



INFORME BREVE

Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico

María L. Castrillo*, Marta A. Horianski y Gladis Jerke

Laboratorio de Microbiología, Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Misiones, Argentina

Recibido el 6 de marzo de 2012; aceptado el 23 de abril de 2013

PALABRAS CLAVE

Frecuencia de aislamiento;
Aspergillus;
Ocratoxina A;
Ilex paraguariensis

KEYWORDS

Isolation frequency;
Aspergillus;
Ochratoxin A;
Ilex paraguariensis

Resumen

Los objetivos del presente trabajo fueron investigar la frecuencia de aislamiento del género *Aspergillus* en yerba mate (*Ilex paraguariensis*) canchada (YMCH) y yerba mate elaborada (YME), determinar la proporción de aislamientos correspondientes a la sección *Nigri* y evaluar su capacidad ocratoxigénica. Se aislaron 328 cepas del género a partir de 20 muestras de YMCH y 1306 cepas de 36 muestras de YME; 279 de las primeras y 1215 del segundo grupo correspondieron a la sección *Nigri*. Para detectar la capacidad ocratoxigénica, las cepas se cultivaron en agar Czapeck extracto de levadura y la toxina se detectó mediante cromatografía en capa delgada, bajo luz UV. Se observó un predominio de especies uniseriadas (*Aspergillus japonicus* var. *japonicus* y *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*) entre las 1494 cepas *Aspergillus* sección *Nigri* obtenidas en total, y ninguna mostró capacidad ocratoxigénica *in vitro*, al menos dentro del límite de detección del método empleado.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Isolation of *Aspergillus* section *Nigri* strains in yerba mate in Posadas (Misiones, Argentina) and evaluation of their ochratoxigenic potential

Abstract

The objectives of the present work were to investigate the isolation frequency of genus *Aspergillus* in canchada yerba mate (YMCH) and elaborated yerba mate (YME) (*Ilex paraguariensis*) and the proportion of section *Nigri* isolates, as well as to determine ochratoxin A production by *Aspergillus* species section *Nigri*. Three hundred twenty eight

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mlc_827@hotmail.com (M.L. Castrillo).

Aspergillus strains from 20 samples of YMCH and 1306 *Aspergillus* strains from 36 samples of YME were isolated; of the total, 279 from the first group of strains and 1215 from the latter group, belonged to section *Nigri*. For the detection of ochratoxin A production, the strains were cultivated on Czapeck yeast extract agar and the toxin was detected by thin layer chromatography under UV light. Uniserate species predominance was observed in the 1494 strains of *Aspergillus* section *Nigri* obtained (*Aspergillus japonicus* var. *japonicus* and *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*), whereas none of the strains analysed showed ochratoxin A production *in vitro* at the detection level of the methodology employed.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La yerba mate, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, es una planta que crece en forma silvestre en el norte de Misiones (Argentina), parte de Brasil y Paraguay, a partir de la cual se obtiene la yerba mate elaborada. Su proceso de elaboración comienza con la cosecha anual de las hojas y ramas finas. Continúa con el zapecado, donde el material cosechado es expuesto a la acción directa de la llama por 20 a 30 segundos, a temperaturas que oscilan entre 400 y 700 °C, y a los gases de combustión durante 2 o 3 minutos. Esto provoca la detención de la actividad enzimática responsable de los procesos biológicos de degradación de los tejidos y, al mismo tiempo, elimina gran parte de la humedad, lo que facilita su posterior secado. En esta etapa de secado el material zapecado es sometido a una corriente de gases de combustión a temperaturas que varían entre 90 y 120 °C, por un período que puede variar de 1 a 24 horas, lo cual reduce aún más su peso y elimina la humedad hasta un nivel residual que garantiza la conservación y posterior obtención de un buen producto. La siguiente etapa es el canchado, la trituración gruesa de las hojas secas de yerba mate, para facilitar su embolsado y estacionamiento. De aquí se obtiene la yerba mate canchada. Posteriormente se realiza el estacionamiento, donde la yerba mate adquiere el sabor, el aroma y el color característicos. Luego de un período de entre 2 y 25 meses de estacionado, la yerba mate canchada es sometida a un proceso de molienda, se obtiene así la yerba mate elaborada¹.

Las principales fuentes de contaminación de la yerba mate son el suelo y el aire. La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos^{2,3}. Los alimentos deshidratados o secados, como la yerba mate, no suelen ser estériles; sin embargo, debido a su baja actividad de agua pueden permanecer estables microbiológicamente durante mucho tiempo, y solo cuando se humedecen podría comenzar la alteración. Si bien los parámetros empleados en la elaboración de yerba mate están estrictamente controlados; los rangos de humedad, temperatura e higiene varían ampliamente. Así, se podrían generar condiciones favorables para la proliferación de hongos, los cuales pueden modificar la calidad bromatológica, microbiológica y comercial del producto. Es por ello que la presencia de hongos en la yerba mate representa un parámetro microbiológico muy importante que sería aconsejable evaluar.

