

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ambiente y Desarrollo
Ingeniería en Ambiente y Desarrollo



Proyecto Especial de Graduación
Evaluación de efecto antagónico de cuatro setas de *Ganoderma spp*
contra bacterias fitopatógenas y entéricas

Estudiante

Francella Junieth Arce Martínez

Asesores

Eric van den Berghe, Ph.D.

Carolina Avellaneda Barbosa, Ph.D.

Honduras, abril 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER

Vicepresidenta y Decana Académica

ERIKA TENORIO MONCADA

Directora Departamento Ambiente y Desarrollo

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

Le agradezco a la Cooperativa Suiza para el Desarrollo (COSUDE) por haberme brindado la increíble oportunidad de ser un Zamorano. Además, la presente investigación no habría sido posible de no ser por las enseñanzas de mis asesores, el Dr. Eric van den Berghe y la Dra. Carolina Avellaneda, gracias a ellos encontré un camino a seguir. Gracias también al Lic. Ever Reyes del Laboratorio de Fitopatología, al Dr. Maldonado del Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAS), a Lic. Lucia Barahona, Lic. Cristian Lituin y al Ing. Fernando Tercero. Finalmente, mis más sinceros agradecimientos al Ing. Carlos López Manzano por su continuo apoyo dentro y fuera del laboratorio. Mi gratitud siempre será para ellos.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de Cuadros	6
Índice de Figuras	7
Índice de Anexos	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos	13
Recolección e Identificación de Setas de <i>Ganoderma</i> spp	13
Elaboración de Extractos Bioactivos	13
Antagonismo de Extractos contra Bacterias Fitopatógenas	14
Antagonismo de Extractos contra Bacterias Entéricas	15
Extracto Etílico contra Bacterias Entéricas	15
Resultados y Discusión.....	16
Antibiogramas con Bacterias Fitopatógenas	16
Pruebas de Antagonismo con Bacterias Entéricas.....	21
Antibiogramas del Extracto Etílico al 50% de <i>Ganoderma</i> spp contra Bacterias Entéricas.....	22
Conclusiones	24

Recomendaciones.....25

Referencias.....26

Anexos.....29

Índice de Cuadros

Cuadro 1 <i>Recolección de setas en Reserva Biológica Uyuca y campus central de Zamorano</i>	13
Cuadro 2 <i>Nomenclatura de extractos bioactivos</i>	14
Cuadro 3 <i>Halos de inhibición de bacterias fitopatógenas contra extractos bioactivos</i>	17
Cuadro 4 <i>Halos de inhibición de bacterias entéricas contra extractos bioactivos</i>	22

Índice de Figuras

Figura 1	Resultado de pruebas de antagonismo frente a <i>Erwinia</i> spp.....	16
Figura 2	Resultado de pruebas de antagonismo frente a <i>Ralstonia</i> spp.....	18
Figura 3	Resultado de pruebas de antagonismo frente a <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19
Figura 4	Resultado de pruebas de antagonismo frente a <i>Xanthomonas</i> spp	20
Figura 5	Resultados de pruebas de antagonismo de los extractos bioactivos frente a <i>E. coli</i> ATCC® 51813™	21
Figura 6	Resultados de pruebas de antagonismo de los extractos bioactivos frente <i>S. typhimurium</i> ATCC® 14028™	22
Figura 7	Resultado de pruebas de antagonismo de extracto al 50% de <i>Ganoderma</i> frente a <i>E. coli</i> ..	23
Figura 8	Resultado de pruebas de antagonismo de extracto al 50% de <i>Ganoderma</i> frente a <i>S.</i> <i>typhimurium</i>	23

Índice de Anexos

Anexo A <i>Setas del hongo Ganoderma cf. polychromum</i>	29
Anexo B <i>Seta Ganoderma cf. applanatum</i>	30
Anexo C <i>Seta de Ganoderma cf. tsugae</i>	31
Anexo D <i>Seta de Ganoderma cf. sessile</i>	32
Anexo E <i>Resultados comparativos de López Manzano y Ponce Chilán (2021)</i>	33
Anexo F <i>Generalidades de E. coli</i>	34
Anexo G <i>Generalidades de Salmonella spp</i>	35

Resumen

El control de bacterias fitopatógenas en cultivos resulta cada vez más complicado debido al desarrollo de resistencia a los antibióticos, la retención en suelo y agua de elementos como el cobre como ingrediente activo de agroquímicos. Hongos del género *Ganoderma* contienen compuestos como triterpenos, flavonoides y polisacáridos capaces de inhibir bacterias y hongos fitopatógenos. El presente estudio evaluó la eficiencia de dichos compuestos en diferentes setas de *Ganoderma*, la reducción de cualidades antagónicas tras preservación en frío y comparó resultados determinando la seta con mejores propiedades antimicrobianas. Se recolectaron 4 setas en diferentes puntos del Campus de Zamorano y la Reserva Biológica Uyuca. Se elaboraron extractos bioactivos partiendo del carpóforo de las setas y alcohol etílico al 70% 10 mL por cada gramo de seta. Las pruebas inhibitoras se realizaron contra bacterias del género *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* y cepas liofilizadas de *Escherichia coli* ATCC® 51813™ y *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028™ *in vitro* con medios de cultivo agar nutriente (AN), agar levadura-dextrosa- carbonato de calcio (YDC) y agar base pseudomonas (PSDF) respectivamente. A través de antibiogramas se corroboró el antagonismo de los extractos mediante halos de inhibición producidos por discos sumergidos en los extractos 24 horas previo al enfrentamiento. Las setas que presentaron efecto antagónico fueron *G. applanatum*>*G. polychromum*>*G. tsugae*>*G. sessile*. Sin embargo, la forma y diámetros de los halos de inhibición no fueron suficientes para declarar un efecto antagónico completo, pero si uno parcial. Por otro lado, la seta de *G. tsugae* fue la que menos inhibición desarrolló.

Palabras clave: Antagonismo, enfrentamiento, fitopatógeno, *Ganoderma*, resistencia antibiótica

Abstract

The control of phytopathogenic bacteria is becoming increasingly complicated due to antibiotic resistance, not to mention environmental contamination by the active ingredients in agrochemicals such as residual copper in soils and water. Fungi of the genus *Ganoderma* present compounds such as triterpenes, flavonoids, acids, and polysaccharides capable of inhibiting pathogenic bacteria and fungi. The present investigation evaluates whether the efficiency of these compounds varies among *Ganoderma* mushrooms, whether cold preservation at 4 °C reduces antagonistic qualities, and finally compares results to define the mushroom with the best antimicrobial properties. Four mushrooms were collected at different points of the Zamorano Campus and the Uyuca biological reserve. Bioactive extracts were then prepared from the mushroom carpophore in 50% ethyl alcohol at 10 mL per gram of mushroom. Inhibitory tests were performed against bacteria of the genus *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* and lyophilized strains of *Escherichia coli* ATCC® 51813™ and *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028™ in vitro with Nutrient Agar (NA), yeast-dextrose-calcium carbonate agar (YDC), and pseudomonas base agar (PSDF) respectively. The antagonism of the extracts was corroborated through antibiograms by means of inhibition halos produced by discs immersed in the extracts for 24 hours prior to the confrontation. The mushrooms that showed antagonistic effects were *G. applanatum*>*G. polychromum*>*G. sessile*. However, the shape and diameters of the inhibition halos were not sufficient to declare a conclusive or significant antagonistic effect. On the other hand, *G. tsugae* produced the least inhibition.

