

METABOLITOS INHIBIDORES DE BACTERIAS PRODUCIDOS POR HONGOS LIGNOCELULÓSICOS CULTIVADOS EN RESIDUOS DE NARANJA

METABOLITES THAT INHIBIT BACTERIA PRODUCED BY LIGNOCELLULOSIC FUNGI GROWN IN ORANGE WASTE

Cruz, Elias¹; Tejerina, Marcos¹; Benitez Ahrendts, Marcelo R.¹

RESUMEN

Se evaluó la degradación del residuo de naranja por tres hongos de la podredumbre blanca de la madera (*Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* y *Pycnoporus sanguineus*) y solamente creció *P. sanguineus* colonizando todo el sustrato en 20 días. La velocidad media de crecimiento micelial en placas de agar-naranja fue de 6,1 mm/día. Los extractos del micelio de *P. sanguineus* con 16 y 32 mg de sólidos/mL mostraron actividad frente a *Escherichia coli* B y *E. coli* C., *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, *E. coli* A no fue inhibido por 16 mg/mL. No se observó inhibición de tales bacterias a una concentración de 8 mg/mL.

Palabras claves: Antibiosis. Degradadores de lignina. Residuo de naranjas.

SUMMARY

Orange waste degradation by three white-rot wood fungi (*Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* y *Pycnoporus sanguineus*) was assessed and only *P. sanguineus* grew colonizing the whole substrate in 20 days. Mycelial average growth on orange agar was 6.1 mm/day. Mycelial extracts of *P. sanguineus* with 16 and 32 mg/mL solids showed activity against *Escherichia coli* B and *E. coli* C., *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. However, *E. coli* A was not inhibited with 16 mg/mL. Bacterial inhibition of said bacteria was not observed at 8 mg/mL concentration.

Keywords: Antibiosis. Orange wastes. White-rot fungi.

INTRODUCCIÓN

Los hongos que generan enzimas extracelulares causando podredumbre blanca de la madera, principalmente por la degradación de celulosa y lignina, pertenecen casi exclusivamente a la división *Basidiomycota*. Deben su acción a las enzimas β -amilasa, celulasa, xilasa, Mn-peroxidasa, lignin-peroxidasa, lacasa y otras (Webster y Weber, 2008). Se ha ensayado el crecimiento de estos hongos en más de 30 residuos agroindustriales tan diversos como aserrín de pino, cedro, roble, paja de cereales, los subproductos de la cosecha del café, de la caña de azúcar, del maíz, porto, en hojarasca, cascaras, entre otros (Mora y Martínez-Carrera, 2007; Quiroz-Castañeda y otros, 2010; Sánchez y Mata, 2012).

La producción mundial de naranjas es aproximadamente de 47 mil millones de toneladas (período 2016/2017). La Argentina contribuye con el 2,19% de dicha producción, destinando a su cultivo un total de 45.984 hectáreas, en donde la provincia de Jujuy participa con 4.545 hectáreas, siendo el octavo productor mundial de frutos cítricos, con un total de 2,3 millones de toneladas destinadas a la producción de jugo concentrado (Federcitrus, 2017), generando gran cantidad de residuos. El alto contenido de carbohidratos y bajo de lignina hacen de estos residuos un sustrato potencialmente apto para el crecimiento fúngico (Piñero-Bonilla y Díaz, 2010).

Pleurotus ostreatus y *Lentinus edodes*, además de producir enzimas hidrolíticas y oxidativas con importantes aplicaciones en el campo industrial y en la bioremediación, sintetizan compuestos tales como poliacetilenos, sesquiterpenoides, ácidos linoleico y oleico, y aminoglúcidos, presentando actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas (Gbolagade y otros, 2007; Iwalokum y otros, 2007).

