



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Eduardo Valenzuela F.

INSTITUTO: Microbiología

FACULTAD : Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Prof. Armin Mella N.

INSTITUTO: Microbiología

FACULTAD : Ciencias

**“DETERMINACIÓN DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
ANTIFÚNGICA DESDE CEPAS DE HONGOS COMESTIBLES”.**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

FERIAL SAJER SIMO

VALDIVIA-CHILE

2008

A Dios,

A mi madre Leyla Simo,

a mi padre Gabriel Sajer (Q.E.P.D)

y a mis hermanos Yakoub y Abjar.

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Valenzuela, por su apoyo científico, buena disposición durante el desarrollo de la presente tesis, y por sobre todo por su paciencia, tiempo, dedicación y calidad humana manifestada en todo momento.

Al Profesor Armin Mella por hacer muy agradable y amena la estadía en el Laboratorio de Microbiología, por su buena disposición en todo momento y por estar siempre dispuesto a ayudar y orientar, gracias Sr. Mella.

Al profesor Juan Carlos Paredes por tener siempre una buena disposición ante cualquier duda.

A todo el personal de Microbiología por estar siempre dispuestos a ayudar y hacer las horas de Laboratorio muy agradables, en especial a Don Nelson y a la Sra Tere, Sra Paty, Sra Vicky por su calidez humana. Y a Miguel y Natalia por generar un ambiente cálido y amistoso.

A mis amigas de infancia, Claudia, María Olga, Yita, Paty, Pollito, Pachi, por ser las mejores amigas y apoyarme siempre en los buenos y malos momentos.

A Alejandro por ser un excelente amigo, gracias por tu apoyo, amistad y comprensión en mis últimos años de formación universitaria.

A Nicole por ser mi gran amiga y compañera de Universidad, por hacer más entretenidos nuestros días de estudio, y por todos los buenos momentos que pasamos juntas.

A Karin y Kathy, por ser mis compañeras y amigas, por aquellas noches de estudio y buenos momentos compartidos.

A la tía Mana, por brindarme su cariño, amistad, y hacerme sentir como una integrante más de su familia.

A mi primo Jack, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis tios Moris y Nadia, por brindarme un hogar en Valdivia y ayudarme siempre que lo necesité.

A mis queridas primas Lara y Dina, por permitirme compartir su hogar con ellas.

A Vivi y Jaime por su buena disposición en todo momento.

A Claudita por tu amistad y apoyo.

A mi querido Yiyi , que durante bastante tiempo tuviste la paciencia para apoyarme profundamente, gracias por brindarme tu comprensión, cariño y amor, por enseñarme a enfrentar los obstáculos sin desesperar y hacer de esos momentos un verdadero vivir.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1 Materiales.....	10
3.1.1 Material Biológico.....	10
3.1.2 Reactivos.....	10
3.1.3 Equipos.....	10
3.1.4 Otros.....	11
3.2 MÉTODOS	11
3.2.1 Masificación de cepas control.....	11
3.2.2 Masificación de las cepas fúngicas ensayadas.....	12
3.2.3 Cultivo líquido de las 8 cepas fúngicas en estudio.....	12
3.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los cultivos líquidos de cepas fúngicas en ensayo.....	13
3.2.5 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los micelios obtenidos de las cepas fúngicas ensayadas.....	14
3.2.6 Determinación <i>in vitro</i> de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) del cultivo líquido obtenido de la mejor cepa fúngica ensayada.....	14

3.2.7	Determinación <i>in vitro</i> de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) del micelio obtenido posfiltrado de la mejor cepa fúngica ensayada.....	15
3.2.8	Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6639).....	16
4.	RESULTADOS	17
4.1	Masificación de las cepas fúngicas ensayadas.....	17
4.2	Cultivo líquido de las 8 cepas fúngicas ensayadas.....	18
4.2.1	Determinación del peso fresco y seco de los micelios obtenidos de las 8 cepas fúngicas en estudio cultivadas en caldo malta al 1%.....	18
4.2.2	Determinación de la masa micelial final de cada cepa fúngica ensayada.....	19
4.3	Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los cultivos líquidos de las cepas fúngicas en ensayo.....	20
4.4	Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los micelios obtenidos de las cepas fúngicas en ensayo.....	22
4.5	Determinación <i>in vitro</i> de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) del cultivo líquido como del micelio obtenido de la mejor cepa fúngica ensayada.....	24
5.	DISCUSIÓN	25
5.1	Masificación de las cepas fúngicas ensayadas.....	25
5.2	Cultivo líquido de las 8 cepas fúngicas ensayadas.....	27

5.2.1	Determinación del peso fresco y seco de los micelios obtenidos de las 8 cepas fúngicas en estudio cultivadas en caldo malta al 1%.....	27
5.2.2	Determinación de la masa micelial final de cada cepa fúngica ensayada.....	28
5.3	Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los cultivos líquidos de las cepas fúngicas en ensayo.....	28
5.4	Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los micelios obtenidos de las cepas fúngicas en ensayo.....	29
5.5	Determinación <i>in vitro</i> de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) tanto del cultivo líquido como del micelio obtenido de la mejor cepa fúngica ensayada.....	30
6.	CONCLUSIONES.....	31
7.	LITERATURA CITADA.....	32
8.	ANEXO.....	37

1. RESUMEN

Existe una constante necesidad por encontrar nuevos fármacos con propiedades antibióticas, debido a la resistencia que presentan algunos patógenos a los medicamentos tradicionales. Por otra parte, se sabe que los hongos comestibles cultivables son altamente valorados por sus características nutritivas y a algunos se les atribuyen propiedades medicinales. Se estudió la producción de metabolitos antibacterianos y antifúngicos desde micelios y cultivos líquidos de ocho cepas fúngicas de hongos comestibles (*Agrocybe aegerita*; *Fistulina hepatica*; *Hericiium erinaceus*; *Hypsizygyus marmoreus*; *Pholiota nameko*; *Stropharia rugoso-annulata*; *Tremella fuciformis* y *Volvariella volvacea*). Cada cepa fue sembrada individualmente en placas Petri que contenían agar extracto malta al 2 % e incubadas por 10 días a 23 °C, luego de su crecimiento fueron cultivadas en botellas previamente estériles que contenían cada una de ellas malta al 1 %, las botellas sembradas se incubaron en agitación constante a 1500 r.p.m. por 15 días a 15 ± 2 °C. Finalizado lo anterior se procedió a separar el micelio del cultivo líquido y posteriormente se les determinó mediante halos de inhibición su capacidad antibacteriana sobre tapices de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*, y su capacidad antifúngica sobre tapices de *Candida albicans*. De acuerdo a los resultados se seleccionarían aquellas cepas que presentaran una buena inhibición y se les determinaría *in vitro* la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL). Se determinó que alícuotas (10, 50 y 100 μ L) del cultivo líquido de la cepa *Hericiium erinaceus* produjeron halos de inhibición en tapices de la cepa control *B. subtilis*.

