura M, Ohta K, Sugawara F, Koshino H, Esumi Y, Uzawa J, Matsukage A, Yoshida S, y Sakaguchi K. 1998b. Anergosterol peroxide, a natural product that selectively enhances the inhibitory effect of linoleic acid on DNA polymerase beta. *Biol and Pharmac Bull.* 21:444–448.

- Moazed D, y Noller HF. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*. 327:389–394.
- Mohsin M, Negi P, y Ahmed Z. 2011. Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. *Int J Med Mushrooms*. 13(6):535-44.
- Moncalvo J, y Ryvarden L. 1997. A nomenclatural study of the *Ganodermataceae* Donk. *Synopsis Fungorum*. 11:1-114.
- Morigawa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, y Ikekawa N. 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharmac Bull*. 34(7):3025-3028.
- Mothana RA, Jansen R, Jülich WD, y Lindequist U. 2000. Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod*. 63:416–4188.
- Nikolaidis I, Favini-Stabile S, y Dessen A. 2014. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Science*. 23:243-259.
- Nishitoba T, Sato H, y Sakamura S. 1987. Triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 26:1777–1784.
- Nonaka Y, Ishibashi H, Nakai M, Shibata H, Kiso Y. y Abe S. 1995. Effects of the Antlered Form of *Ganoderma lucidum* on Tumor Growth and Metastasis in Cyclophosphamide-Treated Mice. *J of Ethnopharmacology*. 47, 1(23)5:33–41.
- Ofodile LN, y Bikomo EO. 2008. Antibacterial Activity of *Ganoderma lucidium* from Nigeria. *Harmdad Medicus*. 51(1):14-17.
- Ofodile LN, Kokubum NU, Grayer ORJ, Ogundipe OT, y Simmonds MSJ. 2005. Antimicrobial Activity of Some *Ganoderma* Species from Nigeria. *Phytotherapia Research*. 19:210-213.
- Ofodile LN, Wanneka AO, y Oladipupo O. 2011. Effect of the Mycelial Culture of *Ganoderma lucidum* on Human Pathogenic Bacteria. *Int J of Biol*. 3(2):111-114.
- Ofodile LN. 2006. Taxonomy and Antimicrobial Activity of some Basidiomycetous Fungi in Southern Nigeria. PhD Thesis, Department of Botany and Microbiology, *University of Lagos*. Akoka, Lagos:6-44.

Oliveira M, Reis FS, Sousa D, Tavares C, Lima RT, Ferreira IC, Santos TD, y Vasconcelos MH. 2014. A methanolic extract of *Ganoderma lucidum* fruiting body inhibits the growth of a gastric cancer cell line and affects cellular autophagy and cell cycle. *Food Funct.* 255(7):1389-94.

Osińska-Jaroszuk M, Jaszek M, Mizerska-Dudka M, Bachowicz A, Piotr-Rejczak T, Janusz G, Wydrych J, Polak J, Jarosz-Wilkołazka A, y Kandefor-Szerszeń M. 2014. Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. Promising Bioactive Compound with Cytostatic and Antibacterial Properties. *Bio. Med Research International*. ID 743812, 10 págs.

Ourisson G, y Nakatani Y. 1994. The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chemistry & Biology*. 1:11-23.

Park Y, y Hahm KS. 2005. Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol.* 38(5):507-16.

Patrick R, Murray K, Rosenthal S, George SK, y Micheal AP. 1998. Medical Microbiology, *Mc Grawhill*. New York.

Petronelli A, Pannitteri G, y Testa U. 2010. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs*:880-892.

Pucci MJ, y Bush K. 2013. Investigational antimicrobial agents of 2013. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):792-821.

Qun Li Y, y Wang SF. 2006. Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Lett.* 28(11):837-41.

Rios JL. 2008. *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. *Revista de Fitoterapia Valencia España.* 8(2):135-146.

