

RECYT

Año 19 / Nº 27 / 2017 / 51–57

## Estudio de la flora microbiana de la yerba mate durante las etapas de su elaboración

### Study of the microbial flora of the yerba mate during the production stages

### Estudo de flora microbiana do mate durante a sua fases de desenvolvimento

Luis A. Cañete<sup>1,\*</sup>, Beatriz del V. Argüello<sup>2</sup>, Amada B. Pucciarelli Román<sup>2</sup>

1- Instituto Nacional de Alimentos (INAL), Posadas, Misiones. 2- Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.

\* E-mail: alcanete@ciudad.com.ar

#### Resumen

El procesamiento, expendio y exportación de la yerba mate representa una importante actividad en la economía de la provincia de Misiones. El objetivo de esta investigación fue conocer la variación de la flora microbiana de la yerba mate y su evolución en las distintas etapas de elaboración. Se evaluó el perfil bacteriológico y micológico durante un periodo de 18 meses, de 72 muestras, desde la cosecha hasta la obtención de la yerba canchada y 48 muestras de yerba mate canchada estacionada, con 9-12 meses de almacenamiento. Los recuentos microbiológicos presentaron valores máximos elevados en la materia prima; Bacterias Aerobias Mesofilas:  $7 \times 10^6$  UFC/g; Bacterias Aerobias Termófilas  $1 \times 10^2$  UFC/g; Coliformes Totales:  $1,1 \times 10^5$  NMP/g; Coliformes termotolerantes:  $1,5 \times 10^4$  NMP/g; *Escherichia coli* (Ec): presencia en 72%; *Anaerobios Sulfitos* Reductores Mesofilos y Termófilos (ASRM y ARST) presencia en 65%; Hongos y Levaduras (HyL):  $8 \times 10^6$  UFC/g; cayendo los recuentos considerablemente luego del zapecado y secado, manteniéndose valores bajos en el producto canchado y estacionado, con excepción del recuento de HyL. No se detectó presencia de Ec, ASRM y ASRT en las últimas etapas del proceso. Por lo tanto, se sugiere considerar los valores de recuentos obtenidos en las etapas de Canchado y Estacionamiento; como valores de referencia en la Reglamentación del Código Alimentario Argentino, que regule la calidad higiénico-sanitaria de la yerba mate envasada, desde el punto de vista microbiológico; y evitar la contaminación durante el envasado.

Palabras clave: Yerba mate; Flora micótica; Flora bacteriana; Etapas del procesamiento.

#### Abstract

Processing, selling and exporting yerba mate represent an important activity in the economy of the province of Misiones. The objective of this research was to determine the variation of the microbial flora of yerba mate; and its evolution in different stages of development. The bacteriological and mycological profile was evaluated over a period of 18 months from 72 samples in the different processing stages, from harvest to the toasted green tea, and 48 samples of yerba mate stationed with 9-12 months of storage. Microbiological counts showed the higher values in raw material, Mesophilic aerobic bacteria:  $7 \times 10^6$  UFC / g; Coliforms:  $1.1 \times 10^5$  NMP / g; Thermotolerant coliforms:  $1.5 \times 10^4$  NMP / g; *Escherichia coli* (Ec): 72% presence; Mesophilic and Thermophilic Sulfites Anaerobes Reducers (ASRM; ASRT) presence in 65%; Yeasts and molds (HyL):  $8 \times 10^6$  UFC / g. Counts fell considerably after zapecado and drying, keeping low values in the *canchado* and drying, except HyL count. No presence of Ec, ASRM and ASRT was detected in the later stages of the process. Therefore, it is suggested to consider the values of counts obtained in the stages of *Canchado* and *Estacionamiento*; as reference values in the Regulation of the Argentine Food Code, which regulates the hygienic-sanitary quality of packaged yerba mate from the microbiological point of view; and avoid contamination during the packaging.

Keywords: Yerba mate; Mycotic flora; Bacterial flora; Processing stages.

#### Resumo

O processamento, venda e exportação da erva-mate é uma atividade importante na economia do estado de Misiones, Argentina. O objetivo desta pesquisa foi determinar a variação da flora microbiana de erva-mate; a sua evolução em vários estágios de produção. O perfil bacteriológico e micológico foi avaliada durante um período de 18 meses, de 72 amostras, desde a colheita até obter o chá verde torrado e 48 amostras de erva-mate

estacionado, com 9-12 meses de armazenamento. Contagens microbiológicas mostrou picos elevados na matéria-prima; bactérias mesófilas aeróbias:  $7 \times 10^6$  UFC / g; Coliformes:  $1,1 \times 10^5$  NMP / g; coliformes termotolerantes:  $1,5 \times 10^4$  NMP / g; *Escherichia coli* (Ec): presença de 72%; Sulfitos Mesófilos e Termofilos Anaeróbios Redutores de presença (ASRM e ASRT) em 65%; Leveduras e bolores (HyL):  $8 \times 10^6$  UFC / g; Contagens cair significativamente após zapecado e secagem, e manter valores baixos em canchado e produtos estacionado, exceto contagem de HyL. Sem presença de Ec, ASRM e ASRT foi detectado nas fases posteriores do processo. Portanto, sugere-se a considerar os valores das contagens obtidas nas etapas de Canchado e estacionamento; evitando a contaminação durante a embalagem; como valores de referência no Regulamento do Código Alimentar Argentino, que regem a qualidade higiênico-sanitária de erva-mate embalados, a partir do ponto de vista microbiológico.

