



MICOFLORA DE HIERBAS AROMATIZANTES UTILIZADAS PARA ELABORAR YERBA MATE COMPUESTA

Jerke, Gladis / Marucci, Raúl Salomón

Laboratorio de Micología de Alimentos y Micotoxinas (CIDEt). Facultad de Cs. Ex. Quím. y
Nat. U.Na.M. Módulo de Bioquímica y Farmacia.

M. Moreno 1375 - (3300) Posadas - Misiones - TE: 03752-427687.

E-Mail: g.jerke@fceqyn.unam.edu.ar

MYCOFLORA OF AROMATIC HERBS USED TO ELABORATE YERBA MATE WITH HERBS

ABSTRACT

The objective of our research was to evaluate the total fungal contamination (filamentous fungi and yeast) and the main types present in the aromatic herbs like Kaá Heé (*Rebaudiana Bertonii*), Peppermint (*Minthostachys verticillata*) and Pennyroyal (*Lippia turbinata*), used to elaborate yerba mate with herbs. Dilution plating method was employed for fungal growth and identification. The total fungal count was in the order of 10^5 CFU/g for all three aromatic types studied. The main genera of filamentous fungi identified were *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Scopulariopsis spp* and *Cladosporium spp*. The more frequently isolated yeast was *Rhodotorula spp* and *Saccharomyces spp*.

KEY WORDS: mycoflora, aromatic herbs, yerba mate, Kaá Heé, peppermint, pennyroyal.

RESUMEN

El objetivo de nuestro trabajo consistió en evaluar la contaminación fúngica total (hongos filamentosos y levaduras) y los principales géneros presentes en las hierbas aromatizantes Kaá Heé, Peperina y Poleo empleadas en la elaboración de Yerba Mate compuesta. Se utilizó el método de Dilución en placas para el desarrollo e identificación de la flora fúngica. Los resultados del Recuento total de Colonias fueron del orden de 10^5 UFC/g, para las tres especies aromatizantes estudiadas. Los principales géneros de hongos filamentosos identificados fueron *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Scopulariopsis spp* y *Cladosporium spp*. Las levaduras de aislamiento más frecuente fueron *Rhodotorula spp* y *Saccharomyces spp*.

PALABRAS CLAVES: micoflora, hierbas aromatizantes, yerba mate, Kaá Heé, peperina, poleo.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los molinos yerbateros del país están comercializando **yerba mate compuesta**, la que se elabora con yerba mate más el adicionado en proporciones diversas de distintas hierbas aromatizantes. Estas le confieren al producto final sabores heterogéneos agradables de buena recepción en el mercado. En la provincia de Misiones, dadas las características climáticas y del suelo, se cultiva con buen rendimiento una amplia variedad de especies, lo que significa un importante aporte económico a la producción local.

La flora fúngica natural contaminante de hojas y tallos se conoce con el nombre de flora filoplana siendo importante conocer el nivel de la misma en las hierbas dado su empleo en la elaboración de diversas yerbas mate compuestas.

Las especies de hierbas aromatizantes que son destinadas para la mezcla se someten a un proceso de deshidratación que consiste en distribuir las dentro de un espacio cubierto convenientemente aireado para la eliminación natural del contenido acuoso. Una vez eliminada la humedad de las hojas y tallos, se les realiza una molienda fina.

A la yerba mate con el período de estacionamiento cumplido se le adicionan las hierbas en proporciones que oscilan desde el 0,5 al 1% de cada una, dependiendo de las características aromáticas y de sabor que se le quieran otorgar al producto para lograr buena aceptación por el consumidor.

Hasta el presente no se ha realizado el análisis de la micoflora en hierbas aromatizantes regionales, aun cuando las condiciones climáticas favorecen ampliamente la contaminación fúngica del sustrato. Por otra parte, estas hierbas no pueden recibir tratamientos térmicos ni químicos debido a que se eliminarían y/o alterarían los compuestos aromatizantes que las caracterizan.

Por ello y ante la presencia en el mercado de una amplia variedad de marcas comerciales de yerba mate compuesta, nos interesó estudiar la flora fúngica contaminante de las hierbas aromatizantes, en especial la presencia de cepas potencialmente micotoxigénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se estudiaron las especies aromatizantes: Kaá Heé, peperina y poleo, obtenidas de un establecimiento yerbatero local productor de yerba mate compuesta.

Se realizaron dos muestreos con un intervalo de tres meses, sobre un total de 1.000 Kg, cada vez, recolectándose 500 g de cada una de las especies almacenadas en bolsas de 50 Kg de paño de arpillera de tejido sintético. Las muestras se tomaron mediante muestreo aleatorio con un calador de acero inoxidable de 50 g de capacidad colocándolas en bolsas de papel.