Riu H, Roig G, y Sancho J. 1997. Production of carpophores of *Lentinus edodes* and *Ganoderma lucidum* grown on cork residues. *Microbiologia SEM.* 13:185-92.

Ryan KJ, y Ray CJ. 2004. Sherris Medical Microbiology, *Mc Grawhill*, New York.

Sande M, y Mandell GL. 1982. Quimioterapia de las enfermedades: agentes antimicrobianos. En: Goodman Gilman A, Goodman LS. Las bases farmacológicas de la terapéutica. La Habana, *Editorial Científico-Técnica.* 2:1062-1165.

SEIMC. 2002. Resistencia a antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 20:147-5346.

- Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad GB y Bisen PS. 2009. *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol.* 10(8):717–42.
- Schloss PD y Handelsman J. 2004. Status of the Microbial Census. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4):686–691.
- Schueffler A, y Anke T. 2014. Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.* 31:1425–1448.
- Shamtssyan M. 2004. Immunomodulating and antitumor Action of extracts of several Mushrooms. *J Biochnol.* 113(1-3):77-83.
- Sheena N, Ajith TA, Mathew A, y Janardhanana KK. 2003. Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in south India. *Pharmaceutical Biology.* 41(8):564-567.
- Shiao MS. 2003. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities and pharmacological functions. *Chem Rec.* 3:172-80.
- Simon PM. 1996. Pharmaceutical oligosaccharides. *Drug Discovery Today.* 1:522–528.
- Soo TS. 1996. Effective dosage of the extract of *Ganoderma lucidum* in the treatments of various ailments. In Mushroom Biology and Mushroom Products, Royse, ed. *The Pennsylvania State University*:177-185. ISBN 1-883956-01-3.
- Stamets P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Berkeley, CA: *Ten Speed Press.*
- Stanley G, Harvey K, Slivova V, Jiang V, y Sliva D. 2005. *Ganoderma lucidum* supresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- β from prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:46-52.
- Sudheesh NP, Ajith TA, y Janardhanan KK. 2013. *Ganoderma lucidum* ameliorate mitochondrial damage in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats by enhancing the activities of TCA cycle enzymes and respiratory chain complexes. *Int J Cardiol.* 165(1):117-25.
- Suhnel S, Lagreze F, Ferreira JF, Campestrini LH, y Maraschin M. 2009. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae) *Braz. J. Biol.* 69(1):209-215.
- Sumano-López HS, y Ocampo-Caraberos L. 2006. Farmacología Veterinaria. Tercera Edición. *McGraw-Hill Interamericana Editores*, México.

- Tang YJ, y Zhong JJ. 2004. Modeling the kinetics of cell growth and ganoderic acid production in liquid static cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering J.* 21:259.
- Teng BS, Wang CD, Yang HJ, Wu JS, Zhang D, Zheng M, Fan ZH, Pan D, y Zhou P. 2011. A protein tyrosine phosphatase 1B activity inhibitor from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst and its hypoglycemic potency on streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *J Agric Food Chem.* 59(12):6492-500.
- Torres-Torres Mabel Gisela. 2007. Sistemática de Ganoderma (Fungy, Basidiomicota, Ganodermatales): aspectos morfológicos, moleculares y químicos. Tesis Doctorado. Universidad de Guadalajara.
- Valentão P., Fernandes E., Carvalho F., Branquinho P., Seabra R y Bastos M. 2002. Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. *J Biol. Pharm. Bull.* 25(10):1324-1327.
- Vazirian M, Faramarzi MA, Ebrahimi SE, Esfahani HR, Samadi N, Hosseini SA, Asghari A, Manayi A, Mousazadeh A, Asef MR, Habibi E, y Amanzadeh Y. 2014. Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) and its main compounds. *Int J Med Mushrooms.* 16(1):77-84.
- Vignoli R, y Seija V. 2002. Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y microbiología médica.* ISO 690, capítulo 35. Disponible en línea: (<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>) 30-06-2015.
- Wachtel S, Yuen J, Buswellj, y Benzie I. 2011. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi) A Medicinal Mushroom. En *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Segunda Edición. Capítulo 9. Editores: Benzie IFF, Wachtel-Galor S. Boca Raton (FL): *CRC Press*. Boca Raton (FL).
- Wainwright M. 1995. Introducción a la biotecnología de hongos. *Editorial Acribia*. Segunda edición. 57-73.
- Wagnerova L, Liskova A, Navarova J, Kristofova A, Trnovec T, y Ferencik M. 1993. The effect of two glucan carboxymethyl derivatives with various substitution degrees on cyclophosphamide immunosuppression in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 15:227-242.
- Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, y Ho CK. 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer.* 70(6):699-705.

