

Comunicación Breve

El hongo *Penicillium* sp. silvestre y su potencial para evaluar la actividad antibacteriana de forma didáctica en la universidad

Carlos Daniel González-González, Fátima Anayanci Juárez-de la Cruz, Cecilia Guadalupe Hernández-Tondopó, María Adelina Schlie-Guzmán, Javier Gutiérrez-Jiménez*

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México

Recibido 02 de mayo de 2024; aceptado el 16 de mayo de 2024

<https://doi.org/10.69833/RSVM.2024.1.44.07>

Resumen: Las prácticas de laboratorio en la enseñanza de la microbiología en la universidad son de capital importancia, ya que permiten un aprendizaje significativo en los alumnos, quienes se formulan preguntas sobre un fenómeno expuesto, detonando la aplicación del método científico. Uno de los tópicos de esta asignatura son los microbios benéficos para la humanidad, entre los que se encuentra el hongo *Penicillium*. Este microorganismo es de amplia distribución en la naturaleza. Se usa en la elaboración de alimentos, para la producción de pigmentos y la obtención de penicilina, antibiótico activo principalmente contra bacterias grampositivas. En este trabajo, se propone como actividad didáctica en el laboratorio, aislar a partir de un alimento cepas de *Penicillium* que permitan estudiar su biología y evaluar su actividad antibacteriana. El hongo *Penicillium* sp. se aisló de una “tortilla”; posteriormente, y a partir de un subcultivo, se obtuvo el sobrenadante con el que se impregnaron discos de papel filtro. Mediante la prueba de difusión en disco, se evaluó su actividad antibacteriana frente a *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. El sobrenadante inhibió el crecimiento de *S. agalactiae*, pero no el de *E. coli*. El hongo *Penicillium* puede recuperarse del ambiente silvestre y usarse para demostrar en el aula y en el laboratorio la actividad antibacteriana sobre bacterias grampositivas y gramnegativas.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, alimentos, *Penicillium*, propuesta didáctica.

Penicillium sp. wildtype and its potential to assess antibacterial activity with a didactic purpose at the university

Abstract: Laboratory practices in microbiology teaching at the university are of capital importance, since they allow significant learning in students, who ask questions about an exposed phenomenon, triggering the application of the scientific method. One of the topics of this subject is beneficial microbes to humanity, among which is the fungus *Penicillium*. This microorganism is widely distributed in nature. It is used in food production, to produce pigments and to obtain penicillin, an antibiotic active mainly against Gram-positive bacteria. In this work, it is proposed, as a didactic activity in the laboratory, to isolate *Penicillium* strains from a food that allow studying its biology and evaluating its antibacterial activity. The fungus *Penicillium* sp. was isolated from a “tortilla”; subsequently, and from a subculture, filter paper discs were impregnated with the obtained supernatant. Antibacterial activity against *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* using the disk diffusion test was evaluated. The growth of *S. agalactiae*, but not of *E. coli* was inhibited by the supernatant. *Penicillium* can be recovered from the wild environment and used to demonstrate antibacterial activity on Gram-positive and Gram-negative bacteria in the classroom and laboratory.

Keywords: antimicrobial activity; food; *Penicillium*; didactic proposal.

* Correspondencia:

E-mail: javier.gutierrez@unicach.mx

ORCID: 0000-0001-8137-3500

Introducción

El siglo XIX fue un periodo de notable avance para la ciencia, donde la microbiología se distinguió por la denominada edad de oro, caracterizada por el hallazgo continuo de agentes causales de enfermedades infecciosas que aquejan a la humanidad [1]. Paralelamente, desde mediados de 1800, en Estados Unidos la enseñanza de la ciencia incorporó actividades para desarrollarlas en el laboratorio [2]. Así, el laboratorio es el espacio donde se confirma la información aprendida en los textos [3] Por ende, la experimentación en la asignatura de microbiología general es una herramienta de aprendizaje básica, que permite el trabajo colaborativo y el debate sobre los microorganismos y su impacto en el planeta [4].