Preparación de las Muestras Analíticas

Se tomaron alícuotas de 20 g de cada una de las especies, se les adicionó 180 ml de agua peptonada al 0,1% y se homogeneizaron en licuadora industrial. Los homogenatos obtenidos se filtraron a través de gasa estéril obteniéndose una dilución de 10^{-1} , a partir de la cual se prepararon las diluciones de 10^{-3} y 10^{-4} [1].

Siembra e Incubación

Se sembraron por triplicado 100 μ l de las diluciones de 10^{-3} y 10^{-4} en medios de cultivo OGYE (Agar Oxytetraciclina-Glucosa-Extracto de Levadura) y DRBC (Agar Dichloran-Rosa de Bengala-Cloramfenicol), mediante diseminación en superficie con espátula de Drigalski. Las placas se incubaron en estufa a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 a 5 días.

Recuento Total de Colonias

A los 4 días se procedió al Recuento Total de Colonias (RTC), y a la caracterización de los géneros que ya presentaban cuerpos de fructificación que permitieran su identificación. Se aislaron las cepas de levaduras para su posterior clasificación y se incubaron nuevamente las placas hasta el completo desarrollo de los hongos filamentosos presentes. Se promediaron los triplicados de los resultados del conteo total de colonias obtenidos en las placas de OGYE y DRBC y se expresaron en Unidades formadoras de Colonias por gramo (UFC/g).

Identificación Taxonómica de Hongos Filamentosos

La identificación genérica de las cepas de hongos filamentosos se realizó en base a la macro-micromorfología de las colonias [1-6]. Se clasificaron por las características que presentaban sus cuerpos de fructificación, los cuales se observaron directamente de las placas del RTC mediante observación microscópica directa (10X) de los bordes de las colonias donde el micelio está más distendido. Las cepas que no fructificaron a los 3-5 días se dejaron crecer hasta que se constató la presencia de micelio aéreo adulto. En estos casos, la identificación se realizó mediante la observación microscópica por el método de la cinta adhesiva [4, 9].

Identificación Taxonómica de Levaduras

Se analizaron las características de crecimiento de las cepas en diversos medios de cultivo [1-11]. Las cepas de levaduras aisladas en medios de mantenimiento se repicaron a: 1) Agar Extracto de Malta (MEA), (a 25°C), para la observación de la macro-micromorfología de las colonias; 2) Agar MEA, incubado a 37°C, que mide el crecimiento a temperaturas elevadas; 3) Agar MEA+Ácido acético (a 25°C), para cepas resistentes a preservativos; 4) Agar MEA+ 50% Glucosa (a 25°C), para medir crecimiento a actividad acuosa reducida; 5) Agar harina de Maíz (a 25°C) para cepas del género *Cándida spp*; 6) Agar Czapeck (a 25°C) para medir la habilidad de utilizar al nitrato como única fuente de nitrógeno. La inspección de las placas

se realizó a los 3-7 días. Se anotó el tamaño y color de la colonia, así como la presencia o ausencia de crecimiento en los diversos medios de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nivel de contaminación fúngica obtenido fue elevado siendo del orden de 10^5 UFC/g para las tres hierbas aromatizantes estudiadas. Los resultados del Recuento Total de Colonias (RTC) y los géneros de hongos filamentosos y levaduras más representativos identificados, así como los porcentajes de los mismos, se presentan en la Tabla 1.

Kaá Heé presentó el mayor recuento fúngico, de $5,1 \times 10^5$ UFC/g con predominio de los géneros de hongos filamentosos *Penicillium spp* (48%), *Aspergillus spp* (44%), *Scopulariopsis spp* (3%) y la levadura *Rhodotorula spp* (3%) (Figura 1).

Peperina arrojó un RTC de $1,2 \times 10^5$ UFC/g siendo *Aspergillus spp* (36%), *Penicillium spp* (23%), *Saccharomyces spp* (14%) y *Rhodotorula spp* (13%) los principales géneros identificados (Figura 2). En esta especie el recuento de levaduras fue más importante que para las otras dos hierbas analizadas llegando al 32% del RTC.

Poleo presentó una flora fúngica muy variada, como puede apreciarse en la Tabla 1, con predominancia de los géneros de hongos filamentosos *Aspergillus spp* (35%), *Penicillium spp* (13%), *Cladosporium spp* (8%), *Chrysosporium spp* (6%) y de las levaduras *Rhodotorula spp* (8%) y *Saccharomyces spp* (6%) (Figura 3). El RTC para esta especie aromatizante fue de $1,1 \times 10^5$ UFC/g.

