

Sinergismo antibacterial de la cepa *G. sichuanense* Gc73 y poliaminas en bacterias gram-positivas

Antibacterial Synergism of cepa *Ganoderma sichuanense* Gc73 and polyamines on gram-positive bacteria

Recepción del artículo: 11/12/2023 • Aceptación para publicación: 23/11/2023 • Publicación: 05/01/2024

<https://doi.org/10.32870/e-cucba.vi21.334>

Ramón Reynoso-Orozco*

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Biología Celular y Molecular. Zapopan, Jalisco, México.

Luis Alberto Barajas-Villegas

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Egresado de la Licenciatura en Biología. Zapopan, Jalisco, México.

Sergio Fausto-Guerra

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Botánica y Zoología. Zapopan, Jalisco, México.

Cecilia Jiménez Plascencia

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Producción Animal. Zapopan, Jalisco, México.

Teresa de Jesús Jaime Ornelas

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Salud Pública. Zapopan, Jalisco, México.

Benito Donato Minjarez Vega

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Producción Agrícola. Zapopan, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: ramon.reynoso@academicos.udg.mx

Resumen

Durante los últimos siglos, las especies del complejo *Ganoderma lucidum* se han utilizado en la medicina tradicional china. "Lingzhi" ha sido usado en Asia por sus propiedades anticancerígenas, inmunomoduladoras, antivirales y antibacterianas. Teniendo en cuenta un micelio aislado de un cultivo vivo etiquetado como la cepa *G. sichuanense* Gc73, el objetivo de este estudio es determinar las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) a las que se usa el caldo de cultivo de *G. sichuanense* cepa Gc73 suplementado con tiamina para inhibir diferentes cepas de bacterias, tanto sensibles como resistentes a la estreptomycin. Dicho caldo de cultivo tras ser centrifugado, filtrado a través de una membrana de poro de 0,22 µm o separado por peso de < 3.000 Daltons, demostró la sinergia con PAs contra diferentes cepas de bacterias. Los resultados muestran un efecto antibacteriano frente a los *Bacillus subtilis* ATCC (ATCC; Manassas, VA, EE. UU.) 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Las cepas fueron probadas en concentraciones de 2.5 a 50 µl del caldo de cultivo suplementado con tiamina por cada ml de caldo Muller Hinton. Incluimos seis cepas de Salmonella spp., previamente aisladas de carne cruda y se utilizó la técnica de electroforesis para determinar la presencia de péptidos antimicrobianos. Los resultados mostraron que estos péptidos solo pueden identificarse en muestras frescas del extracto.

Palabras clave: Cultivo micelial, fraccionamiento, susceptibles, estreptomycin

Abstract

During the last centuries, species of the *Ganoderma lucidum* complex have been used in traditional Chinese medicine. "Lingzhi" has been used in Asia by their anticarcinogenic, immunomodulatory, antiviral and antibacterial properties. Taking into account a mycelium isolated from a live culture labeled as cepa *G. sichuanense* Gc73, the aim of this study is to determine the Minimum Inhibitory Concentrations (CIM) at which the culture of *G. sichuanense* cepa Gc73 broth supplemented with thiamine inhibits different strains of bacteria, both susceptible and resistant to streptomycin. Said culture broth after being centrifuged, filtered through a 0.22 µm pore membrane or separated by weight of <3,000 Daltons, showed synergy with PAs against different strains of bacteria. The results show an antibacterial effect against *Bacillus subtilis* ATCC (ATCC; Manassas, VA, USA) 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341. The strains were tested. in concentrations of 2.5 to 50 µl of the culture broth supplemented with thiamin for each ml of Muller Hinton broth. We included six strains of Salmonella spp., previously isolated from raw meat, and the electrophoresis technique was used to determine the presence of antimicrobial peptides. The results showed that these peptides can only be identified in fresh samples of the extract.

Keywords: Mycelial culture, fractionation, susceptible, streptomycin.

Introducción

El complejo *Ganoderma lucidum* es un hongo usado extensamente como producto natural con un alto valor medicinal (Wang y Ng, 2006). Se usa como una panacea contra enfermedades crónicas como hepatopatías, nefritis, hipertensión, artritis, insomnio, bronquitis, asma, diabetes y cáncer (Baby *et al.*, 2015), así como en la prevención (Jiao-Jiao *et al.*, 2021).