1.1 SUMMARY

There is a constant need to find new drugs with antibiotic properties due to resistance of some pathogens to traditional medicines. Otherwise, it is known that the cultivable edible mushrooms are highly valued because of their nutritional characteristics. In fact, medicinal properties are attributed to some species. In this study the production of antibacterial or antifungal metabolites from mycelia and liquid-culture of eight strains of edible mushrooms (*Agrocybe aegarita*; *Fistulina hepatica*; *Hericium erinaceus*; *Hypsizygus marmoreus*; *Pholiota nameko*; *Stropharia rugoso-annulata*; *Tremella fuciformis* and *Volvariella volvacea*) was studied. Each strain was grown in Petri dishes containing malt extract agar 2% and incubated for 10 days at 23 °C. After growing, the strains were cultivated in flasks with broth malt 1%. The sown flasks were then incubated in agitation at 1500 r.p.m, for 15 days at $15 \pm 2^\circ$ C and the mycelium was separated from the liquid-culture. For both, the mycelium and the liquid- culture antibacterial capability was evaluated by measuring inhibition halos over cultivated of microorganism *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Antifungal capability was measured over cultivated microorganism *Candida albicans*. According with those potential results, those strains presenting a good antibacterial or antifungal capability would be selected for determinations *in vitro* of minimum inhibitory concentration (MIC), lethal media concentration (MLC) and lethal concentration (CL) . The results indicated that aliquots (10, 50 and 100 μ L) from liquid-culture of *Hericium erinaceus* produced inhibition halos in the cultivated control strain of *Bacillus subtilis*.

2. INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de un centenar de especies de hongos saprófitos que pueden ser cultivados. En los mercados comerciales predominan las especies *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp., estos representan más o menos el 75% de las especies cultivadas en el mundo. Las especies mayormente cultivadas crecen en una amplia variedad de sustratos orgánicos, hubo un gran incremento en la producción en los últimos diez años del siglo XX, sobre todo como resultado del aumento de la productividad en China (Chang, 1999). Por otra parte, en el Proyecto FONDEF DO5110196, se está desarrollando tecnologías para el cultivo de *Agrocybe aegerita*; *Fistulina hepatica*; *Hericium erinaceus*; *Hypsizygus marmoreus*; *Pholiota nameko*; *Stropharia rugoso-annulata*; *Tremella fuciformis* y *Volvariella volvacea* (Fig. 1.) en sustratos agroforestales producidos a nivel local, sólo de algunos de estos hongos se sabe que poseen metabolitos de interés farmacológico (Tabla 1).

La gran cantidad de Basidiomycetes que existen en la naturaleza y que constituyen potenciales fuentes naturales de componentes bioactivos ha motivado en las últimas décadas del siglo XX el interés en estudiar estos microorganismos. Es conocido que ciertos componentes macromoleculares aislados de hongos superiores (Tabla 1), tales como polisacáridos, ácidos nucleicos, etc., poseen actividad antitumoral (Mizuno *et al*, 1986).

Los hongos son conocidos por su importante producción antibiótica, sin embargo antibióticos presentes en cuerpos fructíferos han sido poco estudiados y documentados (Suay, *et al* 2000). De acuerdo a Florey *et al* (1949), los primeros trabajos que emplearon Basidiomycetes para determinar si poseían agentes terapéuticos fueron realizados por Anchel, Hervey y Wilkins en

1941, ellos examinaron extractos de cuerpos fructíferos y cultivos miceliales de más de 2000 especies de hongos, detectando diversas actividades antibióticas y cuyos resultados conllevaron al aislamiento e identificación del pleuromutilin, compuesto utilizado para el tratamiento de las enfermedades producidas por micoplasmas en el ganado vacuno.

En los hongos Basidiomycetes los componentes activos son mayoritariamente policetonas, compuestos fenólicos, purinas, pirimidinas, quinonas y terpenoides (Delmas, 1989). Hoy en día, es posible el control de ciertas enfermedades infecciosas que por décadas han provocado serios perjuicios en la salud de la población, gracias al conocimiento integrado de los procesos infecciosos, por la mejora de las prácticas sanitarias y por el descubrimiento y uso de agentes antimicrobianos.

En la última década del siglo XX y debido al uso indiscriminado de los antibióticos, se han obtenido cepas de microorganismos resistentes a las terapias tradicionales. Esto ha llevado a sintetizar nuevos y más efectivos agentes antimicrobianos, con el fin de ser aplicados en terapias que van en pos de la salud de la población humana. Si bien es cierto, la síntesis de antibióticos es una de las prácticas más comunes, la búsqueda de compuestos sintetizados a partir del metabolismo microbiano continúa siendo la fuente principal (Leiva *et al*, 2004).

Se ha informado hasta ahora de cerca de 50.000 productos naturales provenientes de microorganismos, de los cuales más de 10.000 son biológicamente activos y más de 8.000 son agentes antibióticos y antitumorales (Leiva *et al*, 2004). Por otra parte, hay muchas personas que optan por incluir en su dieta alimentos naturales, no sólo por su bajo costo y accesibilidad, sino, por que mucho de ellos son bajos en grasas y presentan un valor nutricional importante. Por eso,

sin duda la importancia de algunos de ellos radica en que se han encontrado diversos principios activos, los cuales han sido utilizados en terapias alternativas para curar diversas enfermedades (tratamiento de la diabetes, hipertensión, antitumoral, antiinflamatorio, etc.), (Guzmán, 2000).

En la actualidad se dispone de muchos agentes antibacterianos distintos, ya sean de origen natural o sintéticos, que se pueden clasificar en grupos, por ejemplo, basándose en el punto de acción en la célula bacteriana y en la estructura química, se encuentran: los inhibidores de la síntesis de la pared celular (betalactámicos y glucopéptidos), los inhibidores de la síntesis de proteínas (aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, y lincosaminas), los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (sulfamidas, trimetropim, quinolonas y rifamicinas) entre otros (Flórez,1997).

Los agentes antimicóticos al contrario son muy limitados y se clasifican de la misma forma que los antibacterianos, entre ellos se encuentran: inhibidores de la síntesis de la pared celular (azoles), inhibidores de la función de la membrana celular (polienos), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (pirimidinas y benzofuranos), (Mims *et al.*, 1999).

Un problema que se presenta con bacterias y hongos patógenos, es que son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, siendo la causa más significativa de aparición y reactivación de enfermedades infecciosas. Según Walsh (2003), el desarrollo cronológico del significado de la resistencia en clínica es multifactorial, depende de factores tales como: cantidad de antibiótico usado en la terapia, la frecuencia en que los niveles sub-terapéuticos de antibióticos son seleccionados por organismos resistentes. De este modo hay una necesidad de encontrar nuevos antibióticos para el tratamiento de patógenos resistentes a múltiples drogas, que frecuentemente se encuentran ubicados tanto en hospitales como en la comunidad (Sutcliffe, 2005).

Todo esto ha puesto de manifiesto la preocupación por el uso apropiado de los antibióticos y la necesidad de contar con nuevos fármacos, por lo que la industria farmacéutica ha retomado el interés por la investigación de antimicrobianos, donde las estrategias a seguir consisten en la modificación de antibióticos ya conocidos, (García *et al*, 2003).

Los Basidiomycetes y hongos miceliales en general presentan potencialidades de biosíntesis más interesantes y numerosas, por lo que resulta conveniente profundizar en el cultivo y manejo de estos microorganismos, con el fin de identificar metabolitos nuevos y útiles para el humano. Es por esta razón que actualmente son objeto de un renovado interés. Si bien se requieren grandes esfuerzos para obtener fármacos a partir de fuentes naturales, es coherente buscar nuevas sustancias con actividad antimicrobiana a partir de moléculas de origen natural.