Keywords: Antagonism, antibiotic resistance, confrontation, *Ganoderma*, phytopathogen.

Introducción

En Honduras el sector agrícola representa aproximadamente el 12.9% del producto interno bruto (PIB), el 35.6% del valor total de las exportaciones y un 35% de fuentes generadores de empleos (Derlagen et al., 2019). Dicho sector sufre pérdidas de hasta el 43% a causa de bacterias fitopatógenas que han logrado generar resistencia a la mayoría de antibióticos comerciales como tetraciclina, estreptomicina entre otros (Quesada et al., 2018). Considerando este desarrollo de resistencia a los antibióticos, surge la necesidad de encontrar y desarrollar nuevas alternativas para disminuir las pérdidas y mejorar los rendimientos de producción.

El género *Xanthomonas* afecta principalmente a la familia de las solanáceas encontradas hasta en un 85% en las áreas de producción de semilla y aproximadamente el 79% en los campos de cultivos. (Nazario et al., 2013). Dentro de la misma categoría se encuentran las *Pseudomonas*, que de manera similar que el género *Erwinia spp* atacan a los cultivos de bulbos causando putrefacción. Estos dos géneros de bacterias son combatidos con productos químicos a base de cobre como el sulfato de cobre pentahidratado.

Ralstonia es otro género que ataca a cultivos de relevancia económica tales como tomate (*Solanum lycopersicum L.*), chile (*Capsicum annum*), tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) entre otros; en Honduras, el resto de Latinoamérica y el Caribe. Gracias a su capacidad de supervivencia al suprimir las defensas de sus hospederos, alterar su metabolismo y evitar el reconocimiento bacteriano este género afecta a más de 250 especies (Landry et al., 2020). A diferencia de *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Erwinia spp* las enfermedades causadas por bacterias de estos géneros no pueden ser tratadas con químicos a base de cobre pentahidratado, los antibióticos de amplio espectro tampoco ofrecen una respuesta por la resistencia desarrollada. Los métodos actuales de control consisten en agroquímicos a base de cloropicrina y ácido fosfórico, pero en mayor medida se aplican controles biológicos como bacterias ácido-lácticas, extractos de *Trichoderma* (Yan y Ali Khan, 2021), bacteriófagos (Ramírez et al., 2020) y *Pantoea spp* (Abo-Elyousr y Hassan, 2021).

El caldo de bordelés desde 1885 ha presentado el sistema de tratamiento contra los géneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Ralstonia* spp con químicos a base de cobre. Sin embargo, su uso excesivo ha despertado alertas por bioseguridad, pues aunque estos compuestos poseen alta toxicidad hacia los patógenos, son los efectos nocivos hacia la biota acuática (Scotto et al., 2019), las afecciones a la salud humana junto con la acumulación en los suelos y los parámetros de calidad de alimentos que han puesto en duda si estos compuestos seguirán representando soluciones seguras (Lamichhane et al., 2018).

Los macro y microorganismos presentan ciertas actividades antagónica entre sí, las cuales a lo largo del tiempo se han venido aprovechando como parte de controles biológicos. *Ganoderma* es un género de hongos basidiomicetos endosimbióticos facultativos de la familia Ganodermataceae. Dentro de los compuestos químicos presentes en el carpóforo se encuentran los triterpenoides, flavonoides, polisacáridos, péptidos (Sun et al., 2004), proteínas, aminoácidos, nucleósidos, alcaloides, esteroides, lactonas, ácidos grasos y enzimas que en temas de bioprospección han demostrado características antitumorales, antibacterianas, anticancerígenas, antiinflamatorias (Sivanandhan et al., 2017), antifúngicas y antivirales (Cole et al., 2003).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad antagónica de diferentes setas de *Ganoderma* spp contra bacterias fitopatógenas de los géneros *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* spp y *Pseudomonas fluorescens* junto con bacterias entéricas como *Escherichia coli* ATCC® 51813™ y *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028™ *in vitro*. Los objetivos específicos fueron: Comparar el efecto antagónico de las diferentes especies a través de halos de inhibición; determinar la seta de *Ganoderma* con mejores propiedades antibacterianas y finalmente determinar si el tiempo de preservación influye en la efectividad del extracto.

Materiales y Métodos

Recolección e Identificación de Setas de *Ganoderma* spp

Cuadro 1

Recolección de setas en Reserva Biológica Uyuca y campus central de Zamorano

Identificación de seta	Sitio	Coordenada	Hospedero	Estado fisiológico
<i>Ganoderma cf. tsugae</i>	Reserva biológica Uyuca a 1200 msnm	14°02'04.87 N y 87°04'33.75 W	<i>Quercus</i>	Maduración
<i>Ganoderma cf. sessile</i>	Alison Bixby Stone School	14°00'27.00 N y 87°00'26.55 W	<i>Juniperus</i>	Maduración finalizada
<i>Ganoderma cf. applanatum</i>	Entre el edificio Zemurray y entrada principal del campus	14°02'07.34 N y 87°00'26.55 W	<i>Ficus</i>	Madurez finalizada
<i>Ganoderma cf. polychromum</i>	Detrás del gimnasio de MATS	14°00'35.2"N y 87°00'49.5"W	Desconocido	Madurez

Las setas fueron nombradas con la abreviatura “cf” del latín *conformis* que denota parecido o similitud (Pedroche y Novelo, 2020). Esta abreviatura fue necesaria debido a que *Ganoderma* crece con diversidad morfológicas dependiendo de su entorno. Para identificar de manera exacta de debía extraer material genético y realizar comparaciones con los filos reportados en literatura. Estos procedimientos quedaron fuera del alcance del presente estudio.

Elaboración de Extractos Bioactivos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Se extrajeron 6 g del cuerpo fructífero los cuales fueron lavados en agua destilada. Se licuaron por un minuto con 10 mL de alcohol etílico al 70% por cada gramo de hongo. Esta metodología fue desarrollada por Pérez-Silva (1959), sin embargo, en el presente estudio se modificó para facilitar elaboración utilizando 10 mL de alcohol por cada gramo de seta en lugar de 5 mL por cada 0.5 g de seta. Posteriormente, el extracto se almacenó en erlenmeyers forrados de papel

aluminio por falta de frascos color ámbar pues algunos compuestos de *Ganoderma* como los ergosteroles presentan fotosensibilidad (Cruz Piñeiro, 2009).

Para asegurar mejor obtención de compuestos se implementó la metodología de Segovia Tello (2017) dejando en reposo el extracto por 30 días en agitación a 150 revoluciones por minuto (RPM). Luego se evaporó el alcohol a baño María a 78° C y se añadió etanol al 50% 10 mL por gramo de hongo ya que esta concentración evidenció los mejores resultados. Debido a que los hongos absorben nutrientes y humedad en sus hábitats, los extractos fueron macerados usando morteros estériles para extraer compuestos retenidos en los restos del cuerpo fructífero. Finalmente, se sumergieron discos de papel filtro 24 horas antes de realizar los enfrentamientos. La nomenclatura de los extractos consistió en la abreviatura de extracto bioactivo más la especie de la seta (Cuadro 2).