En estudios con *G. lucidum* se identificaron hidroquinonas y triterpenoides que inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a metilicina, entre las que se encuentran algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, a dichas sustancias se les dio el nombre de ganomicinas (Ofodile *et al.*, 2011). 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 (Mojsoska y Jenssen, 2015). En un trabajo con medio de cultivo micelial filtrado con papel, el grupo de Saranthima *et al.*, (2017) reportó actividad antibacteriana contra cepas patógenas de *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque también mostró efecto leve contra: *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *E. coli* al determinar proteínas y fenoles del medio de cultivo para *G. lucidum* G2 cultivado durante dos semanas. También el grupo de Čilerdžić *et al.*, (2016) encontró actividad contra casi todas las bacterias probadas y donde *S. typhimurium* fue la más sensible al extracto etanolito de cultivo micelial de *G. lucidum* BEOFB 433.

Algunas especies del género *Ganoderma* se han reportado con múltiples propiedades medicinales en humanos como anti-VIH, anticáncer, antibacteriales, antihipertensión, antiinflamatorias, antioxidantes, hepatoprotectoras e inmunomoduladoras, entre otras (Paterson 2006; Mshigeni *et al.*, 2009; De Silva *et al.*, 2012; Tan y Vanitha, 2004; Jong y Birmingham, 1992; Wasser y Weis, 1999, Čilerdžić *et al.*, 2016). Podría decirse que las aproximadamente 486 especies del género *Ganoderma* (He *et al.*, 2022) contienen sustancias biológicamente activas fundamentalmente triterpenoides y polisacáridos, considerados críticos para sus efectos benéficos (Isaka *et al.*, 2013). Los polisacáridos de alto peso molecular obtenidos de

cultivo micelial presentan efectos antiobesidad y de modulación de la microbiota en ratones (Chang *et al.*, 2015). Según el grupo de Vazirian *et al.*, (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 formas aisladas no reflejan el mismo potencial.

La suplementación con tiamina muestra su importante contribución cuando se evalúa en optimización de medios de cultivo micelial en *Ganoderma lingzhi* para obtener polisacáridos actividad antioxidante (Si *et al.*, 2019). Esta suplementación de cultivo ha recibido una gran atención como alternativa prometedora y reproducible en la producción eficiente de micelio, sustancias bioactivas y metabolitos (Sanodiya *et al.*, 2009; Suhnel *et al.*, 2009). En estudios con *G. lucidum* se identificaron hidroquinonas y triterpenoides que inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a metilicina, entre las que se encuentran algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, a dichas sustancias se les dio el nombre de ganomicinas (Ofodile *et al.*, 2011). 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 (Mojsoska y Jenssen, 2015).

Las poliaminas (PAs) Putrescina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm) son pequeñas moléculas alifáticas policatiónicas, de bajo peso molecular, ubicuas e importantes para el crecimiento celular normal y su contenido se regula mediante biosíntesis, transporte y degradación (Igarashi y Kashiwagi, 2010). Las proteínas que conforman los sistemas de transporte de las PAs están bastante caracterizadas en bacterias mediante el modelo de *E. coli*, implicadas en la importación y exportación de las mismas (Dong-Hun *et al.*, 2018). Sin embargo, también se han aplicado como agentes antibacterianos dado que sus porciones policatiónicas que desestabilizan a los polisacáridos de la membrana externa de procariontes. Además, de la lipofiliidad de la

cadena de PAs y presentar un efecto sobre las porinas inhibitorias de la penetración de químicos tóxicos (Choi y Lee, 2019), dado que pueden unirse a las regiones internas, cargadas negativamente de dichas proteínas y desencadenar el cierre del canal. El mismo grupo de investigadores ha desarrollado complejos de PAs conjugadas con Cloranfenicol, encontrando mejores resultados no sólo en los sistemas de transporte transmembranal, sino también en la incorporación del antibiótico al ribosoma y mejorando su eficiencia.

El objetivo de este estudio es determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) a las que el caldo de cultivo suplementado con tiamina de la cepa *G. sichuanense* Gc73 (Cabarroí-Hernández *et al.*, 2023) inhibe diferentes cepas de bacterias, ya sean susceptibles y resistentes a la estreptomycin después de centrifugar, filtrar a través de una membrana de poros de 0,22 µm o separar por peso molecular <3,000 Daltones, así como el sinergismo con PAs contra distintas cepas de bacterias. Debemos mencionar que no existen reportes con este tipo de suplementación en el cultivo micelial, así como la probable presencia de péptidos antimicrobianos en dicho caldo de cultivo del hongo.

Materiales y Métodos

Cepas Bacterianas Utilizadas

En este experimento se utilizaron las siguientes cepas certificadas: *Bacillus subtilis* ATCC (ATCC; Manassas, VA, USA) 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 51811 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Además, se manejaron seis cepas de *Salmonella* spp, previamente aisladas de carne cruda, reportadas por Martínez-Chávez (2015) como resistentes y susceptibles a estreptomycin.