Palavras-chave: Erva-mate; Flora Fúngica; Microbiota; Etapas de Processamento.

## Introducción

La yerba mate, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire (familia de las Aquifoliáceas), es un árbol de hojas persistentes, oblongas, dentadas, inermes, de 5-7 cm de largo, cortamente peciolada (1). Las características y condiciones agroecológicas para el cultivo y desarrollo de la *Ilex paraguariensis*, sólo se dan en Argentina, que es el mayor productor (62%), luego, le siguen Brasil (34%) y Paraguay (4%).

En Argentina el cultivo se concentra en las provincias de Misiones (85%) y Corrientes (15%); en Brasil en los Estados que rodean a la provincia de Misiones, Río Grande do Sul Paraná y Santa Catarina; y en Paraguay, los Departamentos de Itapúa y Alto Paraná del Paraguay, también limítrofes con Misiones.

La producción promedio de los tres países es de unas 500.000 Tn/año, de las cuales el 90% se consume internamente y el resto se exporta a otros países, principalmente a Medio Oriente [2]. La forma de consumo de la yerba mate más ampliamente difundida es como infusión, ya sea como mate caliente, mate frío (o tereré) y en tazas (mate cocido o en saquitos). Otras formas de consumo que alcanzan al 1% del total, son consumo como yerba mate soluble en forma sólida o instantánea, como base o como ingrediente en la elaboración de bebidas refrigerantes, carbonatadas y licores, y para elaborar helados y alfajores y otros productos culinarios [3], farmacéuticos [4], perfumerías [5], también como materia prima para la extracción de cafeína y clorofila [6]. Además, las infusiones de yerba mate constituyen una fuente importante de antioxidantes, bajo la forma de polifenoles totales, los cuales retrasan el envejecimiento celular y son fundamentales para la prevención de determinadas enfermedades [7].

La elaboración de la yerba mate comprende 5 (cinco) etapas: 1) Zapecado; 2) Secado; 3) Molienda Gruesa o Canchado; 4) Estacionamiento y 5) Molienda fina, tipificación y envasado. Las tres primeras etapas se llevan a cabo en establecimientos denominados “secaderos” y la quinta etapa en establecimientos industriales denominados “molinos”. Las ramas de yerba mate cosechadas manualmente, son transportadas en camiones, y descargadas en la playa de recepción de materia prima. El zapecado es

un proceso en el que las ramas de yerba mate se ponen en contacto con altas temperaturas, entre 400 a 700° C, durante 20-30s, continuando el contacto con gases de combustión durante 2-3 min, para producir la inactivación de las enzimas, evitar el pardeamiento en la etapa de secado y reducir el contenido de humedad en las hojas. Con el proceso de secado se logra reducir la humedad hasta el 2% o el 4%, después de estar en contacto con gases de combustión de leña a temperaturas y tiempos variables, entre 90 y 120° C durante 30 min a 24h, según el establecimiento. El canchado es la molienda gruesa de las ramas de yerba mate que salen del secadero y prepara al material para la etapa de estacionamiento, reduciendo su volumen y aumentando la superficie de contacto entre el material y el aire. En esta etapa se obtiene la conocida yerba canchada que, con o sin agregado de saborizantes o hierbas medicinales, se utiliza para tomar el mate frío o tereré. El estacionamiento es una operación en la que se mantiene durante cierto tiempo, que es variable de 6 a 24 meses dependiendo del establecimiento industrial; donde la yerba mate en bolsas, se apilan en galpones con ambiente controlado, para que adquiera las características de sabor y color requeridas por los consumidores. Puede ser natural o acelerado [8, 9]. El estacionamiento natural, se lleva a cabo en depósitos durante varios meses. El “estacionamiento acelerado” se lleva a cabo en cámaras acondicionadas durante un período de hasta 60 días, con temperatura controlada (50- 60° C) y la humedad relativa hasta el 60%, con buena circulación de aire. En general, los molinos procesan yerba mate proveniente de diferentes secaderos, ya sean propios o de otras empresas.

Si bien en las primeras etapas las altas temperaturas hacen que disminuya la carga microbiana existente en el momento de la cosecha [1], no garantizan con total seguridad que, en las etapas posteriores del proceso, el producto presente distintos microorganismos provenientes del suelo y del aire, que puedan llegar a alterar la calidad final del mismo [10, 11].