Cuadro 2

Nomenclatura de extractos bioactivos

Identificación de las setas	Nomenclatura de extractos
<i>Ganoderma cf. tsugae</i>	EBGT
<i>Ganoderma cf. applanatum</i>	EBGA
<i>Ganoderma cf. sessile</i>	EBGS
<i>Ganoderma cf. polychromum</i>	EBGP

Antagonismo de Extractos contra Bacterias Fitopatógenas

Las bacterias fueron sembradas por estriado en cajas de Petri con 20 mL con el respectivo medio de cultivo para cada bacteria. Posteriormente, se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas. Luego se extrajeron colonias para sembrarlas en medio líquido Luria-Bertani (LB) dentro de tubos de ensayo con tapa con capacidad de 30 mL los cuales fueron dejados en agitación por 72 horas a 150 revoluciones por minuto (RPM). Transcurrido este tiempo, se realizó extensión en placa de 100 µL del Luria-Bertani con crecimiento bacteriano con ayuda de un asa de Drigalsky colocando un disco previamente sumergido en los extractos en el centro del plato Petri. Estos fueron incubados a 37 °C por 24 horas para después verificar si hubo o no inhibición.

Antagonismo de Extractos contra Bacterias Entéricas

Se extrajeron cepas liofilizadas de *Escherichia coli* ATCC® 51813™ y otra de *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028™. Se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad con luria tripticasa, logrando así la hidratación y dilución de la concentración bacteriana. Se dejaron en reposo por 2 horas para que la activación de las bacterias fuera completada.

Pasado este lapso, se empleó el método de siembra por estría en agar MacConkey. Este medio fue seleccionado por ser selectivo tanto para *E. coli* como para otras enterobacterias. Adicionalmente, las bacterias expresan coloración blanquecina y rosa pálido en su crecimiento y el mismo medio cambia de color a medida que las bacterias van consumiendo los nutrientes. El aislado fue dejado en incubadora por 24 horas a 37° C. Una vez comprobado el crecimiento bacteriano se extrajeron colonias y se sembraron en 15 mL de Luria- Bertani en tubos de ensayo con capacidad de 30 mL. Estos tubos quedaron en incubación bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

El enfrentamiento final se efectuó a través de antibiogramas siguiendo los mismos procedimientos que con las bacterias fitopatógenas. Se realizó extensión por placa en AN empleando un asa de Drigalsky estéril para esparcir 100 µL del medio Luria-Bertani con el respectivo crecimiento microbiano por triplicado. Finalmente se colocaron discos previamente sumergidos en cada extracto 24 horas. Dichas placas se incubaron 24 horas a 37° C.

Extracto Etílico contra Bacterias Entéricas

El presente experimento tiene como fin evaluar si el extracto etílico al 50% de *Ganoderma sp* elaborado por López Manzano y Ponce Chilán (2021) hace aproximadamente tres meses ha cambiado sus propiedades antagónicas considerando también que la metodología de Segovia Tello (2017) fue cambiada al dejar en reposo el extracto solo 24 horas en lugar de 30 días. Con la solución de Luria Bertani con crecimiento microbiano con *E. coli* y *S. typhimurium* se realizó extensión por placa en agar nutriente por triplicado colocando discos de papel filtro sumergidos en el extracto de *Ganoderma sp* con alcohol etílico al 50% el cual fue preservado en refrigeración a 4 °C.

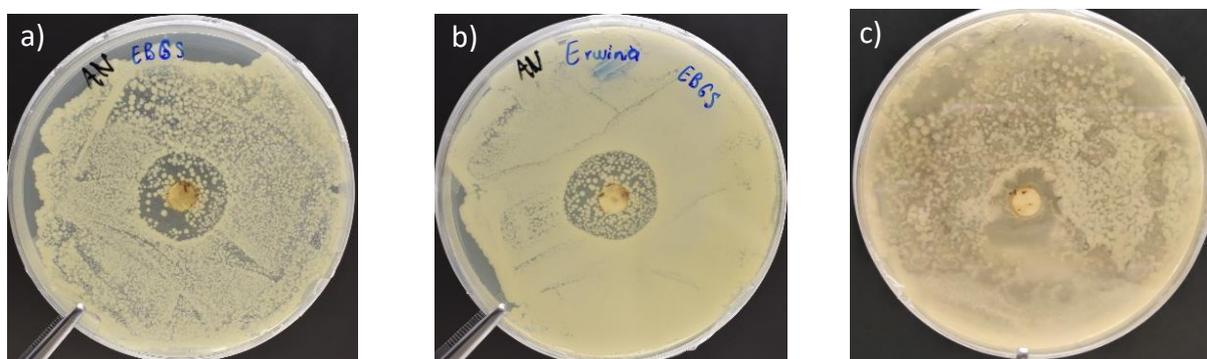
Resultados y Discusión

Antibiogramas con Bacterias Fitopatógenas

Los extractos *G. cf applanatum* y *G. cf polychromum* mostraron los mayores halos de inhibición contra *Erwinia* spp, junto con los otros extractos se encontraron colonias resistentes creciendo dentro de los halos (Figura 1). Los extractos menos efectivos contra este género fueron el extracto de *G. cf sessile* seguido del de *G. cf tsugae*.

Figura 1

Resultado de pruebas de antagonismo frente a *Erwinia* spp



Nota. a) y b) Resultado del extracto de *G. applanatum*, c) Resultado de control de alcohol etílico 50%

Ralstonia spp mostró cierto grado de susceptibilidad contra los extractos *G. cf tsugae* y *G. cf polychromum* formando halos de inhibición de forma irregular y de tamaño pequeño. La presencia de ciertos componentes dentro de los extractos indica que pueden tener propiedades antimicrobianas, pero la concentración de estos no fue suficiente para expresarla.

Todas las bacterias evaluadas fueron Gram negativas y setas como *G. cf applanatum* han presentado mejores propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas en la mayoría de estudios (Barajas, 2015). Se espera que los extractos de *Ganoderma* a bajas concentraciones de compuestos bioactivos sean más eficientes contra bacterias Gram positivo como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, mientras que para tratar a las Gram negativo sea necesario concentrar los compuestos bioactivos para aumentar su concentración obteniendo así un completo efecto antimicrobiano.

Los resultados de los antibiogramas de los extractos *G. cf polychromum*, *G. cf tsugae*, *G. cf sessile* y *G. cf applanatum* no mostraron inhibición contra *Xanthomonas* spp ni *Pseudomonas fluorescens*. Se observó crecimiento microbiano en todo el medio de cultivo sin formación de halos de inhibición. En el estudio de Robles-Hernández et al. (2017) se encontró susceptibilidad por parte de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contra el extracto de *Ganoderma lucidum*. A diferencia de su estudio, los presentes experimentos no contaban con cepas identificadas a nivel de especie y la seta de *Ganoderma* fue diferente. Los compuestos antimicrobianos pueden variar de seta en seta dentro del mismo género de *Ganoderma*, haciendo que *G. lucidum* sea más inhibidor que *G. applanatum* junto con otras especies. Las mediciones de los halos se presentan en el Cuadro 2.