Ensayo Antimicrobial

Se utilizó el método de dilución. Inicialmente, se cultivaron las bacterias en tubos con 3 ml de caldo soya tripticasa (BD Bioxon, México) y se incubaron a 35 °C 20 a 24 h, durante tres días. Las colonias de bacterias fueron resuspendidas hasta alcanzar una turbidez igual a un estándar de 0.5 de

absorbancia de la escala de McFarland (0.5 ml de cloruro de bario (Cl₂Ba) y 9.5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄), en un tubo estéril y se homogenizaron por agitación durante 5 mins. Se tomó lectura en el espectrofotómetro (Jenway 6405, Reino Unido) 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 x 10⁸ UFC/ml). Usando un asa de inoculación se pasaron las bacterias a tubos que contenían caldo de cultivo de *G. sichuanense* cepa Gc73 (Cabarroí-Hernández *et al.*, 2023) suplementado con tiamina, en diluciones seriadas 1:2, mezclado con caldo Muller Hinton (BD Difco, Francia) con un volumen total de 1 ml. Los tubos se incubaron a 35 °C durante 20 a 24 h, después de dicho tiempo se seleccionaron aquellos tubos que no presentaban turbidez para inocularse en placas de agar sangre, en las pruebas confirmatorias. Tubos con estreptomycin a 1,240 µg/ml de Estreptomycin (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo) se usaron como control.

Pruebas de Susceptibilidad Bacteriana

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, es decir sin evaluar el efecto de las diluciones del antibiótico, y como control positivo se probó un tubo con 1,240 µg/mL de Estreptomycin, 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 suplementado con tiamina de *G. sichuanense* cepa Gc73 (Cabarroí-Hernández *et al.*, 2023), se inocularon en tubos de 13x100 mm que contenían 3 ml de caldo Mueller-Hinton (MH) esterilizado, y que previamente se les adicionaron volúmenes correspondientes a 10 diluciones seriadas 1:2 de la solución del caldo de cultivo sumergido suplementado con tiamina de *G. sichuanense* cepa Gc73 (Cabarroí-Hernández *et al.*, 2023). 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, 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 mins 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 Unidades Formadoras de Colonias (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 las bacterias por agitación en vortex (Genie) durante unos segundos, se incubaron a 35°C por 24 hrs. 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 “posibles” bacterias en agar sangre en las pruebas de confirmación de los resultados.

Cultivo en Agar Sangre o Prueba Confirmatoria

De los tubos en donde se colocó el inóculo, más el caldo total del cultivo sumergido suplementado con tiamina de *G. sichuanense* cepa Gc73 (Cabarro-Hernández *et al.*, 2023), y que no presentaron turbidez después de la incubación, se inoculó, con el método de estriado, una alícuota en agar sangre (BBL Becton Dickinson, México) en placa de Petri. El cultivo en agar sangre se incubó a 35 °C durante 20 a 24 h para confirmar si existe o no la presencia de bacterias. 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.

Sinergismo con Poliaminas

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron siguiendo algunas recomendaciones del

CLSI para determinar la CMI de las bacterias al medio del cultivo sumergido suplementado con tiamina de *G. sichuanense* cepa Gc73 (Cabarro-Hernández *et al.*, 2023). Para este reto se utilizaron tubos de 13x100 mm con 3 ml de caldo Mueller-Hinton (MH) en condiciones de esterilidad. Se prepararon diluciones seriadas 1:2, a partir de una dilución al 20% del caldo de cultivo MH con la solución del medio de cultivo sumergido suplementado con tiamina de *G. sichuanense* cepa Gc73. En los grupos en que se adicionó las PAs: Pu, Spd y Spm se usó la concentración de 1,240 μ g/mL, combinadas las tres PAs o independientes en tubos aislados.

Electroforesis para Péptidos Antimicrobianos

La separación electroforética se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida al 7.5% y 10% con un espesor de 0.8 mm, se prepararon según instrucciones del fabricante Mini Protean 3® (BioRad®, Hércules). El proceso se llevó a cabo por 1 h en amortiguador de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8,3) a un voltaje constante de 100 V, utilizando marcadores preteñidos de 2 a 150 KDaltones de peso molecular (BioRad®), en cada corrida electroforética, para estimar el peso de las bandas. Para la visualización de las proteínas purificadas se tiñeron los geles con azul de Coomassie coloidal siguiendo el protocolo descrito por Neuhoff *et al.*, (1998). Posteriormente se sumergió los geles en una solución de ácido acético 10% y glicerol 5% para su conservación.