Existen muy pocos antecedentes de estudios realizados en las etapas de elaboración industrial de la yerba mate, en especial a su calidad bacteriológica, habiendo más trabajos realizados sobre su calidad micológica y sobre la capacidad de algunas especies de hongos productores de micotoxinas

[12]. Ya en 1908, Carlos Spegazzini (13), identifica 72 especies de hongos sobre *Ilex paraguariensis*, la mayoría de la Clase Ascomycetes en hojas verdes de yerba mate; además, también se encontraron hongos de las Clases Zygomycetes y Deuteromycetes [12].

La yerba mate, como producto alimenticio, debe cumplir con ciertas normas de calidad y mantener sus cualidades organolépticas y microbiológicas inalterables en el producto final. Asimismo, la yerba mate debe cumplir con las normativas vigentes en el Código Alimentario Argentino (CAA), con respecto a los parámetros físico-químicos; además de las normas de Higiene y Seguridad de los establecimientos industriales, rotulado, tipos de envase y estampillado; y en Argentina, con la norma IRAM 20517:2007 que establece los métodos y el perfil microbiológico para el control de calidad microbiológica de yerba mate elaborada y yerba mate canchada (Instituto Nacional de la Yerba Mate -INYM-, Instituto de Racionalización de Materiales de la República Argentina -IRAM [14, 15].

El objetivo de esta investigación fue conocer la variación de la flora microbiana de la yerba mate; cómo evoluciona y si su presencia puede incidir en la calidad final del producto. Para ello se procedió a estudiarla en los siguientes niveles: 1) Fases iniciales de la elaboración desde la cosecha (planchada) hasta la obtención de la yerba canchada y 2) durante el período de estacionamiento.

## Materiales y Métodos

Se analizaron 72 muestras en las fases iniciales del proceso, planchada (hojas verdes), zapecado, secado (cinta 1 y cinta 2) y canchado. Para la segunda etapa, se analizaron 48 muestras de yerba mate canchada estacionada, con un período de almacenamiento de 9 a 12 meses. En ambas etapas los análisis fueron realizados mensualmente.

Las muestras fueron tomadas de las líneas del proceso, en distintos puntos (muestreo al azar) y fueron almacenadas en bolsas de polietileno estériles, en una cantidad aproximada de 2-3 kg y se procesaron en el laboratorio dentro de las 24-48 horas, siendo conservadas previamente en lugares adecuados, para evitar posibles contaminaciones externas [16].

El perfil microbiológico se realizó mediante la cuantificación de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) y Bacterias Aerobias Termófilas (BAT), Coliformes Totales (CT), Coliformes Fecales (CF), Anaerobios Sulfito Reductores Mesófilos (ASRM) y Anaerobios Sulfito Reductores Termófilos (ASRT), detección de *Escherichia coli* (EC) y Hongos y Levaduras (HyL).

En el laboratorio se extrajo una unidad analítica de las muestras (previa homogeneización de las mismas en forma manual), utilizando 25 g de yerba mate en 225 mL de agua peptonada al 0,1% (dilución madre). Después de una correcta homogeneización, (2 a 3 min), y diluciones seriadas de la misma, se procedió a realizar las determinaciones mi-

crobiológicas bajo las Normas Internacionales [15, 16, 17]. Para el Recuento de BAM, se utilizó el Método de Recuento en Placas, con Agar glucosa-peptona de caseína (triptona), colocando alícuotas de 1 mL de las diluciones seriadas en placas estériles, agregando luego el agar atemperado a 46° C, homogenizando en forma rotatoria, una vez solidificado el agar, se incubaron a 30-32° C, durante 24-48 h. Para el Recuento de BAT, se utilizó el mismo método y agar, incubando las placas a 55-60° C, durante 24-48 h [17].

Para el Recuento CT se utilizó la Técnica del Número Más Probable empleando una serie de 3 (tres) tubos de ensayo por dilución, con caldo Mac Conkey, inoculando alícuotas de 1 mL de las diluciones en cada tubo, que se incubaron a 35-37° C, durante 24-48 h [17]. El Recuento de CF se realizó a partir de los tubos con producción de gas y acidez para bacterias coliformes totales; se transfirieron inóculos, mediante un ansa, a tubos conteniendo caldo lactosa bilis (2%) verde brillante, incubando a 44° C  $\pm$  0,1°C durante 24-48 h (15,17). El análisis de *Escherichia coli* 1g (EC), se realizó tomando 10 mL de la dilución madre, que se transfirió a un tubo con campanita Durham, con caldo lactosa bilis (2%) verde brillante, concentración doble, las cuales se incubaron durante 24-48 h a 35-37° C. De los tubos que presentaron fermentación, que se evidencia por formación de gas, se repicó a otro tubo con caldo EC, medio para el desarrollo de *Escherichia coli*, simple concentración, incubando durante 24-48 h a 44-45° C. A partir de estos tubos con fermentación por producción de gas, se realizó la identificación de *Escherichia coli*, sembrando por aislamiento en agar eosina-azul de metileno (EMB), incubando durante 24 h a 37° C. Las colonias características de *E. coli* se confirmaron con las pruebas bioquímicas de identificación del IMVIC (Indol-Rojo de metilo-Voges-Proskauer-Citrato) [15, 17].