La placa control para *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia* spp, *Erwinia* spp contó con discos impregnados de alcohol etílico al 50% para evidenciar que, si hubiese habido formación de halos de inhibición estos serán por las propiedades de los extractos y no por el alcohol. El control para *Xanthomonas* spp fue a base de sulfato de cobre pentahidratado, este es el tratamiento comercial más frecuente para tratar este patógeno en campo. Estos controles dieron halos de inhibición de 40 mm de diámetro. Las Figuras 2, 3 y 4 muestran los antibiogramas y controles de estas bacterias menos de *Erwinia* spp.

Cuadro 3

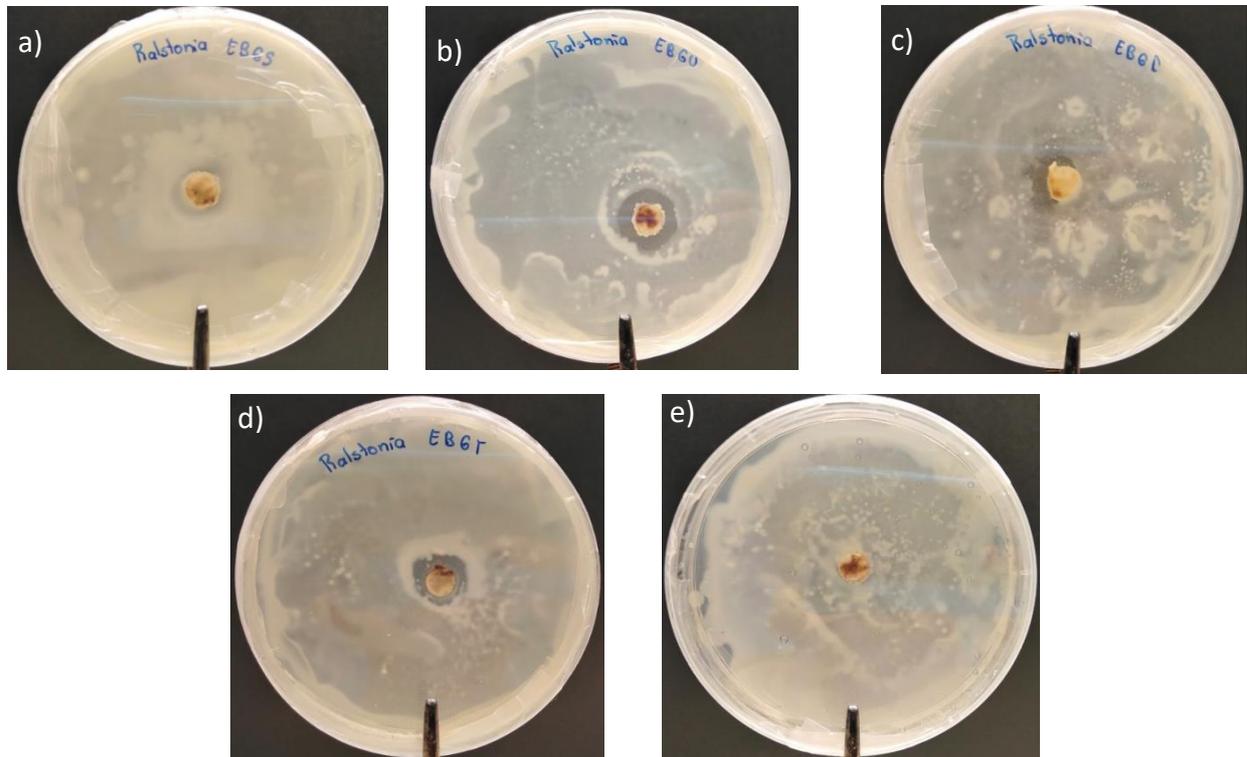
Halos de inhibición de bacterias fitopatógenas contra extractos bioactivos

Repetición	<i>Erwinia</i> spp			<i>Ralstonia</i> spp			<i>Xanthomonas</i> spp			<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Medición (mm)											
EBGA	20	22	16*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EBGT	16*	17	18	0	10	9	0	0	0	0	0	0
EBGS	16	21	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EBGP	20	17	22*	15	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota. *Halos con colonias creciendo dentro de los halos (Figura 1)

Figura 2

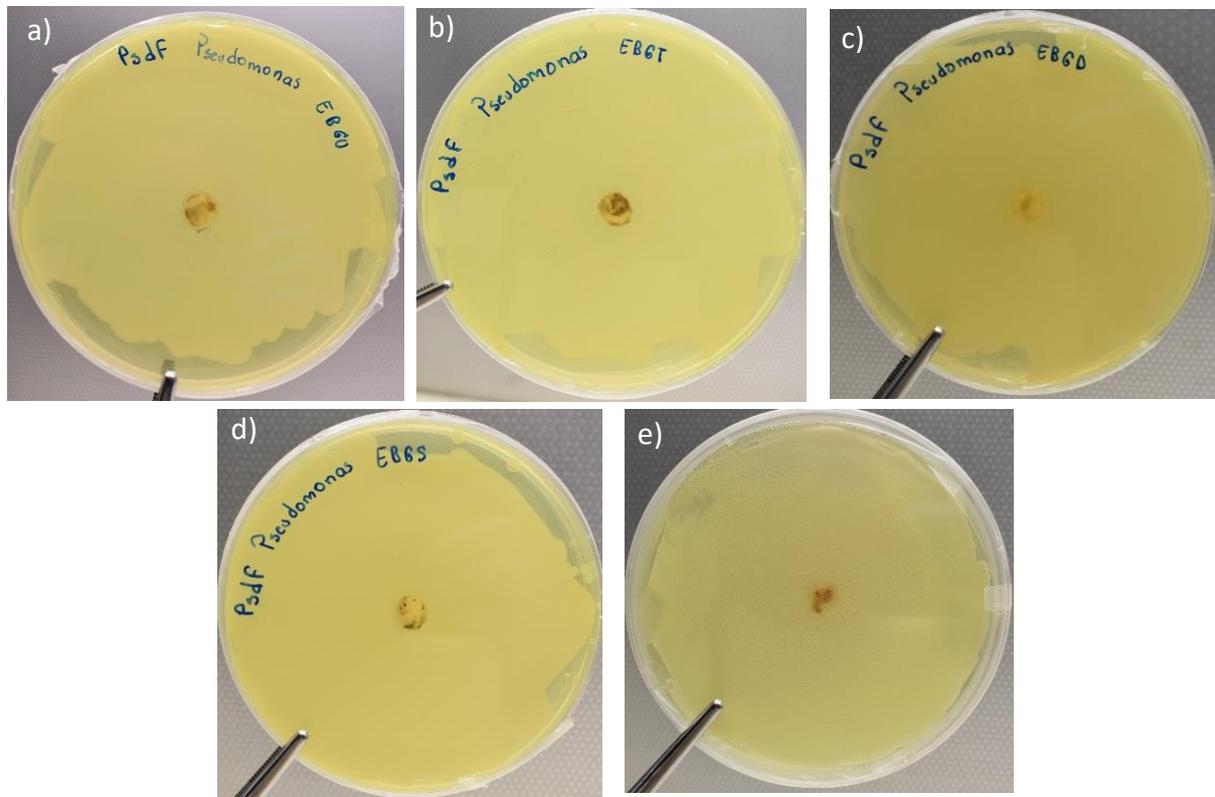
Resultado de pruebas de antagonismo frente a *Ralstonia* spp



