

Determinación de la actividad antibacteriana de hongos del género *Penicillium* presentes en embutidos secos

Latorre Rapela, M. G.*; González, A. M.; Lurá, M. C.

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. (3000) Santa Fe. Argentina.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos de *Penicillium* que colonizan la superficie de embutidos secos, elaborados en tres industrias de la región centro-norte de la Provincia de Santa Fe, Argentina. Se examinaron 10 (diez) muestras de embutidos secos. El aislamiento de los mohos (n=15) se realizó por la técnica del hisopado. Los hongos fueron sembrados sobre el medio Wickerham a 25 ± 2 °C y, al cabo de 4, 6 y 8 días de incubación, se obtuvieron sus metabolitos por extracción de cilindros adyacentes a las colonias, los que fueron ubicados sobre la superficie de placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (no productor de penicilinas). Luego de la incubación, se verificó si existían halos de inhibición del desarrollo bacteriano.

Todos los metabolitos de *P. chrysogenum* Thom y la mayoría de los obtenidos de *P. nalgioense* Laxa, inhibieron la bacteria, al igual que los de *P. griseofulvum* Dierckx y *P. brevicompactum* Dierckx. La mayor cantidad de hongos con actividad antibacteriana, se observó cuando se incubaron 6 días.

Palabras claves: Actividad antibacteriana. *Penicillium*. Embutidos secos.

SUMMARY: Determination of the antibacterial activity of *Penicillium* strains metabolites isolated from dry sausages. Latorre Rapela, M. G.; González, A. M.; Lurá, M. C. The aim of this work was to evaluate antibacterial activity of *Penicillium* strains metabolites isolated from the surface of dry sausages, which are manufactured in three industries of the northern central area of Santa Fe Province, Argentina.

Ten samples of dry sausages were analyzed. Fungi were obtained by the swab method. Fifteen strains were studied. In order to detect antibacterial activity, each *Penicillium* was cultured on a Wickerham agar medium, at 25 ± 2 °C, for 4, 6 and 8 days, respectively. Subsequently, agar plugs were removed from an area close to the fungal colony. Then plugs were placed upon an agar plate previously seeded with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (non penicillinase producer). Agar diffusion techniques allowed detecting zones of inhibition when antibacterial metabolites were present. All *P. chrysogenum* Thom (n=4) metabolites and most of those obtained from *P. nalgioense* Laxa (n=5), inhibited bacteria. *P. griseofulvum* Dierckx and *P. brevicompactum* Dierckx compounds were also active against *S. aureus*.

Most metabolites with antibacterial activity were obtained when fungi were incubated for a period of 6 days.

Key words: Antibacterial activity. *Penicillium*. Dry sausages.

* Correspondencia:

María Gabriela Latorre Rapela. Moreno 3423
(3000) Santa Fe. Argentina. TE: 54-342-4590408.
E-mail: magala@fbc.unl.edu.ar

Nota: Los datos fueron presentados parcialmente en el II Congreso Argentino de Microbiología de los Alimentos, 2003.

Introducción

Los chacinados constituyen uno de los productos más importantes en la industria de los derivados cárnicos argentinos. Entre los más apreciados, se encuentran los embutidos secos, tales como salames, salamines y chorizo español. El Código Alimentario Argentino [1], en su artículo 338, define como salame al "embutido crudo, fermentado, madurado y desecado, elaborado sobre la carne de cerdo o carne de cerdo y vacuna con el agregado de tocino, sal, salitre, especias, vino blanco y azúcar". Una descripción similar, en la que no se establece el tipo de vino que debe emplearse, merecen los salamines (art. 339). Existen diferentes clases de salames y salamines según el tipo de carne y el grosor de las partículas o granos que los componen [2]. Los "chorizos a la española", también son definidos de manera semejante, estableciéndose que deben ser ahumados, elaborarse con pimentón y en su formulación no intervienen el azúcar ni el vino, siendo opcional el agregado de tocino (art. 333) [1].

La fermentación, la maduración y el secado son los procesos más delicados y complicados en la elaboración de estos embutidos, siendo lo ideal que se lleven a cabo en cámaras, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa [2,3]. La utilización de los cultivos iniciadores o "starter" también es necesaria para obtener las características deseadas en cuanto a la calidad del producto y ofrecer seguridad toxicológica [4]. Estos cultivos están constituidos por bacterias lácticas, principales responsables de los procesos de acidificación, y por los microorganismos flavorizantes, entre los que se encuentran hongos filamentosos del género *Penicillium* que contribuyen otorgando color, aroma y sabor al embutido [5].