Las especies silvestres de *Pycnoporus sanguineus* producen enzimas con interés biotecnológico, como también metabolitos secundarios que pueden ser usados como antimicrobianos. Entre los pigmentos que le dan el color rojizo anaranjado al *Pycnoporus* se encuentran: cinabarina, tramesanguina, ácido cinnabarínico, poliporin y varios derivados de 2-amino-fenoxazin-3-ona con actividad antimicrobiana (Achenbach y Blumnotros, 1991; Acosta-Urdapilleta y otros, 2010; Smania y otros, 1998).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la degradación de residuos de naranja por hongos lignocelulósicos y obtener extractos crudos con probable acción antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hongos lignocelulósicos

Se recolectaron, en la zona de valle templado de Jujuy, los ejemplares identificados como *Pycnoporus sanguineus* de acuerdo a Téllez-Téllez y otros (2016) y Wright y Albertó (2002). Se cultivó parte del interior de los basidiocarpos en agar malta (extracto de malta 30 g, peptona de soja 3 g, agar 15 g, agua 1 L; pH 5,4). Además, se emplearon cultivos comerciales de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*.

Sustrato

Las cáscaras de naranjas se procesaron de acuerdo a Acosta-Urdapilleta y otros (2010) y se esterilizaron a 121° C por 20 minutos.

Siembra

Se inocularon explantes de 2,5 cm² provenientes de cultivos mantenidos 9 días a 25°C. La siembra de cada hongo se realizó por quintuplicado bajo condiciones de esterilidad y se incubaron en la oscuridad por un periodo de 20 días. Las especies fúngicas que crecieron sobre el residuo de naranjas se sembraron en agar naranja (residuo de naranja triturado 100 g, agar 16 g, agua 1 L).

Extracto del micelio fúngico

Se separó y deshidrató el micelio a 105 °C durante 20 horas. Se trituró en un mortero con acetato de etilo. Luego se filtró por papel y se evaporó el solvente a temperatura ambiente. El proceso se repitió varias veces y se pesó el total del material extraído. Éste se disolvió nuevamente en acetato de etilo para obtener concentraciones de 8, 16, 24 y 32 mg/ml.

Bacterias

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizaron *Escherichia coli* (cepas designadas A, B y C que presentan diferente resistencia a los antibióticos), *Salmonella typhi* y

Staphylococcus aureus. Se cultivaron en caldo nutritivo durante 24 horas a 35°C y se hicieron diluciones para obtener 1,4 x 10⁷ ufc/ml.

Prueba de inhibición

Se colocó 50 µl de cada suspensión bacteriana en una placa, luego se agregó 20 ml del medio Müller-Hinton (extracto de carne 2 g; hidrolizado de caseína 17,5 g; almidón 1,5 g; agar 15 g; agua 1 L; pH 7,3) a 44-45°C y se mezcló cuidadosamente. Luego se hicieron pocillos de 4 mm de diámetro donde se vertieron 25 µl de las diferentes concentraciones de los extractos (8 mg/ml, 16 mg/ml, 24 mg/ml, 32 mg/ml), un control negativo (solvente puro acetato de etilo) y como control positivo se utilizaron discos con estreptomicina (300 µg) y gentamicina (10 µg). Se consideró como primer criterio de clasificación las diferentes concentraciones (mg de extracto/ml de solvente), dando un total de 4 niveles (8 mg/ml, 16 mg/ml, 24 mg/ml, 32 mg/ml) y como segundo criterio de clasificación cada una de las bacterias *E. coli* (cepas A, B, C), *S. aureus*, *S. typhi*. Estos ensayos fueron realizados por quintuplicado. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 horas y posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición (Rojas y otros, 2004).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis bifactorial completamente aleatorizado de 4 x 5, con 5 repeticiones, en donde se tomó como variable respuesta el diámetro del halo de inhibición. El análisis de comparación de medias utilizado es el test de Tukey.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Hongos lignocelulósicos

Pycnoporus sanguineus, *P. ostreatus* y *L. edodes* colonizaron completamente las placas de agar malta en 12, 13 y 15 días, respectivamente, datos que concuerdan con los de otros investigadores (Gaitán-Hernández y otros, 2006; Sánchez y Mata, 2012). La velocidad media de crecimiento de *P. sanguineus* en placas de agar-naranja fue de 6,1 mm/día.