En general, los estudiantes asocian a los microbios de forma negativa con el ser humano y, aunque es de reconocer que muchos afectan a los seres vivos, también existen microorganismos que brindan muchos beneficios [5]. Algunos de estos microorganismos son los hongos del género *Penicillium*, que alberga más de 200 especies y se ubica en la familia Trichocomaceae, orden Eurotiales, Phylum Ascomycota. Posee una estructura reproductora (que produce los conidios) en forma de pincel (del latín *Penicillus*) llamada fiálide, que es sostenida por el conidióforo [6].

Este hongo tiene amplia distribución en la naturaleza (en la materia orgánica, el humus del suelo, la madera, el estiércol, el cuero, así como en diversos alimentos), ya que asimila la materia orgánica y sintetiza péptidos, pigmentos, antibióticos y micotoxinas [7]. Además, es la fuente de la penicilina, descubierta por Alexander Fleming, quien observó sus propiedades antimicrobianas al observar la inhibición del crecimiento de *Micrococcus* [8]. Un trabajo reveló que 10 de 13 especies de *Penicillium camemberti* exhibieron actividad antimicrobiana, principalmente contra bacterias gramnegativas y *Bacillus cereus*, siendo las cepas de *Penicillium* provenientes de colecciones de cultivos establecidas [9]; sin embargo, dicho acervo biológico no siempre está disponible para propósitos didácticos.

Así, el objetivo de este trabajo fue proponer una actividad didáctica en el medio universitario, en la que se aislara y reconociera al hongo *Penicillium* sp. a partir de un alimento contaminado, y se examinara su probable actividad antibacteriana sobre algunas bacterias de importancia clínica, 13% en el grupo entre 15 a 24 años [4]. Según proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), en el 2030 más de 40 millones de adolescentes de todo el mundo estarán infectados por el virus, dato alarmante que resalta la urgencia de intervenir en la prevención [2].

Materiales y métodos

Procedencia de la cepa de Penicillium sp. El hongo *Penicillium* sp. fue aislado a partir de una tortilla artesanal (alimento típico de México a base de maíz, de forma redonda y plana) elaborada en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Organización para la práctica en el laboratorio. Los estudiantes se conformaron en equipos de hasta tres personas. Cada equipo debía suministrar una tortilla contaminada con *Penicillium* sp., aunque también podían incluir otro tipo de alimento susceptible de contaminación por este hongo. Los estudiantes prepararon los materiales y reactivos requeridos, de acuerdo con lo descrito en los párrafos siguientes. Además de registrar las características fenotípicas de las colonias, los alumnos obtuvieron como variables dependientes las medidas de los halos de inhibición (en mm) y como dependientes las bacterias retadas frente a las cepas de *Penicillium*. Con los datos obtenidos pudieron calcular la media aritmética y la desviación estándar, además de aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas para comparar la actividad antibacteriana entre las distintas cepas de *Penicillium*.

Aislamiento y obtención del sobrenadante del cultivo de Penicillium sp. Para aislar el hongo *Penicillium* sp. se usó una metodología reportada previamente [10]. Con un hisopo humedecido con caldo Luria Bertani (LB), se colectó una fracción de la película algodonosa, se inoculó en agar papa dextrosa (APD) y se incubó a 25 °C por 7 días. Luego de la incubación, a partir de una colonia aislada, se hizo un montaje húmedo del micelio vegetativo, se tiñó con azul de metileno de Loeffler y se observó bajo el microscopio óptico. Posteriormente, se sembraron de 2-3 colonias en 5 mL de caldo LB 2x y se incubó a 25 °C por 24 h. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 1000 x g por 10 min y se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0,45 µm.