Resultados y Discusión

Actividad antibacterial

Los efectos antibacteriales del caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense* cepa Gc73 representados en la Figura 1, se probaron contra las cepas patógenas gram positivas *Bacillus subtilis* ATCC (ATCC; Manassas, VA, USA) 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 51811, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y *Micrococcus luteus* ATCC 9341, y presentaron su

efectividad a partir de una concentración de 50 µl, en todas las cepas de prueba. Este resultado es similar al encontrado por Albino *et al.*, (2007), en el cual investigó el efecto antimicrobiano por el método de micro dilución del extracto austrálico de *G. lucidum*, que mostró susceptibilidad de cepas como *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. También coincide con lo reportado por Zuluaga *et al.*, mismo que menciona que existe actividad antibacteriana del extracto etanólico de *G. lucidum* sobre una bacteria Gram positiva como *S. aureus* y una Gram negativa como *E. coli* (Zuluaga *et al.*, 2007). La actividad parece depender del tipo de moléculas aisladas en cada método de separación.

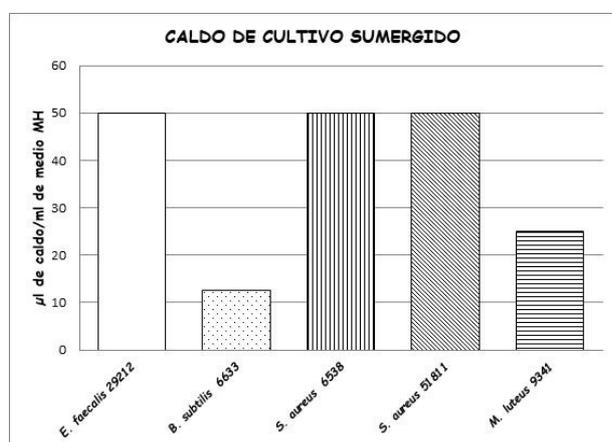


Figura 1. Se muestra la CMI obtenida cuando se reta a las cepas bacterianas ATCC contra el caldo de cultivo sumergido completo de *G. sichuanense* cepa Gc73, según se menciona en la sección de metodología.

En la figura 2 se presenta la reproducibilidad de los resultados para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, como se observó para el experimento de caldo de cultivo sumergido suplementado con timina crudo, con 50 µl del extracto filtrado con membrana de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore, Francia). Pero no así para *B. subtilis* ATCC 6633 y *M. luteus* donde aumentó la CIM al doble de concentración con 25 µL y 50 µL, respectivamente. Es interesante la disminución de la cantidad del caldo de cultivo micelial para *S. aureus* ATCC 51811. Además, este tipo de tratamiento logra una CIM a 25 µl del caldo de cultivo sumergido suplementado con tiamina, filtrado para las cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Dado que los distintos métodos de separación retiran algún(os) compuesto(s) que sinergiza(n) con

los retenidos y se requiere de mayor cantidad para lograr el efecto, o bien, que exista cierta especificidad de los compuestos en el caldo micelial hacia ciertos componentes celulares de *S. aureus* ATCC 51811.

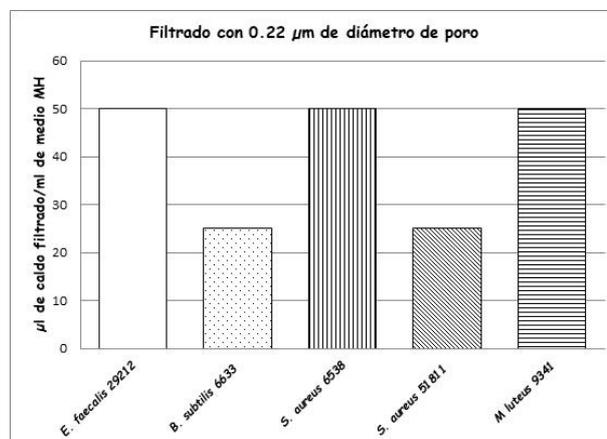


Figura 2. Se muestra la CMI obtenida cuando se reta a las cepas bacterianas ATCC contra el caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense* cepa Gc73 filtrado mediante membrana de nitrocelulosa con 0.22 µm de diámetro de poro.

Sin embargo, para *Micrococcus luteus* ATCC 9341, donde la CIM se elevó al doble, respecto al caldo de cultivo sumergido total suplementado con tiamina, o sea 50 µL de volumen del caldo Muller Hinton (BD Difco, Francia), donde se llevó a cabo el reto bacteriano con el filtrado del caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense* cepa Gc73 suplementado con tiamina y que se obtuvo después de pasarlo por una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore, Francia). Los resultados obtenidos nos permiten especular sobre la posibilidad de la existencia de moléculas con cierta especificidad para *Micrococcus luteus* y no para las otras bacterias probadas en este trabajo.