- Wang HX. 2001. Studies on the anti-mitogenic, antiphage and hypotensive effects of several ribosome inactivating proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.128:359-366.
- Wang H, y Ng TB. 2006. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*. 27(1):27–30.
- Wang X, Zhao X, Malik M, Drlica K. 2010. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J Antimicrob Chemother*. 65:520–524.
- Wang CD, Teng BS, He YM, Wu JS, Pan D, Pan LF, Zhang D, Fan ZH, Yang HJ, y Zhou P. 2012a. Effect of a novel proteoglycan PTP1B inhibitor from *Ganoderma lucidum* on the amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. *Br J Nutr*. 108(11):2014-25.
- Wasser SP, y Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*. 19:65-96.
- Wasser SP, Coates P, Blackman M, Cragg G, Levine M, Moss J, y White J. Encyclopedia of Dietary Supplements. New York: Marcel Dekker; 2005. Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*):680–90.
- Wasson RG. 1968. Divine mushroom of immortality. *Harcourt, Brace, Jovanovich*, Los Angeles:80-93.
- Wei GX, Campagna AN, y Bobek LA. 2007. Factors affecting antimicrobial activity of MUC7 12-mer, a human salivary mucin-derived peptide. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6:14.
- Wen H, Kang S, Song Y, Sung SH, y Park S. 2010. Differentiation of cultivation sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach. *Phytochem Anal*. 21(1):73-9.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2010. Capítulo 6 y 9. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *OIE Terrestrial Animal Health Code*, Volume 1. OIE. Paris, France.
- Wu G, Qian Z, Guo J, Hu D, Bao J, Xie J, Xu W, Lu J, Chen X, y Wang Y. 2012. *Ganoderma lucidum* extract induces G1 cell cycle arrest, and apoptosis in human breast cancer cells. *Am J Chin Med*. 40(3):631-42.
- Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, Yang G, Shao Y, Zhang X, Mao X, Zhang L y She G. 2014 A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma spp*. 19(11):17478-535.

- Yang XJ, Liu J, Ye LB, Yang F, Ye L, Gao JR, y Wu ZH. 2006. *in vitro* and *in vivo* protective effects of proteoglycan isolated from mycelia of *Ganoderma lucidum* on carbon tetrachloride-induced liver injury. *World J Gastroenterol*. 12(9):1379-1385.
- Yang Q, Wang S, Xie Y, Sun J, y Wang J. 2010. HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *Int J Biolog Macromol*. 46(2):167-172.
- Yihuai U, Zhau S, Huang M, y Xu A. 2003. Antibacterial and Antiviral Value of the Genus *Ganoderma Species* (Amphylophoromycetideae): A Review. *Int J Med Mushrooms*. 5:235-246.
- Yoon SY, Eo SK, Kim YS, Lee CK, y Han SS. 1994. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Archives of Pharmacol Research*. 17(6):438-442.
- Zhang QH, y Lin ZB. 1999. Antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt. Tr.) P. Karst. (Lingzhi) (Aphylophoromycetideae) polysaccharides is related to tumor necrosis factor-alpha and interferon gamma. *Int J Med Mushrooms*. 1:207-15.
- Zhang W, Tao J, Yang X, Yang Z, Zhang L, Liu H, Wu K, y Wu J. 2014. Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 449(3):307-12.
- Zhang W, y Tang YJ. 2008. A Novel Three-Stage Light Irradiation Strategy in the Submerged Fermentation of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* for the Efficient Production of Ganoderic Acid and Polysaccharides. *Biotechnol Prog*. 24:1249-1261.
- Zhao H, Zhang J, Liu G, y Tansu N. 2011. Surface plasmon dispersion engineering via double-metallic Au/Ag layers for III-nitride based light-emitting diodes. *Appl. Phys. Lett*. 98(15):1511-15.
- Zhao JD, y Zhang XQ. 1994. Importance, distribution and taxonomy of *Ganodermataceae* in China. Proceedings of Contributed Symposium, B 5th International Mycological Congress, Vancouver:14-21.
- Zhong JJ, y Tang YJ. 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 87:25-59.
- Zhu M, Chang Q, Wong LK, Chong FS, y Li RC. 1999. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res*. 13:529-31.
- Zhu X, y Lin Z. 2006. Modulation of cytokines production, granzyme B and perforin in murine CIK cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Carbohydr Polym*. 63:188-97.