La típica especie utilizada como cultivo "starter" para la producción de embutidos secos en Europa [6] es *Penicillium nalgiovense*, al que algunos autores consideran una variante albina y no toxicogénica de *Penicillium chrysogenum* [5,7]. Sin embargo, ambos son capaces de producir compuestos antimicrobianos [8].

En Argentina, son muy comunes y valorados los embutidos "caseros", fundamentalmente el salame y el chorizo "en grasa" (salame recubierto con grasa de cerdo). Estos se fabrican mediante procedi-

mientos basados en conocimientos empíricos que no contemplan los principios fundamentales acerca de la pérdida de agua ni el agregado de cultivos iniciadores. Por el contrario, se los deja secar "al aire", siendo la fuente tradicional de hongos la flora natural del ambiente, conformada por cepas heterogéneas pertenecientes a diferentes familias y especies que los colonizan al asentarse sobre la tripa [4].

Numerosos estudios realizados en distintas partes del mundo sobre la micoflora de la superficie de diferentes tipos de chacinados embutidos han revelado que la mayoría de las cepas aisladas son indeseables [4,5,8,9,10,11,12], y podrían originar serios problemas, tanto para el productor como para el consumidor, ya que algunos de estos hongos pueden ocasionar la pérdida del sabor y una apariencia desagradable, debido a la decoloración o a las características del micelio que ataca a las tripas [5,6]. También se asocian a problemas de tipo sanitario, ya que poseen capacidad de sintetizar toxinas y/o compuestos antimicrobianos [5,6,9,13] que pueden ocasionar intoxicaciones agudas o crónicas, reacciones alérgicas o selección de cepas de otros microorganismos con resistencia aumentada a los antibióticos, como consecuencia de su continua presencia en estos alimentos [14,15,16].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos fúngicos obtenidos a partir de cepas de *Penicillium* que colonizan la superficie de embutidos secos elaborados en la región centro-norte de la Provincia de Santa Fe, Argentina.

Materiales y Métodos

Muestras

Se trabajó con distintos tipos de embutidos secos, elaborados en tres industrias de la región y manufacturados de acuerdo a las prácticas corrientes (Código Argentino Alimentario, art.338 y 339) [1].

Las muestras (n=10) correspondieron a salame ("en grasa", picado grueso tipo colono y salame de Milán), chorizo español y salamin (picado fino, tipo tandilero y tipo chacarero) y se obtuvieron al azar de las góndolas de diferentes comercios de la ciudad de Santa Fe, entre los meses de marzo-julio de 2002 y febrero-abril de 2003.

Aislamiento e identificación de la flora fúngica

El aislamiento directo de los hongos colonizantes de la superficie de los embutidos seleccionados se llevó a cabo utilizando la técnica del hisopado [17]. Para cada muestra se procedió de la siguiente manera: con un hisopo estéril impregnado con solución salina estéril (CINa 0,9%), se realizó el hisopado de toda la superficie del embutido. El hisopo se colocó en 1 mL de dicha solución y se agitó manualmente durante 5 minutos a fin de homogeneizar la suspensión. A continuación, se sembró 0,1 mL de la misma sobre la superficie de una placa de agar extracto de malta (AEM). Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C durante 7 días, al cabo de los cuales cada una de las colonias obtenidas fue reaislada sobre AEM y rotulada con la letra E y el número de orden correlativo según la fecha de su aislamiento.

Todas las cepas se conservaron a 4 °C para su posterior caracterización fenotípica.

La identificación se llevó a cabo teniendo en cuenta sus características macro y microscópicas y utilizando las claves propuestas por Pitt y col. [8] y Raper y col. [18].

Ensayo para la detección de actividad antibacteriana

Se utilizó una técnica de "screening" basada en la metodología propuesta por Raper y col. [18]. Se trabajó con todas las cepas de *Penicillium* aisladas, llevándose a cabo con cada una de ellas los siguientes pasos:

1. Obtención de los metabolitos fúngicos: El hongo en estudio se cultivó en el Medio de Wickerham (MW) para ensayo de antibióticos, a 25 ± 2 °C. Al cabo de 4 días de incubación y utilizando un sacabocados, se extrajeron 2 cilindros, de 9 mm de diámetro, del medio de cultivo adyacente a la colonia.

2. Preparación e inoculación de las placas con *Staphylococcus aureus*: Se colocaron 25 mL de Agar Mueller-Hinton (AMH), previo control de pH, en cajas de Petri de 10 cm de diámetro y fondo plano, y se dejaron enfriar hasta su solidificación [19,20]. A continuación, se hisoparon ($\approx 0,1$ mL) con una suspensión en solución fisiológica ($\approx 10^7$ - 10^8 UFC/mL), de un cultivo de 18 horas de *S. aureus* ATCC 25923 (no productor de penicilinas).