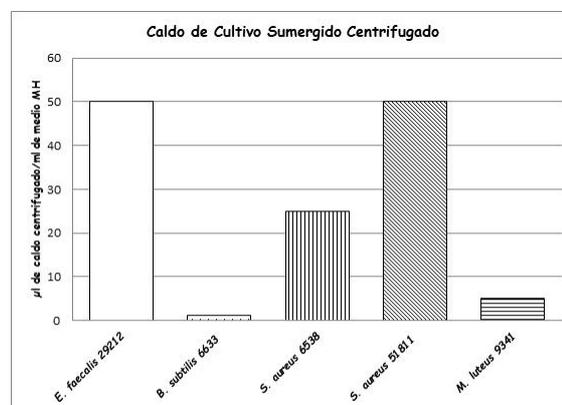


Figura 3. Se muestra la CMI obtenida en los experimentos, donde se reta a las cepas bacterianas ATCC contra el caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense* cepa Gc73 y que fue centrifugado a 2,500 rpm, durante 10 mins, para seguir el procedimiento que se menciona en la sección de metodología.

Para la centrifugación a 2,500 rpm durante 10 mins (Figura. 3) y que consideramos la técnica de separación más económica entre las probadas aquí se logran los resultados más alentadores, ya que para *B. subtilis*, *S. aureus* y *M. luteus* la CIM disminuye. Con sólo 2.5 µL para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y 6 µL para *Micrococcus luteus* ATCC 9341, además de 25 µL en el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 lo que representa un efecto de CIM con la mitad de caldo respecto al caldo total (Figura. 1), este último efecto llama la atención, dado que en ninguna otra prueba presentada aquí se logró como con el sobrenadante del centrifugado. Al retirar las moléculas de mayor masa se logra un mayor sinergismo antibacterial entre los compuestos activos producidos por el micelio de *G. sichuanense* cepa Gc73 cultivado en el caldo suplementado con tiamina.

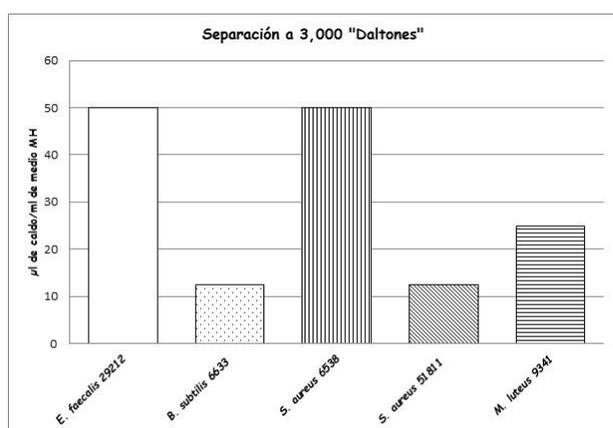


Figura 4. Se muestra la CIM obtenida al probar a las cepas bacterianas certificadas contra el caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense* cepa Gc73 y que fue centrifugado para separar las moléculas, a partir de 3,000 "Daltones" de peso molecular.

También se observan resultados muy interesantes cuando se fracciona el caldo de cultivo micelial suplementado con tiamina, según su peso a menos de 3,000 Daltones (Figura. 4), dado que se obtiene la CIM con la mitad de la cantidad de dicha fracción para *S. aureus* ATCC 51811 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 a 25 µL, respecto al caldo centrifugado (Figura. 3). Dado que se utilizaron las mismas condiciones de centrifugación y que los metabolitos secundarios tienen un peso molecular menor a 900 Daltones (Hadacek y Bachmann, 2015), aunque los triterpenoides con un esqueleto base de C30 presentan un peso molecular que va de 400 a 600 kDa (Wachtel-Galor *et al.*, 2011) y al retirar las moléculas de más

de 3,000 Daltones, se purifican aquellas que presentan la mayor actividad antibacterial por lo que se obtiene mejor resultado con la mitad del volumen para dichas cepas de bacterias, sin embargo se mantiene la actividad para *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Probablemente estamos frente a un fenómeno similar a los efectos logrados con extractos de plantas, donde se puede pensar que se genera una regulación holística, que interviene a través de múltiples blancos y mecanismos, y se obtiene así eficacia antibacterial. Más de 100 triterpenos con su composición química y configuración molecular se reportan para *G. lucidum*, de los cuales más de 50 se consideran nuevos y únicos para dicho hongo (Wachtel-Galor *et al.*, 2011).