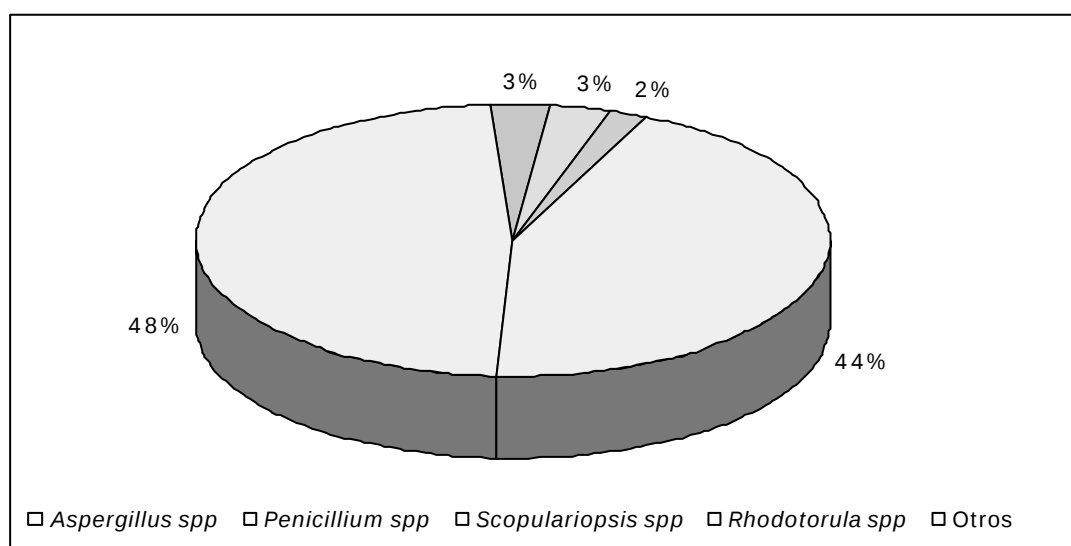


FIGURA 1: Contaminación relativa porcentual en KAÁ HEÉ

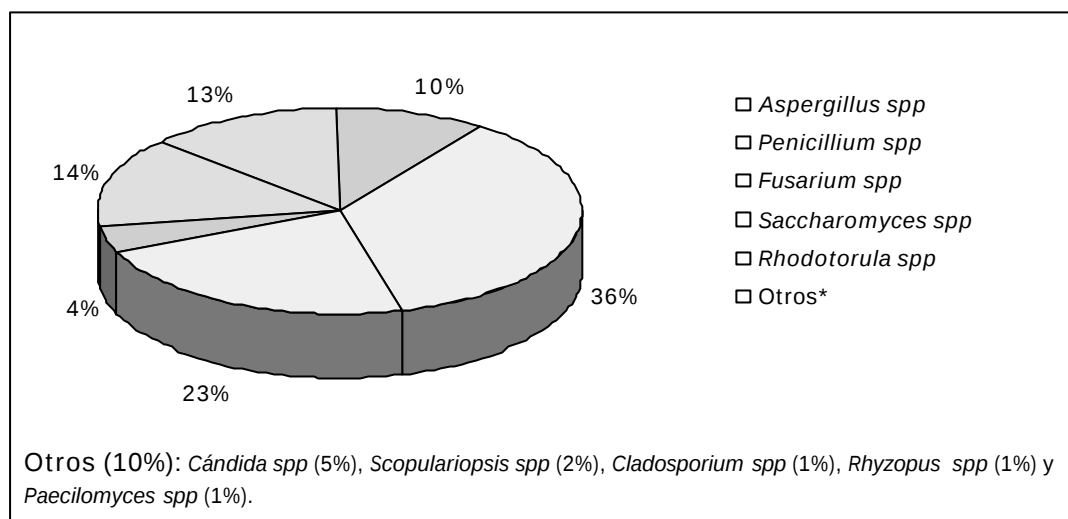


FIGURA 2: Contaminación relativa porcentual en PEPERINA

Tabla 1: Recuento total de colonias fúngicas e identificación genérica de hongos filamentosos y levaduras contaminantes						
	KAÁ HEÉ		PEPERINA		POLEO	
Recuento total de colonias (UFC/g)	5,1 x 10 ⁵		1,2 x 10 ⁵		1,1 x 10 ⁵	
Recuento de filamentosos	4,8 x 10 ⁵ (95%) a	% RTC	8 x 10 ⁴ (68%)	% RTC	9,3 x 10 ⁴ (85%)	% RTC
<i>Aspergillus spp</i>	2,25 x 10 ⁵	44	4,2 x 10 ⁴	36	3,85 x 10 ⁴	35
<i>Penicillium spp</i>	2,4 x 10 ⁵	48	2,7 x 10 ⁴	23	1,4 x 10 ⁴	13
<i>Fusarium spp</i>			4,8 x 10 ³	4	4,4 x 10 ³	4
<i>Cladosporium spp</i>			1,4 x 10 ³	1	8,8 x 10 ³	8
<i>Scopulariopsis spp</i>	1,5 x 10 ⁴	3	2,3 x 10 ³	2		
<i>Rhizopus spp</i>			1,2 x 10 ³	1	5,5 x 10 ³	5
<i>Paecilomyces spp</i>			1,3 x 10 ³	1	3,3 x 10 ³	3
<i>Alternaria spp</i>					4,4 x 10 ³	4
<i>Chrysosporium spp</i>					6,5 x 10 ³	6
<i>Aerobasidium spp</i>					5,4 x 10 ³	5
<i>Trichosporon spp</i>					2,2 x 10 ³	2
Recuento de levaduras	2,5 x 10 ⁴ (5%) b	% RTC	3,8 x 10 ⁴ (32%)	% RTC	1,7 x 10 ⁴ (15%)	% RTC
<i>Saccharomyces spp</i>	9,8 x 10 ³	1,8	1,6 x 10 ⁴	14	7 x 10 ³	6
<i>Rhodotorula spp</i>	1,4 x 10 ⁴	3	1,6 x 10 ⁴	13	9 x 10 ³	8
