



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE  
LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Biocontrol de *Salmonella* durante la producción hidropónica de germinado de alfalfa”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

**Q.F.B. Yajaira Esquivel Hernández.**

DIRIGIDO POR

**DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN**

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE 2012



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Biocontrol de *Salmonella* durante la producción hidropónica de germinado de alfalfa

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

**Q.F.B. YAJAIRA ESQUIVEL HERNÁNDEZ.**

DIRIGIDO POR

**DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN**  
SINODALES

**Dr. Eduardo Fernández Escartín**

Presidente

**Dra. Sofía María Arvizu Medrano**

Secretaria

**M. en C. Josefina Saldaña Lozano**

Vocal

**Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche**

Suplente

**Dr. Fausto Tejeda Trujillo**

Suplente

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

Dr. Ineño Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2012  
México

## RESUMEN

El consumo de germinados crudos de semillas lleva implícito un riesgo de enfermedad microbiana. Los factores de riesgo incluyen su consumo crudo, la presencia y desarrollo de patógenos en las semillas durante la germinación. La prevención se sustenta en la desinfección de las semillas y evitar la proliferación del patógeno. Evaluamos este último factor mediante un tratamiento de inhibición competitiva recurriendo a bacterias antagonistas incorporadas desde inicio del proceso de germinación. Se aislaron 285 cepas de diversos ambientes naturales cuya capacidad antagónica se probó con la técnica del botón contra *Salmonella*; 27 mostraron actividad. El empleo de agar sulfito de bismuto-rifampicina facilitó el recuento de *Salmonella*, sin menoscabo de la sensibilidad y especificidad. Se estudiaron 4 g de semillas o sus germinados por unidad experimental. Se probaron tres fuentes de antagonistas: una cepa de *Pseudomonas* aislada de semilla de amaranto, una mezcla de bacterias obtenidas de un lavado de germinado comercial y un consorcio de 5 cepas de antagonistas previamente ensayadas. El antagonismo se probó sumergiendo en suspensiones de los antagonistas ( $10^5$  Log UFC/mL) semillas inoculadas con cinco serovares del patógeno, y determinando su reducción durante la germinación. Se partió de 1,700 UFC/4g del patógeno. La *Salmonella* alcanzó 7.6 Log UFC/4g a los 3 días de germinación (control: sin antagonistas). La incorporación de *Pseudomonas* no mostró efecto sobre la población del patógeno durante la germinación. Con la mezcla de cepas del lavado del germinado comercial la población del patógeno fue 1.5 Log UFC/4g menor que en el control. Con el consorcio de las 5 cepas se logró una diferencia de 1.3 Log UFC/4g. No se observó efecto de la concentración del antagonista ( $10^5$  y  $10^8$  UFC/mL), ni de la concentración del patógeno empleada (180 y 70 UFC/4g) sobre el efecto antagónico logrado (1.2-1.7 Log UFC/4g). En general, no se observó ninguna relación franca entre la actividad antagónica contra *Salmonella* observada con la técnica del botón y en el germinado de alfalfa.

(Palabras clave: germinados, alfalfa, antagonismo microbiano, desinfección, control biológico)

## SUMMARY

The consumption of raw seed sprouts implies a microbial disease risk. Risk factors include raw consumption, presence and growth of pathogens in seeds during germination. Prevention is supported by disinfection of seeds to avoid the proliferation of pathogens. This factor was evaluated by competitive inhibition treatment using antagonistic bacteria incorporated from the beginning of the germination process. 285 strains from some natural environments were isolated, which antagonistic capacity was tested against *Salmonella* button technique; 27 strains showed activity. The use of bismuth sulfite-rifampicin agar facilitated *Salmonella* counts, without impairing its sensitivity and specificity. 4 g of seeds or sprouts per experimental unit were studied. Three sources of antagonists were tested: a strain of *Pseudomonas* isolated from amaranth seed, a mixture of bacteria obtained from a commercial washed sprouts and a consortium of 5 strains previously tested as antagonist. The antagonism was tested by submerging in suspensions of antagonists ( $10^5$  Log CFU /mL) seeds previously inoculated with five serovars of the pathogen, and determining its reduction during germination. It started with 1,700 CFU/4g of *Salmonella* it reached 7.6 Log CFU/4g after 3 days of germination (control: without antagonists). Incorporating of *Pseudomonas* showed no effect on the pathogen population during germination. With the mixture of strains of commercial washed sprouts the pathogen population was 1.5 Log CFU/4g lower than the control. With the consortium of the 5 strains achieved a 1.3 Log CFU/4g difference. There was no effect of the concentration of antagonist ( $10^5$  and  $10^8$  CFU/mL), or of the pathogen concentration used (180 and 70 CFU/4g) on the antagonistic effect achieved (1.2-1.7 Log CFU/4g). In general, it was no observed any relation between the antagonistic activity against *Salmonella* observed with the technique of the button and alfalfa sprouts.

(Keywords: sprouts, alfalfa, microbial antagonism, disinfection, biological control)

## **Dedicatoria**

**Con respeto, admiración pero sobre todo con mucho amor a mis padres.**

Las palabras no son suficientes para expresar la gratitud y el infinito amor que les tengo pero sobretodo gracias por siempre creer en mí.

### **A mi hermana**

Por ser mi mejor amiga y mi incondicional.

### **A Julián**

Por llegar a nuestras vidas.

## **Agradecimientos**

Al doctor Escartín, por todas las enseñanzas, los consejos pero sobretodo por las llamadas de atención que no solo me han hecho crecer profesionalmente sino personalmente.

A mi maestra Yossi, creo que la lista sería bastante larga. Por apoyarme siempre, por todas las enseñanzas, por permitirme convivir con su hermosa familia, por inyectarme esas ganas de aprender, por esas largas y bonitas charlas, por eso y mil cosas más.

A los doctores Peniche, Fausto y Sofí. Por su tiempo, observaciones y aportaciones para la realización de este proyecto.

A Erika, Vero, Julio, Anita. Por todo el apoyo y el cariño que me brindaron, gracias por hacerme sentir como en casa.

A los chicos de verano y servicio social por toda la ayuda que me brindaron en esas jornadas maratónicas de experimentos pero sobretodo por su grata compañía.

A mis viejas y nuevas amigas: Daly, Jann, Pao, Beris, Nataly, Lili, Ivonne y Carmen, porque sin su amistad y su apoyo este proyecto hubiera mucho más complicado y por supuesto no podrían faltarme mis nuevos amigos sinaloenses Arturo y Carlos, gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)..

## Índice general

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Índice de cuadros	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Germinados	2
II.1.1 Generalidades sobre la germinación	2
II.1.2 Beneficios del consumo de germinados de semillas	3
II.1.3 Producción de semillas y geminados	4
II.1.4 Tipos de cultivo	6
II.1.5 Hidropónico	6
II.1.6 Tradicional	8
II.2 Microbiología de los germinados	8
II.2.1 Microorganismos patógenos asociados a los germinados	9
II.2.2 Mecanismos de contaminación	11
II.2.3 Distribución del patógeno en el germinado	12
II.2.4 Sobrevivencia y desarrollo del patógeno	13
II.2.5 Adhesión y formación de biopelículas	15
II.2.6 Brotes asociados al consumo de germinados	16

II.3 Mecanismos de internación de patógenos humanos a las plantas	19
II.3.1 Internación	19
II.3.2 Tejido dañado.	20
II.4 Medidas para reducir la carga microbiana de los germinados.	20
II.4.1 Tratamientos químicos.	21
II.4.2 Tratamientos físicos.	22
II.4.3 Biocontrol	25
II.2.5 Reducción de riesgos asociados al consumo de germinados.	27
II.2.6 Prácticas sanitarias de agricultura.	28
II.2.7 Prácticas sanitarias de manufactura	29
III OBJETIVOS	30
III. 1 OBJETIVO GENERAL	30
III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
IV MATERIALES Y METODOS	31
IV.1 Materiales	31
IV.1.1 Medios de cultivo	31
IV.1.2 Soluciones	32
IV.1.3 Reactivos y colorantes	32
IV.2 Métodos.	34
IV.2.1 Determinar el contenido microbiano de germinado de alfalfa comercial	34
IV.2.2 Aislamiento de cepas de bacterias nativas de tierra, hortalizas y otros ambientes en los que suelen ocurrir de manera natural procesos de antagonismo microbiano	40
IV.2.3 Valoración de la capacidad antagónica de las cepas aisladas contra <i>Salmonella</i> en medios de cultivo	42

IV.2.4 Obtención de un modelo de germinación para las semillas en el laboratorio en cual se puedan realizar estudios de antagonismo bacteriano	44
IV.2.5 Determinación de los cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación desde la semilla hasta la cosecha	50
IV.2.6 Evaluación de la influencia de la concentración de <i>Salmonella</i> y los antagonistas adicionados al modelo de germinación	51
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
V.1 Contenido microbiano de germinado de alfalfa comercial.	65
V.2 Aislamiento y valoración de la capacidad antagónica de cepas aisladas contra <i>Salmonella</i> .	68
V.3 Obtención del modelo de germinación	71
V.4 Determinación de los cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación	79
V.5 Evaluación de la influencia de la concentración de <i>Salmonella</i> y los microorganismos antagonistas adicionados al modelo de germinación.	82
V.5.1 Efecto de la rifampicina sobre el contenido de BMA al 3er. y 4to. día de crecimiento del germinado de alfalfa	82
V.5.2 Efecto de la rifampicina adicionada en diferentes medios de cultivo sobre <i>Salmonella</i> inoculada en extracto de germinado	83
V.5.3 Comportamiento de <i>Salmonella</i> en extracto de germinado	86
V.5.4 Comportamiento de <i>Salmonella</i> durante la obtención del germinado	88
V.5.5 Comportamiento de <i>Salmonella</i> en presencia de una cepa de <i>Pseudomonas</i> y una mezcla de microorganismos antagonistas durante la germinación	90
V.5.6 Comportamiento de <i>Salmonella</i> frente a dos concentraciones de microorganismos antagonistas durante la germinación	92
VI Conclusiones.	95



## Índice de cuadros

Cuadro	Página
1. Valores nutrimentales de los germinados de semillas.	3
2. Brotes de enfermedad asociados al consumo de germinados en Estados Unidos, 1985-1998.	17
3. Brotes internacionales de enfermedad asociados al consumo de germinados, 1988-1997.	18
4. Estimación de la actividad inhibitoria.	43
5. Porcentaje de germinación de lotes de semillas	75
6. Talla de la plántula al 6to día de germinación.	75
7. Máximas poblaciones alcanzadas de 5 grupos microbianos durante la germinación	80
8. Efecto inhibitorio de rifampicina sobre BMA.	82

## Índice de figuras

Figura.....	Página
1. Producción de semillas.	5
2. Estudio de 5 grupos microbianos en germinado de alfalfa comercial.	35
3. Técnica para la detección de <i>Salmonella</i> .	37
4. Detección de <i>Salmonella</i> sp mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa	38
5. Cuantificación de <i>Salmonella</i> .	39
6. Aislamiento y conservación de cepas para estudio de antagonismo.	41
7. Variables de estudio para la obtención de germinado de alfalfa en tubos.	46
8. Variables de estudio para la obtención de germinado en vaso.	47
9. Contenido de BMA y <i>Enterobacteriaceae</i> en lotes de semillas durante su germinación.	49
10. Estudio de cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación.	50
11. Efecto de rifampicina sobre el contenido de BMA en el crecimiento de germinado de alfalfa	52
12. Efecto de la rifampicina en diferentes medios de cultivo sobre la <i>Salmonella</i> .	54
13. Preparación e inoculación de <i>Salmonella</i> en extracto de germinado al 1%.	55
14. Inoculación de la <i>Salmonella</i> en semillas para la obtención del germinado.	57
15. Suspensiones de microorganismos antagonistas.	59
16. Inoculación de <i>Salmonella</i> y microorganismos antagonistas en semillas para la obtención de germinado.	61
17. Inoculación de semillas con <i>Salmonella</i> y dos concentraciones de microorganismos antagonistas.	64
18. Flora nativa seleccionada en germinado de alfalfa comercial.	66
19. Inhibición microbiana mediante la técnica de botón.	69
20. Porcentaje de bacterias con capacidad antagónica contra 5 serovares de <i>Salmonella</i> .	70
21. Germinación en tubo. A. 400µl, B. 300 µl agua.	71
22. Germinación con película de polietileno (A), sin película de polietileno (B).	73

23.	BMA y <i>Enterobacteriaceae</i> de diferentes proveedores de semillas durante su germinación.	78
24.	Comportamiento de cinco grupos microbianos durante la germinación.	81
25.	Recuperación de <i>Salmonella</i> +R inoculada en extracto de germinado estéril en diferentes medios de cultivo.	84
26.	Efecto de la rifampicina sobre <i>Salmonella</i> +R y la flora nativa en extracto de germinado de alfalfa en medios de cultivo selectivos.	85
27.	Dinámica de dos niveles de inóculo de <i>Salmonella</i> en extracto de germinado estéril y sin esterilizar	87
28.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> durante la germinación.	89
29.	Comportamiento de <i>Salmonella</i> frente a microorganismos antagonistas y una suspensión de bacterias durante la germinación.	91
30.	Comportamiento de un nivel alto de <i>Salmonella</i> frente a dos concentraciones de una mezcla de microorganismos antagonistas.	93
31.	Comportamiento de un nivel bajo de <i>Salmonella</i> frente a dos concentraciones de una mezcla de microorganismos antagonistas.	94

## I. INTRODUCCIÓN

Los considerables beneficios para la salud humana relacionados con la ingesta de frutas y vegetales frescos han favorecido la demanda mundial de estos productos. Sin embargo, en las últimas décadas, el aumento de las enfermedades transmisibles por alimentos (ETA) asociadas al consumo de ese tipo de alimentos, ha conducido a las autoridades sanitarias a considerar tales patologías como un problema de salud pública.

El consumo de germinado de semillas aporta una gran cantidad de nutrientes; sin embargo, representan un riesgo a la salud debido a que su consumo no incluye ningún proceso térmico que pueda eliminar patógenos potencialmente presentes. El daño es ilustrado por la presentación, documentada en la literatura científica, de brotes de enfermedades asociadas a su consumo. Se incluyen casos letales. Destacan entre los patógenos *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* (Taormina y Beuchat, 2002).

Se han reportado diversos tratamientos para destruir o controlar los microorganismos contaminantes en los germinados que incluyen agentes químicos (compuestos clorados) y físicos (presión hidrostática, radiaciones ionizantes). Los resultados revelan beneficios limitados con eventual sobrevivencia de pocas células, una situación desafortunada ya que el germinado constituye un sustrato favorable para la proliferación de esos patógenos (FDA, 1999). Se cuenta con abundante literatura sobre el control biológico de patógenos en una diversidad de plantas, derivados lácteos y cárnicos (Muthukumarasamy *et al.*, 2003) pero es muy escasa la literatura en hortalizas. La prevención de los incidentes de enfermedad asociados a los germinados se sustenta primariamente en la desinfección de las semillas y en evitar la proliferación del patógeno. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar este último factor mediante un tratamiento de inhibición competitiva recurriendo a bacterias antagonistas aisladas de diferentes fuentes e incorporadas desde inicio del proceso de la germinación.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Germinados

#### II.1.1 Generalidades sobre la germinación

La germinación se realiza desde épocas muy remotas con la intención de mejorar su conservación, así como para potenciar algunas de sus cualidades nutritivas y terapéuticas. La germinación es el proceso mediante el cual una semilla se desarrolla hasta convertirse en una nueva planta. Este proceso se lleva a cabo cuando el embrión se hincha y la cubierta de la semilla se rompe (Nieto, 2005).

Para que la germinación ocurra son necesarios algunos factores externos, como la humedad, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia, y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos (FDA, 2004).

La absorción de agua es el primer paso y el más importante que tiene lugar durante la germinación; para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La entrada de agua a la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión.