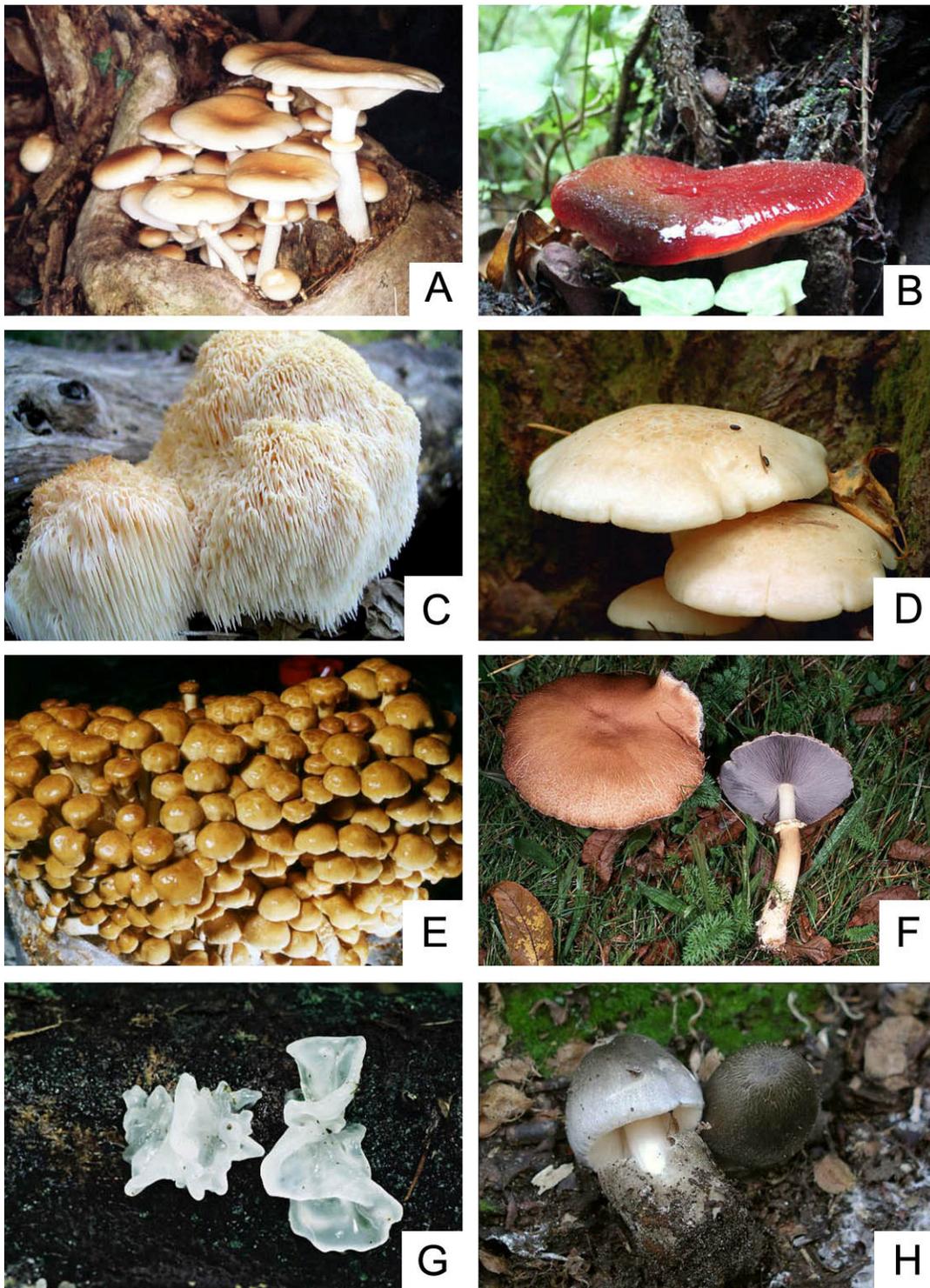


Figura 1. Basidiocarpos de: A = *Agrocybe aegerita*. B = *Fistulina hepatica*. C = *Hericium erinaceus*. D = *Hypsizygos marmoreus*. E = *Pholiota nameko*. F = *Stropharia rugoso-annulata*. G = *Tremella fuciformis*. H = *Volvariella volvacea*. Fuente: www.hongoschile.cl.

Tabla 1. Metabolitos de interés farmacológico presentes en hongos comestibles

Especie de hongo comestible	Propiedades medicinales
<i>Agrocybe aegarita</i>	Antifúngico, antitumoral, hipocolesterolémico, hepatoprotector.
<i>Fistulina hepatica</i>	Antibacteriano.
<i>Hericium erinaceus</i>	Antitumoral, antibacteriano.
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	Antitumoral, antioxidante.
<i>Pholiota nameko</i>	Antitumoral.
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	No determinado.
<i>Tremella fuciformis</i>	Antiinflamatorio, antitumoral, hipocolesterolémico, hipoglicemiante, inmunomodulador, hepatoprotector.
<i>Volvariella volvacea</i>	Antitumoral, antiviral, antibacteriano, hipocolesterolémico.

Fuente: Adaptado de Mattila (2000), Tsuge *et al*, (1999), Wasser y Weiss (1999).

En base a lo anterior se plantea la siguiente hipótesis de trabajo

Al menos un caldo de cultivo o un tipo de micelio obtenido luego de cultivar ocho cepas fúngicas de Basidiomycetes comestibles, presenta actividad antibacteriana o antifúngica.

Para aceptar o rechazar la hipótesis se plantea los siguientes objetivos específicos.

1. Determinar la capacidad antibacteriana y antifúngica del caldo de cultivo y del micelio obtenido de 8 cepas miceliales de hongos comestibles luego de ser cultivadas bajo condiciones de laboratorio.
2. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del caldo de cultivo y del micelio obtenido de la mejor cepa fúngica capaz de inhibir el desarrollo de cepas controles bacterianas y fúngicas.
3. Determinar la concentración letal media (CLM) del caldo de cultivo y del micelio obtenido de la mejor cepa fúngica capaz de matar la mitad de la población de cepas controles bacterianos y fúngicas.
4. Determinar la concentración letal (CL) del caldo de cultivo y micelio obtenido de la mejor cepa fúngica capaz de matar la población total de cepas controles bacterianas y fúngicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material Biológico

Para el trabajo experimental se utilizaron 8 cepas fúngicas detalladas a continuación:

Agrocybe aegerita, *Fistulina hepatica*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygos marmoreus*, *Pholiota nameko*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Tremella fuciformis*, *Volvariella volvacea* adquiridas en Mycelia, Bélgica.

Para determinar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*, se utilizaron las siguientes cepas control: *Bacillus subtilis* (ATCC 6639); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y la cepa fúngica *Candida albicans* (ATCC 90029), pertenecientes al cepario del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

3.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en la fase experimental se presentan en orden alfabético y se señalan entre paréntesis la abreviatura utilizada en el texto: agar extracto de malta Merck al 2% (AEM 2%), agar peptona al 2% (AP 2%), agua destilada, agua destilada estéril, caldo malta al 1% (CM 1%), caldo peptona al 2% (CP 2%)

3.1.3 Equipos

Agitador orbital Shaker S01, autoclave modelo Orsa, balanza analítica Sartorius 2462, cámara de flujo laminar Class II A/B3 Biological Safety Cabinet, cámara de frío Eurofrigo, cámara de

incubación J. Kotterman, cocina a gas indugas, estufa de secado artesanal, pesa digital precisa 2200 C, Spectrofotómetro Ethican UV serie 500.