<i>Cándida spp</i>	1,2 x 10 ³	0,2	6 x 10 ³	5	1 x 10 ³	1
a - % de Hongos filamentosos/Recuento total de Colonias.						
b - % de Levaduras/Recuento total de Colonias.						
% RTC = Recuento del género de Hongo Filamentoso o Levadura/Recuento total de Colonias.						

En las tres hierbas aromatizantes analizadas la presencia de hongos filamentosos prevaleció sobre el recuento de levaduras (Figura 4), con importantes recuentos de hongos potencialmente micotoxigénicos, en especial los géneros *Aspergillus spp* (38%) y *Penicillium spp* (28%). Esto concuerda con las características propias del sustrato estudiado con actividad acuosa reducida y en contacto directo con el aire, vehículo importante de una gran variedad de esporas fúngicas. El RTC para Kaá Heé se observó más elevado que para peperina y poleo.

Los géneros identificados para cada especie vegetal analizada arrojaron resultados diferenciales, propios de la flora filoplana naturalmente presente en estas plantas. El RTC del orden de 10^5 UFC/g, resalta la importancia de conocer la microflora de hierbas aromatizantes, dado que las mismas no pueden recibir ningún tipo de tratamiento químico ni físico para controlar la contaminación fúngica. Además, este nivel de contaminación podría alterar la calidad del producto final.