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O<sub>2</sub> (Nieto, 2005).

## II.1.2 Beneficios del consumo de germinados de semillas

Los germinados de semillas son buena fuente de aminoácidos, carbohidratos, fibra y grasas poliinsaturadas, benéficas para el corazón y los vasos sanguíneos. Entre sus vitaminas sobresalen la vitamina C, B9 o ácido fólico, beta-caroteno o provitamina A, E y K. Sus minerales más notables son: potasio, magnesio, calcio, hierro y cinc. El germinado de alfalfa también es fuente de enzimas, que favorecen la digestión; flavonoides de acción antioxidante, y clorofila (Kylen y McCready, 1975). Algunas investigaciones consignan efectos benéficos que incluyen una reducción en el desarrollo de hipertensión y aterosclerosis (Wu, y Facci., 2004) y cierta protección contra componentes cancerígenos. Entre numerosos vegetales estudiados, los germinados de alfalfa se colocan en los primeros lugares como fuentes de antioxidantes (Cao *et al.*, 1996)

Los valores nutrimentales de diferentes tipos de germinados de semillas se consignan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Valores nutrimentales de los germinados de semillas.

Valores nutricionales de germinados de semillas						
Germinado (1 taza)	Calorías	Proteína (gramos)	Fibra	Vitamina C	Hierro	Folatos
Alfalfa	10	1.3	3	5	2	3
Frijol mungo	26	2.5	4	23	4	9
Rábano	16	1.4	n/a	18	2	9
Soya	86	9	3	17	8	30
Trigo	214	8	4	5	11	10

\* Fuente: Departamento de Agricultura U.S.

### II.1.3 Producción de semillas y geminados

#### Semillas

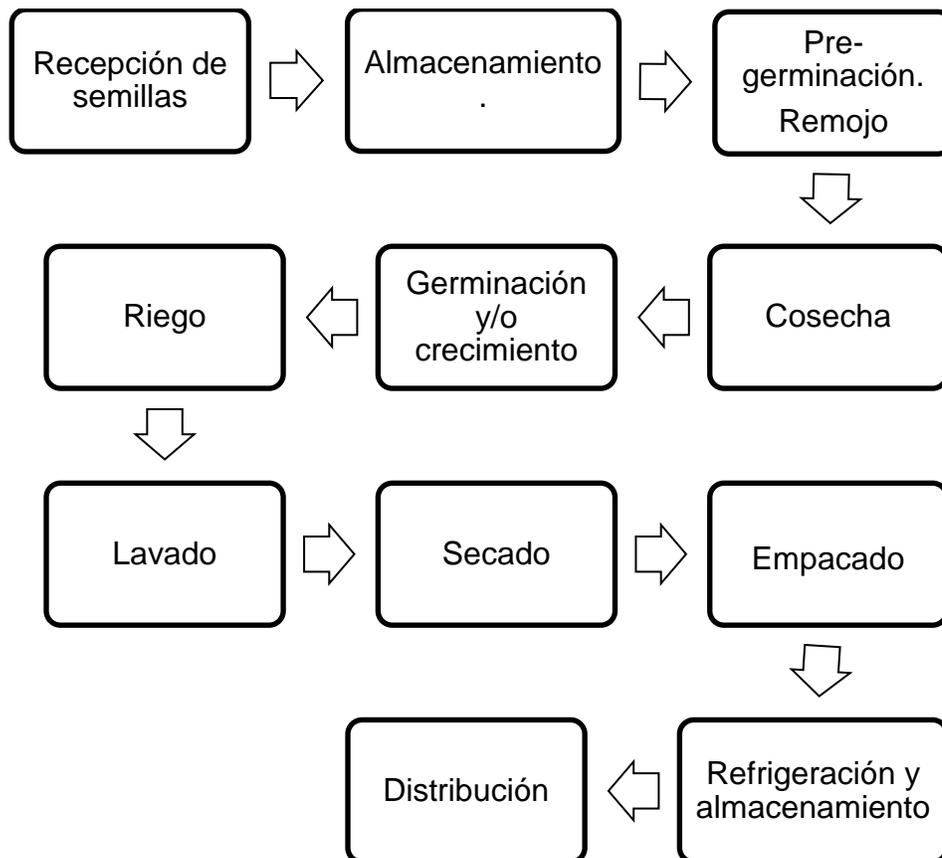
Las plantas para la producción de semillas se cultivan en típicos entornos agrícolas, las semillas son generalmente tratadas como cualquier producto agrícola (jitomates, lechugas, rábanos, etc.) .Aproximadamente 80 millones de libras de semilla de alfalfa son producidas cada año en EE.UU. (Muller, 1999). Los programas de certificación son como una herramienta de mercadotecnia y garantía de calidad para los vendedores de forraje. El uso de semillas certificadas es una garantía de que crecerán conforme a las expectativas en términos del campo y calidad de forraje. Muchos de los atributos de calidad de la semilla certificada tienen menos relevancia para los productores de germinado comparado con los productores de forraje. Sin embargo, la semilla no certificada o semilla común, es la más conveniente para la obtención de germinados. Por otra parte, el uso de un sistema de semillas certificadas puede utilizarse para rastrearlas y saber de qué campo provienen; esto puede ser considerado en la incorporación de programas para mejorar la seguridad de la germinación (FDA; 1989)

Las prácticas de agricultura correctamente coordinadas son la clave para una producción agrícola exitosa. Entre las más importantes con gran impacto en la producción de semillas pueden mencionarse la polinización, riego, control de insectos y control de maleza (FDA, 1999).

## Germinado

En la actualidad la producción de germinados en EE.UU.se estima en 250 millones de dólares; 475 agricultores producen 300,000 toneladas de germinado, según la Asociación Internacional de Productores de Germinados. Hasta un 10% de los estadounidenses consumen germinados regularmente (International Specialty Supply, 1999).

La producción de germinado consiste principalmente en una serie de etapas (Figura 1). Algunos productores pueden omitir o añadir alguna de ellas dependiendo de la semilla, el tamaño y los recursos del productor y el tipo de cultivo (CDC, 2000).



**Figura 1.** Producción de semillas.

#### **II.1.4 Tipos de cultivo**

Debido a los beneficios que este tipo de productos aportan a la salud, la demanda por su consumo se ha incrementado con el tiempo. Con frecuencia la producción de este alimento se efectúa en el hogar de manera artesanal y sin una tecnología sustentada (Eroski consumer, 2007). Cuando se lleva a cabo una producción a nivel industrial, existen normas y técnicas en lo referente a la disposición de espacio, instalaciones, higiene, producción, transporte y venta (Whyte, 1980). Desafortunadamente en nuestro país en general no se cuenta con ese tipo de normas y su producción es llevada a cabo en instalaciones con una higiene incierta.

La germinación de semillas puede llevarse a cabo mediante dos tipos de procesos: 1) hidropónicos. 2) tradicional (Rincker *et al.*, 1988)

#### **II.1.5 Hidropónico**

Los cultivos hidropónicos constituyen un método científico de producción agrícola (sin tierra) que provee los elementos nutritivos y condiciones necesarias para el crecimiento (Gázquez, 2000). La producción de germinados de semillas en hidroponía consiste básicamente en germinar gramíneas durante un periodo de seis días.

Los procesos hidropónicos caen generalmente en dos categorías: tambores rotativos y contenedores estacionarios (charolas, contenedores) en cuartos de ambientes controlados o cámaras de germinación las cuales a menudo se conservan en oscuridad.

El proceso de germinación depende del tipo de germinado (**Cuadro 2**)

**Cuadro 2** Procesos de germinación (CDS/FDA, 1998)

Procesos de germinación	Tipo de germinado
Tambor giratorio	Alfalfa, brócoli, trébol, rábano
Cuartos de germinación	Soya, cebolla, lenteja, garbanzo, chicharos
Bandejas de crecimiento con tierra	Trigo, girasol, chicharos, brócoli.

### Tambores giratorios

Típicamente las semillas de alfalfa, brócoli, trébol, rábano, son germinados en tambores giratorios. Los tambores giratorios son usualmente cilindros de plástico. Cada cámara puede contener aproximadamente 100 libras de semilla y producir 500 libras de germinado; las semillas contenidas en el cilindro son regadas intermitentemente cada 10 a 15 minutos.

### Cuartos de germinación

Las semillas de soya son generalmente germinadas en contenedores o charolas. Los cuartos mantienen cierta oscuridad con temperaturas entre 20-26°C; el riego puede ser manual con mangueras o con un sistema automatizado. Cada cámara puede contener aproximadamente 12 libras de semillas y producir en promedio 200 libras de germinado.

Los métodos usados para la germinación y crecimiento de semillas así como la cosecha y lavado de los cultivos depende de muchos factores, incluyendo el tamaño de la operación y el tipo de germinado que se quiere producir.

### **II.1.6 Tradicional**

En este tipo de procesos se preparan charolas con una mezcla de composta y tierra; previamente las semillas son remojadas aproximadamente de 12-14h; después de remojadas son esparcidas en las charolas. El riego se lleva a cabo dos veces al día mediante un sistema automatizado o manualmente con una manguera.

### **II.2 Microbiología de los germinados**

La microbiología de los germinados de semillas ha sido ampliamente estudiada debido a que se trata de un producto con un alto contenido de nutrientes que se generan durante la germinación. El pH y nivel de humedad son factores que favorecen la actividad microbiana; se han encontrado elevadas concentraciones en la microflora nativa sin presentar signos de deterioro (Andrews *et al.*, 1979). La flora nativa puede estar en el interior de las semillas, Mundt y Hinkle (1976) encontraron que entre el 13 y 15% de la superficie de semillas de alfalfa y soya respectivamente contenían en su interior bacterias. Una amplia variedad de hongos también pueden contaminar la superficie de germinados de semillas.

El contenido microbiano de los germinados consiste principalmente de bacilos Gram negativos, bacilos Gram positivos, levaduras y hongos. Las bacterias mesófilas aerobias se detectan en concentraciones que varían entre 7 y 9 Log UFC/g (Taormina *et al.*, 1999), las *Enterobacteriaceae* oscilan entre 7 y 8 Log UFC/g (O'Mahony *et al.*, 1990), coliformes totales, fecales, levaduras y hongos varían ampliamente entre 2 y 8 Log UFC/g (Piernas y Guiraud, 1997).

Entre las especies prominentes destacan *Pseudomonas fulva*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas marginalis*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia hermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas syringae tabaco*, *Pseudomonas fluorescens biotype A*, *P. fluorescens biotype G*, *P. asplenii*, *Erwinia rhapontici*, *Stenotrophomonas matophila*, *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter pyrinus* y *Pseudomonas putida biotype A* (Fett, 2002)

### **II.2.1 Microorganismos patógenos asociados a los germinados**

El consumo de germinado de alfalfa contaminado ha sido responsable de numerosos brotes de enfermedad a nivel mundial; la gran mayoría han sido contaminados con varios serovares de *Salmonella* (McMahon *et al.*, 1997). Un gran brote aconteció en Japón en 1996, con más de 7,000 casos confirmados con *E. coli* O157:H7; el alimento implicado fue germinado de rábano (NACMCF, 1999).

Es importante destacar que los daños resultantes de la deficiente calidad sanitaria de los alimentos consisten en la presentación de enfermedades, gastos de atención médica, menoscabo de la calidad de vida, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos, daño al turismo y causa de muerte (Fernández- Escartín, 2008).

Un claro ejemplo de los costos económicos generados se ilustra con el reciente brote ocurrido en mayo de 2012 en Alemania, donde el alimento implicado fue germinado de rábano. Se registraron 2,412 personas afectadas, 824 presentaron síndrome urémico hemolítico y 38 muertes (FDA, 2003). El costo aproximado por casos de muerte fue de 39,000,000 dólares, por personas afectadas sin cuadros de síndrome urémico hemolítico 440,000,000 dólares y personas con síndrome urémico hemolítico 2,360,000,000 dólares. El costo total fue de 2,840,000,000 dólares.

Un gran número de patógenos ha sido aislados de germinados. Estos incluyen *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* y *K. pneumoniae* (Fett *et al.*, 2006).

### ***Salmonella spp.***

Ha sido responsable de varios brotes de enfermedad alrededor del mundo (O'Mahony *et al.*, 1990; Mahon *et al.*, 1997; Puohiniemi *et al.*, 1997; Farrar y Mohle-Boetani, 1999). Existen reportes de brotes por salmonelosis asociados al consumo de germinados que comenzaron con niveles bajos del patógeno en las semillas seguidos de un importante incremento durante la germinación (Splittstoesser *et al.*, 1983).

### ***Escherichia coli* Enterohemorrágica.**

Ha sido responsable de un gran número de brotes asociados al consumo de germinados de rábano y alfalfa (CDC, 1997; Wantabe y Okasa, 1997). Existen estudios que sugieren que la fuente del patógeno fue la semilla; el patógeno pudo incrementar su población rápidamente durante la germinación. (Itoh *et al.*, 1998).

### ***Listeria monocytogenes.***

Está asociada a tierra, plantas y procesos en la industria de alimentos. Es una bacteria con amplia ubicuidad, que tiene la capacidad de multiplicarse tanto en semillas como en el propio germinado. Puede crecer a temperaturas de refrigeración en gran variedad de productos, incluyendo germinados (Lovett y Buchanan, 1999). Ha sido aislada de germinados comerciales; sin embargo, no existen casos de listeriosis asociados al consumo de germinados. En la actualidad, no está claro si la presencia y el crecimiento de *L. monocytogenes* en germinados es significativamente diferente de la presencia y crecimiento de *L. monocytogenes* en otros productos frescos.

### ***Bacillus cereus.***

Bacteria con amplia ubicuidad. Se encuentra comúnmente en tierra y/o plantas (Kramer y Gilbert, 1989). En 1973, se reportó un brote asociado al consumo de una mezcla de germinados (soya, mostaza y berro empacados) contaminados con *B. cereus*. La fuente de contaminación fue la semilla. *B. cereus* fue capaz de crecer en las condiciones de germinación (Harmon *et al.*, 1987).

### ***Yersina enterocolítica.***

Puede encontrarse en una diversidad de alimentos de origen animal incluido el cerdo, res, ave. Es común aislarla de diferentes ambientes tales como lagos, ríos, pozos, y tierra (Kapperud, 1991) Un brote de yersiniosis se asoció al consumo de germinado de soya no comercial producido con riegos de agua de estanque (Cover y Aber, 1989). Como es un psicrótrofo, se asume que puede crecer en germinados refrigerados en almacenamiento (Chao *et al.*, 1988). La bacteria es capaz de crecer durante la producción de germinados, pero no hay información específica.

### **II.2.2 Mecanismos de contaminación**

La contaminación microbiana de los germinados puede ocurrir a través de los siguientes conductos o sus combinaciones: las semillas, equipo y utensilios agua de riego, fauna y humana. Generalmente las semillas de plantas utilizadas en la producción de germinados se encuentran expuestas a contaminación por bacterias de origen intestinal o ambiental (NACMCF, 1999).

Diversos estudios demuestran que en el producto comercial es posible recuperar microorganismos patógenos. Burnett y Beuchat (2001) detectaron *E. coli* en germinados comerciales, evidencia de exposición a la contaminación fecal. En germinados de alfalfa y de frijol muestreados en comercios se han detectado poblaciones microbianas de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g; 6 de 23 contenían  $>10^5$  coliformes fecales/ gramo, mientras que germinados de cebolla mostraron  $>10^9$  bacterias aerobias/g (Gandhi *et al.*, 2001).

### II.2.3 Distribución del patógeno en el germinado

Las semillas son el vehículo más frecuente de patógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. Beuchat (1997) demostró la presencia de *E. coli* O157:H7 tanto en las superficies como en el tejido interno y estomas de los cotiledones en germinados de rábano a partir de semillas inoculadas. Cuando las semillas se sumergieron en suspensiones de *E. coli* O157:H7 las partes comestibles (cotiledones e hidrocotilo) se contaminaron intensamente con  $>7$  Log UFC/g.