Evaluación del crecimiento sobre residuo agro-industrial de naranjas

Se observó que de los tres hongos (*L. edodes*, *P.*

ostreatus y *P. sanguineus*) sembrados en el residuo agro-industrial, solamente *P. sanguineus* creció y colonizó el sustrato completamente en un periodo de 20 días. El sustrato se mantuvo a una temperatura de 25°C, humedad relativa de 80% y un tamaño de partícula igual 1 mm o inferior. Estos resultados difieren a los obtenidos por Inacio y otros (2015), en donde evaluaron el crecimiento de *P. pulmonarius* sobre residuos de naranjas. Diversos residuos agro-industriales son sustratos adecuados para el crecimiento del micelio de *L. edodes* y *P. ostreatus*, pues cuentan con las enzimas necesarias para su degradación (Sanchez y Mata, 2012). Probablemente lo que afectó el crecimiento de *L. edodes* y *P. ostreatus* fue la poca porosidad y la compactación del sustrato debido a que el tamaño de las partículas era de 1 mm o inferiores, limitando la cantidad de oxígeno que es necesaria para el crecimiento y desarrollo del hongo. Royse y Sánchez-Vázquez (2003) demostraron que los sustratos formulados con un tamaño de partículas inferior a 1 mm producían un crecimiento nulo o casi nulo de *L. edodes*.

P. sanguineus tuvo un crecimiento vigoroso en 20 días de incubación, observándose un crecimiento micelial al principio de color blanco y posteriormente variando a un color anaranjado. Acosta-Urdapilleta y otros (2012) observaron un periodo de colonización completa de granos de trigo entre 15 y 20 días. El sustrato a base de cáscara de naranja, al igual que el grano de trigo, contiene bajo contenido de lignina y una mayor proporción de carbohidratos (celulosa para el residuo de naranja y almidón para el grano de trigo), facilitando de esta manera la bioconversión microbiana, ya que la lignina es más resistente a la degradación enzimática (Piñero-Bonilla y otros, 2010). Los estudios realizados sobre el crecimiento de *P. sanguineus* y otros hongos de pudrición blanca en distintos materiales ligno-celulosicos también mostraron un mayor crecimiento en sustratos con una muy baja cantidad de lignina (Marquez-Mota y otros 2012; Quiroz-Castañeda y otros, 2010). *P. sanguineus* presenta gran adaptabilidad y resistencia a condiciones desfavorables, se lo encuentra sobre troncos caídos o quemados, y madera de lugares modificados por el hombre. El complejo enzimático de *P. sanguineus* resiste temperaturas de hasta 80°C y un rango de pH entre 2 y 8 (Quiroz-Castañeda y otros, 2010).

Actividad antibacteriana

Bacterias	Halo de inhibición en mm para los extractos de <i>P. sanguineus</i>				Controles		
	8mg/mL	16mg/mL	24	32	Negativo	Positivo	
			mg/mL	mg/mL		Estrepto- micina 300 µg	Genta- micina 10 µg
<i>E. coli A</i>	-	-	9,4 ± 1,14	10,8 ± 0,83	-	23	24
<i>E. coli B</i>	-	11,4 ± 2,07	11,2 ±1,30	12,6 ± 1,67	-	18	17
<i>E. coli C</i>	-	11,6 ± 1,14	12 ± 0,70	17 ± 1,58	-	22	18
<i>S. thypi</i>	-	12 ± 0,70	15,2 ±1,78	21,8 ± 1,92	-	24	24
<i>S. aureus</i>	-	13,6 ± 0,89	14,8 ±1,09	19,6 ± 1,51	-	28	15

El signo – indica que no se presentó inhibición.