El análisis de *Anaerobios Sulfitos* Reductores mesófilos y termófilos/ 1g, se realizó tomando de la dilución madre 10 mL, que se colocaron y mezclaron en tubos con el medio de cultivo agar sulfito-hierro (base) y solución de sulfato ferroso al 7% (20 mL/L del medio), fundido y templado a una temperatura de 50-60° C. Para crear las condiciones de anaerobiosis, se agregó una capa de vaselina o parafina líquida estéril, sobre la mezcla y se sumergieron en baño maría a 70-80° C durante 15 a 20 min con el objetivo de eliminar las células vegetativas y activar el metabolismo de los esporos. Luego, se incubaron a 35-37° C, para los mesófilos y 55-60° C para los termófilos, durante 3 a 5 días. A los tubos considerados positivos (+) (los Clostridios crecen como colonias negras), se les realizó la prueba de la catalasa [17].

Para el Recuento de HyL, se utilizó el Método de Recuento en Placas, inoculando alícuotas de 0,1 mL en cajas de Petri conteniendo Agar extracto de levadura-glucosa (OGY), con antibióticos: Gentamicina (Sn 0,5% p/v) - Oxitetraciclina (Sn 0,1% p/v) - Cloranfenicol (Sn 0,5% p/v), previamente secadas; distribuyendo el inóculo sobre

toda la superficie, con la ayuda de la espátula de Drigalsky, incubando a 25° C durante 5 días [15].

Los recuentos en placas se expresaron en UFC/g y el análisis por fermentación en tubos en NMP/g; todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para el análisis estadístico de la influencia de los diversos factores y su posible interacción y contrastes múltiples, se utilizó el Análisis de varianza de más de un factor a través del paquete estadístico del programa Statgraphics Plus 5.1. Statpoint Technologies. Inc. Warrenton VA.USA.

También se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene para determinar normalidad y homogeneidad de los datos, respectivamente. Como los datos no fueron ni normales ni homogéneos, aun después de transformarlos, se realizaron análisis no paramétricos de Kruskal-Wallis para ver el efecto de las diferentes etapas del proceso. Los análisis se realizaron en el programa R studio.

**Resultados y Discusión**

Las Tablas 1 a 3 muestran los resultados obtenidos luego del análisis de los microorganismos para la materia prima en todas las etapas, donde figuran el menor y mayor valor para cada una de las determinaciones en cada etapa del proceso, cuyos valores no variaron significativamente.

**Tabla1:** Recuentos de Bacterias Aerobias Mesófilas y Bacterias Aerobias Termófilas en las distintas etapas de elaboración de yerba mate

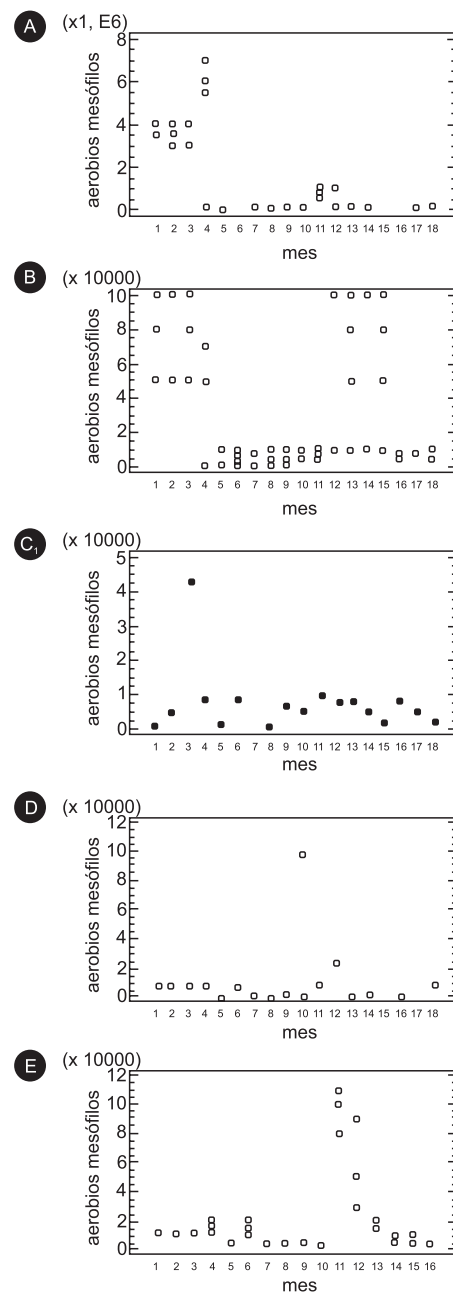
		Planchada	Zapecado	Secado C1	Secado C2	Canchada	Estacionamiento
BAM UFC/g	Max	7x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>
	Min	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	8x10 <sup>1</sup>	9x10 <sup>1</sup>	3x10 <sup>2</sup>
	Promedio	1x10 <sup>6c</sup>	3x10 <sup>4c</sup>	6x10 <sup>3b</sup>	3x10 <sup>3ab</sup>	9x10 <sup>2a</sup>	1,8x10 <sup>3b</sup>
BAT UFC/g	Max	1x10 <sup>2</sup>	10	10	10	10	1x10 <sup>2</sup>
	Min	0	<1	<1	<1	<1	10
	Promedio	1x10 <sup>2a</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>