Los patógenos oportunistas han mostrado tener capacidad para multiplicarse durante la germinación en el laboratorio; por ejemplo: *B. cereus* ha alcanzado concentraciones de  $10^4$  Log UFC/g en germinados de soya y alfalfa y  $10^7$  Log UFC/g en germinado de arroz (Harmon *et al.*,1987), *K. pneumoniae* (Park y Sandres,1990) muestra concentraciones de  $10^6$  y  $10^5$  Log UFC/g en germinados de alfalfa y soya, y *Vibrio cholerae* ha alcanzado concentraciones de  $10^6$  Log UFC/g en germinados de alfalfa (Castro- Rosas y Fernández Escartín,1999).

*S. entérica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* parece que preferentemente colonizan las raíces de los germinados de alfalfa (Castro- Rosas y Fernández Escartín, 2000). Un estudio realizado reveló que al segundo día de germinación, aparecían agregados de *S. entérica*, pero no de *E. coli* O157:H7, estos se detectaron en raíces de alfalfa (Charkowski *et al.*, 2001). Estos agregados pueden llegar a ser biopelículas adheridas a la superficie de la planta generadas por materiales como polímeros producidos extracelularmente (Charkowski *et al.*, 2002).

Como sucede en otros productos como lechugas y jitomates, los patógenos pueden internarse en los germinados durante el crecimiento de la plántula a través de la raíz. Itoh *et al.* (1998) fueron los primeros en demostrar este fenómeno al inocular y observar en germinado de rábano con *E. coli* O157:H7, usando microscopia de inmunofluorescencia y de barrido. Reportaron que se localizaba en los estomas y en el sistema vascular. Como se sabe, tanto *Salmonella* spp como *E.coli* O157:H7 no son productoras de enzimas degradadoras de la pared celular de la planta (como celulasas

o pectinasas). Es probable que el patógeno entrara a través de las raíces de los germinados mediante absorción pasiva en sitios donde hay lesiones en la propia raíz.

#### **II.2.4 Sobrevivencia y desarrollo del patógeno**

Se sabe que tanto *Salmonella* como *E. coli* O157:H7 sobreviven en semillas natural o artificialmente inoculadas por más de dos años dependiendo de las condiciones de almacenamiento (Beuchat, y Scouten, 2002). Eventualmente se tiene éxito para detectar al patógeno en la semilla y el hallazgo robustece considerablemente el estudio epidemiológico. (Inami y Lee, 2001).

El problema más significativo es el potencial que muestran los patógenos intestinales para proliferar en la planta una vez iniciada la germinación. Taormina y Beuchat (1999) demostraron que *E coli* O157:H7 inoculada en semillas de alfalfa con 2,000 bacterias/g alcanzaban  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g dentro de 48 h después de iniciado el proceso de germinación. Las poblaciones en el germinado maduro mantenidas posteriormente a  $9 \pm 2^\circ\text{C}$  por 6 días no se modifican. Ingram *et al.* (2000) reportaron el desarrollo de *E. coli* O157:H7 que alcanzó niveles hasta de  $10^7$  UFC/g en germinados de alfalfa. El ensayo para la detección de *Salmonella* durante la germinación es un recurso efectivo para la industria como medio que evitaría la distribución de productos contaminados. (Montvilley Schaffner, 2005). El crecimiento no depende del serovar, la fuente de aislamiento o las características de virulencia de la cepa (Hu y Worobo, 2004). Existen reportes de máximas poblaciones alcanzadas de *Salmonella entérica* y *E. coli* O157:H7 ( $10^5$  y  $10^8$  Log UFC/g) durante el proceso de germinación. Las poblaciones de *E. coli* O157:H7 en germinados de alfalfa presentaron un logaritmo menos que *Salmonella entérica*. Este hallazgo sugiere una mayor adhesión de *Salmonella* a las superficies del germinado, la cual puede disminuir por el efecto de lavado por los riegos frecuentes (Himathongkham *et al.*, 2001)

Las máximas poblaciones de patógenos alcanzadas parecen no depender de las poblaciones iniciales en las semillas cuando son inoculadas con un nivel relativamente elevado (Taormina *et al.*, 1999) lo que indica que puede haber una

máxima capacidad de patógenos adheridos a la superficie del germinado. Esta observación puede deberse al número de sitios disponibles y el nivel de nutrientes ó ambos; pueden influir en la naturaleza y población de los microorganismos nativos. Sin embargo, en semillas inoculadas con bajos niveles de *S. entérica* serovar Newport se alcanzó  $10^3$  Log UFC/germinado, con inóculos en la semilla de 1 UFC/mL. En semillas inoculadas con  $10^2$  UFC/mL o niveles más altos, las poblaciones finales del patógeno alcanzan más de  $10^5$  Log UFC/germinado.

Albrecht *et al.* (1995). Realizaron un experimento que consistía en la obtención de germinado proveniente de semillas naturalmente contaminadas con *S. entérica* con una concentración de  $10^1$ UFC/g las cuales mostraron poblaciones de  $10^4$ UFC/g después de la germinación. Se aplicaron las mismas prácticas industriales para la obtención de germinado, se compararon las poblaciones alcanzadas en el germinado proveniente de semillas inoculadas en el laboratorio y se encontraron niveles más bajos del patógeno en el germinado proveniente de las semillas naturalmente contaminadas. Esto pudo deberse a que las poblaciones del patógeno fueron más bajas en las naturalmente contaminadas que en las inoculadas en el laboratorio por un alto porcentaje de células dañadas, o bien a la frecuencia de riego, donde aquellos patógenos que no estaban fuertemente adheridos a la superficie de la plántula hayan sido desprendidos.

### **II.2.5 Adhesión y formación de biopelículas**

Las biopelículas en la superficie de los germinados son conjuntos heterogéneos de diferentes bacterias, levaduras o sus mezclas (Fett, 2000). Se han hallado biopelículas en germinados de alfalfa y soya con un espesor aproximado de 13  $\mu\text{m}$ ; las biopelículas aun así (con un espesor mínimo) aumentan considerablemente la resistencia a la desecación y tratamientos de desinfección (Donlan y Costerton, 2002).

Se han realizado estudios de la interacción entre *E. coli* O157:H7 y lechuga tanto en cultivos hidropónicos como en cultivos tradicionales (tierra). Los resultados indican que las raíces, hipocotilos y los cotiledones de las plantas crecidas en cultivo tradicional (inoculados con agua de riego contaminada) albergaron al patógeno por 10 días independientemente del nivel del inóculo depositado en las plantas ( $10^2$  y  $10^8$  Log UFC/mL). Los estudios realizados con microscopía de barrido revelaron que había células adheridas de *E. coli* O157:H7 alrededor del estoma y en la vascularización de los hipocótilos. Los investigadores especulan que las bacterias se movieron a través de los xilemas (Wachtel *et al.*, 2002).

Las bacterias nativas que están firmemente unidas a la superficie del germinado, es la evidencia de que no es suficiente la aplicación de lavados después de la cosecha para reducir las poblaciones en más de  $10^1$  Log UFC/g aproximadamente (Bruhn *et al.*, 1992). Se ha demostrado la presencia de microorganismos nativos a través del uso de microscopía electrónica de barrido tanto de células individuales como de biopelículas en cotiledones, hipocotiledones y en las superficies de germinados. (Park *et al.*, 1998).

### **II.2.6 Brotes asociados al consumo de germinados**

En las últimas dos décadas ha sido notable el número de brotes de enfermedad vinculados al consumo de germinados de semillas, así como de considerables volúmenes de alimento decomisado a escala mundial. (O'Mahony, 1990; Mahon y Ponka 1997; Taormina, y Beuchat, 1999; Van Beneden y Kenene 1999). Un resumen de los brotes de enfermedad reportados por consumo de germinado en los Cuadro 2 y Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Brotes de enfermedad asociados al consumo de germinados en Estados Unidos, 1985-1998.

<b>Año</b>	<b>Patógeno</b>	<b>No. de casos</b>	<b>Lugar del brote</b>	<b>Tipo de germinado</b>	<b>Fuente de contaminación</b>	<b>Referencia</b>
1995	S. Stanley	242	17 estados y Finlandia	Alfalfa	Semilla	Mahon <i>et al.</i> , 1997
1995-96	S. Newport	>133	7 estados y Canadá	Alfalfa	Semilla	Van Beneden <i>et al.</i> , 1999
1996	S. Montevideo/ Meleagridis	>500	California	Alfalfa	Germinado/semilla	Farrar y Mohle-Boetani, 1999
1997	S. Infantis/ Anatum	90	Kansas, Missouri	Alfalfa	Semilla	Slutsker, 1999
1997	<i>E.coli</i> O157:H7	108	Michigan, Virginia	Alfalfa	Semilla	CDC, 1997
1997/98	S. Senftenberg	60	California, Nevada	Trébol/ Alfalfa	Germinado/semilla	Farrar y Mohle-Boetani, 1999
1998	<i>E.coli</i> O157:H7	8	California	Trébol/ Alfalfa	Semilla	Farrar y Mohle-Boetani, 1999
1998	S.Havana/ Cubana	18	California	Alfalfa	Semilla	Farrar y Mohle-Boetani, 1999
1999	S. Mbandaka	75	Oregon, Washington	Alfalfa	Semilla	Keene, 1999

(Fuente: FDA, 1999)

**Cuadro 3.** Brotes internacionales de enfermedad asociados al consumo de germinados, 1988-1997.

Año	Patógeno	No. de casos	Lugar del brote	Tipo de germinado	Fuente de contaminación	Referencia
1988	S. Saint-Paul	143	Reino Unido	Soya	Semilla	O'Mahony <i>et al.</i> , 1990
1989	S. Gold-Coast	31	Reino Unido	Berros	Desconocido	Joce <i>et al.</i> , 1990
1994	S. Bovismorbificans	492	Suecia, Finlandia	Alfalfa	Semilla	Ponka <i>et al.</i> , 1995 Puohiniemi <i>et al.</i> , 1997
1995	S. Stanley	114	Finlandia	Alfalfa	Semilla	Kontinen <i>et al.</i> , 1996 Mahon <i>et al.</i> , 1997
1995	S. Newport	????	Dinamarca Canadá	Alfalfa	Semilla	Oregon Health Division, 1995 Aabo y Baggesen, 1997
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	>6,000	Japón	Rábano	Desconocido	Nat'l Inst. Infect. Dis. and Infect. Dis. Ctrl Div., Ministry of Health and Welfare of Japan, 1997
1997	S. Meleagridis	78	Canadá	Alfalfa	Semilla	Buck <i>et al.</i> , 1998
1997	<i>E. coli</i> O157:H7	126	Japón	Rábano	desconocido	Gutierrez, 1997

(Fuente: FDA, 1999)

## II.3 Mecanismos de internación de patógenos humanos a las plantas

### II.3.1 Internación

La flora nativa puede ganar cierta protección hacia el ambiente y contra el estrés antimicrobiano por interiorización en la planta (Fu *et al.*, 2003). La entrada puede ser pasiva a través de sitios tales como heridas o en áreas secundarias en la raíz o en los tricomas rotos, o por entradas naturales como estomas y lenticelas. Las entradas activas se deben a la acción de enzimas hidrolíticas bacterianas como pectinasas y celulasas que también pueden penetrar el lugar. Una vez dentro de la planta, las bacterias pueden residir en el tejido vascular, en espacios intracelulares en estado latente o pueden colonizar activamente los tejidos (Hallman *et al.*, 1997).

El gran brote acontecido en Japón en 1996 asociado al consumo de germinado de rábano por *E. coli* O157:H7 y los numerosos brotes asociados al consumo de germinados de alfalfa, han resultado ser objeto de investigación en las interacciones entre patógenos entéricos y semillas de germinados. La colonización interna de germinados de rábano por *E. coli* O157:H7 fue demostrada usando microscopia de fluorescencia y de barrido (Itoh *et al.*, 1998). Sin embargo, el objetivo principal de estas investigaciones fue conocer cual era el punto de entrada de las bacterias para albergarse en el interior de la plántula. El estudio de microscopia de barrido revela que *E. coli* O157:H7 se encontraba en los xilemas de los germinados de rábano y fue confirmado esterilizando la superficie y con tinciones *in situ* (Warriner *et al.*, 2003). Los investigadores sugieren que las bacterias pudieron haber entrado por grietas en la epidermis o fisuras en las raíces.

### **II.3.2 Tejido dañado.**

La sobrevivencia de *E. coli* y *S. entérica* por largos periodos en agua, composta y tierra indican la posibilidad de que las plantas puedan contaminarse en la pre-cosecha. Numerosos estudios han estado centrados en la habilidad de los patógenos para colonizar y llegar a internarse en cultivos de plantas como tomates, lechugas, germinados y espinacas (Fenlon *et al.*, 2000).

Estudios en manzana demostraron que la penetración por *E. coli* O157:H7 (70 µm) por debajo de la piel de la fruta en sitios alrededor de heridas por punción (Burnett, y Beuchat., 2000). En un experimento se observó la infiltración en pepinos con *E. coli* O157:H7 después de la inoculación en poros o heridas en la superficie. Los autores especulan que las superficies cerosas de los pepinos fueron una barrera contra la infiltración por *E. coli* O157:H7, pero las irregularidades en la superficie cerosa de los pepinos permitieron la adhesión y penetración por un gran número de bacterias (Han *et al.*, 2000).

### **II.4 Medidas para reducir la carga microbiana de los germinados.**

Se han evaluado una diversidad de tratamientos tanto químicos como físicos, con el propósito de eliminar diversos patógenos de los germinados obtenidos ya sea en el hogar o en la industria.

Desde que se conoce que la semilla es la principal fuente de contaminación, su tratamiento ha sido una prioridad. Debido a la capacidad de sobrevivencia de las bacterias de crecer rápidamente durante el proceso de germinación, la meta principal hace énfasis en eliminar completamente a cualquier patógeno presente en la semilla (Fett y Cooke., 2006).

#### **II.4.1 Tratamientos químicos.**

Además del uso de cloro [NaOCl y Ca(OCl<sub>2</sub>)], han sido probados antimicrobianos naturales y sintéticos como desinfectantes en las semillas, ácido acético, agua electrolizada ácida, ClO<sub>2</sub>, NaClO<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, ácido cítrico, agua ozonificada, fosfato trisódico, Tween 80 (Beuchat, 1997; Lang y Ingham, 2000; Kim y Lin, 2002; Bari *et al.*, 2003; Gandhi y Matthews, 2003). En todos los casos se ha reportado la disminución del patógeno sin eliminarlo por completo.

Se han realizado pretratamientos de semillas con surfactantes y adicionando germicidas a las soluciones de surfactantes, pero tampoco han tenido un efecto significativo, tan solo una mínima reducción de 1 Log o menos del patógeno. El uso de desinfectantes a altas temperaturas (55°C) con y sin sonicación permite incrementar su eficacia pero disminuye la tasa de germinación de semillas de alfalfa (Beuchat y Scouten, 2002). El remojo de semillas en agua con 20,000 ppm por una hora, incrementa la muerte del patógeno hasta 2 Log; sin embargo, se disminuye la tasa de germinación (Fett., 2002).

Agentes antimicrobianos como el cloro, peróxido de hidrogeno, ozono, fosfato de trisodio y ácido peracético todos han sido estudiados como desinfectantes en la pos cosecha para el uso de productos frescos (Adams y Hartley, 1989). Ninguno ha demostrado ser completamente efectivo para eliminar al patógeno. Investigaciones recientes han demostrado la habilidad de los patógenos entéricos para llegar a internarse en un gran numero de frutas y hortalizas (Buck *et al.*, 2003). Esta habilidad para infiltrarse en el tejido de la plántula es una de las grandes preocupaciones en la industria de los alimentos desde que los microorganismos están presentes en el interior de las estructuras de las plantas como protección de desinfectantes superficiales.

