

MICROHONGOS DE LA HIERBA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Alberto, M. Stchigel

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Farmacobotánica
Junin 956 B. Aires, Argentina

Palabras clave: Microhongos, hierba mate.

Key words: Microfungi, "yerba mate".

RESUMEN.

Se estudió cuantitativa y cualitativamente la presencia de especies fúngicas mesófilas, termotolerantes y termofilas presentes en 10 muestras de hierba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), obtenidas de diversos locales comerciales de la Capital Federal y del Gran Buenos Aires.

Mediante las técnicas de dilución en placa y cámara húmeda, se aislaron un total de 14 géneros y 15 especies. Los aislamientos más comunes fueron: *Aspergillus niger* Van Tieghem (en 100% de las muestras) y *Rhodotorula* spp. (80%).

Otros taxa menos frecuentes integraron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Phaeococcomyces* y algunas de ellos pueden considerarse potencialmente toxicogénicas.

Cephalophora tropica Thaxter, *Melanospora* sp., *Rhizomucor pusillus* Schipper y *Humicola grisea* Traaen, fueron unicamente recuperados mediante la técnica de cultivo en cámara húmeda.

El número de propágulos por gramo del producto analizado, osciló desde 2.700 a 50.000 ufc. para hongos mesófilos y de 0-3000 ufc. para termotolerantes.

INTRODUCCION.

Las hojas procesadas de *Ilex paraguariensis* St. Hil., con o sin porciones de tallo, son conocidas bajo la denominación de hierba mate. Este producto se utiliza para la preparación de infusiones que son consumidas, frías o calientes, por un amplio sector de la población humana de Argentina. Dichos brebajes se emplean por sus propiedades estimulantes, debidas a las xantinas (Alikardis, 1987; Litter, 1986), y digestivas, por su contenido en ácidos cafeoilquínicos (De Sequeira &

SUMMARY.

[Microfungi of mate herb (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Quantification, isolation and determination of the meso, thermotolerant and thermophilic fungal species in samples of mate herb (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from several market of Buenos Aires (City and surroundings) were performed.

A total of 14 genera and 15 spp. were isolated in Malt Agar. Dilution plate method showed *Aspergillus niger* Van Tieghem, and *Rhodotorula* spp. as the most dominant and frequent species (100% and 80% respectively). Other minor species isolated, belong to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Phaeococcomyces*. Some species of this genera are potentially mycotoxigenic.

Cephalophora tropica Thaxter, *Melanospora* sp., *Rhizomucor pusillus* Schipper and *Humicola grisea* Traaen, could be isolated only by culture in humid chamber.

The number of dispersal propagules/g is 2.700 - 50.000 cfu. for mesophilic fungi and 0-3000 cfu for thermotolerant.

Reggi, (1965); Preziosi & Loscalzo, 1956).

No existen aparentemente datos nacionales internacionales sobre el tema y la literatura solo abarca algunos vegetales considerados como especias, brebajes o condimentos, tales como: café, té, pimienta etc. (Abdel-Hafez & El-Maghraby, 1992)

Debido a su importante mercado, que en los últimos años se ha expandido gracias a las exportaciones y debido a la falta de conocimiento sobre los microhongos presentes, se emprendió un breve estudio cuali-cuantitativo, con énfasis en la búsqueda de los hongos

asociados y de aquellos considerados potencialmente toxicogénicos.

MATERIALES Y METODOS.

Se analizaron 10 muestras de hierba mate destinadas al consumo, presentadas a la venta en dos formas diferentes:

a) Tres paquetes de muestras, los que contenían bolsitas-filtro con hojas finamente molidas de *Ilex paraguariensis*, destinadas a la preparación de la infusión conocida como "mate cocido".

b) Siete correspondientes a recipientes (paquete) de papel impermeabilizado mediante plásticos, parafina u otras sustancias, con un peso bruto de 500 gr., conteniendo ya sea con la hoja sola o porciones del tallo, con un grado medio de molienda.

Las muestras se seleccionaron al azar, siendo adqui-

ridas en diversos locales comerciales de venta de productos alimenticios localizados en la Capital Federal y el Gran Buenos Aires. Estas fueron elaboradas por cinco establecimientos hiebertaleros.