BAM: Bacterias Aerobias Mesofilas; BAT: Bacterias Aerobias Termófilas; UFC/g: Unidad Formadora de Colonia por gramo. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05)

Los Recuentos de BAM y BAT, son un índice del número total de bacterias en el producto y se toma su cuantificación como parámetro para la evaluación de la contaminación bacteriana [17]. En la primera etapa, el producto presentó una contaminación bacteriana inicial, en promedio de BAM de 1x10<sup>6</sup> UFC/g y de BAT de 1x10<sup>2</sup> UFC/g (Tabla 1). Como se observa, la variación en el desarrollo de las bacterias aerobias mesófilas fue mucho mayor y significativa respecto al desarrollo de las bacterias aerobias termófilas. En ambos grupos de bacterias se observó en la placa de Petri, desarrollo de *Bacillus spp*; cuyo hábitat es el suelo, además de ser microorganismos aerobios esporulados, pero el recuento de los mismos no superaron los límites de riesgos para causar alguna enfermedad [11].

En la Figura 1, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de aerobios mesófilos

de un nivel de mes a otro, para un nivel de confianza del 95%, siendo el p-valor del Test F<0,05, para las distintas etapas de elaboración. En Planchada (A), hay dos grupos homogéneos perfectamente diferenciados, con mayor concentración de microorganismos en los primeros meses, debido probablemente a diversos factores, como condiciones climáticas o de toma de muestra, con una mayor carga inicial. En la etapa del Zapecado (B), se observa una distribución heterogénea en cuanto al desarrollo de las bacterias aerobias mesófilas, probablemente debido a que en esta etapa la distribución de la muestra no es uniforme dentro del zapecador, y por consiguiente no toda la materia prima recibe la misma temperatura, pudiendo quedar parte de la yerba con cantidades residuales de microorganismos.



**Figura 1:** Análisis de Varianza para Bacterias Aerobias Mesófilas en distintas etapas de elaboración: Dispersión de los datos por nivel del factor mes. x: meses; y: Recuentos en UFC/g. A: Planchada; B: Zapecado; C1: Secado1; D: Canchado; E: Estacionamiento.

Durante el Secado (cintas 1 y 2) (C1), se observa una distribución más homogénea que en la etapa anterior, porque la muestra va perdiendo humedad [11], ya que tiene mayor superficie de contacto en las cintas y también más tiempo de exposición al calor. Se tomaron muestras de dos cintas por encontrarse las mismas, generalmente en lugares físicos diferentes.

En la etapa de Canchado (D) se observó, también una distribución más homogénea en el desarrollo de las bacterias, debido a que el tratamiento se vuelve cada vez más eficaz, ya que el proceso grosero de trituración implica una mayor transferencia de calor a la muestra, impidiendo de esa manera el desarrollo de los microorganismos.

En la etapa de Estacionamiento (E), hay un desarrollo heterogéneo de los microorganismos, y un incremento en el recuento (Tabla 1), que podría deberse al modo en que este proceso se realiza, ya que puede ser influenciado por distintos factores, como la forma de acondicionamiento de las bolsas en el depósito o la humedad relativa del ambiente [1].

De acuerdo al análisis de recuento, de Anova (p-valor del Test  $F < 0,05$ , para las distintas etapas de elaboración) y Contraste múltiple de Rangos /Dispersión de los datos por nivel del factor mes, para aerobios mesófilos según los meses, se observó una disminución paulatina del recuento bacteriano en las etapas de Zapecado y más notorio en el Secado cinta 1 y cinta 2, Canchado y Estacionado con respecto al de las hojas verdes o Planchada (Tabla 1).

Con respecto a Bacterias Coliformes Totales (CT) y Bacterias Coliformes Fecales (CF), también se observaron variaciones en los recuentos en las distintas etapas, según la Tabla 2. Comparando los valores obtenidos de CT en la Planchada, con un valor promedio de  $9 \times 10^4$  NMP/g, con las otras etapas del proceso, se observó que la caída en la etapa del Zapecado, fue de un orden de magnitud, con un valor promedio de  $6 \times 10^3$  NMP/g, siendo más notoria la disminución en las etapas de Secado, cinta 1, con un valor promedio de  $3 \times 10^2$  NMP/g y cinta 2 con un promedio de  $8 \times 10^1$  NMP/g; en la de Canchado, con  $4 \times 10^1$  NMP/g y en el Estacionamiento con  $3,4 \times 10^1$  NMP/g.