Nandiwada *et al.* (2004) trataron semillas de alfalfa inoculadas con *E. coli* O157:H7 con una bacteriocina (colcin HU195, tipo E2) en una concentración de 10,000 AU/g resultando en una reducción en niveles de más de 10<sup>5</sup> Log; desafortunadamente la bacteriocina resultó ser menos efectiva contra otras dos cepas de *E. coli* O157:H7. Los resultados subrayan el problema de las diferencias entre las

cepas es su susceptibilidad a las bacteriocinas, lo que constituye una restricción para el uso de bacteriocinas en general como antimicrobianos.

Existen escasos reportes sobre la combinación de tratamientos con germicidas químicos. Un tratamiento secuencial de semillas de alfalfa con  $\text{ClO}_2$  (25 mg/l; 5 min), agua ozonificada (14.3 mg/l; 3 min) y una suspensión de aceite de tomillo (5mL; 3 min) redujo de  $10^4$  a  $10^3$  Log los niveles de *E. coli* O157:H7. La combinación de germicidas fue mucho más efectiva que el empleo individual de cada componente. Un problema mayor es que tres días de germinación, las poblaciones del patógeno se elevaron a casi  $10^8$  Log UFC/g (Singh y Bhunia, 2003). A menos de que se pueda eliminar al patógeno, cada combinación de tratamientos resulta poco práctica para los productores. La comparación de la eficacia de los tratamientos químicos para la desinfección de semillas, es válida en el laboratorio, utilizando un solo protocolo de experimentación, pero la comparación de la eficacia entre laboratorios presenta problemas adicionales. Deben mencionarse las diferencias entre los lotes de semillas utilizados, incluyendo por ciento y severidad de los daños en las semillas, la metodología para la inoculación de semillas, condiciones de secado, almacenamiento y la población inicial del patógeno en la semilla, (Scouten y Becucaht, 2002). Es importante resaltar que pueden existir células dañadas que no reflejen la eficacia del tratamiento y sobre estimarlo.

#### **II.4.2 Tratamientos físicos.**

Se han probado diversos tratamientos de desinfección en germinados de semillas: agua caliente, calor seco, radiaciones gamma, presión hidrostática, luz U.V., radiofrecuencias de calor y ultrasonido (sonicación) (Maude, 1996). El empleo de agua caliente fue estudiado por primera vez por Jaquette *et al* (1996) encontraron que con un tratamiento de 5 minutos con agua caliente de 57 a 60 °C permitió una reducción de 2.5 Log en poblaciones de *S. entérica* en semillas de alfalfa inoculadas en el laboratorio, sin reducir la tasa de germinación. Sin embargo, un ligero incremento en la temperatura o prolongando el tiempo de contacto afectó significativamente la tasa de germinación. Enomoto (2004), estudió la eficacia de tratamientos con agua caliente

para eliminar una cepa no patógena de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en semilla de alfalfa, usando tres pasos: 30 min de remojo a 25°C, 9 segundos a 50°C y 9 segundos a 85°C; se alcanzó una reducción mayor a 10<sup>4</sup> Log sin afectar la tasa de germinación.

La exposición de semillas contaminadas con aproximadamente 260 UFC/g de *S. Stanley* a 54-71 °C por 5-10 minutos, redujo el número a 6-9 UFC/g; pero a 60 °C por 5 minutos no hubo una reducción notable. Los tratamientos por 10 minutos redujeron la viabilidad de las semillas entre 96 y 42-88%. Aunque los tratamientos de las semillas destruyen células de *S. Stanley*, el margen de operación es muy corto: 57°C a 60°C por 5 minutos. Temperaturas menores pueden quedar sin efecto, en tanto que más elevadas o mayores tiempos de exposición, es decir, más de 10 minutos disminuyen la tasa de germinación (Jaquette y Beuchat, 1996).

El empleo de tratamientos con agua caliente en germinados de semillas parece ser prometedor, si bien la aplicación en el comercio puede resultar problemática. Diversos estudios subrayan que existen diferencias en los niveles de tolerancia no solamente entre los tipos de semilla sino dentro de un lote de semillas, debido a la producción y almacenamiento al que son sometidos. Las semillas con bajo contenido de humedad son más resistentes al calor. Las que son almacenadas por largos períodos, aun en condiciones ideales (baja temperatura y humedad relativa) son afectadas por procesos de envejecimiento los cuales reducen su capacidad para resistir el estrés, incluyendo el calor (Fosberg, 2004)

Se ha evaluado el efecto de radiaciones ionizantes para eliminar patógenos como *Salmonella spp* y *Escherichia coli* O157:H7 en semillas y germinados de alfalfa. Se ha reportado la eliminación de *S. Tyhymurium* mediante radiaciones (0.5-2.0kGy) en semillas inoculadas para ser usadas en la obtención de germinados; sin embargo existe una disminución en la tasa de germinación y longitud de los germinados. La aplicación de radiaciones muestra que se pueden controlar las poblaciones de bacterias en las semillas, pero no de patógenos introducidos durante manejo ulterior (Saroj *et al.*, 2007).

Un problema con la aplicación comercial de radiaciones gamma para desinfectar semillas es que la dosis de absorbancia aplicada a las semillas es desigual, debido a los diferentes lugares en la cámara donde se aplica el tratamiento; es decir, la dosis absorbida por las semillas localizada cerca del exterior de la cámara es más alta que la dosis que es absorbida por las semillas localizadas en el centro de la cámara. De ahí que se recomienda aplicar las radiaciones en el producto final y no en las semillas.

Hay muy pocos estudios publicados en la combinación de tratamientos químicos y físicos para la desinfección de semillas. La combinación de dos o más germicidas puede tener diferentes modos de acción, lo que favorece la muerte del patógeno o bien como aditivo o sinérgico. Bari (2003), reportó que la combinación de tratamientos con calor seco (50°C; 1h), agua electrolizada caliente, y la sonicación reducen hasta 4.6 Log en semillas de frijol mungo, sin reducir la tasa de germinación o el promedio de la longitud del germinado en el 4to día de crecimiento.

Una buena alternativa sería implementar tratamientos durante el proceso de germinación para prevenir o inhibir el crecimiento de patógenos que sobreviven al tratamiento en semillas. Sin embargo, existe escasa literatura publicada en esta área.

Las biopelículas protegen a los patógenos de la actividad de germicidas. Mientras la contaminación de las semillas puede encontrarse en bajos niveles y dificultar su detección, los incrementos en las poblaciones de microorganismos son significativos durante el proceso de germinación (Jaquette *et al.*, 1996). Se han realizado estudios donde se recuperan niveles importantes de microorganismos en el agua de riego. Los recuentos de bacterias mesófilas y coliformes indican que el agua contiene al menos 90% de los microorganismos totales en el propio germinado. El efecto de los tratamientos germicidas durante la germinación sobre los niveles de patógenos en el agua de irrigación no se conoce. Si los germicidas eliminan a los patógenos en el agua de irrigación pero permite la sobrevivencia en el propio germinado, las pruebas en el agua de riego no tendrían sentido (Tortorello *et al.*, 2000)

### II.4.3 Biocontrol

Existen muy pocos estudios en la aplicación de control biológico como estrategia para controlar el crecimiento y sobrevivencia de patógenos en alimentos, incluyendo los germinados de semillas. En contraste, ha sido ampliamente estudiado como una medida para controlar enfermedades en plantas desde 1920 (Campbell, 2003) últimamente ha sido investigado el control biológico de patógenos humanos en pollos, cerdos, terneros, carne y productos lácteos (Breidt y Fleming, 1997; Nisbet, 2002; Tkalcic *et al.*, 2003). Para el control de patógenos humanos en alimento para animales o en alimentos para humanos, se han realizado estudios tanto con una sola cepa específica como en consorcios de cepas no definidas

Existen en el comercio diferentes formulaciones para controlar la colonización de *Salmonella* en pollos recién nacidos. Uno de ellos (PREEMPT), consiste en una mezcla de 29 diferentes cepas bacterianas aisladas del contenido intestinal de gallinas adultas (Charkowski *et al.*, 2001).

Diversos estudios han demostrado que patógenos humanos son buenos competidores en las superficies de los germinados y pueden incrementar en niveles significativos durante la germinación ya sea en semillas inoculadas o contaminadas naturalmente (Schoeller *et al.*, 2002). Sin embargo, la exclusión competitiva ocurre de manera natural, Castro y Fernández en el 2000, detectaron un escaso crecimiento de 1 Log UFC menos de patógenos inoculados en germinados en el 1er al 5to. Día de germinación.

Diversas bacterias lácticas aisladas de semillas de alfalfa y germinados demostraron ser altamente inhibitorias frente a *S. entérica*, *E.coli* O157:H7, y *L. monocytogenes* (Palmai y Buchanan, 2002); sin embargo, cuando una cepa de *Lactobacillus lactis* SP26 (que demostró tener capacidad inhibitoria) fue inoculada en semillas contaminadas con *L. monocytogenes*, al germinar la semilla sólo se redujo el crecimiento del patógeno 1 Log UFC (Palmai y Buchanan., 2002). Las bacterias lácticas no constituyen una porción significativa de la flora nativa de los germinados de semillas (Becker y Holzapfel., 1997), por esa razón probablemente no pueda competir o exhibir

un efecto antimicrobiano significativo contra patógenos durante la obtención del germinado.

La prueba de que la exclusión competitiva puede ser una intervención viable contra el crecimiento de *Salmonella* en germinados comenzó con el trabajo realizado por Matos, Garland y Fett (2002). Adicionaron una cepa de *Pseudomonas fluorescens* 2-79 durante el remojo de semillas en una suspensión bacteriana de la cepa en una concentración de 8 Log UFC/mL. Se redujeron 4 Log las poblaciones de *Salmonella* en el 1er. y 4to día de germinación. Las poblaciones de microorganismos aisladas de germinado de alfalfa comprado en el supermercado y adicionadas al agua de remojo de las semillas no fueron tan efectivas en la reducción del crecimiento de *Salmonella* en los días 1 y 3 de la germinación; sin embargo, mostraron grandes reducciones en el séptimo día. No se presentó algún efecto adverso en la apariencia del germinado con la cepa de *Pseudomonas*.

### **II.2.5 Reducción de riesgos asociados al consumo de germinados.**

Debido a que los microorganismos presentan gran capacidad para desarrollar durante la germinación, deben tomarse medidas que impidan la contaminación antes y durante la germinación. Se sabe que la mayoría de brotes de enfermedad asociados al consumo de germinados fueron ocasionados por el uso de semillas contaminadas. Sin embargo, los patógenos pueden ingresar a través del agua del riego, equipo o manipulación de los trabajadores los cuales pueden ser un riesgo a pesar de que la semilla no este contaminada. Es importante reconocer que puede ocurrir la entrada de patógenos a la planta. Por lo tanto, además de aplicar buenas prácticas sanitarias de agricultura en la producción de semillas también deben aplicarse durante el proceso de germinación, cosecha y empaado (FDA, 2000). Los productores pueden implementar tales prácticas en base a sus propias facilidades, implementar programas de desinfección de semillas, muestreo y análisis de patógenos durante la producción de germinados para asegurar la inocuidad de su producto. La inocuidad de los germinados es un reto que requiere de sistemas complementarios de reducción de riesgos (FDA, 2004).

### **II.2.6 Prácticas sanitarias de agricultura.**

Las semillas usadas en la producción de germinados, generalmente no están destinadas para consumo humano, son producidas para pastura, generalmente como cualquier tipo de producto fresco (lechugas, jitomates, brócoli, etc) que son expuestos a contaminación fecal a través del viento, animales domésticos, composta y tierra. Las semillas destinadas a la obtención de germinados para consumo humano, y el propio proceso es regulado por la FDA en E.E.U.U. (FDA, 1989).

El propósito de las prácticas sanitarias de agricultura consiste en minimizar la probabilidad de contaminación por patógenos. Los agricultores deben adoptar este compendio de medidas, durante la germinación, cosecha y empaqueo. Entre las recomendaciones destaca el uso de composta y biosólidos tratados, la calidad del agua, la higiene del trabajador y el control de plagas en el empaque y la distribución. Debe considerarse la eventualidad de contaminación cruzada por uso de equipo con semillas contaminadas. Todo el equipo debe ser lavado y desinfectado para cada lote de producción (FDA, 1998).

Aun si las semillas son producidas siguiendo los lineamientos de las prácticas sanitarias de agricultura, la mezcla de lotes de semillas constituye un riesgo de contaminación relevante. La rastreabilidad de los lotes implicados está reconocida como una estrategia importante para la reducción de riesgos y es un complemento válido para las prácticas sanitarias de agricultura (FDA, 2004).

### **II.2.7 Prácticas sanitarias de manufactura**

La industria de los alimentos está obligada a aplicar prácticas sanitarias de manufactura que incluyen la producción, empaqueo y comercialización de alimentos. Se incluyen operaciones de desinfección, mantenimiento de equipo, protección contra la contaminación y control durante el procesamiento, almacenamiento y distribución (FDA, 2004).

La FDA hace dos recomendaciones adicionales: 1) el uso de un tratamiento aprobado para reducir los patógenos en las semillas antes de la germinación, 2) análisis de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 de cada lote de producción.

El germinado de semillas como se ha mencionado mantiene de condiciones favorables que elevan la población de microorganismos nativos o contaminantes. La contaminación suele presentarse de manera esporádica y en bajos niveles.

Los productores de germinados han integrado el enfoque de reducción de riesgos que no solo involucra la desinfección de semillas y detección de patógenos en el agua de riego sino también el uso de semillas certificadas. La aceptación de semillas preferentemente para la producción de germinados sería determinada por la inspección de embarques de semillas para poder evidenciar los lotes de semillas contaminadas. La integración de todas estas medidas son la mejor opción disponible para reducir los riesgos microbiológicos asociados germinados de semillas (FDA, 2004).

### III OBJETIVOS

#### III. 1 OBJETIVO GENERAL

Abatir el desarrollo de *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa por efecto de la incorporación de suspensiones de bacterias antagonistas.

#### III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el contenido microbiano de germinado de alfalfa comercial.
- 2) Aislar cepas de bacterias nativas de tierra, hortalizas y otros ambientes en los que suelen ocurrir de manera natural procesos de antagonismo microbiano.
- 3) Valorar la capacidad antagónica de las cepas aisladas contra *Salmonella* en medios de cultivo.
- 4) Obtener un modelo de geminación para las semillas en el laboratorio en el cual se puedan realizar estudios de antagonismo bacteriano.
- 5) Determinar los cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación desde la semilla hasta la cosecha.
- 6) Evaluar la influencia de la concentración relativa de los *Salmonella* y los antagonistas adicionados al modelo de germinación.

## IV MATERIALES Y METODOS

### IV.1 Materiales

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)

Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)

Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)

Bolsas de poli-papel en rollo sin marca comercial diferentes tamaños

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Centrifuga de mesa (HermLe)

Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)

Homogenizador (Stomacher, Seward 400)

Horno para esterilización (Shel-lab)

Incubadora de 35° (Precision Scientific, Seward 400)

Incubadora de 30° (Precision Scientific, Seward 400)

Microscopio luminoso (Leica)

Potenciómetro óptico (Jenway), modelo 3510

Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)

Micropipetas 2-1000 µl (Labsystems)

#### IV.1.1 Medios de cultivo

Agar Base Sangre (ABS), (BD Bioxon)

Agar rojo violeta bilis con 1% glucosa (ARVBG), (BD Bioxon)

Agar sulfito bismuto (ASB), (BD Bioxon)

Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), (BD Bioxon)

Agar soya tripticasa (AST), (BD Bioxon)

Agar hierro y triple azúcar (TSI), (BD Bioxon)

Agar hierro lisina (LIA), (BD Bioxon).