Para estimar el número total de hongos mesofílicos y termotolerantes, se recurrió a las siguientes técnicas:

Método de dilución. Diez gr. de cada muestra tomadas al azar ya sea desde las bolsitas o paquetes, fueron transferidos en forma aséptica a matraces Erlenmeyer estériles. Se agregaron 90 ml. de agua peptonada al 0.1 % y luego se sometieron a agitación manual por períodos de 5 minutos, interrumpidos con iguales períodos de reposo, hasta completar un total de 25 minutos. Esta operación se realizó a temperatura ambiente.

Se tomó 1 ml. del sobrenadante de cada matraz y se hicieron 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) seriadas en tubos de ensayo al décimo con agua peptonada (0.1 %).

Tabla 1. Presencia relativa (%) de taxa aislados mediante técnica de dilución en las 10 muestras analizadas

	MUESTRAS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HONGOS MESOFILICOS:										
<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6
<i>Aspergillus alutaceus</i> Berk.	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp. Serie <i>Versicolores</i>										
W. Gams et al.	-	-	1.7	-	0.5	1.4	3.6	-	1.1	-
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	97.2	95.6	94.3	79.4	90.1	95.0	10.0	50.0	92.3	84.9
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	-	-	-	-	-	0.6	-	-	0.5	-
<i>Aspergillus sydowii</i> Thom & Church	-	-	-	-	0.6	1.2	3.8	-	2.3	0.9
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita	0.3	-	-	-	0.3	0.6	-	-	-	-
<i>Emmericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	10.3	1.1	1.2	-	-	1.8	2.0
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	0.3	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-
<i>Phaeococcomyces nigricans</i> de Hoog	-	-	-	-	-	-	80.7	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	1.3	-	-	-	1.4	-	1.9	-	1.4	1.7
<i>Rhodotorula</i> spp.	0.3	4.4	4.0	10.3	5.7	-	-	45.0	0.5	10.0
Otras levaduras sin pigmentos carotenoides	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-
HONGOS TERMOTOLERANTES Y TERMOFILICOS:										
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fries	100.0	100.0	100.0	-	100.0	-	-	-	-	-
<i>Rhizomucor pusillus</i> Schipper	-	-	-	-	-	100.0	-	-	-	-

De cada dilución se tomaron 0,2cc los cuales fueron sembrados en cuadruplicado en placas de Petri de 10 cm con Agar Extracto de Malta (M.E.A.) con cloranfenicol (250mg./l.) y dichloran (2.0 mg./l.), para inhibir el desarrollo bacteriano y reducir el diámetro de las colonias fúngicas, respectivamente.

Un juego de placas por cada dilución se incubó a 25°C y el otro a 45°C, para cuantificar hongos mesofílicos y termotolerantes, respectivamente.

Los recuentos se efectuaron a los 7 días de incubación, seleccionando aquellas diluciones que mostraron un número de colonias comprendidas entre 30 y 300 por placa.

Para el aislamiento e identificación de las especies se examinaron a los 7, 15 y 21 días luego de efectuados los recuentos.

Método en cámara húmeda.

En placas de Petri estériles se colocaron fracciones de las distintas muestras, de manera de cubrir completamente el fondo de las mismas. Luego fueron humectadas con 5 ml. de solución fisiológica estéril.

Las muestras se realizaron por cuadruplicado. Un par fue incubado a 25°C y el otro a 45°C.

Mediante examen macro y microscópico se identificaron las colonias presentes (según Domsch et al (1980) y De Hoog (1977)). Los cultivos especiales de los integrantes de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se procedió, según los criterios de Pitt (1988); Raper & Fennel (1965).

La presencia relativa de los hongos aislados según la técnica de dilución en placa se calculó como el número de colonias de cada taxa/ número total de colonias y para la técnica de cámara húmeda, solamente por presencia

RESULTADOS Y DISCUSION.

En las muestras en bolsitas, los recuentos presentaron rangos entre las 8000 y 50000 u.f.c./g., mientras las provenientes de paquetes, entre 2700 a 13200 u.f.c. /g.. De estas últimas solo 2 muestras presentaron valores superiores a las 10000 u.f.c./g., mientras las restantes, un valor medio de 3000 u.f.c./g.

Para los hongos termotolerantes y termofílicos, los rangos fueron entre 100 y 3000 u.f.c./g., para las muestras en bolsita y desde 0 hasta 800 u.f.c. / g., para las contenidas en paquetes.