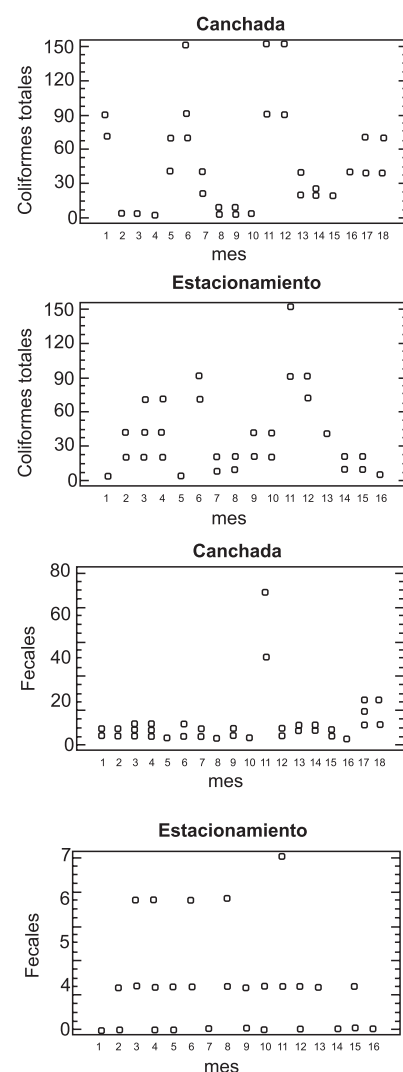
**Tabla 2:** Variación de Coliformes Totales y Coliformes Fecales en las Distintas Etapas de Elaboración de Yerba Mate

		Planchada	Zapecado	Secado C1	Secado C2	Canchada	Estacionamiento
CT NMP/g	Max	$1,1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
	Min	7	4	4	7	< 3	< 3
	Promedio	$9 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$6 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$3 \times 10^2$ <sup>c</sup>	$8 \times 10^1$ <sup>a,c</sup>	$4 \times 10^1$ <sup>a</sup>	$3,4 \times 10^1$ <sup>a</sup>
CF NMP/g	Max	$1,5 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	90	90	$7 \times 10^1$	7
	Min	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Promedio	$1,5 \times 10^4$ <sup>b</sup>	$1,3 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$3 \times 10^1$ <sup>c</sup>	$2,1 \times 10^1$ <sup>a,c</sup>	$9$ <sup>a</sup>	$4$ <sup>a</sup>

CT: Coliformes Totales; CF: Coliformes Fecales; NMP/g: Número Más Probable por gramo. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Con respecto a las Bacterias Coliformes Fecales (CF) con un valor promedio de  $1,5 \times 10^4$  NMP/g en la Planchada (Tabla 2), en el Zapecado se observó una disminución de

la carga bacteriana con un valor promedio de  $1,3 \times 10^3$  NMP/g. Igual que para el recuento de CT, aquí también se observó una disminución más notoria en el desarrollo microbiano en las etapas posteriores, Secado, Canchado y Estacionamiento. Estas variaciones en el recuento bacteriano de los CT y CF, podría ser causada por la presencia de calor en las distintas etapas, que hace disminuir notablemente el número de microorganismos [18]. Sin embargo, el resultado en los gráficos con diferencias estadísticamente significativas de las bacterias, de un nivel de mes a otro, para un nivel de confianza del 95%, muestran una distribución más heterogénea sólo en las etapas de Canchada y Estacionamiento tanto para CT y CF según Figura 2., encontrando una distribución más homogénea en las demás etapas de Planchado, Zapecado y Secado.



**Figura 2:** Análisis de Varianza/Dispersión de los datos por nivel del factor mes para Coliformes Totales y Coliformes Fecales en las etapas de Canchada y Estacionamiento x: meses; y: Recuentos en UFC/g.

En cuanto a la presencia de *Escherichia coli*, se detectó en el 78% de las muestras analizadas en la etapa de Planchada (Tabla 3), un 35% en el Zapecado y ausencia total en las otras etapas, es decir, en el Secado cinta 1 y cinta 2, Canchado y Estacionamiento.