Agar Pseudomonas F

Caldo tetrionato (CTT), (BD Bioxon)

Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV), (BD Bioxon)

Caldo soya tripticasa (CST), (BD Bioxon)

Caldo urea, (BD Bioxon)

#### **IV.1.2 Soluciones**

Diluyente de peptona 0.1% (DP) (Peptona de caseína, BD Bioxon)

Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (cloruro de sodio, Productos Químicos Monterrey

#### **IV.1.3 Reactivos y colorantes**

Coloración de Gram (cristal violeta, safranina, lugol, alcohol etílico 95%), (Sigma Chemical Co.)

Rojo de metilo, (Sigma Chemical Co.)

Antisuero polivalente A-I y Vi para *Salmonella* (DIFCO).

#### **IV.1.4 Material biológico.**

*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

*Salmonella* Agona. Procedente del cepario de la UAQ.

*Salmonella* Montevideo. Procedente del cepario de la UAQ

*Salmonella* aislada de composta (empresa de pepino orgánico).

*Salmonella* aislada de germinado comercial.

**Semilla de alfalfa** obtenida en Querétaro. (cv. 'San Miguelito')

**Germinado de alfalfa** comprado en mercados públicos y supermercados de la Ciudad de Querétaro.

## IV.2 Métodos.

### IV.2.1 Determinar el contenido microbiano de germinado de alfalfa comercial

Se estudió el contenido de 5 grupos microbianos y la presencia de *Salmonella* en 46 muestras de germinado comercial proveniente de: mercados públicos, supermercados y restaurantes de la ciudad de Querétaro, a lo largo de 3 meses.

Preparación de la muestra:

Porciones de 10 g de germinado se homogenizaron en estomaquer a velocidad media por un minuto con 90 mL de DP al 0.1%, la suspensión se utilizó para el recuento de los siguientes microorganismos (Figura 2):

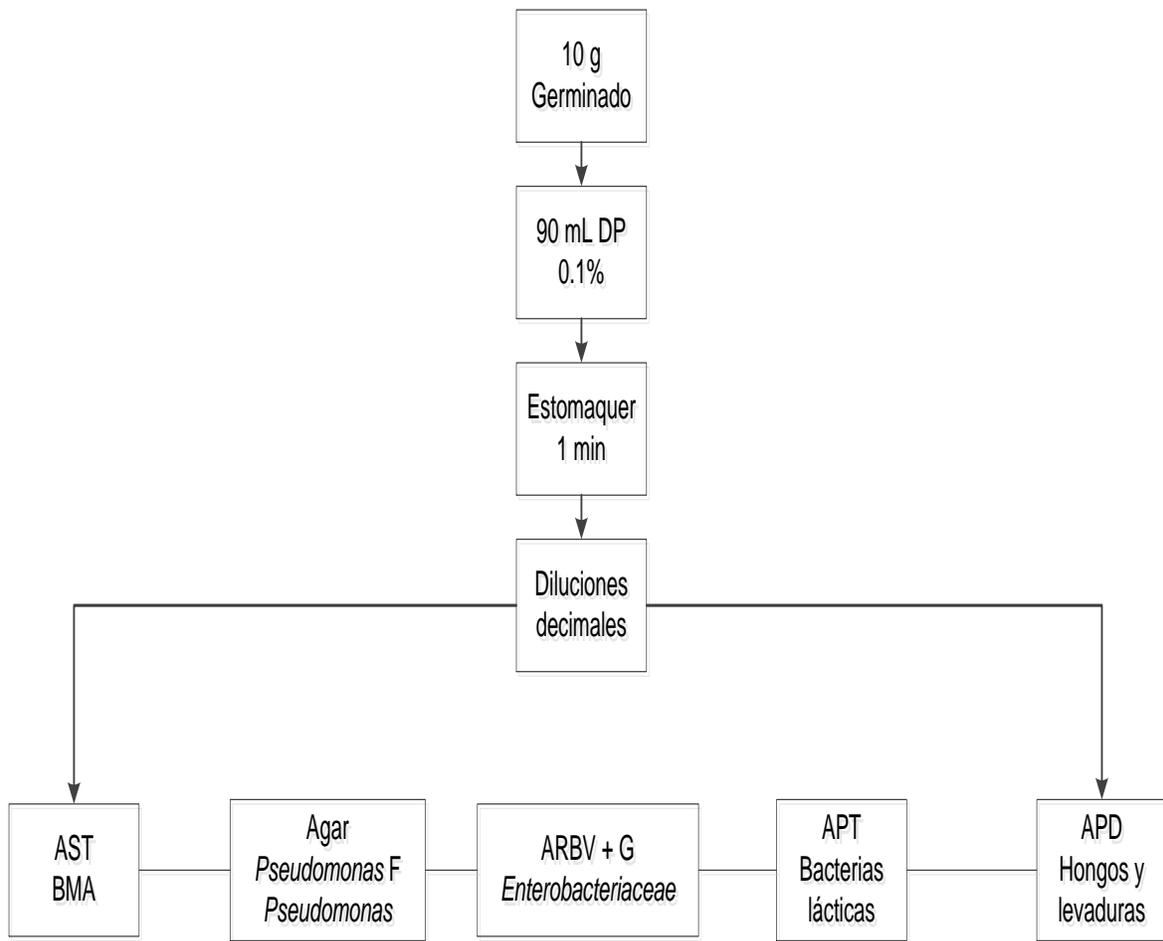
a) Bacterias mesófilas aerobias. (BMA) (Peeler y Maturin, 1992). Técnica de vaciado en placa utilizando AST a 22°C/48h.

b) *Enterobacteriaceae* (Kornacki y Johnson, 2001). Técnica de vaciado en placa con bicapa, utilizando ARVB con 1% de glucosa a 35°C/48 h.

c) Bacterias lácticas. (Vedamuthu *et al.*, 1992). Técnica de extensión en superficie en placas con APT a 30°C/48h.

d) *Pseudomonas*. (Stefanova *et al.*, 1990).Técnica de extensión en superficie en placas con agar *Pseudomonas* F.

e) Hongos y levaduras (Pitt y Hocking, 1997). Técnica de vaciado en placa utilizando APD e incubado a 22°C/3-5 días. A 100 mL de agar temperado a 45°C se adicionó 1mL de solución de ampicilina 0.2 % y 0.5 mL de una solución de rosa de bengala al 0.6% con el propósito de inhibir el desarrollo bacteriano y la extensión del micelio de los hongos respectivamente (Mislivec *et al.*, 1992).



**Figura 2.** Estudio de 5 grupos microbianos en germinado de alfalfa comercial.

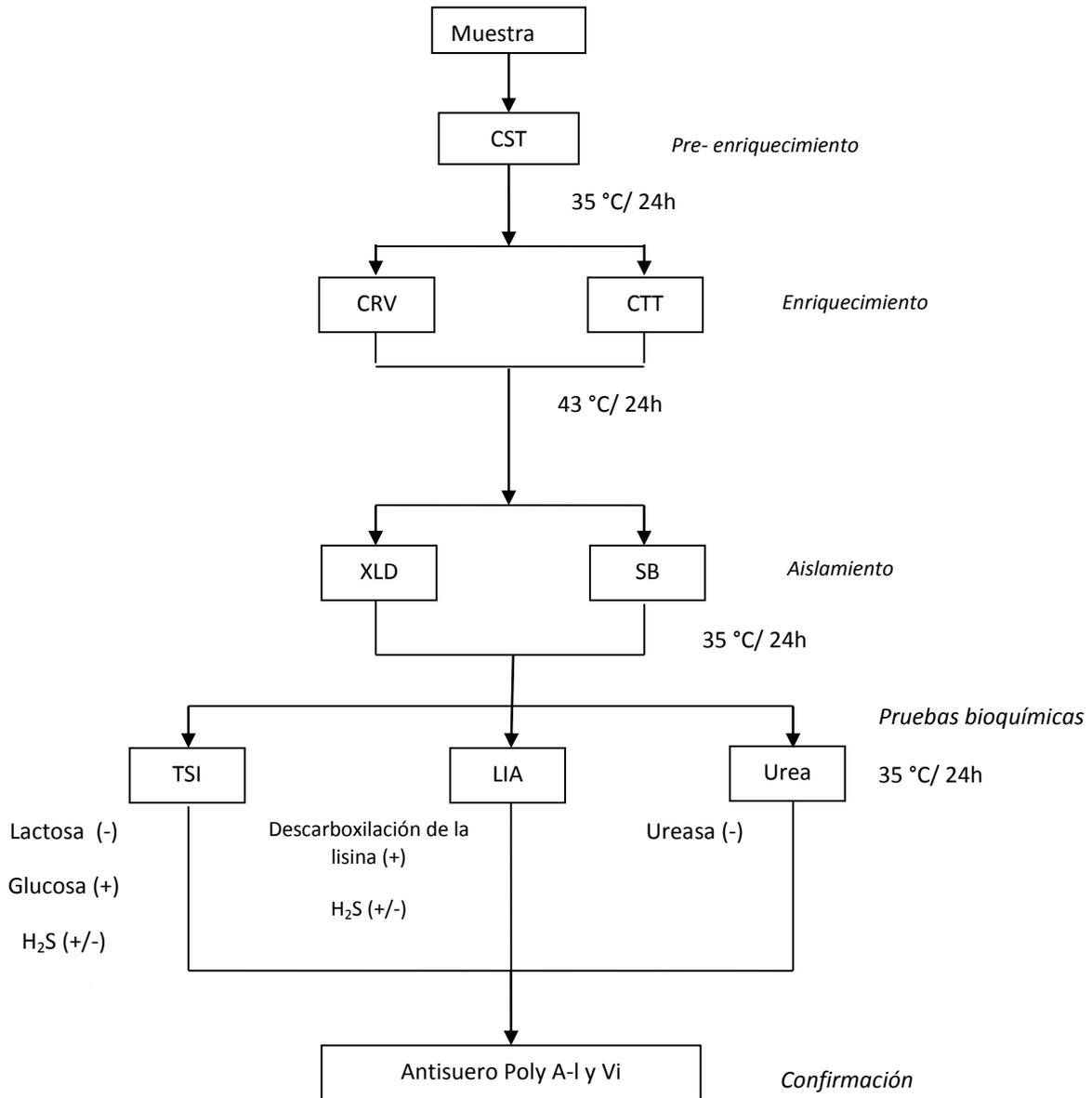
## Detección y cuantificación de *Salmonella*.

Se siguió la técnica tradicional de Flowers *et al.*, 1992. Se pesaron 25 g de muestra se preenriquecieron en CST por 24h, seguido del enriquecimiento en caldos CTT y CRV a 43°C/ 24h y el aislamiento se consiguió en medios de XLD y SB. Se seleccionaron colonias con morfología típica, para realizar pruebas bioquímicas (Edwards y Ewing, 1972; Koneman *et al.*, 1983)

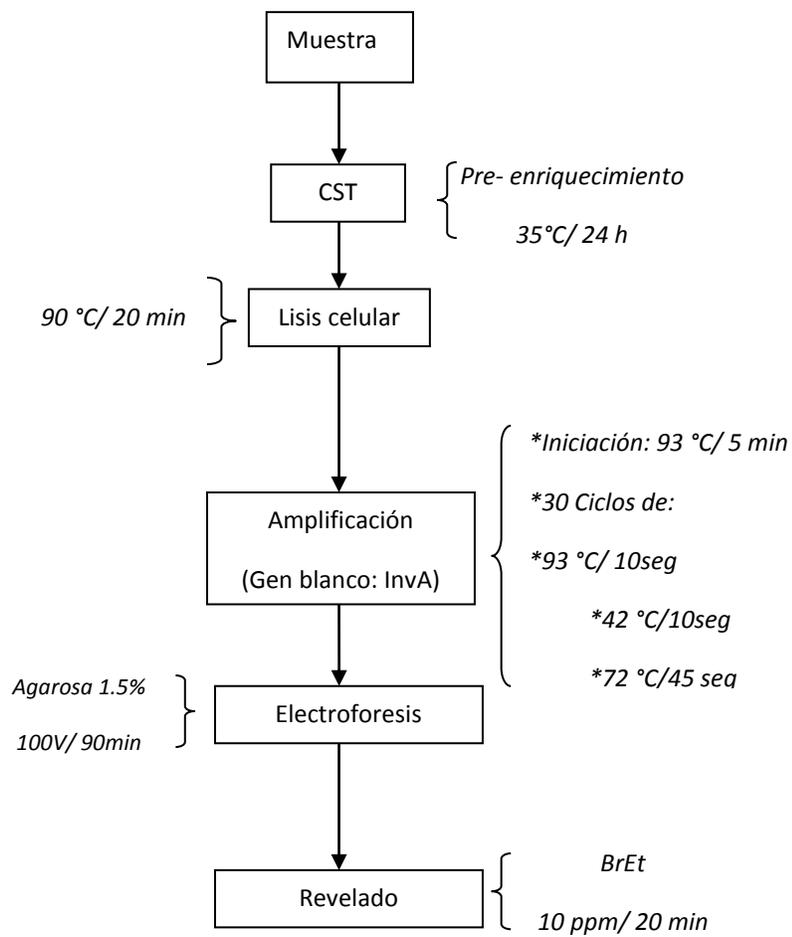
- Fermentación de lactosa TSI.
- Descarboxilación de lisina y arginina LIA.
- Utilización de urea (caldo urea).

Las cepas con patrón de cultivo y bioquímico de *Salmonella* se confirmaron mediante aglutinación con antisuero poly A I & Vi Difco™ (Figura 3).

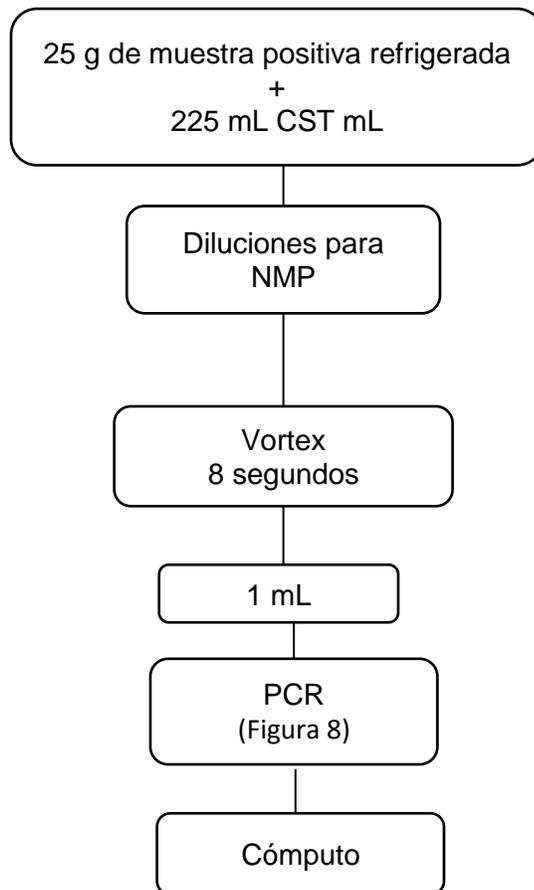
De manera concurrente con esta técnica, se refrigeró (previo a la incubación), la muestra en el caldo de preenriquecimiento. A partir de las muestras positivas se efectuó el recuento del patógeno por la técnica de NMP (Swanson *et al.*, 2001) (Figura 5) confirmando los tubos mediante la prueba molecular (PCR) Figura 4.



**Figura 3.** Técnica para la detección de *Salmonella*.



**Figura 4.** Detección de *Salmonella* sp mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Liu *et al.*, 2002).



**Figura 5** Cuantificación de *Salmonella*.

#### **IV.2.2 Aislamiento de cepas de bacterias nativas de tierra, hortalizas y otros ambientes en los que suelen ocurrir de manera natural procesos de antagonismo microbiano**

Se estudiaron diferentes fuentes de microorganismos con potencial antagónico:

- Semillas (amaranto, alfalfa y trigo), hortalizas (brócoli, jitomate, zanahoria) adquiridas de mercados públicos.
- Tierra, composta (adquiridas de una huerta de hortalizas).
- Materia fecal (obtenidas de lactantes sanos) y exudado vaginal (de mujeres jóvenes sanas). En total 10 muestras de cada uno.