3.1.4 Otros

Aguja de siembra, alcohol de 90°, asa de siembra, botellas de vidrio de 250 mL, cinta adhesiva, lápiz marcador, mechero bunsen, micropipeta de 100 µL, mortero de cerámica, papel filtro Whatman's N° 1, pipeta Pasteur, placas Petri de 9 cm. de diámetro, probeta de 500 mL Kymble, regla, tómulas estériles, tubos de ensayo, vasos precipitados de 500 y 1000 mL.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Masificación de cepas control

La masificación de las cepas controles bacterianas y levadura se realizó como se indica: las cepas bacterianas de, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* se sembraron por cuadruplicado en tubos que contenían AP 2 % y la levadura *C. albicans* en igual número de tubos, pero que contenían AEM 2 %. Con un asa de siembra estéril se extrajo de la placa cepario un inóculo de la cepa respectiva y se sembró en cada tubo que contenía el agar correspondiente. Sembrados los tubos se incubaron en el caso de las bacterias por 24 h a 37 °C y en el caso de la levadura por 48 h a 23 °C. Una vez desarrollados los cultivos, los tubos se sellaron con parafilm y se mantuvieron en cámara fría a 4 °C.

3.2.2 Masificación de cepas fúngicas ensayadas

Cada una de las 8 cepas fúngicas a ensayar (ver anexo 1, Tabla N° 7) se masificaron individualmente, para lo cual del tubo de cepario respectivo se extrajo con una aguja de siembra un inóculo de agar con micelio el cual se sembró por duplicado en placas petri que contenían 15 mL de AEM 2%, en el caso de *Tremella fuciformis*, se extrajo con un asa de siembra un pequeño inóculo y se sembró por estrías en placas petri que igualmente contenían 15 mL de AEM 2%. Las placas sembradas se incubaron por 10 días a 23 °C.

3.2.3 Cultivo líquido de las 8 cepas fúngicas en estudio

Cada uno de los cultivos líquidos de las 8 cepas fúngicas, se realizaron individualmente como se señala a continuación: con un sacabocado de 1,4 cm de diámetro se cortaron 3 círculos de agar con micelio, estos círculos fueron depositados asépticamente (con un aguja de siembra) en botellas de 250 mL (2 botellas por cada cepa) que contenían 100 mL de CM 1%. Las botellas sembradas se depositaron en un agitador orbital a 1500 r.p.m por 15 días a temperatura ambiente (15 ± 20 °C) (Figura 2). Finalizado el período de incubación, el contenido de cada botella fue filtrado independientemente, usando papel filtro Wthaman's N° 1. Los filtrados obtenidos se recolectaron en botellas de 250 mL estériles, éstas fueron conservadas en cámara fría a 4 °C. El micelio recolectado fue pesado previamente para obtener el peso fresco y luego secado en estufa a 60 °C por 48 horas hasta peso constante.



Figura 2: Agitación de las 8 cepas fúngicas por 15 días a 15 ± 20 °C.

3.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los cultivos líquidos de cepas fúngicas en ensayo

La actividad inhibitoria de los filtrados fúngicos se determinó sobre tapices de cultivos de las cepas controles (*B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*). Del cultivo respectivo de la cepa control se extrajo con un asa de siembra estéril una pequeña cantidad de inóculo y se depositó en un tubo que contenía 3 mL de CP 2% para el caso de las bacterias y 3 mL de CM 2% para la levadura, luego el tubo conteniendo la suspensión, se agitó por 2 minutos en un vórtex y a continuación con una tórula se extrajo una pequeña cantidad de la suspensión y se sembró en placas petri que contenían AP 2% (para las bacterias) y AEM 2% (para la levadura). Sembradas las placas se incubaron por 15 minutos a 37 °C (en el caso de las bacterias) y a 23 °C (en el caso de la levadura) y luego en forma estéril sobre el cultivo bacteriano o fúngico respectivo se inoculó con micropipeta alícuotas de 10, 50 y 100 μ L del cultivo líquido fúngico en ensayo. Luego las placas se mantuvieron cerradas a temperatura ambiente por 2 h y a continuación se incubaron por 24 h a 37 °C para las bacterias y a 23 °C para la levadura. Por cada bacteria y levadura control ensayado se utilizaron 2 placas.

Terminado el tiempo de incubación se observó y midió el halo de inhibición (si lo hay) y se determinó que volumen de alícuota sembrado lo produjo.

3.2.5 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los micelios obtenidos

Los micelios secos obtenidos como se señaló en el punto 3.2.3, fueron molidos en forma independiente en un mortero. De cada macerado obtenido en forma separada se pesaron 3 g, que fueron resuspendidos en 5 mL de agua destilada estéril (llevada previamente a baño maría a 60 °C por 1 h), la suspensión fue agitada en vórtex por 2 minutos y luego para determinar la actividad antibacteriana y antifúngica se procedió como se señaló en el punto 3.2.4.

3.2.6 Determinación *in vitro* de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) del cultivo líquido obtenido de la mejor cepa fúngica ensayada.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el punto 3.2.4, se decidió ensayar el filtrado líquido obtenido de la cepa fúngica *Hericiium erinaceus* versus la cepa control *B. subtilis* (ATCC 6639). Previo a determinar *in vitro* la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL), se realizó mediante diluciones seriadas, un recuento de la bacteria *B. subtilis* (ATCC 6639), para ello desde un cultivo joven de la cepa se extrajeron 2 inóculos con un asa de siembra previamente estéril y se depositaron en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, la mezcla obtenida se agitó hasta lograr su total homogenización (dilución 10^1), desde este tubo se extrajo 1 mL y se depositó en otro tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución 10^2), este tubo se agitó y se repitió la metodología antes señalada hasta obtener una dilución de 10^7 . De cada una de las diluciones se

sembró 0,1 mL en forma individual y por triplicado en placas Petri que contenían AP 2%.

Sembradas las placas se incubaron por 24 h a 37 °C, pasado este período de incubación se realizó a ojo desnudo el recuento de las colonias. Finalmente los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

Para determinar *in vitro* la CIM, CLM y CL, en primer lugar se realizaron las diluciones de la cepa control (*B. subtilis*), como ya se mencionó anteriormente, luego de forma independiente alícuotas de 1 mL de la dilución bacteriana fueron sembradas en tubos que contenían 5 mL de CP 2% y se les adicionó 1 mL del filtrado fúngico estudiado seleccionado a diferentes concentraciones (0,25; 0,30; 0,40; 0,60; 0,85; 0,89; 0,90; 1,0 y 1,5 mg/mL). Una vez sembrados los tubos se incubaron por 24 h a 37 °C, luego de cada tubo en forma individual y por triplicado se extrajeron alícuotas de 0.1 mL, las cuales fueron sembradas en placas petri que contenían 15 mL de AP 2%. Las placas sembradas se incubaron por 24 h a 37 °C, luego de este período de tiempo se realizó el recuento de las colonias.

3.2.7 Determinación *in vitro* de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) del micelio obtenido posfiltrado de la mejor cepa fúngica ensayada

Para determinar *in vitro* la CIM, CLM y CL se utilizó la suspensión obtenida en la metodología señalada en el punto 3.2.5 y luego se realizó de igual manera la metodología utilizada en el punto 3.2.6.

3.2.8 Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC 6639)

- A)** Análisis poblacional por cambios de turbidez del cultivo: 100 mL de CP 2% estéril contenidos en un matraz se sembraron con una población bacteriana inicial de $1,2 \times 10^5$ UFC/mL (tiempo cero). El matraz se mantuvo en agitación constante a 1500 r.p.m, por 24 h a temperatura ambiente (15 ± 20 °C) en un agitador orbital. Para realizar las mediciones de absorbancia (A°), cada 30 minutos a partir del cultivo se extrajo en forma estéril alícuotas de 1mL, que fueron depositadas en cubetas de vidrio leyéndose en un espectrofotómetro a 560 nm versus el blanco (CP 2%), los datos obtenidos A° versus tiempo finalmente se graficaron.
- B)** Análisis de crecimiento poblacional por recuento viable: cada 30 minutos se extrajo 1 mL del cultivo indicado en “A” y se depositó en un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril, a partir de estos tubos se realizaron diluciones seriadas, de estas se tomaron en forma independiente 0,1 mL y se sembraron por triplicado en placas Petri que contenían 15 mL de AP 2%. Una vez sembradas las placas se incubaron por 24 h a 37 °C, al término de este período se realizó el recuento de las colonias. Los resultados obtenidos se expresaron como UFC/mL y luego se graficaron en función del tiempo.