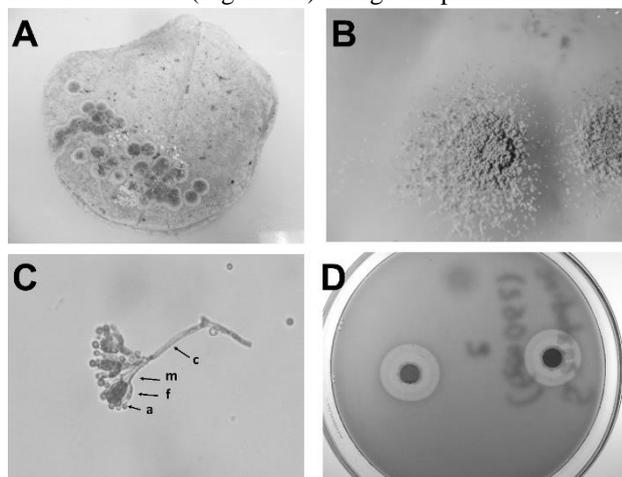
Prueba de difusión en disco. El sobrenadante de *Penicillium* sp. se evaluó frente a *Escherichia coli* ATCC® 25922™ CGEN 014, *Streptococcus agalactiae* CGEN 052 y *S. agalactiae* CGEN 062, todas de la colección de bacterias del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas [11]. Las cepas de *Streptococcus* se aislaron del cerebro de peces del género *Oreochromis* sp., que presentaron nado errático y fueron cultivados en jaulas flotantes en la presa hidroeléctrica Malpaso, Chiapas, México [12].

Se impregnaron discos estériles (6 mm de diámetro) de papel de filtro Whatman™ N° 1 con 400µL del sobrenadante, y se dejaron secar en un ambiente estéril a 37°C por 24 h. A partir de cultivos de 24 h de las bacterias a ensayar, se ajustaron los inóculos a la escala 0,5 de MacFarland (~1.5 x 10⁸ UFC/mL) con solución salina

fisiológica [13]. Se introdujo un hisopo estéril en dicha suspensión y se inoculó en agar sangre de carnero al 5%, estriando toda la superficie del agar, dejando reposar por 5 min. Posteriormente se depositaron los discos impregnados con el sobrenadante de *Penicillium* sp., y los medios de cultivo se incubaron a 35°C por 24 h. Como control se usaron discos con 10 U de penicilina (Biorad). El halo de inhibición se midió con un vernier y los ensayos se hicieron por triplicado. Los resultados se interpretaron de acuerdo con lo establecido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio para penicilina [14].

Resultados y discusión

Luego de dos semanas en refrigeración, en una tortilla apareció un crecimiento irregular de aspecto algodonoso, de color verdoso (Figura 1A). Luego del primo aislamiento



de *Penicillium* sp. en agar APD, se obtuvieron colonias mate, de color azul, de aspecto algodonoso, con crecimiento denso en el centro y disperso en la periferia (Figura 1B). El examen microscópico reveló la presencia de conidióforos, cuyas ramificaciones forman las métulas, de las que emergen las fiálides superpuestas, de las que a su vez emanan las conidias (Figura 1C); estas estructuras son distintivas del género *Penicillium* [15].

Figura 1. Características de *Penicillium* sp. aislado del medio ambiente. A: película fúngica de color verdoso con borde blanco en la superficie de una tortilla; B: colonia de forma irregular, de color azul sobre el medio APD; C: estructura fúngica consistente de conidióforo (c), métula (m), fiálide (f) y conidias (a); D: inhibición de *Streptococcus agalactiae* por el sobrenadante del cultivo de *Penicillium* sp.

De esta forma es posible recuperar cepas de *Penicillium* a partir de alimentos como la tortilla, así como de otros alimentos como el salami tipo italiano producido en Uruguay, o en embutidos españoles, cuya presencia en este tipo de alimentos los protege de los microbios indeseables [16]. Otras fuentes son las frutas en descomposición, vegetales, pan y granos [17]. De esta manera, los alumnos pueden disponer de una diversidad de fuentes de

aislamiento de cepas de *Penicillium* sp. para propósitos didácticos.