Las micotoxinas son productos del metabolismo secundario de algunas especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Cuando las micotoxinas son ingeridas por animales, incluyendo el hombre,

causan alteraciones biológicas perjudiciales para la salud. Estos metabolitos son químicamente diversos y pueden estar contenidos en el micelio, en el interior de las esporas o ser liberados en el alimento⁴. Se forman a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones subóptimas o de estrés. La cantidad producida depende no solo de los parámetros nutricionales y ambientales, sino también del estadio en que se encuentra el hongo. La formación de las micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica².

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica, inmunosupresora, teratogénica y potencialmente cancerígena producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Ha sido clasificada por la *International Agency for Research in Cancer*⁵ como un posible carcinógeno humano (grupo 2B), debido a la suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales. Es termoestable y soluble en agua, razón por la que podría ser ingerida con el mate o tereré, que son las formas habituales de consumo de la yerba mate. La enfermedad producida por OTA se presenta luego de una ingesta crónica de alimentos o bebidas que contienen concentraciones muy pequeñas de este compuesto.

Desde su descubrimiento, en 1965, la producción de esta micotoxina quedó clásicamente asociada a *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*⁶. No obstante, la frecuencia y distribución habitual de estas especies no permitirían explicar la elevada presencia de OTA en una gran variedad de alimentos destinados al consumo humano y animal. Estudios más nuevos demostraron que aislamientos identificados como *Aspergillus* sección *Nigri* son importantes productores de dicha toxina y forman parte de la biota fúngica de diversos alimentos⁷.

Debido a que los *Aspergillus* negros se consideran fuente de OTA en climas tropicales y subtropicales, a que se han encontrado residuos de OTA en el suero de numerosos individuos, sin poder precisar su origen^{4,8,9}, y a que se ha comunicado que el género *Aspergillus* es el mayor contaminante en muestras de yerba mate¹⁰, actualmente se buscan aislamientos con capacidad de producción de OTA *in vitro* en muestras de yerba mate canchada y yerba mate elaborada.

Los objetivos del presente trabajo fueron investigar la frecuencia de aislamiento del género *Aspergillus* en yerba mate canchada y elaborada, determinar la proporción de aislamientos correspondientes a la sección *Nigri* y evaluar su capacidad ocratoxigénica.

Se evaluaron 20 muestras de yerba mate canchada (YMCH) y 36 muestras de yerba mate elaborada (YME), de

diferentes marcas comerciales, diferentes orígenes de producción y diferentes lotes, obtenidas de comercios céntricos y periféricos de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina. La diferencia en el número de muestras analizadas se debió a la disponibilidad y variedad de las formas de comercialización que se estudiaron: la YMCH, generalmente usada para la preparación de tereré, se obtiene casi exclusivamente a partir de los propios productores y no es posible encontrarla en los comercios; en cambio, la YME es altamente comercializada, de fácil acceso y con gran variedad de producto.

Para realizar los diversos recuentos a partir de las muestras obtenidas desde las góndolas de los comercios de la ciudad, se realizaron diluciones decimales seriadas de cada muestra en agua peptonada estéril, tantas como fueran requeridas de acuerdo al grado de contaminación de las muestras.

Estas diluciones muestrales fueron sembradas en medio de cultivo para hongos y levaduras con cloranfenicol (HyL). Se registró el total de mohos contaminantes y se seleccionaron las cepas con características macro y micromorfológicas correspondientes al género *Aspergillus*, las cuales fueron clasificadas empleando claves taxonómicas^{11,12}. Para ello, cada cepa seleccionada fue sembrada en tres medios de cultivos diferentes: agar Czapeck extracto de levadura (CYA), agar extracto de malta (MEA) y agar Czapeck extracto de levadura con 20 % de sacarosa (CY20S); luego se incubó a diferentes temperaturas.

Se determinó el porcentaje de frecuencia del género *Aspergillus* sobre el total de muestras analizadas (PFGA = N.º de muestras contaminadas con el género *Aspergillus* x 100/N.º total de muestras analizadas) y el porcentaje de frecuencia de *Aspergillus* sección *Nigri* (PFGAN = N.º de muestras contaminadas con *Aspergillus* sección *Nigri* x 100/N.º total de muestras analizadas). Teniendo en cuenta el total de cepas aisladas también se determinó la frecuencia relativa porcentual del género *Aspergillus* (FRPA = N.º de cepas del género *Aspergillus* x 100/N.º total de cepas contaminantes) y la frecuencia relativa porcentual de *Aspergillus* sección *Nigri* (FRPAN = N.º de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* x 100/N.º total de cepas de *Aspergillus* contaminantes).