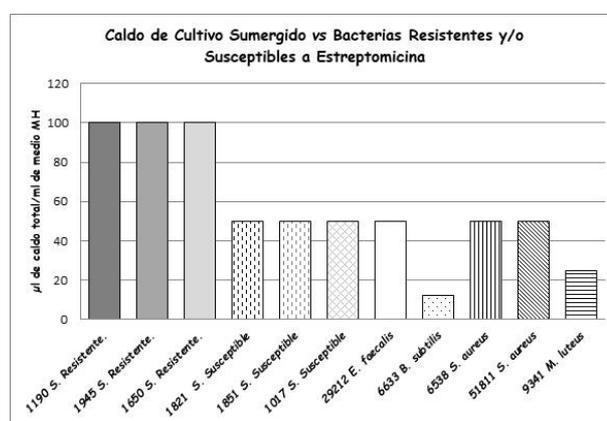


Figura 5. Se muestra la CIM obtenida cuando se reta a las cepas bacterianas ATCC, así como aquellas de *Salmonella* resistentes y susceptibles a estreptomina, contra el caldo de cultivo sumergido *G. sichuanense*, cepa Gc73 según se menciona en la sección de metodología.

En cuanto a las cepas resistentes a estrepptomina (Figura. 5) la exposición del caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense* cepa Gc73 suplementado con tiamina se puede apreciar un efecto antibacterial en todas las cepas de bacterias probadas. La Figura 5 muestra como las cepas resistentes a estreptomina de la especie *Salmonella* con asignación numérica 1190, 1945 y 1650, según Martínez-Chávez *et al.* (2015) inhiben su crecimiento con 100 µl de caldo de cultivo sumergido suplementado con tiamina, en 1 ml del caldo Muller Hintom (BD Difco, Francia) 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, según el mismo autor, pero con sólo 50 µl del caldo de

cultivo sumergido suplementado con tiamina. 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 a dicho antibiótico.



Figura 6. Efecto del sinergismo del caldo de cultivo micelial de *G. sichuanense* cepa Gc73 con las Poliaminas: Putrescina, Espermidina y Espermina, con la CMI para cepas de bacterias utilizadas en las pruebas previas.

En general se espera que los constituyentes químicos de hongos difieran entre especies del mismo género (Loyd *et al.*, 2018). Según reportes previos dichas moléculas en este tipo de cultivo corresponden a alcaloides, terpenoides y de naturaleza fenólica (Ofodile *et al.*, 2011; Yihuai *et al.*, 2003; Ofodile, 2006), así como algunos metabolitos secundarios que inclusive muestran efecto contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos sintéticos como lo mencionan (Demain, 2009). El cultivo sumergido incrementa la producción de ácido ganodérico utilizando distintas estrategias de desarrollo (Baby *et al.*, 2015) y el trabajo de Djide *et al.* (2014) muestra la actividad antibacteriana de los triterpenoides en el cuerpo fructífero de *G. lucidum*. 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 *et al.*, 2014). También exopolisacáridos de *G. applanatum* muestran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio fischeri* a partir de cultivo micelial, lo que incrementa la gama de sustancias con dicha actividad (Osińska-Jaroszuk *et al.*, 2014).

A partir de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 2.5 µL de medio de cultivo del hongo, en un mL de caldo MH, así

como la adición de 1,240 µg/mL de las tres PAs se desarrollaron las pruebas de susceptibilidad. *Staphylococcus aureus* ATCC 51811 y 6538, así como *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mostraron ser susceptibles a 50 µL/mL de caldo MH. Además, se puede observar que presenta susceptibilidad *Bacillus subtilis* ATCC6633 a 12.5 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 a 25 µL de medio de cultivo sumergido, respectivamente. Así mismo, podemos observar en la Figura 6 que la adición de PAs inhibe desde los 2.5 µL de medio de cultivo sumergido, pero a concentraciones de 50 y 100 µL de medio de cultivo sumergido no se inhibe el crecimiento para *Enterococcus faecalis* ATCC29212, y no es hasta 200 µL/mL de caldo MH que se logra su total inhibición.

Los resultados son congruentes con estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, excepto para *Enterococcus faecalis* ATCC29212, probablemente debido a que sintetiza una enzima homóloga a N-acetiltransferasas del metabolismo de PAs, que tiene como sustrato a las mismas PAs y les confiere mayor virulencia en mutantes de dicha especie (Martini *et al.*, 2015).