3. Ensayo propiamente dicho: Los cilindros obtenidos para cada cepa analizada (apartado 1) se ubicaron sobre la superficie de 2 placas recientemente preparadas e inoculadas con *S. aureus* (apartado 2); de este modo se trabajó por duplicado. Se colocaron en total 5 cilindros por placa (ver Fig. 1); tres provenientes de distintas cepas analizadas y los dos restantes correspondientes a un blanco y a un control positivo. El blanco estuvo constituido por un cilindro del MW en el que no se habían inoculado hongos. El control positivo se elaboró, según el apartado 1, con un cilindro obtenido del mismo medio inoculado con *P. chrysogenum*, Thom. A CECT 2784, buen productor de penicilina.

El conjunto se incubó a 35 ± 2 °C. Al cabo de 16-18 horas, se procedió a verificar si existían halos de inhibición del desarrollo bacteriano alrededor de cada cilindro. Se consideró actividad antibacteriana positiva cuando se observó inhibición, independientemente del diámetro del halo, y actividad antibacteriana negativa (AAN) cuando no se observaron halos.

Los ensayos se efectuaron, al menos, por duplicado para cada una de las cepas.

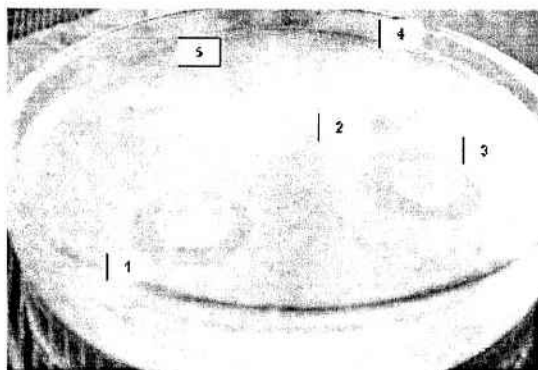
Idéntico procedimiento se llevó a cabo con cilindros obtenidos a partir de hongos incubados durante 6 y 8 días.

Resultados

Se trabajó con 10 muestras, de las que se aisló un total de 24 hongos. *Penicillium* resultó ser el género más frecuente (15; 62,5%), siguiéndole en orden de importancia *Aspergillus* (7; 29,1%). En menor proporción se detectaron *Cladosporium* (1; 4,2%) y *Scopulariopsis* (1; 4,2%). El único género contaminante del chorizo español fue *Aspergillus*.

La prueba de "screening" para detectar la capacidad de producir compuestos antibacterianos se llevó a cabo con *P. chrysogenum*, Thom. A CECT 2784 (testigo positivo) y con los 15 *Penicillium* aislados (*P. chrysogenum* Thom, n=4; *P. nalgiovense* Laxa, n=8; *P. griseofulvum* Dierckx, n=1; *P. brevicompactum* Dierckx, n=1 y *P. crustosum* Thom, n=1).

Figura 1: Ensayo para la detección de la actividad antibacteriana



1- Control positivo (*Penicillium chrysogenum*, Thom. A CECT 2784 buen productor de penicilina); 2- Blanco (medio de Wickerham sin inocular); 3 y 5 actividad antibacteriana positiva; 4- actividad antibacteriana negativa

Tabla 1: Origen y actividad antibacteriana de cepas de *Penicillium* a los 4, 6 y 8 días de incubación

Cepa	Origen	M.C. ¹	Denominación	Halos de inhibición (\bar{x}^2 expresados en mm)		
				4 días	6 días	8 días
<i>Penicillium chrysogenum</i> , Thom. A	CECT ³ 2784			13	15	15
<i>P. chrysogenum</i> Thom	Salame en grasa ⁴	A	E ₁	19	19	20
<i>P. chrysogenum</i> Thom	Salame en grasa ⁴	A	E ₃	17	17	18
<i>P. chrysogenum</i> Thom	Salame en grasa ⁴	A	E ₁₆	14	19	19
<i>P. chrysogenum</i> Thom	Salamín tipo chacarero	B	E ₆	18	18	20
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salame en grasa ⁴	A	E ₁₅	17	21	22
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salame tipo colono ⁵	B	E ₃₁ ; E ₃₃	AAN ⁶	AAN	AAN
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salame tipo colono ⁵	B	E ₃₂	AAN	14	15
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salame tipo colono ⁵	B	E ₃₉	AAN	AAN	15
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salamín picado fino	C	E ₂₁	19	23	23
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salamín picado fino	C	E ₄₈	AAN	19	21
<i>P. nalgioense</i> Laxa	Salame de Milán	C	E ₅₀	AAN	AAN	AAN
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	Salamín tipo tandilero	C	E ₁₀	17	22	22
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	Salame en grasa ⁴	A	E ₂	AAN	13	20
<i>P. crustosum</i> Thom	Salame en grasa ⁴	A	E ₅	AAN	AAN	AAN