4. RESULTADOS

4.1 Masificación de las cepas fúngicas ensayadas

En la Tabla 2, se muestran los promedios de los tamaños de las colonias obtenidas en agar extracto malta (AEM 2%) luego de su incubación por 10 días a 23 °C para las cepas de hongos comestibles ensayadas.

Tabla 2. Promedio del tamaño de las colonias en agar extracto malta al 2% de las ocho cepas de hongos comestibles ensayadas.

Cepa fúngica	Diámetro de la colonia(cm)
<i>Agrocybe aegerita</i>	9,0
<i>Fistulina hepatica</i>	4,5
<i>Hericiium erinaceus</i>	4,0
<i>Hypsizygyus marmoreus</i>	8,5
<i>Pholiota nameko</i>	6,0
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	5,8
<i>Tremella fuciformis</i>	6,2
<i>Volvariella volvacea</i>	8,6

En la Tabla 2, se observa que todas las cepas de hongos produjeron colonias en AEM al 2%. El mayor diámetro promedio (9,0 cm) de las colonias se determinó para el hongo *A. aegerita* y el menor diámetro promedio (4,0) de las colonias se determinó para el hongo *H. erinaceus*. En la Figura 3, se muestran a modo de ejemplo las colonias de *H. erinaceus* (A) y de *V. volvacea* (B),

ambas colonias están formadas por micelio de color blanquecino-cremoso y son de textura lanosa-algodonosa a diferencias de las colonias de *T. fuciformis*, que por ser una levadura forma colonias de textura mucosa, hialinas y de consistencia butirosa.

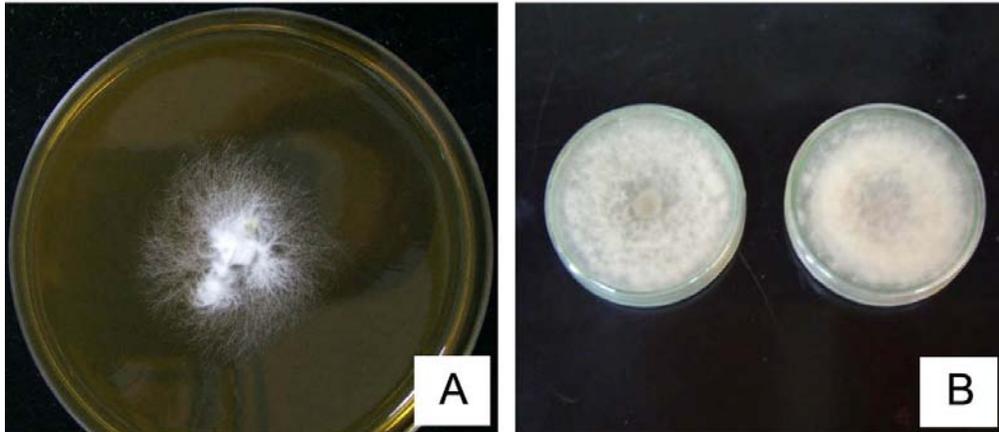


Figura 3. Colonias en agar extracto malta al 2 % de: A = *Hericium erinaceus* y B = *Volvariella volvacea*.

4.2 Cultivo líquido de las 8 cepas fúngicas ensayadas

Terminado el tiempo de agitación en caldo malta al 1% de las cepas fúngicas ensayadas, y luego de proceder como lo señala el punto 3.2.3, se determinó el P.F y P.S de los micelios de las 8 cepas fúngicas en estudio y a continuación la masa micelial final de cada cepa fúngica estudiada.

4.2.1 Determinación del peso fresco y seco de los micelios obtenidos de las 8 cepas fúngicas en estudio cultivadas en caldo malta al 1%

En la Tabla 3, se indican los promedios de los P.F y P.S de los micelios fúngicos, obtenidos luego de filtrar los cultivos líquidos independientemente de las ocho cepas fúngicas cultivadas en caldo malta al 1%.

Tabla 3. Promedios de pesos frescos y secos de las ocho cepas fúngicas cultivadas en caldo malta al 1%.

Cepa fúngica	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Masa micelial final (g)
<i>Agrocybe aegerita</i>	*	*	*
<i>Fistulina hepatica</i>	8,14	3,57	0,04
<i>Hericium erinaceus</i>	8,67	3,01	0,05
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	*	*	*
<i>Pholiota nameko</i>	9,21	3,32	0,05
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	11, 26	4,17	0,07
<i>Tremella fuciformis</i>	11,89	3,09	0,08
<i>Volvariella volvacea</i>	8,23	3,18	0,05

* = Producto del incendio acontecido al edificio de la Facultad de Ciencias no se alcanzó a determinar el peso fresco y seco de las cepas fúngicas respectivas.

En la Tabla 3, se puede observar que el mayor P.F promedio (11,89 g) corresponde a la cepa fúngica *T. fuciformis*, y el menor (8,14 g.) a la cepa *F. hepatica*. Por su parte, el mayor P.S promedio (4,17 g) se determinó para la cepa fúngica *S. rugoso-annulata* y el menor (3,01 g) para la cepa de *H. erinaceus*.

4.2.2 Determinación de la masa micelial final de cada cepa fúngica ensayada.

Luego de obtener los P.F y P.S de las cepas fúngicas estudiadas se procedió a determinar la Masa micelial final (Mmf) de la siguiente manera:

$$\text{Mmf} = \text{PF} - \text{PS} / 100 \text{ mL caldo malta.}$$

Como se observa en la Tabla 3, la mayor Mmf (0,08 g), se determinó para el hongo *T. fuciformis* y la menor Mmf (0,04 g) para *F. hepatica*.

4.3 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los cultivos líquidos de las cepas fúngicas en ensayo

En la Tabla 4, se indica la presencia o ausencia de halo de inhibición que se determinó sobre tapices bacterianos y fúngicos de cepas controles, al depositar gotas (de distintos volúmenes) de los filtrados obtenidos de los cultivos fúngicos ensayados.

Tabla 4. Determinación de la actividad antimicrobiana de filtrados obtenidos de cultivos fúngicos sobre tapices de cepas control.

Cepa fúngica	Presencia o ausencia de halo de inhibición			
	A	B	C	D
<i>Agrocybe aegerita</i>	*	*	*	*
<i>Fistulina hepatica</i>	-	-	-	-
<i>Hericium erinaceus</i>	+	-	-	-
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	*	*	*	*
<i>Pholiota nameko</i>	-	-	-	-
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	-	-	-	-
<i>Tremella fuciformis</i>	-	-	-	-
<i>Volvariella volvacea</i>	-	-	-	-

A = *Bacillus subtilis*. B = *Escherichia coli*. C = *Staphylococcus aureus*. D = *Candida albicans*.

* = No determinado. + = Presencia de halo de inhibición. - = Ausencia de halo de inhibición.