Nota. a) Resultado del extracto *G. applanatum*, b) Resultado del extracto *G. polychromum*, c) Resultado del extracto *G. sessile.*, d) Resultado del extracto *G. tsugae*, e) Placa control de alcohol etílico 50%

Figura 3

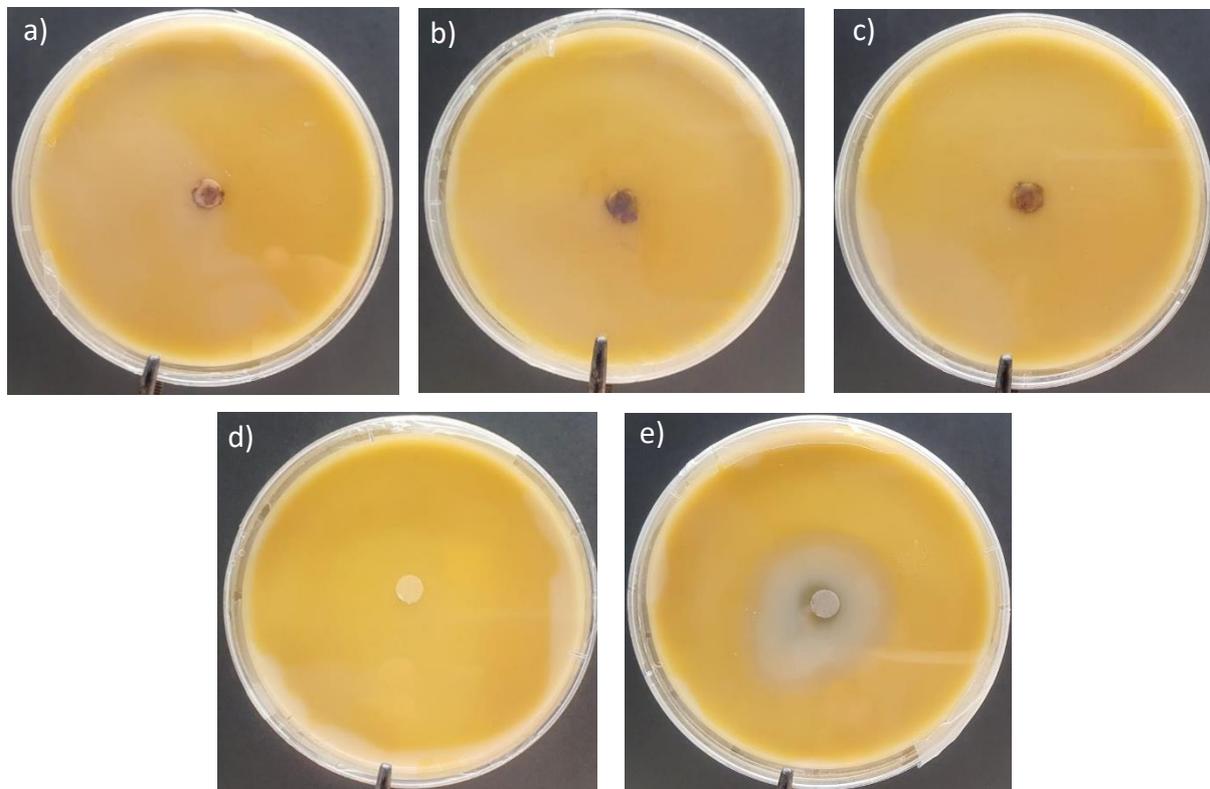
Resultado de pruebas de antagonismo frente a *Pseudomonas fluorescens*



Nota. A) Resultado del extracto *G. polychromum*, b) Resultado del extracto *G. tsugae*, c) Resultado del extracto de *G. sessile*, d) Resultado del extracto *G. applanatum*, e) Resultado control alcohol etílico al 50%

Figura 4

Resultado de pruebas de antagonismo frente a Xanthomonas spp



Nota. a) Resultado del extracto *G. applanatum*, b) Resultado del extracto *G. tsugae*, c) Resultado del extracto *G. sessile*, d) Resultado del extracto *G. polychromum*, e) Resultado control sulfato de cobre pentahidratado

En el estudio de Mueses-Mafla et al. (2022) se almacenaron extracto etanólico y acuoso de *G. lucidum* durante 6 años y conservaron sus polisacáridos de tipo β -glucanos. Estos mostraron alta estabilidad al estar sometidos a preservación en frío. Adicionalmente, confirma la pérdida de fenoles por tratamientos térmicos recomendando no aplicar calor más de cinco minutos (Minh et al., 2019).

De acuerdo con Martínez-Flórez et al. (2002) los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos los cuales cumplen con la función bactericida y antifúngica en estructuras vegetales. Dicha actividad está determinada por la presencia de al menos un grupo hidroxilo y lipofilidad. Los fenoles acaban destruyendo la membrana mitocondrial de los fitopatógenos por acción de los hidroxilos (Modak et al., 2002).

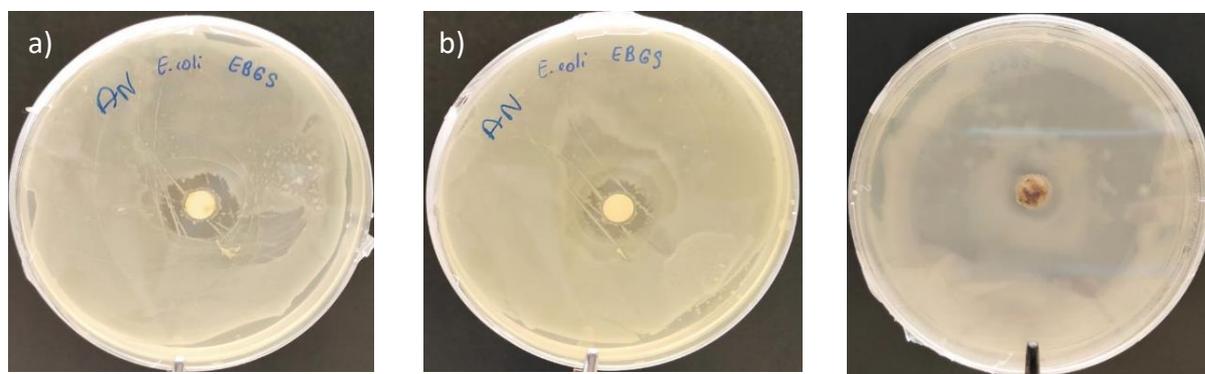
Pruebas de Antagonismo con Bacterias Entéricas

La cepa de *E. coli* ATCC® 51813™ mostró susceptibilidad parcial hacia los 4 extractos de *Ganoderma*. Con el extracto *G. cf sessile* generó halos difusos en dos de tres placas, no siendo suficientes en tamaño y forma para considerarles completamente susceptibles (Figura 5). Este resultado es similar al obtenido por Noverita (2020) en donde el extracto etílico de *G. lucidum* tampoco inhibió el crecimiento de esta especie. Por el contrario, el estudio de Jogaiah et al. (2019) se demostró que los componentes fenólicos de *G. applanatum* del extracto crudo de metanol tuvieron altas propiedades inhibitoras para *E. coli* en comparación con otras siete especies de *Ganoderma*.