¹MC (marca comercial) A, B, C representan las tres marcas comerciales; ² \bar{x} : Valor promedio de los halos de inhibición; ³ CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ⁴ salame picado grueso en grasa; ⁵ salame picado grueso tipo colono; ⁶ AAN: actividad antibacteriana negativa

Los promedios de los halos de inhibición obtenidos según los distintos períodos de incubación del hongo estudiado, y el origen de los mohos, se observan en la Tabla 1. Sólo 4 de las cepas no presentaron actividad antibacteriana. A los 4 días, 7 de los *Penicillium* (46,7%) presentaron actividad antiestafilocócica, detectándose 3 más (66,7%) cuando la incubación se prolongó hasta los 6 días. La prolongación del período de incubación a 8 días sólo permitió detectar una cepa adicional, si bien en algunos casos los tamaños de los halos se incrementaron.

Todos los *P. chrysogenum* Thom produjeron metabolitos con actividad sobre los estafilococos, independientemente del tiempo de incubación, y 3 de los *P. nalgiovense* Laxa no presentaron inhibición.

Discusión

Los embutidos, en todas sus variedades, constituyen uno de los alimentos más apetecibles de Argentina.

En la elaboración de los productos crudos fermentados, durante el proceso de secado, los hongos colonizan su superficie asentándose sobre la tripa. En el presente trabajo, los resultados obtenidos demostraron la presencia de hongos provenientes de la flora natural del ambiente.

Si bien en algunos estudios no se pudo demostrar la producción de micotoxinas en embutidos [4], el hecho de que sobre estos alimentos puedan desarrollar hongos ambientales con capacidad potencial de sintetizar micotoxinas o antibióticos representa un verdadero problema para la salud [4,17,21]. A fin de evitar estos potenciales problemas es que se recomienda a los fabricantes que adopten el uso de cultivos iniciadores puros, constituidos por hongos conocidos como toxicológicamente seguros y que, simultáneamente, cuenten con la capacidad de conferir las características deseadas al producto, siendo *P. nalgiovense* y *P. chrysogenum* las especies más frecuentemente utilizadas como "starters" en los productos cárnicos [17,21].

Aunque el presente estudio es similar al realizado por otros autores, este reporte es el primero en su tipo en nuestra zona. A pesar de que el número

de cepas estudiadas no fue muy elevado, no deja de ser preocupante el hecho de que la totalidad de los *P. chrysogenum*, al igual que la mayoría de los *P. nalgiovense* recuperados en las muestras analizadas, demostraron ser productores de metabolitos con actividad antibacteriana. La bibliografía describe a estos hongos como capaces de sintetizar antibióticos β -lactámicos [17,21].

El único *P. crustosum* analizado no manifestó acción inhibitoria sobre *S. aureus*, aunque en la bibliografía [21] existen reportes de cepas productoras de compuestos antimicrobianos diferentes a la penicilina que actúan sobre cocos Gram positivos. *P. griseofulvum*, frecuentemente aislado de productos cárnicos, fue otro de los hongos con marcada actividad antibacteriana [21]. Esta especie, además de sintetizar penicilina, ha sido descrita como productora de patulina, ácido ciclopiazónico, roquefortina C y griseofulvina; estas cuatro micotoxinas son compuestos antimicrobianos, siendo las tres primeras capaces de inhibir bacterias [21].

La cepa de *P. brevicompactum* estudiada produjo inhibición del desarrollo de *S. aureus*, contrariamente a lo referido por Laich y col. [21]. Este hongo, recientemente reportado como capaz de sintetizar ocratoxina A [22], es un conocido productor de ácido micofenólico el que, además de ser utilizado como droga inmunosupresora [23], es un viejo antibiótico (nunca usado como tal) que actúa inhibiendo la síntesis de compuestos esenciales para la célula, tales como los ácidos nucleicos [24].

Los hallazgos de este trabajo ponen en evidencia que en el comercio local existen embutidos secos cuya superficie se encuentra colonizada por hongos productores de compuestos con actividad antibacteriana, lo que crea la necesidad de realizar controles más estrictos sobre la calidad de estos alimentos. Por su sencillez y bajo costo, la técnica de "screening" empleada puede resultar de utilidad en estos controles.