En la Tabla 4, se observa que para *A. aegerita* y *H. marmoreus* no fueron determinados la capacidad inhibitoria de los filtrados, esto se debió a que producto del incendio acontecido al edificio de la Facultad de Ciencias los cultivos se calcinaron. Por su parte, independiente del volumen de las alícuotas ensayadas (10; 50 y 100 μ L) el único filtrado que mostró capacidad inhibitoria fue el obtenido a partir del cultivo de *H. erinaceus* sobre el tapiz de *B. subtilis* (ATCC 6639). En la Figura 4, se muestran los halos de inhibición formados por las alícuotas de *H. erinaceus* sobre el tapiz de *B. subtilis* (ATCC 6639).

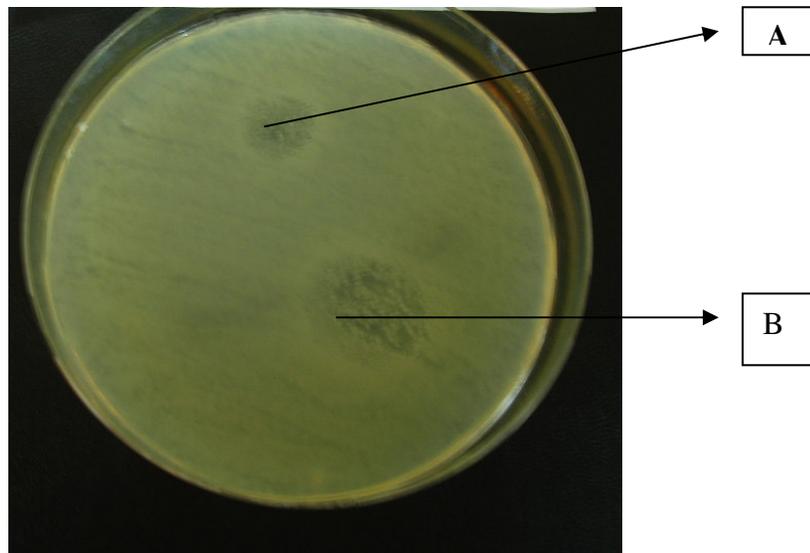


Figura 4. Halos de inhibición producidos por alícuotas de 10 μ L (A) y 50 μ L (B) de filtrados obtenidos desde el cultivo líquido de la cepa de *Hericium erinaceus* sobre el tapiz de la cepa control de *Bacillus subtilis* (ATCC 6639).

En la Figura 4 se puede observar que sobre el tapiz de *B. subtilis* se formaron halos de inhibición, cuyo tamaño vario con el volumen de las alícuotas ensayadas, siendo mayor el obtenido con la alícuota de 50 μL (B).

En la Tabla 5, se indican los tamaños de los halos producidos por las alícuotas de filtrados obtenidos desde el cultivo líquido de la cepa de *H. erinaceus* sobre el tapiz de la cepa control de *B. subtilis* (ATCC 6639).

Tabla 5. Tamaño del halo de inhibición sobre tapices de *Bacillus subtilis* producido por alícuotas de 10, 50 y 100 μl obtenidas del cultivo líquido de *Hericium erinaceus*.

Cepa fúngica	Tamaño del halo (cm)		
	10 μL	50 μL	100 μL
<i>Hericium erinaceus</i>	1,1 x 1,0	1,9 x 1,2	2,3 x 1,7

Como se observa en la Tabla 5, a medida que se incrementa el volumen de la alícuota ensayada mayor tamaño de halo se obtiene, así con la alícuota de 100 μL se determinó el mayor tamaño del halo de inhibición (2,3 x 1,7 cm).

4.4 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los micelios obtenidos de las cepas fúngicas en ensayo

En la Tabla 6, se indica la presencia o ausencia de halo de inhibición que se determinó sobre tapices bacterianos y fúngicos de cepas controles al depositar gotas (de distintos volúmenes) de los macerados de los micelios obtenidos de los hongos ensayados.

Tabla 6. Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de macerados de los micelios obtenidos de hongos ensayados sobre tapices de cepas control.

Cepa fúngica	Presencia o ausencia de halo de inhibición			
	A	B	C	D
<i>Agrocybe aegerita</i>	*	*	*	*
<i>Fistulina hepatica</i>	-	-	-	-
<i>Hericium erinaceus</i>	*	*	*	*
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	*	*	*	*
<i>Pholiota nameko</i>	-	-	-	-
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	-	-	-	-
<i>Tremella fuciformis</i>	*	*	*	*
<i>Volvariella volvacea</i>	*	*	*	*

A = *Bacillus subtilis*. B = *Escherichia coli*. C = *Staphylococcus aureus*. D = *Candida albicans*.

* = No determinado. + = Presencia de halo de inhibición. - = Ausencia de halo de inhibición.

En la Tabla 6, se observa que para *A. aegerita*; *H. erinaceus*; *H. marmoreus*; *T. fuciformis* y *V. volvacea* no se determinó la capacidad inhibitoria de los macerados de los micelios obtenidos, esto se debió a que producto del incendio acontecido al edificio de la Facultad de Ciencias los cultivos se calcinaron. Por su parte, independiente del volumen de las alícuotas ensayadas (10; 50 y 100 μ L) de los macerados obtenidos, ninguno mostró capacidad inhibitoria para ninguna de las cepas controles ensayadas. En la Figura 3, se muestran a modo de ejemplo un tapiz de *B. subtilis* (ATCC 6639), que fue inoculado con alícuotas de 10 μ L (A) y 50 μ L (B) del macerado obtenido del micelio de *P. nameko*

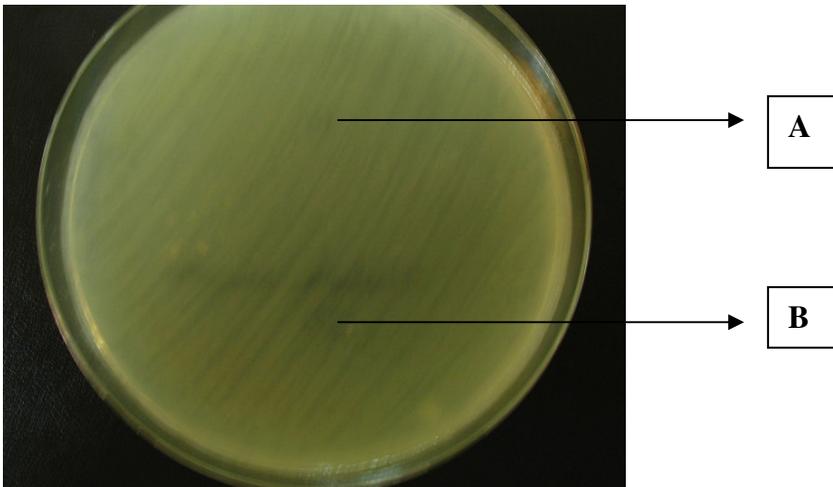


Figura 5: Alícuotas de 10 μL (A) y 50 μL (B) del macerado obtenido del micelio de *Pholiota nameko* inoculadas sobre tapiz de la cepa control *Bacillus subtilis* (ATCC 6639).

Como se observa en la Fig. 5 independiente del volumen de la alícuota ensayada no hay formación de halo de inhibición.

4.5 Determinación *in vitro* de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) tanto del cultivo líquido como del micelio obtenido de la mejor cepa fúngica ensayada.

En este punto no se obtuvieron resultados debido al incendio acontecido al edificio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

5. DISCUSIÓN

La gran cantidad de especies de Basidiomycetes que existen en la naturaleza constituyen potenciales fuentes naturales de componentes bioactivos, ha motivado en las últimas décadas del siglo XX el interés por estudiar estos organismos. (Brizuela *et al*, 1998).