El enfrentamiento de *S. typhimurium* ATCC® 14028™ dio resultados similares a los obtenidos contra *E. coli*. Se observó cómo las colonias bacterianas invaden parcialmente los halos de inhibición en las placas con los extractos *G. cf applanatum* y *G. cf sessile*. (Figura 6). Este resultado es comparable con el obtenido por Chu et al. (2021) en donde el extracto etanólico inhibió mejor a levaduras que a *S. typhimurium*. En este estudio se demuestra, a través de cromatografías líquidas de alto rendimiento (HPLC), que la actividad antimicrobiana es dependiente de la fracción o concentración de los compuestos bioactivos con cualidades antagónicas. El Cuadro 3 muestra los resultados de ambas cepas bacterianas.

Figura 5

Resultados de pruebas de antagonismo de los extractos bioactivos frente a *E. coli* ATCC® 51813™

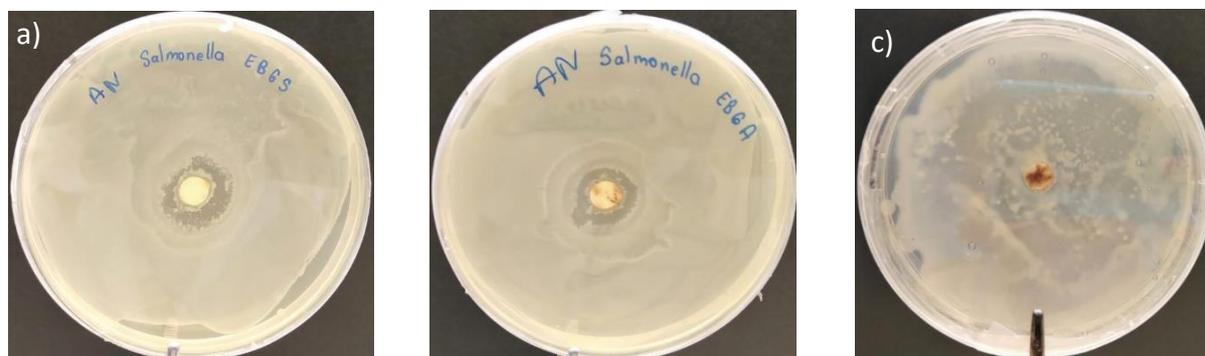


Nota. a) y b) Resultados de extracto *G. sessile*, c) Control alcohol etílico 50%

Figura 6

Resultados de pruebas de antagonismo de los extractos bioactivos frente *S. typhimurium* ATCC®

14028™



Nota. a) Resultado de extracto *G. sessile*, b) Resultado de extracto *G. applanatum*, c) Control alcohol etílico 50%

Cuadro 4

Halos de inhibición de bacterias entéricas contra extractos bioactivos

Repetición	<i>E. coli</i>			<i>S. typhimurium</i>		
	1	2	3	1	2	3
	Medición (mm)					
EBGA	0	0	0	0	13*	14*
EBGT	0	0	0	0	0	9
EBGS	0	16*	14*	13*	12*	9*
EBGP	0	0	0	0	0	0

Nota. *Halos no definidos con crecimiento bacteriano.

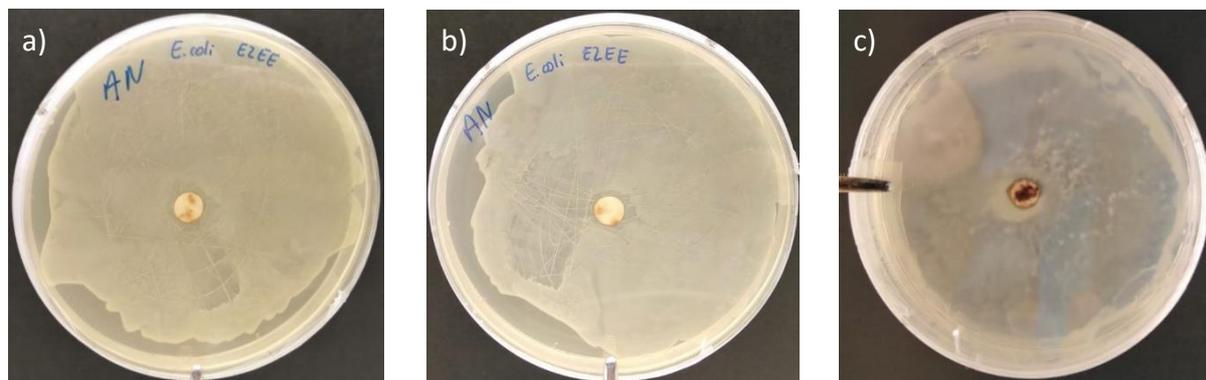
Antibiogramas del Extracto Etílico al 50% de *Ganoderma* spp contra Bacterias Entéricas

Tanto *E. coli* como *S. typhimurium* mostraron resistencia ante el extracto etílico al 50% de *Ganoderma* sp elaborado por López Manzano y Ponce Chilán (2021). En el estudio realizado por ellos el extracto formó halos de inhibición de 12.6 mm (Anexo D), mientras que en este experimento no hubo halos como se aprecia en la Figura 7 para *E. coli* y Figura 8 para *S. typhimurium*. Estos resultados difieren a los obtenidos por Abd El-Razek et al. (2020) en donde extractos etílicos al 50% formaron halos de inhibición de 19.5 mm para *S. typhimurium*. Ante la diferencia de resultados debe destacarse que el extracto etanólico de este experimento no fue cerrado correctamente al preservarlo. La

cobertura de papel aluminio quedó parcialmente abierta lo que posiblemente causó pérdidas en las propiedades antagonicas.

Figura 7

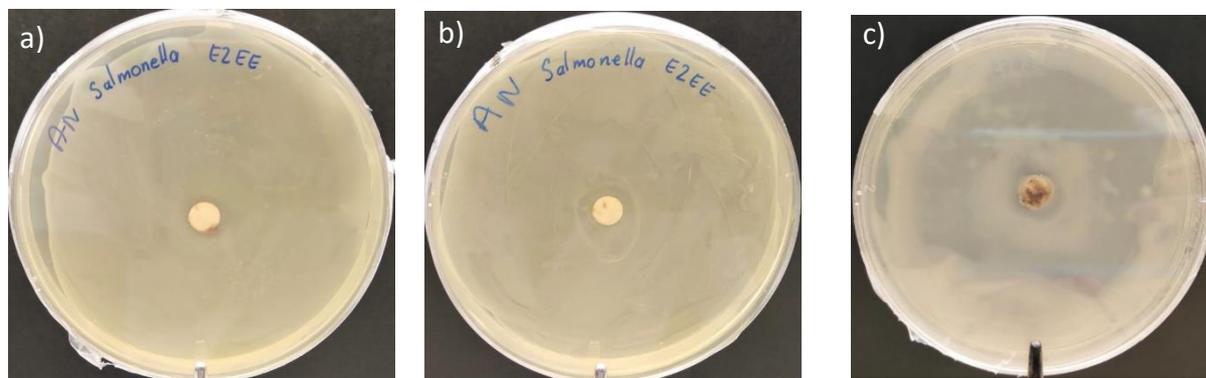
Resultado de pruebas de antagonismo de extracto al 50% de Ganoderma frente a E. coli



Nota. a) y b) Resultados *E.coli* contra extracto al 50% de *Ganoderma* sp, c) Control alcohol etílico 50%

Figura 8

Resultado de pruebas de antagonismo de extracto al 50% de Ganoderma frente a S. typhimurium



Nota. a) y b) Resultado de *S. typhimurium* contra extracto 50% *Ganoderma* sp, c) Control alcohol etílico 50%

Se predice que los extractos tendrían mejores efectos antimicrobianos contra las bacterias entéricas que contra las fitopatógenas. Esto es debido al ambiente aislado en el que se encuentran las entéricas en comparación con los entornos dinámicos y abiertos en los que han evolucionado las fitopatógenas, y que hacen más probable que estas últimas hayan estado en contacto con algunos compuestos antimicrobianos de *Ganoderma* en el pasado. Mas no se descarta su potencial aplicación contra este tipo de fitopatógenos.