El 73,3 % de los *Penicillium* aislados de la micoflora de la superficie de los embutidos estudiados produjeron metabolitos con actividad antibacteriana, habiéndose determinado que el mejor tiempo de incubación para la detección de los mismos fue de 6 días.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral, por haber subsidiado parte del trabajo (Subsidio CAID'2000).

Bibliografía

1. Código Alimentario Argentino.1992:"Alimentos cárneos y afines". Marzochi Ediciones Argentinas (Buenos Aires), VI: 278-279.
2. Terra, N., 2003. Particularidades na fabricação do salame. Revista Nacional da Carne 317.
3. Frey, W., 1995. "Fabricación fiable de embutidos" Editorial Acribia S.A. (Zaragoza), I:1-39.
4. Pose, G.; Ludemann, V.; Pollio, M.L. y Segura, J., 2003. Microflora autóctona de la superficie de embutidos secos fermentados. Importancia del desarrollo de starters para productos cárnicos regionales. La Industria Cárnica Latinoamericana 129: 28-31.
5. Castro, L.C.; Luchese, R.H.; Martins, J.F.P., 2000. Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. Ciênc Tecnol Aliment 20: 40-46.
6. Martín, J.F., 2003. Starter para productos cárnicos. Cepas de *Penicillium nalgiovense* bloqueadas en la biosíntesis de penicilina. Castilla y León, España, Programa Legite. Mesa de trabajo Sector Biotecnología. Accesible por internet: <http://www.inbiotec.com>.
7. Samson, R.A. and Van Reenen-Hoekstra, E.S., 1988. Introduction to Foodborne Fungi Edn. 3 Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn), 299 pp.
8. Pitt, J.I. and Hocking, A.D.,1999. "Fungi and food spoilage" Aspen Publishers, Inc (Maryland), 7: 272-337.
9. Andersen, S.J., 1995. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. J Food Prot 58: 426-429.
10. Núñez, F.; Díaz, M.C.; Rodríguez, M.; Aranda, E.; Martín, A. and Asensio, M.A., 2000. Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. J Food Prot 63: 231-236.
11. Núñez, F.; Rodríguez, M.M.; Bermúdez, M.E.; Córdoba, J.J. and Asensio, M.A., 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. Int J Food Microbiol 32: 185-197.
12. Sosa, M.J.; Córdoba, J.J.; Díaz, C.; Rodríguez, M.; Bermúdez, E.; Asensio, M.A. and Núñez, F., 2002. Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat-extract based substrate. J Food Prot 65: 988-992.
13. Mintzloff, H.J. and Leistner, L.,1972. Selection of a technologically suitable and toxicologically harmless strain of mold for preparation of raw sausage. Zentralbl Veterinarmed B 19: 291-300.
14. Al-Mustafa, Z.H. and Al-Ghamdi, M.S., 2002. Use of antibiotics in the poultry industry in Saudi Arabia: implications for public health. Ann Saudi Med 22,1-2: 4-7.
15. Kanny, G.; Puygrenier, J.; Beaudoin, E. and Moneret-Vautrin, D.A.,1994. Alimentary anaphylactic shock. Implication of penicillin residues. Allergy Immunol 26,5: 181-183.
16. Raison-Peyron, N.; Messaad, D.; Bousquet, J. and Demoly, P., 2001. Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. Allergy 56,8: 796.
17. Laich, F.; Fierro, F.; Cardoza, R.E. and Martín, J.F.,1999. Organization of the gene cluster for biosynthesis of penicillin in *Penicillium nalgiovense* and antibiotic production in cured dry sausages. Appl Environ Microbiol 65,3: 1236-1240.
18. Raper, K.; Thom, C. and Fennell, D., 1949. A manual of the Penicillia. Williams and Wilkins Co (Baltimore), V: 94-96; IX: 359-364.
19. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. Jr., 1997. "Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology" Lippincott (Philadelphia), 23: 1324-1326.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1996. Evaluating production lots of dehydrated Mueller-Hinton agar. Approved standard M6-A. Wayne.
21. Laich, F.; Fierro, F. and Martín, J.F., 2002. Production of penicillin by fungi growing on food products: identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. Appl Environ Microbiol 68,3: 1211-1219.
22. Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Accensi, F. y Cabañes, F.J., 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev Iberoam Micol 17: S63-S68.
23. Inmunología básica de los trasplantes. Accesible por internet: <http://www.uninet.edu/tratado/c080301.html>.
24. Peláez, F. and Genilloud, O. Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano. Centro de Investigación Básica Merck, Sharp & Dohme de España, S.A. Madrid. Accesible por internet: <http://www.ranf.com/pdf/monografias/monografia15/03.pdf>