##### **Preparación de las muestras.**

En cada muestra se realizó un enjuague con DP al 0.1% para desprender la flora nativa que contenían.

##### **Hortalizas.**

Cada unidad se colocó en bolsa de plástico con 90mL DP al 0.1% y fue frotada por un minuto.

##### **Semillas, tierra y composta.**

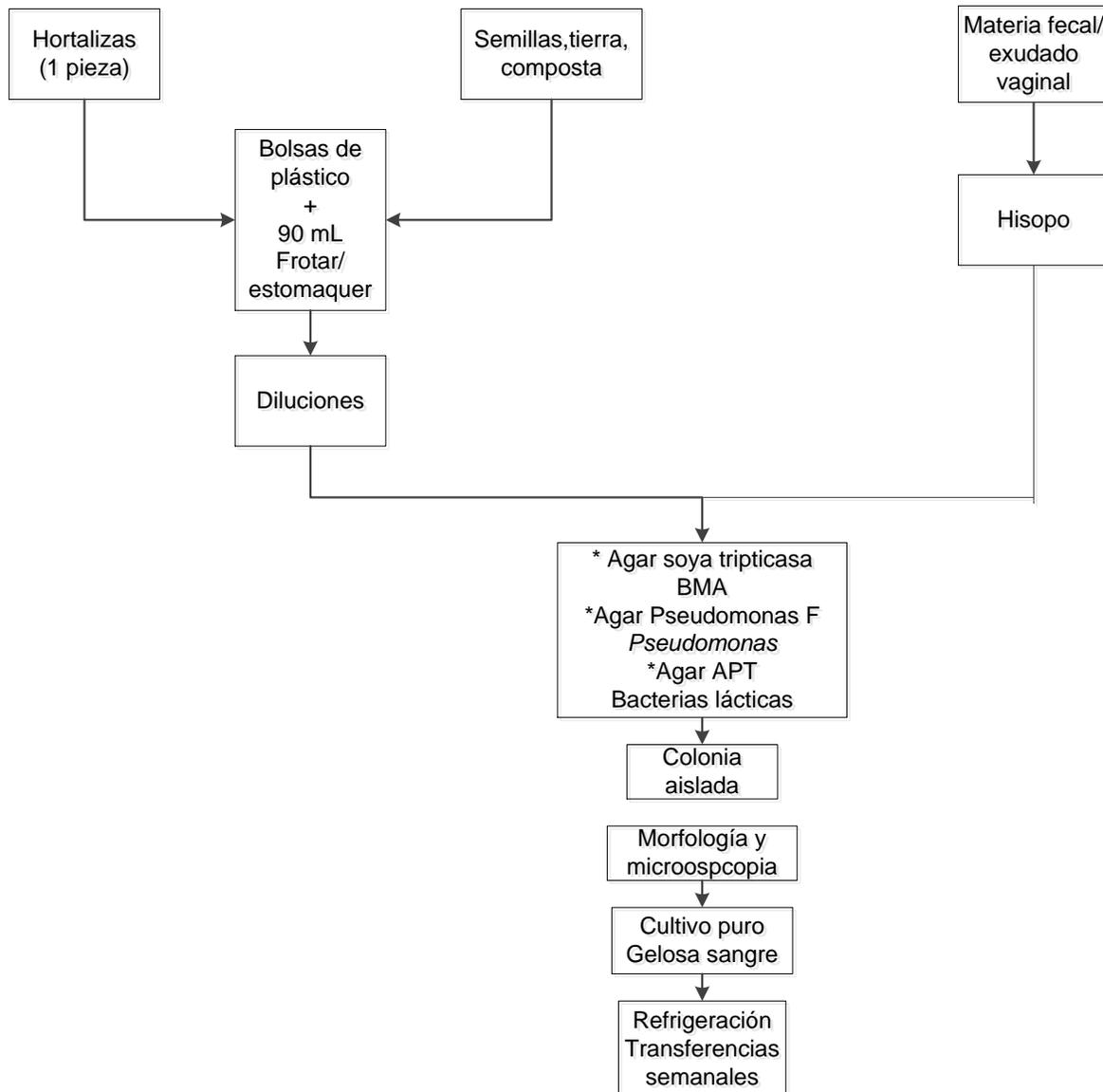
Se pesaron de cada muestra 10 g, se colocaron en bolsas de plástico con 90 mL de DP al 0.1% y se homogenizaron en el estomaquer por un minuto.

Con las suspensiones de cada enjuague, se prepararon diluciones decimales y se inocularon en diferentes medios de cultivo: AST (BMA, Peeler y Maturin, 1992), APT (bacterias lácticas, Vedamuthu et., 1992), Pseudomonas F (*Pseudomonas*, Mohan & Schaad, 1987).

##### **Materia fecal de lactante y exudados vaginales.**

La muestra fue tomada con un hispo; posteriormente se sembraron en los medios de cultivo mencionados a excepción del medio Pseudomonas F.

Después de 24h/35°C se transfirieron colonias aisladas al medio de AST y se reincubaron a 35°C/24 h .Mediante tinción de Gram se confirmó su pureza al microscopio. Se conservaron en refrigeración en gelosa sangre con transferencias semanales (Figura 6).



**Figura 6.** Aislamiento y conservación de cepas para estudio de antagonismo.

### **IV.2.3 Valoración de la capacidad antagónica de las cepas aisladas contra *Salmonella* en medios de cultivo**

Se realizó un ensayo de antagonismo mediante la técnica del botón (Fernández Escartín, 1984) para detectar cualquier efecto inhibitorio de cada cepa de microorganismo antagonista contra *Salmonella*.

- a) Se prepararon cultivos individuales de los 5 serotipos de *Salmonella* mencionados anteriormente así como de los microorganismos potencialmente antagónicos en tubos con caldo soya tripticasa (CST). Todos fueron incubados a 35°C/18h.
- b) A partir de los cultivos frescos se prepararon suspensiones que contenían  $10^9, 10^8, 10^7$  UFC/mL del microorganismo potencialmente antagonista y  $10^5$  y  $10^4$  UFC/mL del patógeno.
- c) Con las suspensiones de los microorganismos potencialmente antagónicos, por separado se inocularon 5  $\mu$ L de cada una en tubos con 10 mL de agar soya tripticasa (AST) fundido y temperado a 45°C, se homogenizó en vortex por 10 segundos, se vertió en cajas Petri y se dejó solidificar en la campana de flujo laminar.
- d) Una vez solidificado el medio, se depositaron en áreas separadas 5 $\mu$ L de las concentraciones de  $10^5$  y  $10^4$  UFC/mL del patógeno y se dejaron secar por 15 minutos en campana de flujo laminar.

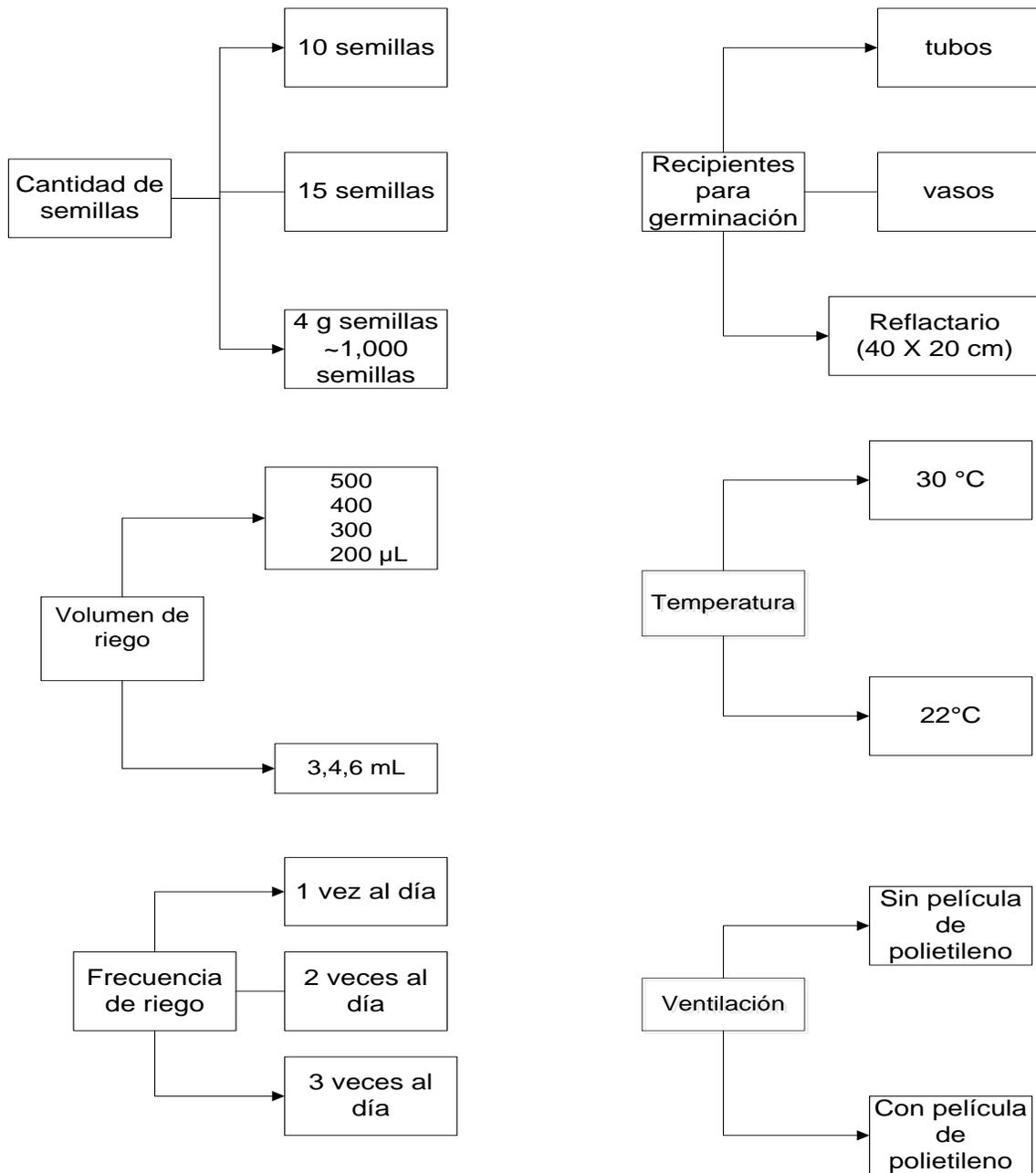
Se incluyeron placas control inoculadas únicamente con el patógeno. Después de 24 h a 35°C se estimó visualmente el grado de inhibición del desarrollo del patógeno en relación con las placas control y se reportó en cruces de acuerdo a la siguiente escala (Cuadro 4)

Clave	% aproximado de inhibición
++++	100
+++	75-99
++	50-74
+	25-49
+/-	<25
-	0

**Cuadro 4** Estimación de la actividad inhibitoria del patógeno.

#### IV.2.4 Obtención de un modelo de germinación para las semillas en el laboratorio en cual se puedan realizar estudios de antagonismo bacteriano

Se estudió el crecimiento del germinado por influencia de diferentes factores como:

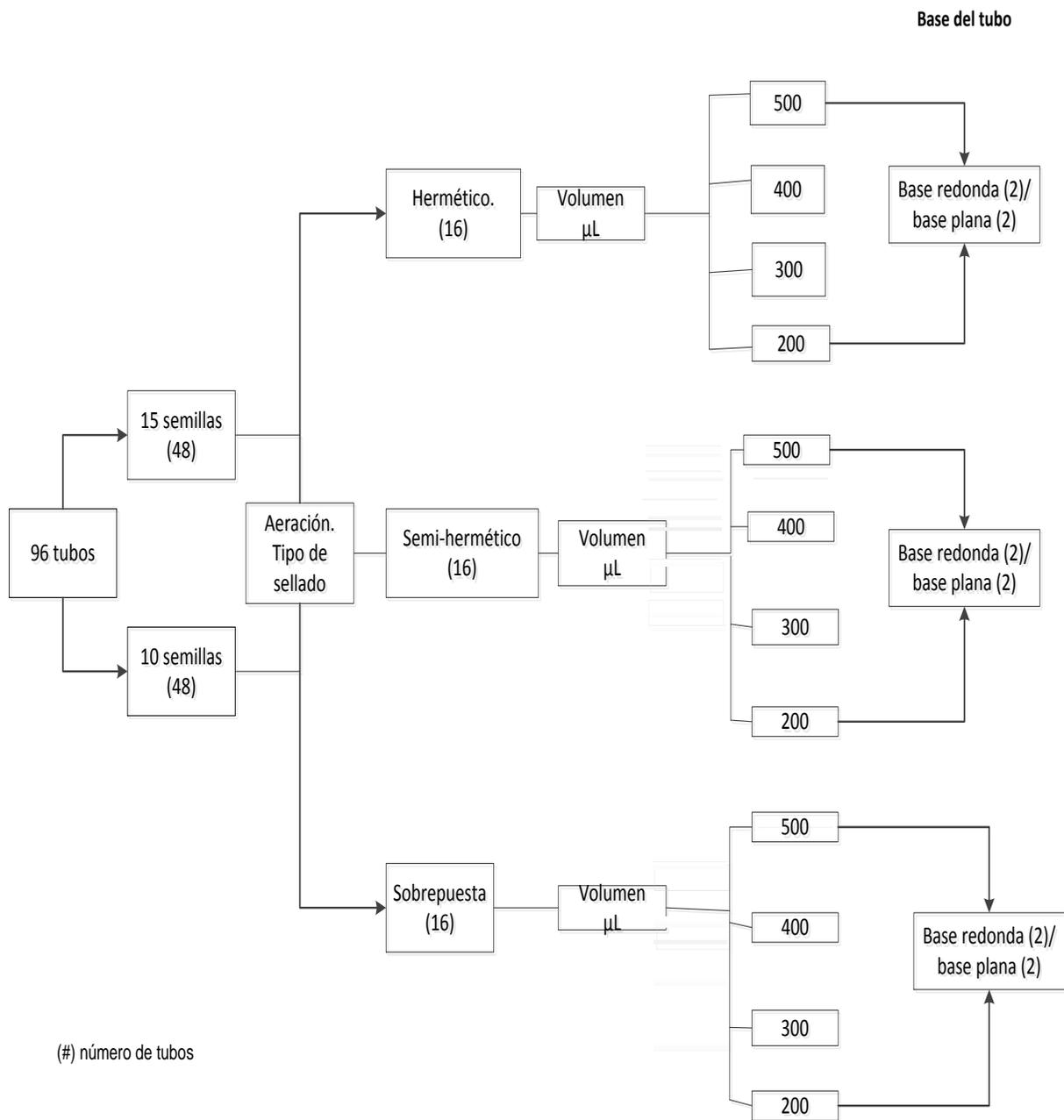


### **Crecimiento de germinado en tubo.**

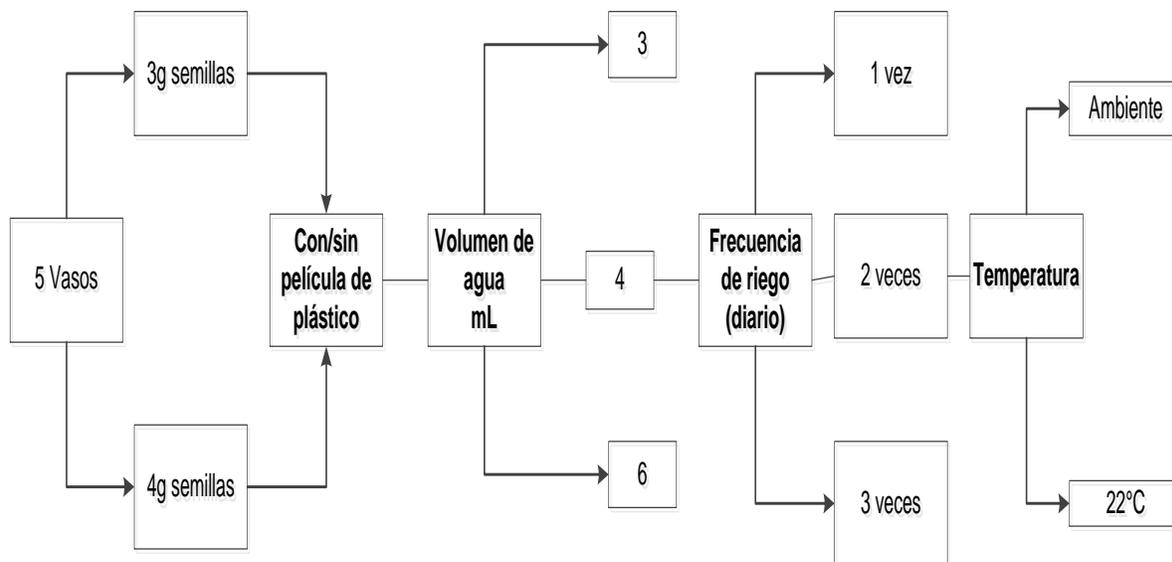
Se colocaron 96 tubos en total distribuidos en dos partes iguales, cada una con 15 y 10 semillas respectivamente y se observó el efecto de cada tratamiento sobre el crecimiento del germinado bajo diferentes condiciones: aeración (tapa de rosca sellada herméticamente (cerrado completo), sobrepuesta y semi-herméticamente volumen de agua (500,400, 300, 200  $\mu$ L), base del tubo (plana y redonda), temperatura 22°C (Figura 7).