Conclusiones

La seta que creó los mayores halos de inhibición fue *G. cf polychromum*. Sin embargo, los resultados no son lo suficientes para declarar completa inhibición, pues los halos formados eran de circunferencia irregular con colonias creciendo en su interior.

Las setas que formaron mayores halos de inhibición contra las bacterias fitopatógenas fueron *G. cf applanatum*>*G. cf polychromum*>*G. cf tsugae*>*G. cf sessile*. Esta última y *G. cf applanatum* mostraron mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias entéricas resultando más antagónicas contra *S. typhimurium* que contra *E. coli*.

Las concentraciones de los compuestos antagónicos presentes en las setas no alcanzaron los valores necesarios para mostrar propiedades antimicrobianas.

La preservación en frío no evitó que el extracto de etanol al 50% de *Ganoderma* sp conservara sus propiedades antimicrobianas iniciales. El no haberlo preservado en un frasco con tapa sellada pudo haber sido una de las causas de pérdida de compuestos activos. Sin embargo, hay otras variables como la manipulación, alteración de metodología, entre otras que pudieron influir.

Recomendaciones

Someter los extractos a cromatografías líquidas de alto rendimiento (HPLC) para separar los compuestos bioactivos, aislarlos individualmente, cuantificar concentraciones en cada seta y ponerlas a prueba para concluir cuál de ellas posee los mejores compuestos antagónicos y a qué concentración estos muestran propiedades inhibitorias.

Dividir los extractos en dos frascos, uno que permanezca abierto y el otro cerrado. Ir realizando antibiogramas con intervalos de tiempo definidos para concluir si uno pierde o mantiene efectividad ante el otro.

Elaborar extractos con diferentes solventes a diferentes concentraciones para comparar el efecto de cada uno sobre los compuestos bioactivos. *Ganoderma* posee diversidad de metabolitos, los cuales variarán su concentración y disponibilidad en dependencia de los solventes, afinidades o restricciones químicas. Esto explicaría por qué en diferentes literaturas la misma seta mostró diferentes comportamientos inhibitorios contra las mismas cepas bacterianas.

Someter los extractos a cromatografías líquidas de alto rendimiento (HPLC) inmediatamente después de ser elaborado, posterior a los 30 días de la metodología y en el experimento final después del tiempo definido de preservación en frío para verificar las pérdidas de compuestos activos.

Identificar compuestos en el micelio y cuerpo fructífero a través de la cromatografía antes mencionada, elaborar extractos de ambas partes y ponerlos a prueba en cultivos para determinar efectividad en condiciones de campo.

Para elaborar tratamientos aplicables en campo, los ingredientes activos deben de estar enfocados en compuestos diferentes a los fenoles, ergosteroles, u otros sensibles a condiciones de campo. Se espera encontrar en el micelio la mayoría de estos compuestos.

Referencias

- Abd El-Razek, A. M., Ibrahim, A., Elattar, A. y Asker, D. (2020). Utilization of Agro-Wastes to Produce Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with High Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 17(1), 1–15. https://www.researchgate.net/publication/344152792_Utilization_of_Agro-Wastes_to_Produce_Oyster_Mushroom_Pleurotus_ostreatus_with_High_Antioxidant_and_Antimicrobial_Activities
- Barajas, L. A. (2015). *Efecto antibacterial del caldo de cultivo sumergido de Ganoderma lucidum en bacterias susceptibles y resistentes a estreptomycin* [Tesis profesional]. Universidad de Guadalajara, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5972/Barajas_Villagas_Luis_Alberto.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Chu, H. S. S. S., Boyer, R., Williams, R. y O'Keefe, S. F. (2021). Preliminary evaluation of inhibitory activity of medicinal mushroom extracts against pathogenic bacteria and spoilage yeasts. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111200>
- Cole, R., Schweikert, M. y Jarvis, B. (2003). Secondary Fungal Metabolites. *Academic Press*, 2, 816. <https://cutt.ly/kDqPc7W>
- Cruz Piñeiro, M. (2009). *Estudio químico orgánico del hongo Ganoderma lobatum* [Tesis de pregrado]. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. <https://cutt.ly/3Smv8dM>
- Derlagen, C., De Salvo, C. P., Egas Yerovi, J. J. y Guillaume, P. (2019). *Análisis de políticas agropecuarias de Honduras*. Banco Interamericano de Desarrollo. https://publications.iadb.org/publications/spanish/document/An%C3%A1lisis_de_pol%C3%ADticas_agropecuarias_en_Honduras.pdf
- Jogaiah, S., Kurjogi, M., Abdelrahman, M., Hanumanthappa, N. y PhanTran, L.-S. (2019). *Ganoderma applanatum*-mediated green synthesis of silver nanoparticles: Structural characterization, and in vitro and in vivo biomedical and agrochemical properties. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 1108–1120. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.12.002>
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B. y Aubertot, J.-N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(28). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Landry, D., González-Fuente, M., Deslandes, L. y Nemo Peeters, N. (2020). The large, diverse, and robust arsenal of *Ralstonia solanacearum* type III effectors and their in planta functions. *Molecular Plant Pathology*, 21(10), 1377–1388. <https://doi.org/10.1111/mpp.12977>
- López Manzano, C. A. y Ponce Chilán, N. E. (2021). *Potencial antimicrobiano de Ganoderma spp. encontrados en Zamorano, Honduras* [Tesis pregrado]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano., Francisco Morazán, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7179>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271–278. <https://cutt.ly/HSsD45B>
- Minh, N. P., Thong Nha, N. P., Le Pha, P. T., Ngoc, N. H. y Thao, T. P. (2019). Effect of technical variables on the total phenolic and antioxidant activity in cooking of Canned white Lingzhi