Zuluaga J, Pérez C, Angulo, A, Torres O, y Santafé G, 2007. Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia Et Technica*, Pereira, Colombia. XIII (33):329-332.

ANEXOS

ANEXO I. Caldo de Cultivo Bacteriano Mueller Hinton.

Caldo Mueller Hinton (DIFCO), posee una formulación de gramos por litro Infusión de carne 300.0 Peptona ácida de caseína 17.5, Almidón 1.5, Agar 15.0 y pH final de 7.3 ± 0.1 . Para preparar el caldo se suspendieron 21 grs del medio deshidratado en litro de agua destilada. Se dejó embeber de 10 a 15 min. Se calentó con agitación a temperatura constante. Se depositó 3 mL por tubo, en tubos de 16 x 100 mm que se taparon con tapa plástica, como lo establece la CLSI (por sus siglas en inglés: Institute of Standars Clinical and Laboratory). Se esterilizaron los tubos con caldo a 121°C, durante 15 mins en autoclave. Se enfriaron a temperatura ambiente y se guardaron a 4 °C para su conservación.

ANEXO II. Caldo Soya Trypticasa

De igual manera se utilizó Caldo Soya Trypticasa (DIFCO), cuya formulación por litro de agua es de 17.0 g, Triptona 3.0 g Soytona 2.5 g, Dextrosa 5.0 g, NaCl y 2.5 g de K_2HPO_4 . La solución a preparar se debe ajustar a 7.3 ± 0.2 de pH. Para su preparación se debe suspender de 30 g del medio deshidratado, por litro de agua destilada, se deja reposar de 10 a 15 min y se calienta con agitación, a temperatura constante. Se depositaron 3mL por tubo de 13 x 100 mm con rosca y cerrados con tapa plástica, según el CLSI (por sus siglas en inglés: Institute of Standars Clinical and Laboratory). Se esterilizaron a 121°C durante 15 mins en autoclave, se enfriaron a temperatura ambiente y se conservaron a 4°C en refrigerador.

ANEXO III. Preparación del Reactivo de Mc. Farland

El Mc. Farland es una solución salina que se utiliza para determinar por comparación de turbidez y se asocia con la concentración bacteriana en los caldos nutritivos. Para la preparación del Mc. Farland a una escala de 0.5 se utilizaron 0.5 ml de cloruro de bario ($BaCl_2$) y 9.5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), estos reactivos se colocaron en un tubo de 10 ml estéril y se homogenizaron, durante 5 min. Se tomó lectura en el espectrofotómetro a

una longitud de onda de 625 nm en un rango de 0.08 a 0.13 de unidades de absorbancia. 0.5 de Mc. Farland equivale a 1.5×10^8 UFC/ml de bacterias. Se comparó la turbidez del tubo con bacterias y el tubo con el reactivo de Mc. Farland.