El metabolismo secundario de los hongos basidiomycetes son ricos en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides, otros metabolitos con actividad antibiótica obtenidos a partir de basidiocarpos son: compuestos fenólicos, ácidos fenilglicoxídicos, purinas, quinonas, etc. (Brizuela *et al*, 1998).

Muchos antibióticos utilizados en la actualidad en clínica fueron desarrollados a partir de metabolitos fúngicos. (Rosa *et al*, 2003). Durante las décadas pasadas del siglo XX, varios microorganismos patógenos desarrollaron resistencia contra los antibióticos.

En la actualidad se han descrito cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes fuentes, de las cuales, los microorganismos, constituyen una de las menos estudiadas y que sin embargo ofrece grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas. Dentro de los microorganismos, los Basidiomycetes presentan una capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos apenas investigada. Estas actividades biológicas producidas por estos hongos comestibles van desde agentes antibacterianos, hasta antifúngicos. (Brizuela *et al*, 1998).

5.1 Masificación de las cepas fúngicas ensayadas

De acuerdo a los resultados obtenidos en el punto 4.1, se logró masificar mediante varias resiembras las cepas miceliales en estudio (ver Tabla 7, anexo 1) en AEM 2%.

Tanto la composición del medio de cultivo, como el tiempo de incubación y la temperatura (23 ± 2 °C) a la cual fueron expuestos los hongos, son factores determinantes en el crecimiento óptimo del micelio, ya que según Stamets y Chilton (1983), estas especies crecen a una temperatura de 21-24 °C en 10 a 14 días, así mismo estos autores recomiendan diferentes medios de cultivo de acuerdo a la especie, donde el más utilizado es AEM (agar extracto malta).

Según Wilkinson y Royse (2001), las cepas de todos los hongos generalmente se comportan de diferente manera en cada medio de cultivo, de un medio a otro puede variar su morfología, color y tasa de crecimiento.

Sánchez y Royse (2001), señalan que el crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una espora o de una fracción viable de hifa. Dicho crecimiento se da en forma polarizada o apical, porque la elongación de la superficie se da en un punto y no en toda la célula. Esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, denominada hifa, delimitada por una pared que se extiende de manera ramificada para formar un sistema hifal conocido como micelio.

Debido a que *Tremella fuciformis* fue cultivada sin adicionar otro hongo para obtener un crecimiento micelial, se obtuvieron colonias de textura mucosa y el diámetro obtenido no pudo ser comparado con el resto de las cepas fúngicas estudiadas, ya que las 7 cepas restantes tuvieron un crecimiento micelial.

Según Chen y Huang (2000), para obtener un crecimiento micelial de la levadura *T. fuciformis*, es necesario utilizar un cultivo mixto del Basidiomycete *T. fuciformis* con un Ascomycete (*Hypoxylon acheri*), esta mezcla de cultivo proporciona los nutrientes necesarios para lograr esto.

De los resultados obtenidos en el punto 4.1 se puede mencionar que factores, tales como medio de cultivo de masificación, T° y tiempo de incubación fueron variables fijas, quiere decir que para

las 8 cepas fúngicas estos factores fueron constantes, por ende la explicación a los diferentes diámetros obtenidos, puede deberse a la variabilidad genética, propia de cada cepa fúngica estudiada, estos factores genéticos pueden determinar un mayor o menor crecimiento micelial.

5.2 Cultivo líquido de las 8 cepas fúngicas ensayadas.

Según Sánchez y Royse (2001) el cultivo de un hongo en medio líquido crece sólo sobre la superficie cuando el líquido está en reposo; pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. En este trabajo experimental las botellas fueron agitadas a 1500 r.p.m por 15 días, según estas condiciones el hongo puede formar pequeñas esferas de micelio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los descritos por los autores antes citados, en donde 7 de las 8 cepas fúngicas formaron esferas de micelio más o menos compactas, sólo la cepa fúngica *T. Fuciformis*, por ser una levadura formó un pellet.

Una de las ventajas del cultivo líquido, es el control y seguimiento de las condiciones de cultivo, disminución del tiempo para la obtención de biomasa y bioactivos (9-14 días), (Zapata *et al*, 2007).

5.2.1 determinación del peso fresco y seco de los micelios obtenidos de las 8 cepas fúngicas en estudio cultivadas en caldo malta al 1%

De los valores obtenidos en la Tabla 3, se puede observar que el mayor rendimiento de PF micelial, corresponde a la cepa fúngica *T. fuciformis*, ya que este hongo por ser una levadura en cultivo líquido forma un pellet, debido a la mayor cantidad de agua que contenía en comparación con el resto de los micelios obtenidos. El menor PF corresponde a la cepa fúngica *F. hepatica*. El mayor PS fue para la cepa fúngica *S. rugoso-annulata*, y el menor PS fue para *H. erinaceus*.

Según Lee *et al*, (2004), señalan que el efecto de la fuente de carbono en la producción de la biomasa (micelio+agua) y bioactivos es un aspecto relevante. Para el cultivo líquido las fuentes de carbono que más se han estudiado son la glucosa, lactosa, sucrosa y maltosa.

Por su parte Guillén *et al*, (1998) señalan que el cultivo líquido permite producir mayor cantidad de biomasa, de mejor calidad y en menor tiempo, lo cual favorecería la dispersión y adaptación del hongo.

Como fue mencionado anteriormente, la mayor explicación a las diferencias de peso miceliales obtenidos, puede deberse a factores genéticos propios de cada hongo, lo cual podría determinar un mayor o menor crecimiento micelial, al igual que el caso anterior, los factores de T°, medio de cultivo y tiempo de incubación fueron factores constantes para las 8 cepas fúngicas estudiadas.

5.2.2 Determinación de la masa micelial final de cada cepa fúngica ensayada.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 3), se puede indicar que el hongo con una mayor masa micelial fue *T. fuciformis*, aquí existe una relación directa entre el PF y la masa micelial final, por ende se puede asumir que existe una ganancia de masa micelial, debido a que la biomasa (micelio+agua) fue mayor para *T. fuciformis*.

De forma análoga, se determinó una relación directa entre el menor PF y la menor cantidad de masa micelial final, producida por la cepa fúngica *F. hepatica*.

5.3 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los cultivos líquidos de las cepas fúngicas en ensayo.

De acuerdo a los resultados señalados en el punto 4.3 se determinó a través del método de las gotas el cultivo líquido de la cepa fúngica *H. erinaceus* presentó actividad inhibitoria leve sobre

la cepa *B. subtilis*, con alícuotas de 10, 50 y 100 μL , siendo el mayor halo de inhibición con la alícuota de 100 μL , (ver Tabla 5).

Según Son *et al* (2006), las cepas de *H. erinaceus* presentan actividad antimicrobiana. Si bien no existe mucha literatura acerca de un posible efecto antibacteriano de esta cepa fúngica, Arnone *et al*, (1994) señalan que de la fermentación del hongo comestible *H. erinaceus* se aislaron los hericenos A y B, y la γ -dihidropirona denominada erinapirona C. Estas moléculas están formadas por una unidad tetracétida conectada a una cadena lateral isoprénica. Los hericenos exhibieron un efecto citotóxico débil, en cambio la erinapirona C presentó efectos contra Bacterias Gram-positiva.

5.4 Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los micelios obtenidos de las cepas fúngicas en ensayo

Los resultados descritos en la Tabla 6 muestran que, de las 3 cepas fúngicas que se alcanzaron analizar, ninguna de ellas posee efecto inhibitorio sobre las cepas *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.