- (*Ganoderma lucidum*) Fruit. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3), 708–711. <https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol11issue03/jpsr11031906.pdf>
- Modak, B., Arrieta, A., Torres, R. y Urzua, A. (2002). Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: Efecto del tipo de estructura. *Boletín De La Sociedad Chilena De Química*, 47(1), 19–23. <http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442002000100005>
- Mueses-Mafla, Robinson-Byron, Benavides-Calvache y Olga-Lucia (2022). Polifenoles totales de *Ganoderma lucidum* cultivado en residuos de Pandala talaumanariñensis y avena sativa. *Bioteología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 20(1), 18–26. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1491>
- Nazario, F. F., Gallegos, G., Ochoa, Y. M., Hernández, F. D., Benavides, A. y Castillo, F. (2013). Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 31(2), 147–160. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a6.pdf>
- Noverita, R. Y.H. L.T. (2020). Antibacterial Activities of Ethanol Extracts Fruit Bodies of *Ganoderma lucidum* and *Rigidoporus microphorus* against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Tropical Biodiversity*, 1(1), 35–46. <http://e-journal.unas.ac.id/index.php/bio/article/view/25/26>
- Pedroche, F. F. y Novelo, E. (2020). Pertinencia de la nomenclatura abierta en ficología. *Cymbella*, 6(2), 99–105. <https://bit.ly/3DUwe7j>
- Pérez-Silva, A. (1959). Antimicrobial action of some antibiotics extracted from superior fungi. *Botanical Sciences*(24), 1–13. <https://doi.org/10.17129/botsci.1057>
- Quesada, A., Chin, J. S., Aguilar, P. y Ruiz, K. (2018). Sensibilidad a los antibióticos en bacterias gram negativas de bulbos de cebolla en Tierra Blanca de Cartago. *Repertorio Científico*, 20(2), 121–130. <https://doi.org/10.22458/rc.v20i2.2395>
- Ramírez, M., Neuman, B. W. y Ramírez, C. A. (2020). Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. *Biological Control, Elsevier*, 149, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104238>
- Robles-Hernández, L., Ojeda-Barrios, D. L., González-Franco, A. C., Hernández-Huerta, J., Salas-Salazar, N. A. y Hernández-Rodríguez, O. A. (2017). Susceptibilidad de aislados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Streptomyces* y extractos bioactivos de *Ganoderma*. *Acta Universitaria*, 27(6), 30–39. [10.15174/au.2017.1417](https://doi.org/10.15174/au.2017.1417)
- Scotto, C., Rondón, R., Arriola, C. y Alvarez2, F. (2019). Determinación de la concentración letal media (CL) producida por el sulfato de cobre pentahidratado en diez especies de peces dulceacuícolas bioindicadores utilizados en el Perú. *Ciencia Y Desarrollo*, 22(4), 49–57. <http://dx.doi.org/10.21503/cyd.v22i4.1837>
- Segovia Tello, L. A. (2017). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico obtenido de Ganoderma lucidum frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Proteus mirabilis* [Tesis de pregrado]. Escuela Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6408/1/56T00693.pdf>
- Sivanandhan, S., Khusro, A., Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S. y AL-Dhabi, N. A. (2017). Biocontrol properties of basidiomycetes: An overview. *Journal of Fungi*, 3(2), 2–14. <https://doi.org/10.3390/jof3010002>

- Sun, J., He, H. y Xie, B. J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6646–6652. 10.1021/jf0495136
- Yan, L. y Ali Khan, R. A. (2021). Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, *Trichoderma harzianum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(5). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00351-9>

Anexos

Anexo A

Setas del hongo Ganoderma cf. polychromum



Encontrada detrás del gimnasio de maestría en el campus central de Zamorano

14°00'35.2"N 87°00'49.5"W

Anexo B*Seta Ganoderma cf. applanatum*

Encontrada entre el lote del círculo de fuego y el portón de la entrada del campus central de Zamorano

Anexo C*Seta de Ganoderma cf. tsugae*

Encontrada en la reserva biológica Uyuca 14°02'04.87 N 87°04'33.75 W

Anexo D

Seta de Ganoderma cf. sessile



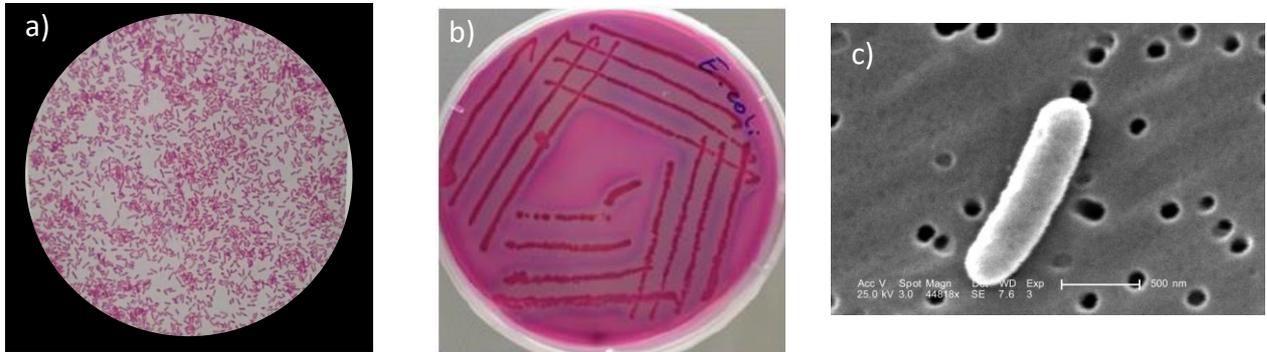
Encontrada en en cercanías de la Escuelita de Zamorano con coordenadas 14°00'27.00

N 87°00'26.55 W

Anexo E*Resultados comparativos de López Manzano y Ponce Chilán (2021)*

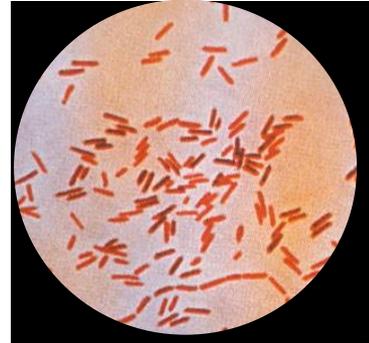
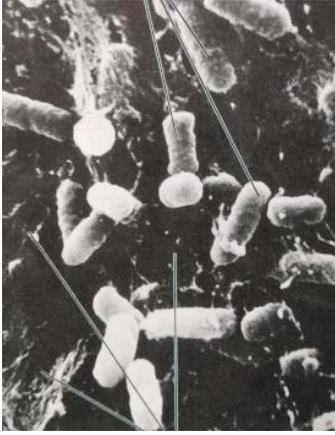
Variación entre repeticiones de las mediciones del halo de inhibición (cm) al enfrentar Salmonella typhimurium contra extracto etanólico al 50% de Ganoderma sp.

Bacteria	Halo de inhibición (cm)
<i>S. typhimurium</i> 1	1.6
<i>S. typhimurium</i> 2	1.2
<i>S. typhimurium</i> 3	1.3
<i>S. typhimurium</i> 4	1.3
<i>S. typhimurium</i> 5	0.9

Anexo F*Generalidades de E. coli*

Nota. a) *E. coli* mostrando tinción Gram negativa, b) Cultivo de *E. coli* en agar MacConkey por López Manzano y Ponche Chilán (2021), c)

Colonias de *E. coli* en AN por 24 horas, d) *E. coli* bajo microscopio electrónico

Anexo G*Generalidades de Salmonella spp*

Nota. a) *S. typhi* bajo microscopio electrónico, b) Cultivo de *S. typhi* en agar MacKonkey por López Manzano y Ponce Chilán, c) Tinción Gram negativa de *S. typhi*