Aspergillus niger, fue la especie con la mayor presencia relativa (constancia), comprendida entre un 10 a un 97,5% y una media de 79,5%, seguida de *Rhodotorula spp.* con una constancia de aislamiento de un 80% y una media del 8% de las colonias totales (Tab-

Tabla 2. Constancia de taxa según las técnicas de aislamiento, en (%) del total de las 10 muestras

Método Cámara húmeda (1)		
Método Dilución (2)	(1)	(2)
Hongos termotolerantes:	(%)	(%)
<i>Absidia corymbifera</i> Sacc.		
& Trotter	20	0
<i>Acremonium</i> sp.	0	10
<i>Aspergillus alutaceus</i> Berk.	20	10
<i>Aspergillus</i> sp. Serie <i>Versicolores</i>		
W.Gams et al.	50	50
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	100	100
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	10	20
<i>Aspergillus sydowii</i> Thom		
& Church	100	60
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita	100	30
<i>Cephalophora tropica</i> Thax.	30	0
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill	100	20
<i>Fusarium</i> sp.	0	50
<i>Melanospora</i> sp.	10	0
<i>Mucor</i> sp.	10	0
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainie	0	20
<i>Phaeococcomyces nigricans</i> DeHoog	0	10
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	20	50
<i>Rhodotorula</i> spp.	0	80
Otras levaduras sin pigmentos carotenoides	0	10
Hongos termotolerantes y termofílicos		
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fries	0	50
<i>Humicola grisea</i> Traaen	60	0
<i>Rhizomucor pusillus</i> Schipper	60	10

la 1). Además como se desprende en Tabla 2, su constancia en las muestras es del 100% para las dos técnicas empleadas (Tabla 1).

Los valores de los recuentos de hongos mesofílicos encontrados en este sustrato son similares a los informados para otros productos con baja actividad de agua, tales como: chile, cayena y paprika en polvo (King et al. 1986).

En las muestras en cámara húmeda 4 géneros fueron constantes en aparición (100%). *A. niger*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *Emericella nidulans* y 7 taxa no se detectaron (Tabla 2).

A. fumigatus, fue la especie termotolerante cuantitativamente más importante en la técnica de dilución con valores de 0 a 100% y de mayor constancia de

aislamiento(50%).

Debido que las técnicas usadas para el aislamiento muestran resultados diferentes (Tabla II), se recomienda emplearlas conjuntamente cada vez que se estudie la micota de productos similares a la hierba mate (productos vegetales elaborados con baja actividad de agua).

Aspergillus alutaceus Berk., *Aspergillus fumigatus* Fries, *Aspergillus parasiticus* Speare, *Aspergillus sydowii*

Thom & Church, *Aspergillus tamaritii* Kita, *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill., *Fusarium* sp. y *Penicillium citrinum* Thom, fueron las especies potencialmente toxicogénicas identificadas. Debido a que su frecuencia de aislamiento es relativamente elevada (Tabla II) y que en algunas muestras pueden considerarse como cuantitativamente importantes (Tabla I), la presencia de micotoxinas no puede ser descartada (Abdel-Hafez & El-Maghraby, 1992) y serán evaluadas en un trabajo futuro.

REFERENCIAS

- Abdel-Hafez, A.I.I. & El-Maghraby, O.M.O. (1992). Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. *Cryptogamie, Mycologie* 13:31-45
- Alikardis, F. (1987). *Ethnopharmacology*. 20:121-144.
- De Hoog, G. S. (1977). The Black Yeast and Allied *Hyphomycetes*. *Studies in Mycology*, vol.15. CBS. Baarn. The Netherlands.
- De Sequeira, R.; Reggi, S. P. (1965). *Public. Soc. Arg. de Gastroenterologia* 9: 1-8.
- Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press. London.
- King, A. D.; Pitt, J. I.; Beauchat, L. R.; Corry, J. E. L. (Eds.). (1986). *Methods for the Mycological Examination of Food*. Plenum Press & N.A.T.O. S.A.D. U.S.A.
- Litter, M. (1986). *Farmacologia Experimental Clinica*. VII Edición. El Ateneo. Buenos Aires.
- Pitt, J. I. (1988). *A Laboratory guide to Common Penicillium species*. Sec. Edi. CSIRO Division of Food Processing North Ryde. N.S.W.
- Preziosi, P. & Loscalzo, B. (1956). *Fitoterapia*. El Ateneo. Buenos Aires. pp. 690-698.
- Raper, K.B. & Fennel, D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. Baltimore, U.S.A. Williams and Wilkins.