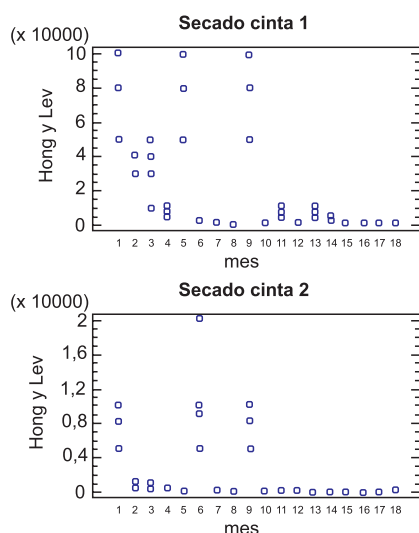
**Tabla 3:** Variación de *Escherichia coli*, Aerobios Sulfito Reductores Mesófilos; Aerobios Sulfitos Reductores Termófilos, Hongos y Levaduras en Etapas de Elaboración de Yerba Mate

	Planchada	Zapecado	Secado C1	Secado C2	Canchada	Estaciona Mientos	
<i>Escherichia coli</i>	P=72%	P=35%	P=0%	P=0%	P=0%	P=0%	
ASRM y ASRT	P= 65%	P=0%	P=0%	P=0%	P=0%	P=0%	
H y L UFC/g	Max	8x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>
	Min	5x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	8x10 <sup>1</sup>	3x10 <sup>2</sup>
	Promedio	2,9x10 <sup>5</sup> c	1,6x10 <sup>4</sup> d	1,9x10 <sup>4</sup> b	1,7x10 <sup>4</sup> <sub>a,b</sub>	2,6x10 <sup>4</sup> a	1,8x10 <sup>4</sup> b

P: Presencia; ASRM: Anaerobio Sulfito Reductor Mesófilos; ASRT: Anaerobio Sulfito Reductor Termófilo; H y L: Hongos y Levaduras. UFC/g: Unidad Formadora de Colonia por gramo. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Con respecto a los *anaerobios sulfitos* reductores, tanto mesófilos como termófilos, se detectó presencia de los mismos únicamente en la etapa de Planchada, en un 65% de las muestras analizadas, siendo nulo el crecimiento en las otras fases del proceso. Por lo tanto, estos microorganismos como la *E. coli* y los *Anaerobios Sulfitos* Reductores Mesófilos y Termófilos están presentes solo en las etapas iniciales de elaboración, y no influirían en la calidad final del producto.

Comparando el recuento de Hongos y Levaduras de la etapa de Planchada (Tabla 3), con un valor promedio de 2,9x10<sup>5</sup> UFC/g, con los valores de las otras etapas, se observó una disminución menos importante en el número de microorganismos que en el recuento de bacterias aerobias. La disminución fue del orden de magnitud inferior de 1 (uno) en todas las etapas. Se observa que la presencia de calor en las distintas etapas, influyó poco en la caída del número de Hongos y Levaduras, y en la etapa del Estacionamiento influyen factores como estado de conservación, condiciones ambientales en el depósito durante el estacionamiento [11]. Por lo tanto se debería tener más control higiénico- sanitario en los depósitos de estacionamiento para evitar una re contaminación con la yerba antes de ser empaquetada [19, 20]. Con respecto



**Figura 3:** Análisis de Varianza/ Dispersión de los datos por nivel del factor mes para Hongos y Levaduras en la etapa de Secado, Cinta 1 y 2. x: meses; y: Recuentos en UFC/g.

a los parámetros estadísticos, los gráficos de la tabla de ANOVA (Dispersión de datos por factor mes), demostraron diferencias estadísticamente significativas entre este grupo de microorganismos de un nivel de mes a otro para un nivel de confianza del 95%, puesto que el p- valor del Test F es inferior a 0,05; en donde se observó una distribución más heterogénea, solo en las cintas del Secado 1 y 2, como se muestra en la Figura 3.

## Conclusiones

Las sucesivas operaciones en la elaboración de la yerba mate afectan marcadamente la flora inicial, notándose una disminución más acentuada luego de la etapa del Secado, manteniéndose en algunos casos más bajos o iguales durante la etapa de Canchado y algo más variado durante el Estacionamiento.

El desarrollo de las Bacterias consideradas patógenas (productoras de enfermedades) para los humanos, como *Escherichia coli* y *Anaerobios sulfitos* reductores tanto mesófilas como termófilos, son más predominantes en las etapas de hojas verdes (Planchada) y en el Zapecado, no observándose su desarrollo en las etapas de Secado, Canchado o en el Estacionamiento. Por lo tanto, estos microorganismos no influirían en la calidad final del producto.

En cuanto a los Recuentos de Hongos y Levaduras, se observa un descenso significativo entre las etapas de Planchada (hojas verdes) y el de Estacionamiento, debido probablemente a las condiciones ambientales en el depósito durante la estiba.

De acuerdo a lo observado; de los valores de recuentos obtenidos, se podrían tomar como referencia aquellos obtenidos en la etapa del Canchado y durante el Estacionamiento, para poder comparar con los valores que se observen en la yerba mate elaborada (lista para el consumo humano). Teniendo en cuenta los posibles cambios que se pueden producir durante el envasado y acondicionamiento para la venta, se deducen valores de referencia de los distintos grupos microbianos a tener en cuenta en la Reglamentación del Código Alimentario Argentino, que regule la calidad higiénico-sanitaria de la yerba mate, desde el punto de vista microbiológico.