### **Crecimiento de germinado en vaso.**

Se colocaron 10 vasos de plástico en total con diámetro=9cm y altura=8.5 cm. Se observó el crecimiento de 3g y 4 g de semilla bajo las siguientes condiciones: aireación (con y sin película de plástico), volumen de riego (3, 4, 6 mL), frecuencia de riego (1, 2, 3 veces al día), temperatura (ambiente y 22°C) Figura 8.



**Figura 7.** Variables de estudio para la obtención de germinado de alfalfa en tubos.



**Figura 8.** Variables de estudio para la obtención de germinado en vaso.

Se hizo una selección de proveedor de semillas para los ulteriores experimentos con el objetivo de descartar aquellos con mayor variabilidad. En total se estudiaron 5 lotes de diferentes proveedores.

Los criterios de selección fueron:

- 1) Fertilidad: Se determinó de acuerdo con el porcentaje de germinación:

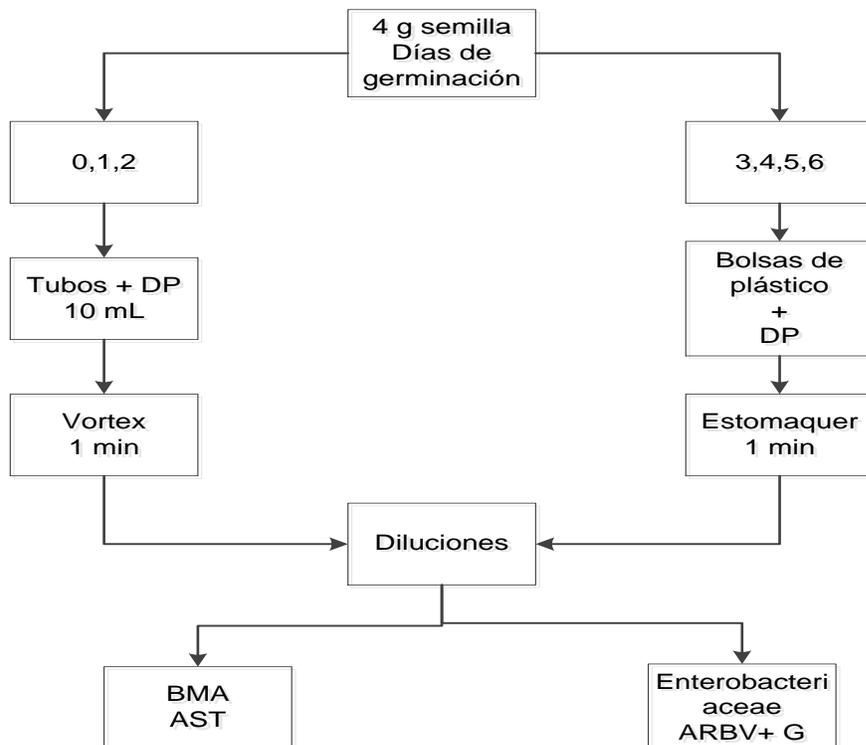
Clave	% de germinación
+	0
++	10-40
+++	50-70
++++	80-100

- 2) Talla de la plántula: Se midió el crecimiento diario de la plántula hasta el 6to. día, aproximadamente 5-6cm (Nieto R., 2005)
- 3) Contenido microbiano: Se incluyeron BMA. (Peeler y Maturin, 1992) y *Enterobacteriaceae* (Kornacki y Johnson, 2001) de cada lote para seleccionar el que presentara la menor carga microbiana (Figura 9), y la ausencia de *Salmonella*.

Preparación de la muestra.

Se estudiaron 4 g de semillas o sus germinados como unidad experimental desde el 0 hasta el sexto día de germinación. Se muestreó el crecimiento de la plántula los días 0,1 y 2 retirándolo con espátula estéril. Se transfirieron a tubos con 10 mL de diluyente de peptona, se homogenizaron en vortex por un minuto y se prepararon las diluciones correspondientes. Los días restantes (3, 4, 5 y 6) se tomó con guante estéril el germinado de cada unidad experimental, escurriendo el exceso de agua sobre gasa estéril y transfiriéndolo a una bolsa de plástico.

Se pesó el material y finalmente se agregó diluyente de peptona de manera que se mantuviera la relación de 4g/10mL y se realizaron las diluciones correspondientes. Se utilizó la técnica de vertido en placa empleando los medios de cultivo de AST y ARBV+G, incubados a 22°C/48h.



**Figura 9.** Contenido de BMA y *Enterobacteriaceae* en lotes de semillas durante su germinación.

Detección de *Salmonella* en semillas.

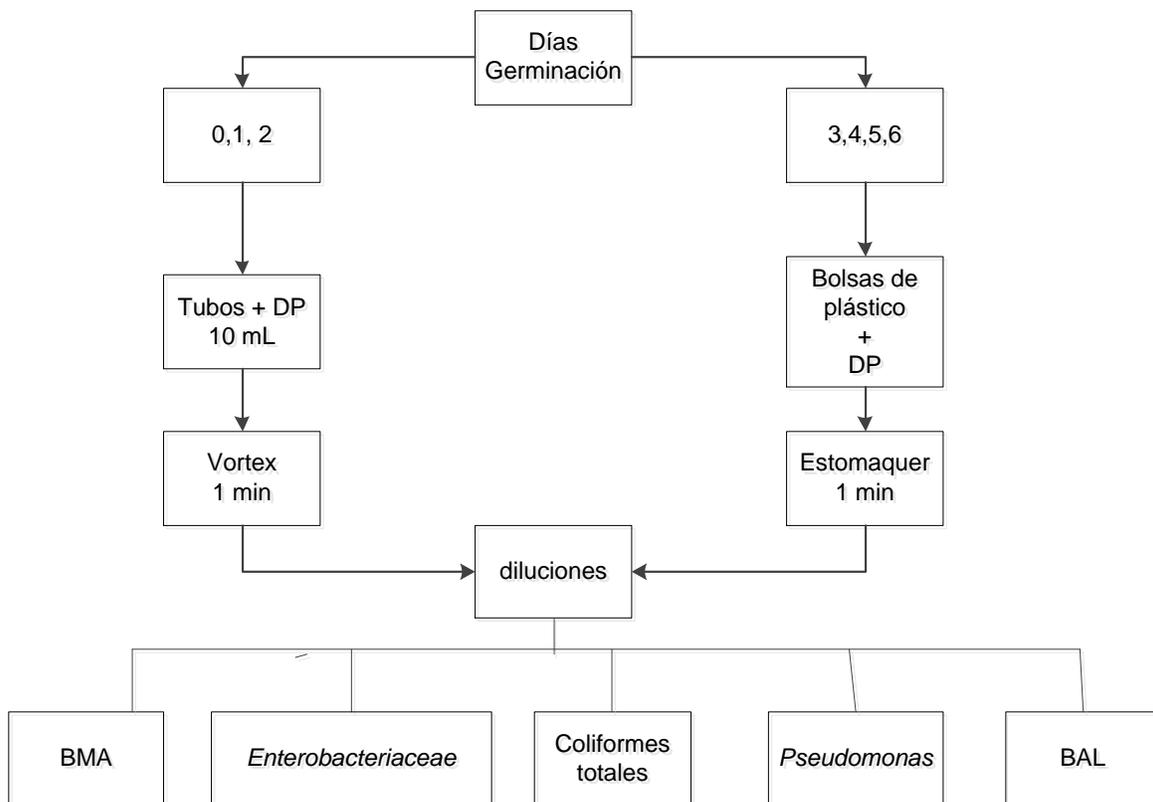
Se siguió la metodología mencionada en la página 5.

#### IV.2.5 Determinación de los cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación desde la semilla hasta la cosecha

Se estudiaron los cambios cuantitativos de 5 grupos microbianos: BMA, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, bacterias lácticas y coliformes totales\* (Figura 10). durante el proceso de germinación desde la semilla misma hasta el 6to. día de germinación, aplicando las mismas técnicas de recuento para cada microorganismo mencionadas en la página 34:

- \* Coliformes totales (Hitchins *et al.*, 1992). Recuento por la técnica de vaciado en placa en ARVB a 35°C/24h.

Se utilizó la misma metodología para la preparación de las muestras descrita en las páginas 48 y 49.



**Figura 10.** Estudio de cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación.

#### **IV.2.6 Evaluación de la influencia de la concentración de *Salmonella* y los antagonistas adicionados al modelo de germinación**

Para alcanzar este objetivo fue necesario realizar los siguientes estudios:

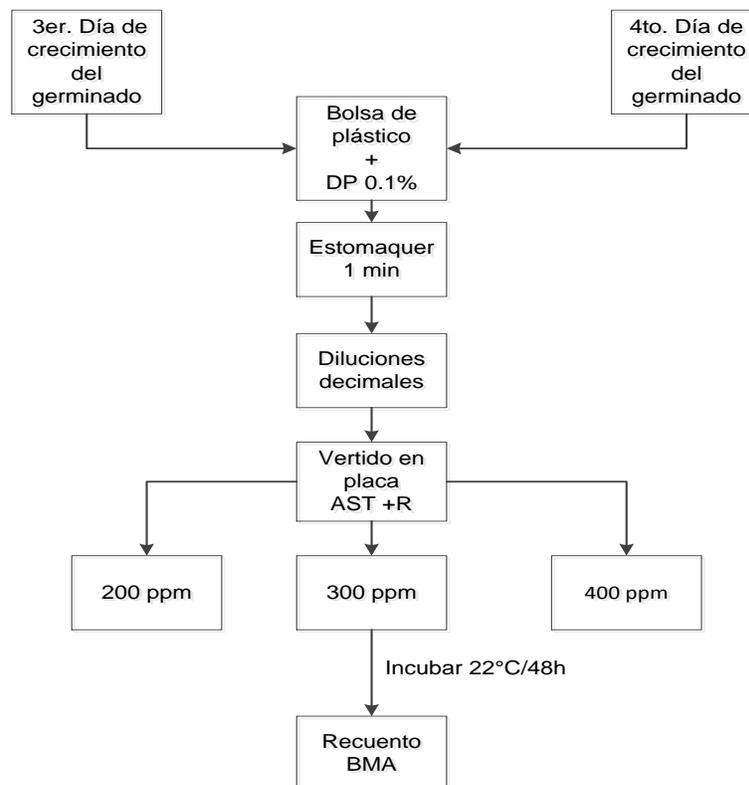
- a) Obtención y selección de cepa resistente a rifampicina.
- b) Efecto de la concentración de rifampicina sobre el contenido de BMA al 3er y 4to día de crecimiento del germinado de alfalfa
- c) Recuperación de *Salmonella* en diferentes medios de cultivo adicionados de rifampicina
- d) Comportamiento de *Salmonella* en extracto de germinado.
- e) Comportamiento de *Salmonella* durante la germinación.

##### **a) Obtención y selección de cepa resistente a rifampicina**

Preparación del inóculo: se utilizó una mezcla de *Salmonella* (Typhimurium, Montevideo, Agona, una de serovar desconocido y una cepa aislada del propio germinado comercial). Todas resistentes a rifampicina (Kaspar y Tamplin, 1993). Un cultivo de 18 h desarrollado a 35°C en CST, se centrifugó y se suspendió en SSI a una concentración final estimada de  $10^9$  UFC/mL. Mediante extensión por superficie se inocularon 100µL de la suspensión en AST con rifampicina (AST+R 100 ppm) y se incubó a 35°C/48-72h. Las colonias desarrolladas se estriaron en cajas con AST +R y se conservaron en refrigeración (4-7°C). La activación de cada cepa se realizó transfiriendo una asada de cada cepa a CST suplementado con rifampicina (100 ppm) seguido de incubación a 35°C por 24 h. Se efectuaron dos transferencias sucesivas cada una de 24 h y a las 18-20 h de incubación del último cultivo las células se centrifugaron a 4500 X g/15 min en S.S.I. (dos lavados), se resuspendió en S.S.I. y finalmente se mezclaron las 5 cepas en un tubo estéril.

**b) Efecto de la concentración de rifampicina sobre el contenido de BMA al 3er y 4to día de crecimiento del germinado de alfalfa**

Se retiró de los vasos el germinado con 3 y 4 días de germinación, se escurrió el exceso de agua sobre gasa estéril y se transfirió en bolsas de plástico. Se pesó el material y se agregó diluyente de peptona en una relación de 4g/10 mL. Se homogenizó cada muestra en el estomaquer por un minuto y se efectuó el recuento de BMA mediante la técnica de vertido en placa por duplicado en placas de AST más rifampicina en concentraciones de 200, 300 y 400 ppm respectivamente (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de rifampicina sobre el contenido de BMA en el crecimiento de germinado de alfalfa

**c) Efecto de la rifampicina adicionada en diferentes medios de cultivo sobre *Salmonella* inoculada en extracto de germinado de alfalfa**

Obtención del extracto.