Cuadro1. Sinergismo del caldo de cultivo para *Ganoderma sichuanense* cepa Gc73 (50 µL/mL de medio Muller Hilton) con las PAs Putrescina, Espermidina y Espermina a 1,240 µg/mL de medio Muller Hinton.

Bacterias	Penicilina 150 µg/mL	Putrescina 1,240 µg/mL	Espermidina 40 µg/mL	Espermina 1,240 µg/mL
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	No crece	crece	No crece	No crece
<i>Staphylococcus aureus</i> 51811	No crece	crece	No crece	No crece
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	No crece	crece	No crece	No crece
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	No crece	crece	crece	Crece
<i>Micrococcus luteus</i> 9341	No crece	No crece	No crece	No crece

Para probar el sinergismo de sustancias ubicuas y con actividad antibacteriana como las PAs. Se usó de manera individual 50 µL/mL de medio de cultivo de *G. sichuanense* de la cepa Gc73. En el Cuadro 1 se pueden observar los resultados correspondientes y que sugieren un sinergismo muy marcado para *Micrococcus luteus* ATCC9341, dado que las tres PAs en forma individual inhiben su desarrollo. No así para el resto de las cepas en estudio y específicamente para Putrescina. En el caso de Espermidina y Espermina parece existir un efecto sinérgico para todas las cepas, y nuevamente exceptuando a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. A este respecto el grupo de Igarashi en 1977 utilizó

Literatura citada

- Albino, E. F., Monache, F. D., Yunes, R. A., Paulert, R. y Junior, A. S. (2007). Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma austral*. *Braz. J. Pharmacog*, 17(1), 14-16.
- Arenas, I., Villegas, E., Walls, O., Barrios, H., Rodríguez, R. y Corzo, G. (2016). Antimicrobial Activity and Stability of Short and Long Based Arachnid Synthetic Peptides in the Presence of Commercial Antibiotics. *Molecules*, 21, 225 DOI: 10.3390/molecules21020225
- Baby, S., Johnson, A. J. y Govindan, B. (2015). Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, 114, 66–101.
- Cabarroi-Hernández, M., Decock, C., Welti, S., Amalfi, M., Villalobos-Arámbula, AR., Aliaga-Ramos, D., Morera, G., Macedo-Pérez Sandi, E., Almarales Castro, A. y Guzmán-Dávalos, L. (2023). *Ganoderma* from Cuba: an approach to some species based on morphology and phylogenetic analyses. *Biological Journal of the Linnean Society*, blad055. DOI: 10.1093/biolinnean/blad055
- Chang, C. J., C. S. Lin, C.C. Lu, J. Martel, Y. F. Ko, D. M. Ojcius, S. F. Tseng, T. R. Wu, Y. Y. Chen, J. D. Young y H. C. Lai. (2015). *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat Commun*, 23. DOI: 10.1038/ncomms8489.
- Chang, S. T. y Buswell, J. A. (1999). *Ganoderma lucidum* (lingzhi), a mushrooming medicinal mushroom. *Int J Med Mushroom*, 11, 1319–1346.
- Chang, S. T. (2004). *Ganoderma lucidum*—a leader of edible and medicinal mushrooms. *Int Agri Trade*, 90, 22–24.
- Choi, U. y Lee, C. R. (2019). Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 30, 1-9. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00953.
- Čilerdžić, J., Stajic, M. y Vukojevic, J. (2016). Potential of Submergedly Cultivated Mycelia of *Ganoderma* spp. as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Curr Pharm Biotechnol*, 17(3), 275-82.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Fons, F., Bahkali, A. H. et al. (2012). Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 55, 1–35.
- Demain, A. L. (2009). Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev*, 29(6), 821-42.
- Deng, H., Bloomfield, V. A., Benevides, J. M. y G. J. (2000). Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res*. 1, 28(17), 3379-85.
- Djide, M. N., Sartini, L. Rahman y N. Hasyim. (2014). Antibacterial Activity of Various Extracts From The Fruiting Bodies Of *Ganoderma lucidum* Growing At Samanea Saman (Jacq.) Merr) Trunk. *Int J Sci & Technol Res*, 3(1), 15-16.
- Dong-Hun, B., Darius, J. R., Lane, P., Jansson, J. y Des, R. R. (2018). The old and new biochemistry of polyamines. *Bbagen*. DOI:10.1016/j.bbagen.2018.06.004.
- Hadacek, F. y Bachmann, G. (2015). Low-molecular-weight metabolite systems chemistry. *Front in Envir Sci Envir Toxicol*. (3)12:1-21.
- He, MQ., Zhao, RL., Liu, DM., Denchev, TT., Begerow, D., Yurkov, A., Kemler, M., Millanes, AM., Wedin, M., McTaggart, AR., Shivas, RG., Buyck, B., Chen, J., Vizzini, A., Papp, V., Zmitrovich, IV., Davoodian, N., Hyde, KD. (2022). Species diversity of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 114, 281–325. DOI: 10.1007/s13225-021-00497-3
- Igarashi, K. y Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol and Biochem*. 48. 506e512.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol Biochem*, 48(7), 506-512. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.01.017.
- Isaka, M., Chinthanom, P., Kongthong, S. y Srichomthong, K. (2013). Lanostane triterpenes from cultures of the Basidiomycete *Ganoderma orbiforme* BCC 22324. *Phytochemistry*, 87, 133–139.