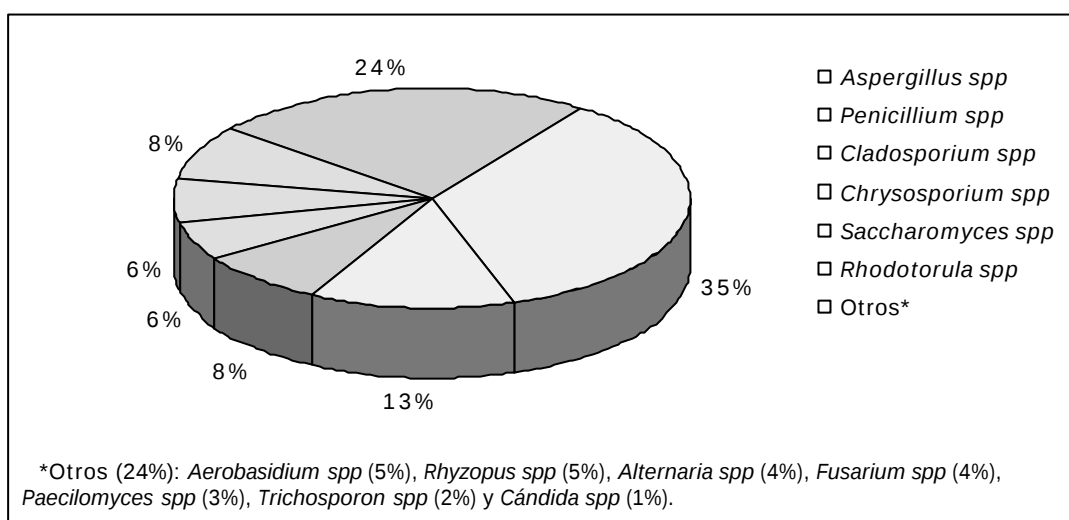


FIGURA 3: Contaminación relativa porcentual en POLEO

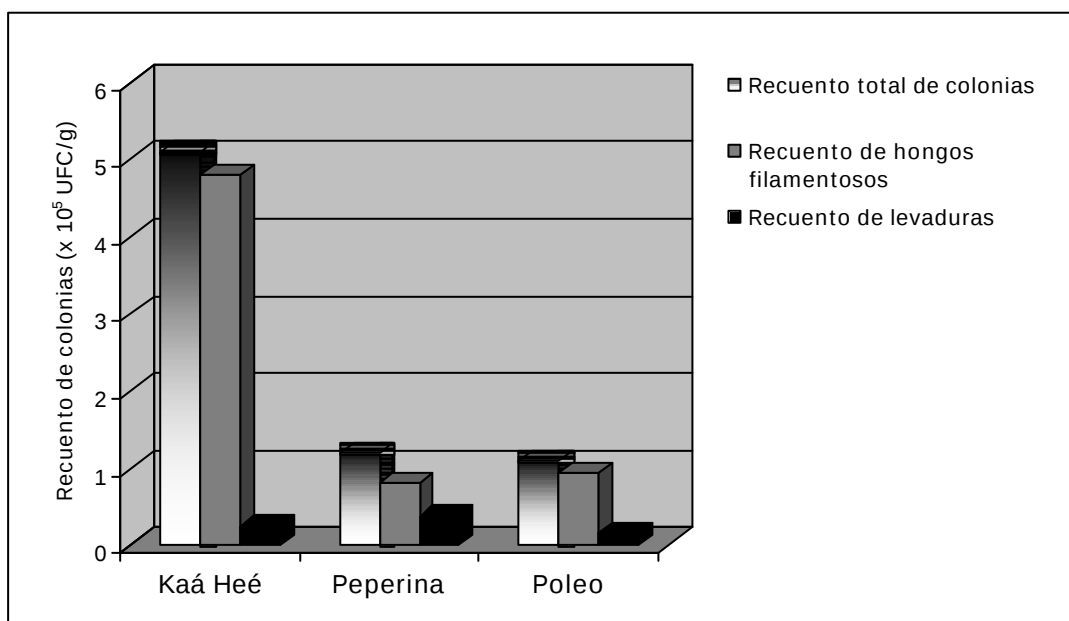


FIGURA 4: Recuento total de colonias, de Hongos filamentosos y de Levaduras

REFERENCIAS

1. PITT, J. I.; HOCKING, A. D., *Fungi and Food Spoilage*. 2° ed. London-Wienheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Blackie Academic & Professional. 1997.
2. PIONTELLI, E. L., *Bases y conceptos para la clasificación de los hongos de importancia Médico-Veterinaria*. En Curso: Criterios taxonómicos básicos para las Disciplinas microbiológicas. Posadas, Misiones: Universidad Nacional de Misiones. 1995.
3. WEBSTER, J., *Introduction to Fungi*. 2° ed. C.U. Press. Vol. 1. Cambridge: University of Cambridge. 1991.
4. KONEMAN, E. W.; ROBERTS, G. D., *Micología Práctica de Laboratorio*. 3° ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A. 1987.
5. VAAMONDE, G.; CABRAL, D., *Micología de Alimentos*. Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires. 1995.
6. LARONE, D. H., *Medically Important Fungi A Guide to Identification*. 2° ed. New York: Elsevier. 1987.
7. CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA. *Guías Prácticas*. En Curso de Micología de Alimentos. Córdoba: Universidad Nacional de Río Cuarto. 1994.
8. BETTUCCI, L.; ROQUEBERT, M. F., Curso sobre Biología e Identificación de hongos contaminantes de Alimentos. Micotoxinas. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. PEDECIBA. 1995.
9. ALEXOPOULUS, C. J., *Introducción a la Micología*. 3° ed. Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1979.
10. KING, D. A. J.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I., *A novel selective medium for the enumeration of yeasts and moulds associated with food spoilage*. J. Appl. Environ. Microbiol. 37: p. 959-964. 1979.
11. MOSSEL, D. A. A.; VISSER, M.; MENERINK, W. H. J., *Media for the selective enumeration of moulds and yeasts*. J. Appl. Bact. 33: p. 454-457. 1962.