Para detectar la producción de OTA *in vitro*, cada cepa se cultivó en CYA y se incubó en oscuridad a 25 °C durante 7 días. Se efectuó la extracción de todo el medio de cultivo con cloroformo en agitación a 250 r.p.m. durante 90 minutos. El extracto se filtró, se evaporó en estufa a 50 °C y se resuspendió en 1 ml de cloroformo:éter:ácido acético 17:3:1. Se sembró en una placa cromatográfica de sílica gel 60: a) 10 µl del extracto de cada cepa analizada, b) 10 µl de la cepa patrón (*A. carbonarius* JFPE 1546), y c) 2, 4 y 6 µl del estándar de ocratoxina A (SIGMA 01877 - 1 mg, rotulado como *Ochratoxin A from Aspergillus ochraceus*). Se utilizó como solvente de corrida cloroformo:éter:ácido acético 17:3:1. La OTA fue identificada bajo luz UV a 366 nm como una mancha fluorescente verde azulada con la misma movilidad del estándar de OTA. Como confirmación, las manchas se expusieron a vapores de amoníaco, ya que en presencia de OTA la fluorescencia verde azulada vira a azul brillante. Límite de detección: 0,2 ppm¹³.

En las muestras de YMCH, la frecuencia del género *Aspergillus* (PFGA) fue del 80 % y la frecuencia de *Aspergillus*

sección *Nigri* (PFGAN) del 70 %. De las 20 muestras de YMCH estudiadas se aisló un total de 453 cepas de mohos contaminantes, de las cuales 328 pertenecieron al género *Aspergillus*, con un valor FRPA de 72 %. Dentro del género *Aspergillus* se observó que 85,2 % correspondieron a cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* (valor FRPAN); 6,2 % a cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y 8,6 % a las demás cepas del género, como *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus ustus*, entre otros.

En las muestras de YME, el PFGA fue de 81 % y el PFGAN de 75 %. De las 36 muestras estudiadas se aisló un total de 1559 cepas de mohos contaminantes, de las cuales 1306 pertenecieron al género *Aspergillus*, el valor FRPA fue de 84 %. Dentro del género *Aspergillus* se observó que 93 % correspondieron a cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* (valor FRPAN), 1 % a cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, y 6 % a las demás cepas del género, como *A. fumigatus* y *A. ustus*, entre otros.

El número de géneros fúngicos diferentes obtenidos fue mayor en la yerba mate tradicional (elaborada) y menor en la yerba mate canchada, lo que podría relacionarse con los pasos sucesivos del proceso de elaboración del producto. Como ya fue explicado, la yerba mate canchada se obtiene en uno de los primeros pasos de elaboración y la tradicional después de esta, por lo que se podría inferir que el aumento en el número de diferentes géneros fúngicos colonizadores iría relacionado con el agregado de una etapa más de procesado. Asimismo, se ha reportado que en estudios realizados con yerba mate compuesta la carga fúngica fue mayor que la obtenida en esta investigación, lo que apoyaría esta inferencia³.

En ambas formas comerciales el género *Aspergillus* fue representado ampliamente por cepas pertenecientes a la sección *Nigri*; se aisló un total de 1494 cepas: 279 de muestras de YMCH y 1215 de YME.

Las cepas *Aspergillus* sección *Nigri* fueron identificadas a nivel de especie y se observó la siguiente distribución en YMCH: 192 *Aspergillus japonicus* var. *japonicus* (69 %), 59 *A. japonicus* var. *aculeatus* (21 %), 20 *Aspergillus niger* var. *niger* (7 %), 4 *Aspergillus carbonarius* (1,5 %) y 4 *A. niger* var. *awamori* (1,5 %). En YME se caracterizaron 389 *A. japonicus* var. *aculeatus* (32 %), 328 *A. japonicus* var. *japonicus* (27 %), 194 *Aspergillus foetidus* (16 %), 109 *A. niger* var. *niger* (9 %), 109 *A. carbonarius* (9 %) y 85 *A. niger* var. *awamori* (7 %).

Para la detección de la capacidad de producción de OTA *in vitro*, se trabajó con todas las cepas aisladas de *Aspergillus* sección *Nigri* y con una cepa patrón con conocida capacidad de producción de OTA (*A. carbonarius* JFPE 1546). De las 1494 cepas estudiadas considerando ambas formas comerciales, ninguna presentó capacidad de producción de OTA *in vitro* dentro de la restricción que impone el límite de detección del método empleado.