Tabla 1. Media ± Desviación estándar en mm de diámetro de los halos de inhibición (n=5) presentados por las bacterias en contacto con los extractos de *P. sanguineus*.

Los extractos acetónicos obtenidos de los cultivos fúngicos crecidos en residuos de naranja mostraron actividad antimicrobiana frente a todas las bacterias evaluadas (*E. coli* cepa A, *E. coli* cepa B, *E. coli* cepa C, *S. aureus* y *S. typhi*) a concentraciones de 16 mg/mL y 32 mg/mL, excepto en la cepa A de *E. coli*, en donde no se registró inhibición a una concentración de 16 mg/ml (tabla 1) probablemente debido a la resistencia a diversos antibióticos adquirida por la cepa.

Smania y otros (1998) observaron actividad inhibitoria y bactericida a concentraciones iguales o mayores a 4 mg/mL con estas mismas bacterias. Por su parte, Cruz-Muñoz y otros (2015) comprobaron la inhibición de bacterias de interés clínico a concentraciones iguales o mayores a 8 mg/mL. En el ensayo se utilizaron concentraciones iguales y superiores a 16mg/mL, esto se puede deber a que los pigmentos extraídos del micelio contenían una menor cantidad de cinabarina con respecto a los del basidiocarpo, y por lo tanto su efecto menor (Acosta-Urdapilleta y otros, 2010).

El extracto de *P. sanguineus* fue efectivo tanto en el control de bacterias Gram positivas como Gram

negativas, coincidiendo con lo dicho por Smania y otros (1998) aunque estos autores expresan que existe una mayor acción sobre las Gram positivas. Al provocar inhibición en el crecimiento de ambos grupos bacterianos, se puede inferir que los principios activos que están presentes en el extracto, en su mayoría cinabarina, no actúan sobre la síntesis de la pared celular aclarar, con lo que deberá existir otro mecanismo de acción que sería interesante dilucidar. Los halos de inhibición de las cepas más sensibles no fueron mayores que las de los controles positivos (estreptomicina y gentamicina).

Estos pigmentos, principalmente la cinabarina, tienen potencial contra infecciones producidas por *E. coli*, *S. typhi* y *S. aureus* como también sobre otras bacterias patógenas que se encuentran en los alimentos (Sánchez y Mata, 2012).

Análisis estadístico de la inhibición microbiana

Los resultados del análisis bifactorial completamente aleatorizado, demostraron que los factores en estudio presentan diferencias

significativas, lo que implica que cada bacteria responde de diferente manera a las distintas concentraciones del extracto, como también que unas son más sensibles que otras. En el ANAVA estableció que existe diferencia significativa entre las concentraciones del extracto y entre las diferentes cepas bacterianas. test de Tukey, estableció diferencias significativas entre las medias de los halos de inhibición de las distintas cepas bacterianas.

CONCLUSIÓN

Los basidiomas recolectados en la zona de valle templado de Jujuy se identificaron como *P. sanguineus*. Se evaluó el crecimiento de éste y otros hongos lignocelulósicos, sobre residuos de naranjas siendo *P. sanguineus* el único que creció sobre el sustrato sólido debido principalmente a su composición química, como también un pH adecuado para la producción de metabolitos secundarios. Las bacterias inhibidas por distintas concentraciones del extracto de este hongo fueron *S. aureus*, *S. typhi* y *E. coli*. Es interesante la producción industrial de *P. sanguineus* pues representa una alternativa a los productos farmacológicos aplicados en animales y además crece sobre sustratos considerados un desperdicio como la cáscara de naranjas.

BIBLIOGRAFÍA

Achenbach, H. & Blumm, E. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus*: pycnosangi and new phenoxazin-3-one. *Archiv der Pharmazie* 324: 3-6.