Tras el aislamiento de la cepa de *Penicillium* y obtener el sobrenadante, los ensayos mostraron la inhibición del crecimiento bacteriano sobre las dos cepas de *S. agalactiae*, en tanto que la bacteria *E. coli* no presentó inhibición de crecimiento (Tabla 1).

Los halos de inhibición sobre las cepas de *S. agalactiae* fueron de 13,5 a 15,5 mm de diámetro (Tabla 1). Esto pudiera obedecer a la presencia de penicilina en el sobrenadante de la cepa de *Penicillium* sp. aislada de la tortilla, dado que se han reportado cepas de *P. nalgiovense* y *P. olsonii* secretoras de penicilina aisladas de alimentos tipo embutidos elaborados en Grecia [18], o de embutidos argentinos, en donde se recuperaron *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense* y *P. nordicum* productores de este antibiótico [19].

Tabla 1. Actividad antibacteriana del sobrenadante de una cepa de *Penicillium* sp. sobre *S. agalactiae* y *E. coli*.

Bacteria	Halo de inhibición [X mm (± DE)].	
	Sobrenadante de <i>Penicillium</i> sp.	Penicilina 10 U
<i>S. agalactiae</i> CGEN 052	15,5 (0,70)	32 (1,41)
<i>S. agalactiae</i> CGEN 062	13,5 (0,70)	30,5 (0,70)
<i>E. coli</i> ATCC® 25922™	0 (0,0)	0 (0,0)

X=media aritmética; DE=desviación estándar; U=unidades.

Aunque el sobrenadante de *Penicillium* sp. inhibió el crecimiento de las cepas de *Streptococcus*, el diámetro de los halos de inhibición sobre estas bacterias fue más del doble cuando se utilizó el disco de penicilina comercial. Esto pudo obedecer a que en el sobrenadante pudieran estar presentes otras moléculas que interfieren con la actividad biológica de la penicilina [20], o como han señalado otros autores, que debe añadirse al medio de cultivo un estimulante para la secreción de este antibiótico, como el diaminopropano [21].

Por otra parte, la cepa de *E. coli* no fue inhibida por los discos impregnados con sobrenadante de *Penicillium*, lo cual podría deberse a que el efecto del antibiótico depende de las características de las bacterias, tal como la escasa cantidad de peptidoglicano que tienen las bacterias gramnegativas como *E. coli*, o a la secreción de beta lactamasas que inactivan a la penicilina [10,22].

La actividad aquí presentada se incorporó recientemente al programa educativo de la Licenciatura en Biología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, por lo que aún se evaluará el impacto de dicha actividad en el proceso de enseñanza-aprendizaje. Además de ello, a partir de esta actividad se puede generar una colección de cepas de *Penicillium* aisladas de distintas fuentes y conservarlas, para estudiar sus rasgos biológicos e identificar de forma preliminar las cepas productoras de penicilina [7,23].

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Financiamiento

Los autores declaran no haber recibido financiamiento para realizar el estudio.