La inactividad de los respectivos extractos puede ser a raíz de que la maceración de los micelios secos no fue la adecuada, ya que quizás no se rompieron las células adecuadamente lo que impidió que se disolvieran los posibles componentes activos en el solvente utilizado (agua destilada estéril, previamente depositada a 60 °C a baño maría). Por su parte Jonathan and Fasidi (2003), señalan que la actividad antimicrobiana de los hongos varía notablemente según el tipo de solvente utilizado, pues los extractos etanólicos muestran una mayor actividad antimicrobiana en comparación con extractos acuosos. Además Yang (2000) indica que los compuestos activos

altamente hidrofóbicos no difunden en agar, por lo tanto compuestos, tales como terpenos quizás no difundieron sobre el tapiz de microorganismos.

Por otro lado la inactividad de los respectivos extractos puede estar dada quizás, porque las cepas patrones son resistentes frente a determinados constituyentes activos de estos.

De las cepas fúngicas que no pudieron ser determinadas producto del incendio acontecido al edificio de la Facultad de Ciencias, tanto del micelio seco como de los extractos acuosos, existe literatura donde se señala que estos hongos comestibles presentan diversas actividades medicinales, como por ejemplo, propiedades antifúngicas y antibacterianas para la cepa fúngica *A. aegerita* como lo indican, Poucheret *et al*, (2006).

5.5 Determinación *in vitro* de la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración letal media (CLM) y concentración letal (CL) tanto del cultivo líquido como del micelio obtenido de la mejor cepa fúngica ensayada.

Estos parámetros no pudieron ser determinados producto del incendio acontecido al edificio de la Facultad de Ciencias. Por lo tanto no existen resultados que se puedan discutir.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados y discutidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Las ocho cepas de hongos comestibles pueden ser cultivados en caldo malta al 1% bajo condiciones de laboratorio.
- Se determinó la actividad antibacteriana del cultivo líquido de la cepa fúngica *Hericium erinaceus* sobre la cepa bacteriana control *Bacillus subtilis*.

De acuerdo a lo anterior se acepta la hipótesis tal como fue planteada.

7. LITERATURA CITADA

Arnone, A., Cardillo, R., Nasini, G. & Vajina de Pava O. 1994. Secondary mold metabolites: part 46. Hericines A-C and Erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Hericium erinaceus*. Journal of Natural Products. 57: 602-606.

Brizuela, M., Garcia, L., Perez, L. & Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15: 69-74.

Chang, S. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushroom in 1997 with emphasis on *Lentinula edodes* (Berk.). Sing in China. Internacional journal of medicinal mushrooms. 1: 291-300.

Chen, A. y Huang, N. 2000. Mixed-culture cultivation of *Tremella fuciformis* on synthetic logs. <http://www.mushroomcompany.com/005/tremella.pdf>. (Página revisada 02-04-2008).

Delmas, J. 1989. Les champignons et leur culture. Ed.: Flammarion, Paris, 689 pp.

Flórez, J. 1997. Farmacología humana. Editorial Masson S.A., Barcelona, España. Sección XI, Enfermedades Infecciosas, pp. 1061-1131.

Florey, HW., Chain, W., Heatley, NG. 1949. Antibiotics. London, Oxford University Press, pp.554.

García, E., Azanza, J., Sábada, B. & Gil, I. 2003. Farmacología de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de las infecciones graves por bacterias Gram positivas. *Revista Española Quimioterapia*. 16: 277-322.

Guillén, G., Márquez, F. & Sánchez José. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotas ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 302-306.

Guzman, G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. *Int. J. Of Med. Mushrooms*, 2:95-123.

Hongos Comestibles Cultivados en Chile-Uach. <http://www.hongoschile.cl/>. (Página revisada 04 –04 –2008).

Jonathan, S. & Fasidi, I. (2003). Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro-fungi- *Lycoperdon pusillum* (Bat.Ex) and *Lycoperdon Giganteum* (Pers.). *African Journal of Biomedical Research*. 6: 85-90.

Lee, B., Bae, J., Pyo, H., Choe, T., Kim, S., Hwang, H. & Yun, J. 2004. Submerged culture conditions for the production of micelial biomasa and exopolysacarides by the edible *Basidiomycete Grifota frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 369-376.

Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & Garcia, H. 2004. Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile.* 132:151-159.

Matilla, P., Sounpaa, K. & Piironen, V. 2000. Functional Properties of Edible Mushrooms. *Nutrition.* 16: 694-696.

Mims, C., Playfai, R.J., Roitt, I., Wakelin, D. & Willians, R. 1999. *Microbiología médica.* Editorial Harcourt Brace, Madrid. España. 484 p.

Mizuno, T., Ohsawa, K., Hagiwara, N., Kuboyama, R. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from *Maitake, Grifola frondosa*. *Agricultural Biology Chemical,* 50: 1679-1688.

Poucheret, P., Fons F. & Raptor S. 2006. Biological and Pharmacological activity of higher Fungi: 20- year retrospective análisis. *Cryptogamie, Mycologie.* 4: 311-333.

Rosa, L., Gomez, Kátia., Jacob, C., Capelari, M., Rosa, C., Zani, C. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.* 98 (7): 967-974.

Sánchez, J. & Royse, D. 2001. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* 1ª edición. UTEHA Noriega editores. México. 290 p.

Son, Ch., Shin J., Cho, J., Cho, Ch., Yun, Ch., Chung, W. & Han, S. 2006. Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components of *Hericium erinaceum*. *Internacional Immunopharmacology*. 6: 1363-1369.

Stamets, P. & Chilton, J. 1983. *The mushrooms Cultivator*. Agarikon Press. Washington, USA. 415p.

Suay, I., F, Arenal., F, Asenio., A, Basilio., M, Cabello., M.T, Diez., J. B, Garcia., A, Gonzalez del Val., J, Gorrochategui., P, Hernandez., F, Pelaez & M. F. Vicente. 2000. "Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities." *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 129-139.

Sutcliffe, J. 2005. Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Current Opinión in Microbiology*. 8: 534-542.

Tsuge, N., Mori, T., Hamano, T., Tanaka, H., Shin-Ya, K. & Seto, H. 1999. Cinnatriacetins A and B, new antibacterial triacetylene derivatives from the fruiting bodies of *Fistulina hepatica*. *Journal of antibiotics* 52: 578-81.

Walsh, C. 2003. Where Hill new antibiotics come from?. *Perspectivas. Nature Reviews/Microbiology*. 1: 65-70.

Wasser, S. & Weiss, A. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycete Mushrooms: current perspectives (review). *International Journal Medicinal Mushrooms*. 1: 31-62.

Wilkinson, V. & Royse, D. 2001. Una revisión de técnicas de mantenimiento de cepas, Con énfasis en las que se adaptan a *Pleurotus* spp. In: Sánchez, J. y Royse, D. (eds.) *Biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Noriega editores, México. Pp. 125-139.

Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Department of food technology, University of Helsinki. Finlandia. 61 pp.

Zapata, P., Rojas, D., Fernández, C., Ramírez, D., Restrepo, G., Orjuela, V., Arroyave, M., Gómez, T. & Atehortúa L. 2007. Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifota frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista EIA (Escuela de Ingeniería de Antioquía)*. 7: 137-134.

ANEXO

ANEXO 1

Tabla 7: Cepas fúngicas estudiadas

<i>Agrocybe aegerita</i>
<i>Fistulina hepatica</i>
<i>Hericium erinaceus</i>
<i>Hypsizygus marmoreus</i>
<i>Pholiota nameko</i>
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>
<i>Tremella fuciformis</i>
<i>Volvariella volvacea</i>