Acosta-Urdapilleta, L.; Alonso, G.A.; Rodriguez, A.; Adame, M.; Salago, D., Salago, J.; Montiel-Peña, M.; Medrano-Vega, F. & Villegas, E.C. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. 189-220 En: Martínez-Carrera, D., Cuvertto, N., Sobal, M., Mora, V. M. (eds). Hacia un Desarrollo Sostenible de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. Micología Aplicada Internacional. Puebla, México.

Cruz Muñoz, R.; Piña-Guzmán, A.B; Yañez-Fernández, J.; Valencia-Del Toro, G Bautista-

Baños, S & Villanueva Arce, R. 2015. Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia* 49 (4): 347-359.

Federcitrus, 2017. Informe regionales 2017: Estadística de los últimos diez años en la actividad citrícola en Argentina. Disponible en :www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2017.pdf. Último acceso: 4 de junio del 2017.

Gaitán-Hernández, R.; Salmones, D.; Mata, G. Merlo, R. 2006. Característica generales de las setas y Elaboración del inoculo: 3-19 Manual Práctico del Cultivo de Setas: Aislamiento, Siembra y Producción. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz México.

Gbolagade, J.; Kigigha, L. & Ohimain, E. 2007. Antagonistic effect of extracts of some nigerian higher fungi against selected pathogenic microorganisms. *American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 2(4): 364-368.

Inácio, D.; Ferreira, O.; Vaz de Araujo, A.; Peralta, M. & Márquez de Sounza, C. G. 2015. Production of enzymes and biotransformation of orange waste by oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. *Advances in Microbiology* 5:1-8.

Iwalokun, A.; Usen, A.; Otunba, A. & Olukoya, K. 2007. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*. 6 (15): 1732-1739.

Mora, M. & Martínez-Carrera, D. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. 7-26 En: El Cultivo de Setas *Pleurotus spp.* en México. ECOSUR. México.

Marquez-Mota, C.; Leal-Lara, H. & Ramirez-Carrillo, R. 2012. Efecto de la cascarilla de algodón y el aserrín de encino sobre el rendimiento de *Pleurotus eryngii*. 163-171 .En: Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: Investigación y Desarrollo en un Entorno Multicultural. Colegio de las fronteras del Sur. Tapachulas, México.

Piñero-Bonilla, J. & Díaz, I. 2010. Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia sp.* a partir de residuos de naranja como sustrato. *Revista de la Sociedad Venezolana de*

Microbiología 30: 102-108

Quiroz-Castañeda, R.; Pérez-Mejía, N.; Martínez-Anaya, C.; Acosta-Urdapilleta, L. & Folch-Mallol, J. 2010. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation* 22(3):565-572.

Rojas, J.; García, A. & López A. 2004. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 4(2):28-32.

Royse, D. & Sanchez-Vazquez, J. 2003. Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. *Bioresource Technology* 76 (3): 229-233.

Sánchez JE, Mata G, eds. 2012. *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica*. 163-338. En: *Investigación y Desarrollo en un Entorno Multicultural*. Colegio de las fronteras del Sur. Tapachulas, México.

Smania, E. F. A.; Samania, A. & Loguerio-Leite, L. C. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Rev. Microbiol.* 29: 129-136.

Téllez-Téllez, M; Villegas E, Rodriguez, A.; Acosta-Urdapilleta, M.L.; O'Donovan A. & Díaz-Godínez G. 2016. Fungi of *Pycnoporus*: morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential. *Mycosphere* Doi 10.5943/mycosphere/si/3b/3

Webster, J. & Weber, R.W.S. 2008. *Homobasidiomycetes*: 527-532 *Introduction to Fungi*. 3^a ed. Cambridge University Press. The Edinburgh Building, Cambridge

Wright E. J. & Albertó E. 2002. *Hongos. Guía de la región Pampeana*. Vol. I *Hongos con laminillas*. Vol. II. *Hongos sin laminillas*. Editorial L.O.L.A. Buenos Aires.