Referencias

- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 12 ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Sunal DW, Sunal CS, Sundberg C, Wright EL. Chapter 1. The importance of laboratory work and technology in science teaching. In: The impact of the laboratory and technology on learning and teaching science K-16. Sunal DW, Wright EL, Sundberg C (Eds). Charlotte, North Carolina, United States of America: Information Age Publishing, Inc.; 2008.1-30 pp.
- Hofstein A. The role of laboratory in science teaching and learning. In: Science Education. An International Course Companion. Taber KS, Akpan B (Eds). Rotterdam, The Netherlands: Sense Publishers; 2017. 357-68 pp.
- Escallón Largacha E, Forero Gómez A. Aprender a escribir en la universidad. 1era Ed. Colombia: Ediciones Uniandes; 2015.
- Stark LA. Beneficial microorganisms: countering microbophobia. CBE Life Sci Educ. 2010; 9:387-9. DOI 10.1187/cbe.10-09-0119
- Roncal T, Ugalde U. Conidiation induction in *Penicillium*. Res Microbiol. 2003;154:539-46. DOI 10.1016/S0923-2508(03)00168-2
- Rabha J, Jha DK. Metabolic diversity of *Penicillium*. In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. *Penicillium* system properties and applications. Kumar Gupta V, Rodriguez-Couto S (Eds). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2017.217-234 pp. DOI 10.1016/B978-0-444-63501-3.00012-0
- Gaynes R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. Emerg Infect Dis. 2017;23:849-53. DOI 10.3201/eid2305.161556 .
- Larsen AG, Knøchel S. Antimicrobial activity of food-related *Penicillium* sp. against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. J Appl Microbiol. 1997;83:111-9. DOI 10.1046/j.1365-2672.1997.00196.x
- Lewis JA, Anderson N. *Penicillium* antibiotic effect. The American Biology Teacher. 2018;80:530-5 DOI 10.1525/abt.2018.80.7.53011
- Gutiérrez-Jiménez J, Luna-Cazás LM, Mendoza-Orozco MI, Díaz-Marina G de J, Burguete-Gutiérrez JC, Feliciano-Guzmán JM. Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Rev Soc Ven Microbiol. 2015;35:95-102. <https://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v35n2/art07.pdf>
- Hernández-Hernández M, Gutiérrez-Jiménez J, Ruiz-Sesma B, Bautista-Trujillo G. Oxígeno-temperatura en la incidencia de *Streptococcus* spp. en jaulas flotantes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en Malpaso, Chiapas. Revista Digital Espacio I+D. Innovación más Desarrollo. 2012;10:131-43. DOI 10.31644/IMASD.27.2021.a03
- Bernal R. M, Guzmán M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. Biomédica (Bogotá). 1984;4:112-21. <https://www.academia.edu/download/101486362/1917.pdf>
- Clinical Laboratory Standards Institute. M100. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 34th Ed. United States: Clinical Laboratory Standard Institute; 2024.
- Qian D, Du G, Chen J. Isolation and culture characterization of a new polyvinyl alcohol-degrading strain: *Penicillium* sp. WSH02-21. World J Microbiol Biotechnol. 2004;20:587-91. DOI 10.1023/B:WIBI.0000043172.83610.08
- Galvalisi U, Lupo S, Piccini J, Bettucci L. *Penicillium* species present in Uruguayan salami. Rev Argent Microbiol. 2012;44:36-42. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v44n1/v44n1a08.pdf>
- Sajjad-Ur-Rahman, Rasool MH, Rafi M. *Penicillin* production by wild isolates of *Penicillium chrysogenum* in Pakistan. Braz J Microbiol. 2012; 43:476-81. DOI 10.1590/S1517-83822012000200007
- Papagianni M, Ambrosiadis I, Filiouis G. Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. Meat Sci. 2007;76:653-7. DOI 10.1016/j.meatsci.2007.01.018
- Castellari C, Quadrelli AM, Laich F. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. Int J Food Microbiol. 2010;142:149-55. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.016
- Zampieri D, Guerra L, Camassola M, Dillon AJP. Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. Ind Crops Prod. 2013;50:882-6. DOI 10.1016/j.indcrop.2013.08.045
- Martín J, García-Estrada C, Rumero Á, Recio E, Albillos SM, Ullán RV, Martín J-F. Characterization of an autoinducer of penicillin biosynthesis in *Penicillium*

- chrysogenum*. Appl Environ Microbiol. 2011;77:5688-96. DOI 10.1128/AEM.00059-11
22. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011;28:648-56. https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpmesp/v28n4/a13v28n4.pdf
23. Ludemann V, Pose G, Pollio ML, Segura J. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. Int J Food Microbiol. 2004; 96:13-8. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.003



Este artículo está bajo licencia CC BY-NC-SA 4.0