## Bibliografía

1. Giberti, G. C. *Las especies argentinas del género Ilex L. (Aquifoliaceae)*. Darwiniana 22: p 217-240.1979.
2. Ramallo, L.A.; Schmalko, M.E. y Känzig, R.G. *Variación de la concentración de ácido ascórbico (Vitamina C) en el procesamiento de la Yerba Mate*. Rev de Cienc y Tecnol; 1: p 25-29. 1998.
3. <http://www.cocinerosargentinos.com/recetas/19/756/Regionales/Original-torta-misionera-de-yerba-mate.html> (verificada 19/04/2015).

4. Filip, R. *Yerba mate, de bebida tradicional a alimento funcional. Perspectivas para el siglo XXI*. 5<sup>o</sup> Congreso Sudamericano de la Yerba Mate, Posadas, Misiones, Argentina. Conferencia. Libro de Actas p. 25) 2011.
5. <http://www.lanacion.com.ar/843074-crearon-un-perfume-a-base-de-yerba-mate> - 2006 – (verificada 19/04/2015).
6. Hartwig, Vanessa Graciela. *Obtención de extractos secos de yerba mate con alto contenido de polifenoles y alta capacidad antioxidante*. Tesis Doctoral en Química Industrial 2015-Universidad de Buenos Aires [On-line].
7. Brumovsky, L. *Programa Regional de Asistencia al Sector Yerbatero del INYM (PRASY)*.; En <http://www.kraus.com.ar/esp/yerba-mate/que-es-la-yerba-mate/informacion-nutricional> (verificada 19/04/2015).
8. De Bernardi, L.A. y Prat Kricun, S.D. *Cadena Alimentaria de la Yerba Mate. Diagnóstico de la Región Yerbatera*. En [www.sagpya.mecon.gov.ar/0-3/infusion/diagnostico\\_YM.htm](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0-3/infusion/diagnostico_YM.htm). 2001.
9. Prat Kricun, S. D. *Yerba Mate. Guía para la aplicación de buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura*. INTA EEA Cerro Azul. Ed. Araucaria Producciones SRL. Misiones Argentina. 2011.
10. Mossel, D.A.A. y García Moreno, B. *Capítulo 3: Alteraciones de los Alimentos por los Microorganismos*. En *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y calidad de los alimentos*. Editor Acribia: Zaragoza. P. 54-89. 1983.
11. Jay, J.M. *Capítulo 3: Parámetros intrínsecos y extrínsecos de los Alimentos que influyen en el crecimiento de los microorganismos, en Microbiología Moderna de los Alimentos*, 4<sup>o</sup> Ed. Acribia, Zaragoza, España. P. 45-62. 2002.
12. Tonón, S. y Marucci, R. *Flora fúngica contaminante de la yerba mate estacionada. Presencia de hongos productores de aflatoxinas*. La Alimentación Latinoamericana, 206. P. 23-32. 1995.
13. Spegazzini, C. *Hongos de la yerba - mate*. Anales del Museo Nacional de Buenos Aires: Serie 3a, Buenos Aires, N° 10, p. 111-141. 1908.
14. *Código Alimentario Argentino. Cap. XV; Productos Estimulantes o Fruitivos*. Art. 1193.
15. Norma IRAM 20517: 2007. *Yerba mate canchada y yerba mate elaborada. Análisis Microbiológicos*. 1<sup>o</sup> Ed. Instituto Argentino de Racionalización de los Materiales. Buenos Aires, Argentina. 2007.
16. ICSMF 2. *Microorganismos de los Alimentos*. Métodos de muestreo para análisis microbiológico. Principios y aplicaciones específicas. 2<sup>o</sup> Ed. Acribia, Zaragoza, España. p 19-104. 1999.
17. ICSMF *Microorganismos de los Alimentos I*. Su significado y Métodos de enumeración. Ed. ICSMF. 2<sup>o</sup> Ed. Acribia, Zaragoza, España. p 111-146. 2000.
18. ICSMF *Ecología microbiana de los Alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos de los Alimentos*. U.O.T. Press, Editor. Ed. Acribia, Zaragoza, España. P. 1-38. 1983.
19. Marucci, R.S.; Jerke, G.; Naidich, A. y Knass P.S. *Estudio bacteriológico en yerba mate envasada comercializada en la ciudad de Posadas provincia de Misiones, Argentina*. 2<sup>o</sup> Congreso Sul Americano da Erva Mate. III Reunião Técnica da Erva mate. Encantado. Brasil. Libro de resúmenes. P. 162. 2000.
20. Horiánsky, M; Castrillo, M; Tayagui A.; Jerke, G. *Calidad Microbiológica de Yerba Mate Canchada*. Rev de Cienc y Tecnol 14. N°17. P. 30-33. 2012.

Recibido: 17/08/2016.

Aprobado: 23/03/2016.