- Jiao-Jiao, Z., Dai-Wei, W., Dan, C., Qing, L. y Yong-Xian, Ch. (2021). Meroterpenoids From *Ganoderma lucidum* Mushrooms and Their Biological Roles in Insulin Resistance and Triple-Negative Breast Cancer. *Front Chem*, 9. DOI: 10.3389/fchem.2021.772740.
- Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., Mizerska-Dudka, M., Błachowicz, A., Rejczak., TP, Janusz, G., Wydrych, J., Polak, J., Jarosz-Wilkofazka, A., Kandefer-Szerszeń, M. (2014). Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. *Biomed Res Int*. DOI: 10.1155/2014/743812.
- Jong, S. C. y Birmingham, J. M. (1992). Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv Appl Microbiol*, 37, 101–34.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Loyd, A. L., Richter, B. S., Jusino, M. A., Truong, C., Smith, M. E., Blanchette, R. A. y Smith, J. A. (2018). Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the *Ganoderma* Species Composition in Commercial Reishi Products. *Front. Microbiol.* 9, 1557, 1-14. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01557
- Martínez-Chávez, L., Cabrera-Díaz, E., Pérez-Montaño, J. A., Garay-Martínez, L. E., Varela-Hernández, J. J., Castillo, A., Lucia, L., Ávila-Novoa, M. G., Cardona-López, M. A., Gutiérrez-González, P. y Martínez-González, N. E. (2015). Quantitative distribution of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. *Int J Food Microbiol*, 1(210), 149-155.
- Martini, C., Michaux, C., Bugli, F., Arcovito, A., Iavarone, F., Cacaci, M., Paroni Sterbini, F., Hartke, A., Sauvageot, N., Sanguinetti, M., Posteraro, B. y Giard, J. C. (2015). The polyamine N-acetyltransferase-like enzyme PmvE plays a role in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 83(1), 364-371.
- Mojsoska, B. y Jenssen, H. (2015). Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. *Pharmaceuticals*, 8, 366-415.
- Neuhoﬀ, V., Arold, N., Taube, D. y Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9, 255-262.
- Ofodile, L. N., Wanneka, A. O. 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, L. N. (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.
- Paterson, R. R. M. (2006). *Ganoderma* a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67(18), 1985–2001.
- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. y Bisen, P. S. (2009). *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus. *Curr Pharm Biotech*, 10(8), 717-742.
- Sarnthima, R., Khammaung, S. y Sa-Ard, P. (2017). Culture broth of *Ganoderma lucidum* exhibited antioxidant, antibacterial and α -amylase inhibitory activities. *J Food Sci Technol*, 54(11), 3724-3730. DOI: 10.1007/s13197-017-2839-6.
- Si, J., Meng, G., Wu, Y., Ma, HF., Cui, BK., Dai, YC. (2019). Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1186-1196. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.274
- Suhnel, S., Lagreze, F., Ferreira, J. F., Campestrini, L. H. 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.
- Tan, B. K. H. y Vanitha, J. (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Curr Med Chem*. 11: 1423–1430.

- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Branquinho, P., Seabra, R. y M. Bastos. (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, M. A., Ebrahimi, S. E., Esfahani, H. R., Samadi, N., Hosseini, S. A., Asghari, A., Manayi, A., Mousazadeh, A., Asef, M. R., 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 Mush*, 16(1), 77-84.
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. A. y Benzie, I. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi) A Medicinal Mushroom. Major bioactive components; Triterpenes, in: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. (2da edición). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Wang, H. y Ng, T. B. (2012). Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27(1), 27-30.
- Wasser, S. P. y Weis, A. L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *Int J Med Mushrooms*, 1, 31-62.
- Yihuai, U., Zhau, S., Huang, M. y Xu, A. (2003). Antibacterial and Antiviral Value of the Genus *Ganoderma* Species (Amphylophoro mycetideae): A Review. *Int J Med Mushrooms*, 5, 235-246.
- 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*, (33), 329-332.