En estudios micológicos previos, en diversas formas comerciales de yerba mate y en sustratos similares, como el té negro, se ha observado una gran frecuencia de los géneros micotoxigénicos *Aspergillus* y *Penicillium*^{3,10}, los que han mostrado capacidad de biosintetizar aflatoxinas *in vitro*¹⁰. Asimismo, en muestras de yerba mate compuesta con agregado de hierbas sávido-aromáticas, hemos obtenido cepas con capacidad de producción de OTA positiva empleando el mismo método de detección que en este estu-

dio³, lo que da cuenta de su sensibilidad. Consideramos que el citado método es eficiente, económico y rápido en la detección de producción de OTA *in vitro* a partir de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*.

En el presente estudio se ha confirmado la presencia de uno de los principales géneros micotoxigénicos, *Aspergillus*, en ambas formas comerciales. Los resultados obtenidos muestran una gran frecuencia de *Aspergillus* y un importante porcentaje de cepas pertenecientes a la sección *Nigri*. Esto concuerda con lo referido en la bibliografía existente^{7,10,12}, donde se cita que los integrantes de dicha sección son ubicuos y especialmente abundantes en zonas tropicales y subtropicales, y que poseen la capacidad de crecer en una gran variedad de sustratos como semillas, granos, forrajes, verduras y piensos, entre otros, por lo que se los considera como hongos responsables del deterioro de los alimentos.

Desde la primera descripción de la capacidad productora de OTA por *A. niger* var. *niger*, en 1994¹⁴, se ha publicado un importante número de trabajos de investigación sobre la capacidad ocratoxigénica de las especies incluidas en la sección *Nigri*^{7,15}. En este estudio no se han encontrado cepas ocratoxigénicas en ninguna de las dos formas comerciales analizadas, por lo que se concluye que el hallazgo de hongos toxigénicos en un sustrato no implica necesariamente la presencia de micotoxinas.

La producción de micotoxinas depende no solo del genotipo de la cepa, sino también de toda una serie de factores ambientales que van a ejercer su influencia en el crecimiento y metabolismo de la cepa. Pero, indudablemente, su presencia en el sustrato debe ser motivo de alerta ya que representa un peligro potencial. Por tanto, es muy importante conocer la distribución de los hongos capaces de elaborarlas y las circunstancias que inciden en su capacidad toxigénica^{3,7}.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ. Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* sp. *J Food Prot.* 2001;64:903-6.
2. Adams MR, Moss MO, editores. Microbiología de los alimentos. T.R.S.O. Chemistry. Zaragoza, ACRIBIA SA, 1997, p. 478.
3. Castrillo ML. Caracterización morfológica y confirmación molecular de *Aspergillus* sección *Nigri* aislados de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Tesis de Grado 2010. Universidad Nacional de Misiones.
4. De Bernardi LA, Prat Krikun SD. 2001. Cadena alimentaria de la yerba mate. Diagnóstico de la región yerbatera. [On-line] <http://www.biomanantial.com/yerba-mate-argentina-a-905-es.html>. Consultado en diciembre 2011.
5. Esteban A, Abarca ML, Bragulat MR, Cabañes FJ. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Res Microbiol.* 2004;155:861-6.
6. Esteban F. *Aspergillus* sección *Nigri*, estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxigénicas. Tesis Doctoral 2005. Universidad Autónoma de Barcelona.
7. Filtenborg O, Frisvad JC. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensm Wiss Technol.* 1980;13:128-30.
8. Hesseltine CW, Vandegrift EE, Fennell DI, Smith MI, Shotwell OL. Aspergilli as ochratoxin producers. *Mycologia* 1972;64:539-50.
9. IARC, International Agency for Research on Cancer. 2006. [On-line] <http://www.iarc.fr> Consultado en noviembre 2011.
10. Jerke G, Horiński MA, Salvatierra KA. Evaluación de géneros micotoxigénicos en yerba mate elaborada. *Rev Ciencia Tecnol. UNAM* 2010; 12a:41-5.
11. Klich MA, editor. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, p. 510.
12. Mantle PG. Risk assessment and the importance of ochratoxins. *Int Biodeterior Biodegradation* 2002;50:143-6.
13. Peraica M, Radie B, Lucie A, Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull WHO* 1999;77:754-66.
14. Petzinger E, Weidenbach A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livest Prod Sci.* 2002;76:245-50.
15. Pitt JI, Hocking AD, editors. Fungi and food spoilage. London, Blackie Academic and Professional, 1997, p. 524.