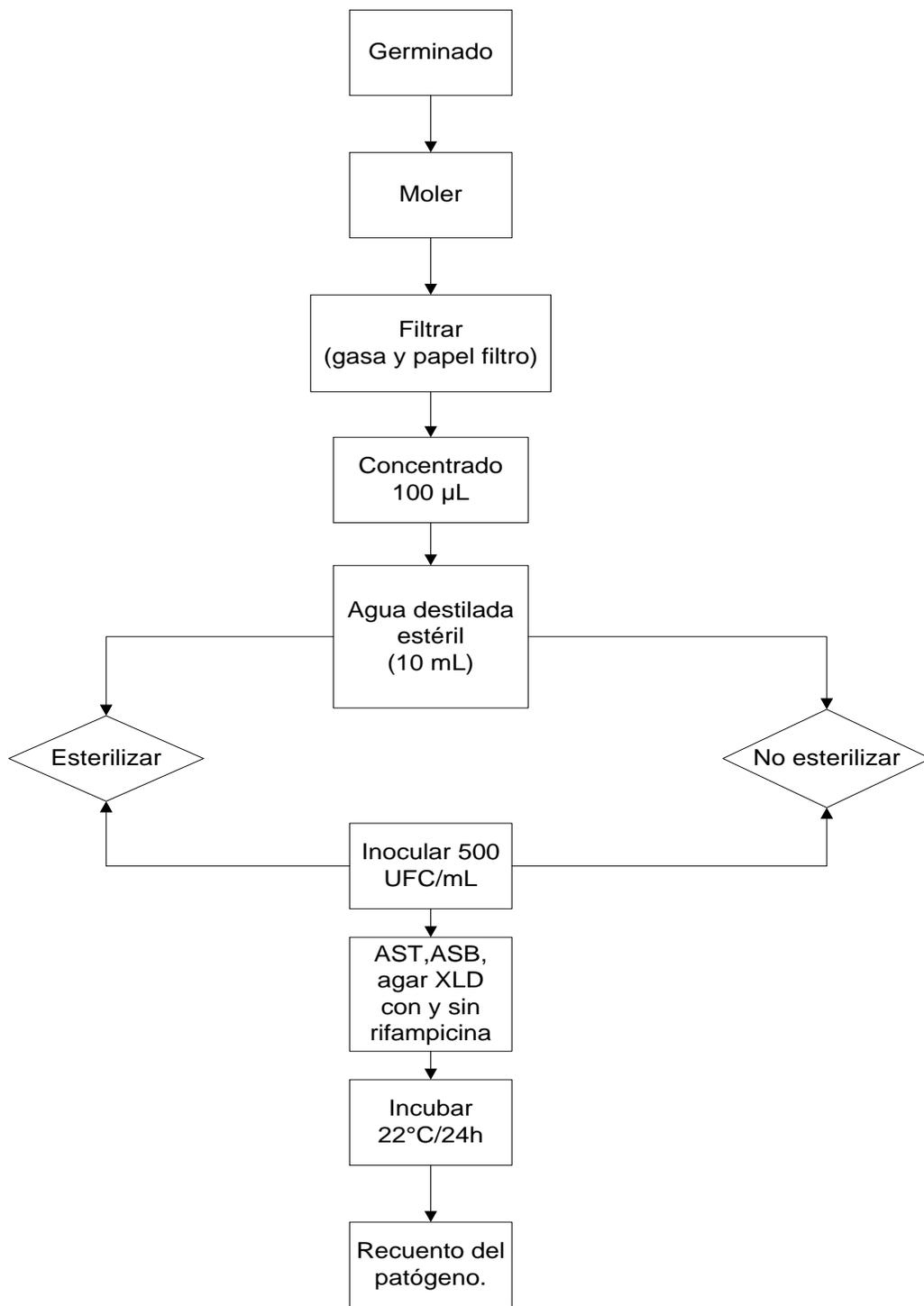
Se molieron 2 gramos de germinado de alfalfa comercial en mortero estéril y se filtro a través de gasa y papel filtro estéril. Del concentrado obtenido se agregaron 100µL a cada uno de los 6 tubos que contenían 10 mL de agua destilada estéril; tres de ellos se esterilizaron en autoclave a 121°C/15 min.

Inoculación del patógeno.

La mezcla de 5 cepas de *Salmonella* resistentes a rifampicina, se diluyó hasta una concentración de 100,000 UFC/mL. Se agregaron 50 µl a los tubos para obtener una concentración final de 500 UFC/mL.

Recuento del patógeno.

Se efectuó a las 0 y 24 h de incubación a 22°C mediante la técnica de vertido en placa por triplicado en placas de AST, ASB y XLD con y sin rifampicina para los tubos con extracto de germinado que fueron sometidos a esterilización. Con los tubos restantes, se utilizaron los mismos medios con excepción del AST (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de la rifampicina en diferentes medios de cultivo sobre la *Salmonella*.

#### d) Comportamiento de *Salmonella* en extracto de germinado

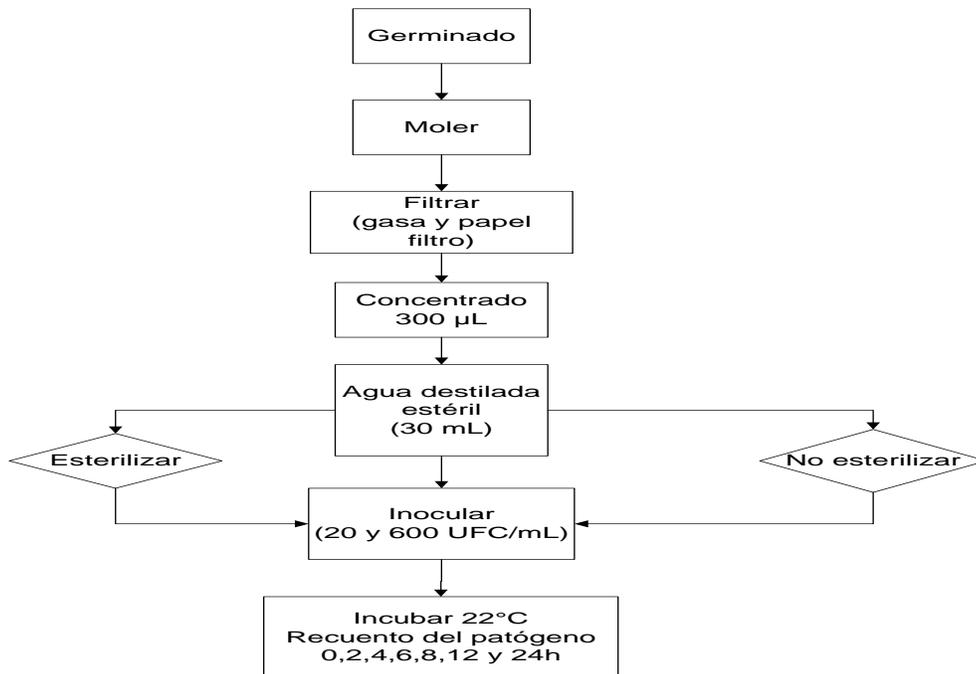
Se prepararon en total 12 frascos con 30 mL de agua destilada estéril, con extracto de germinado al 1%. La mitad se sometió a esterilización; también se obtuvieron suspensiones de la mezcla de cepas de *Salmonella* resistente a rifampicina (+R), tanto el extracto como la suspensión del patógeno se prepararon como se ha mencionado.

Inoculación del patógeno.

Los frascos con extracto de germinado estéril y no estéril se inocularon por triplicado, de manera independiente con 20 y 600 UFC/mL.

Recuento del patógeno.

Se efectuó a las 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h a 22°C mediante la técnica de vertido en placa con ASB +R (Figura 13).



**Figura 13.** Preparación e inoculación de *Salmonella* en extracto de germinado al 1%.

### e) Comportamiento de *Salmonella* durante la germinación

Partiendo del hecho de que la semilla suele ser el principal vehículo de contaminación (Puohiniemi, 1997), se estableció una metodología para contaminar las semillas con el patógeno y estudiar su comportamiento en la plántula desde la germinación (Figura 14)

Preparación del inóculo.

A partir de la mezcla de cepas de *Salmonella* +R, se realizaron diluciones hasta obtener una suspensión con una concentración de  $10^7$  UFC/mL. Se tomaron 500  $\mu$ L y se agregaron a una bolsa de plástico con 500 mL de DP.

Inoculación del patógeno.

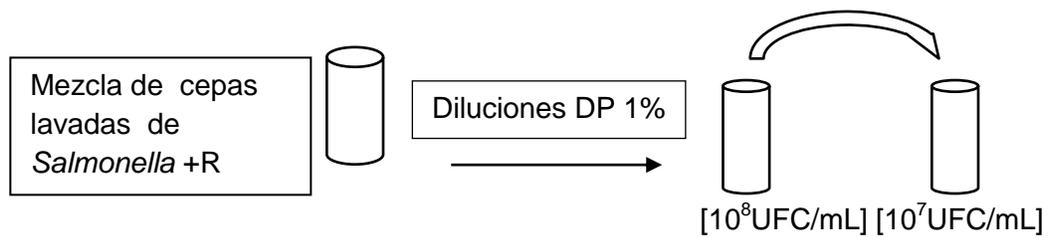
Se colocaron 100 g de semillas en la bolsa de plástico con el inóculo por 40 min, se decantó el líquido, se esparció la semilla sobre un refractario cubierto con una malla estéril y se dejó secar en la campana de flujo laminar por 3 horas.

Germinación.

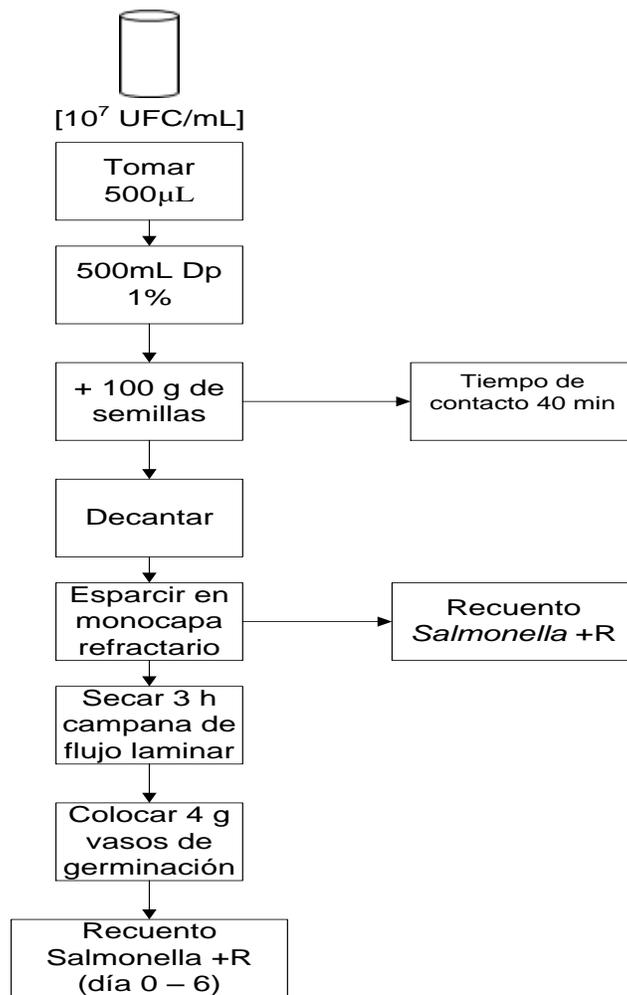
La semilla ya inoculada y seca, se colocó en una bolsa de plástico con 1 L de agua de la llave estéril por 4 h a temperatura ambiente, se decantó, se pesaron 10 g de semilla hidratada que equivalían a 4 g de semilla seca y se colocaron en los vasos de germinación. Se prepararon triplicados para valorar cada día la germinación.

Recuento del patógeno.

Los muestreos se hicieron por triplicado. La muestra se preparó como se describe en las páginas 48 y 49. El recuento se efectuó a las 48 h a 22°C mediante la técnica de vertido en placa utilizando ASB +R.



Inóculo teórico: 10,000 UFC/mL



**Figura 14** Inoculación de la *Salmonella* en semillas para la obtención del germinado.

#### IV.2.6.1 Comportamiento de *Salmonella* en presencia de una cepa de *Pseudomonas* y una mezcla de microorganismos antagonistas durante la germinación.

Preparación del inóculo de los microorganismos antagonistas (**Figura. 15**)

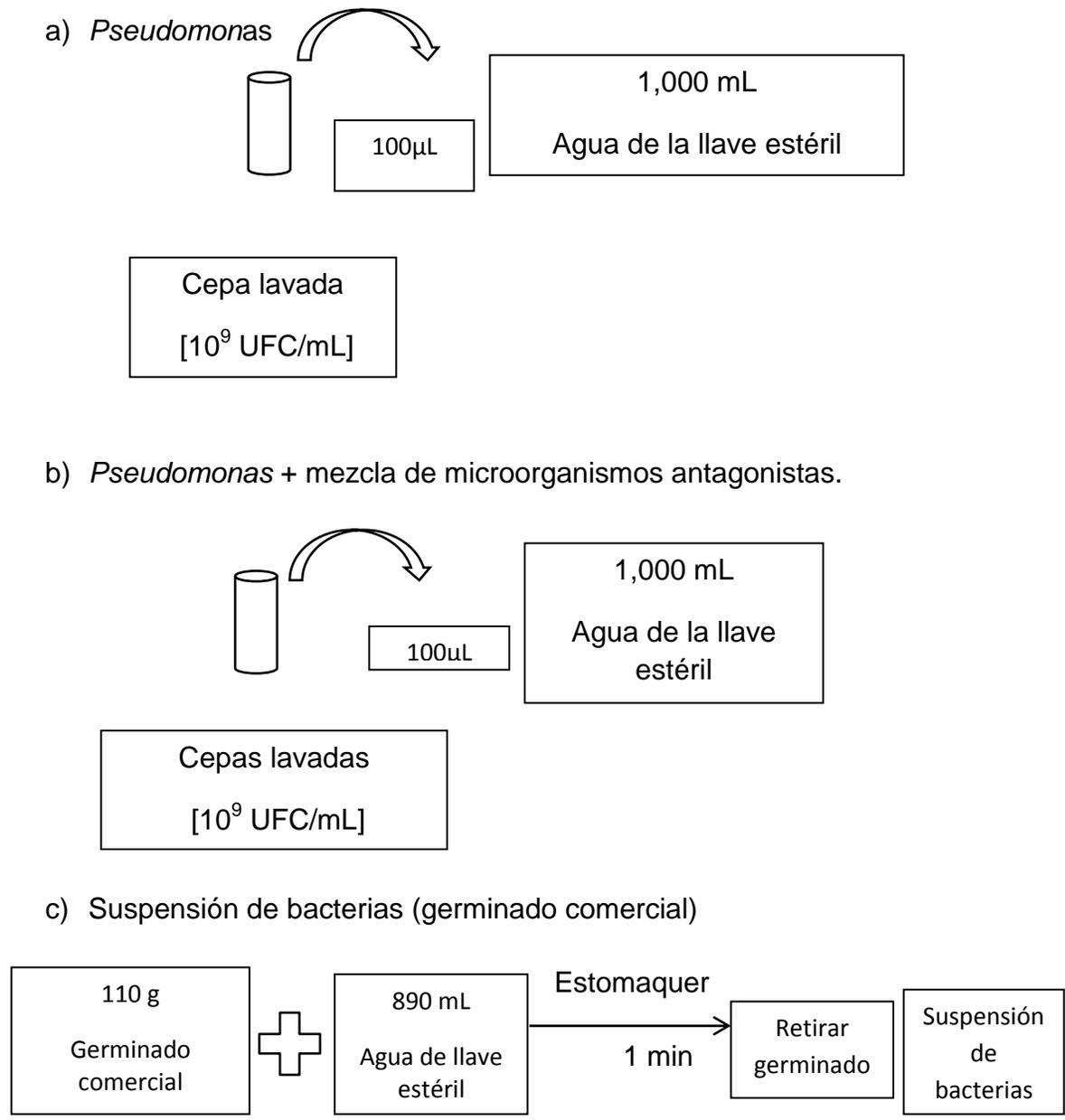
Se obtuvieron cultivos frescos independientes de:

- a) Cepa de *Pseudomonas* aislada de semilla de amaranto.
- b) 4 cepas de microorganismos antagonistas más la cepa de *Pseudomonas*. De cada cepa se efectuaron dos transferencias sucesivas en CST cada una con 18-20 h de incubación, se centrifugaron a 4500 X g/15 min en S.S.I. (dos veces) y se resuspendió en S.S.I. Finalmente se mezclaron en un tubo estéril.

Tanto de la cepa de *Pseudomonas* como de la mezcla de microorganismos antagonistas (b) se tomaron 100 µL de cada suspensión y se colocaron en 2 bolsas de plástico con 1L de agua de la llave estéril respectivamente.

- c) Suspensión bacteriana proveniente de germinado de alfalfa comercial.

Se colocaron 110 g de germinado más 890 mL de agua de la llave estéril en una bolsa de plástico, se sometió al estomaquer por un minuto a velocidad media y se obtuvo la suspensión retirando el germinado.



**Figura. 15** Suspensiones de microorganismos antagonistas.

### Contaminación de semillas con *Salmonella*.

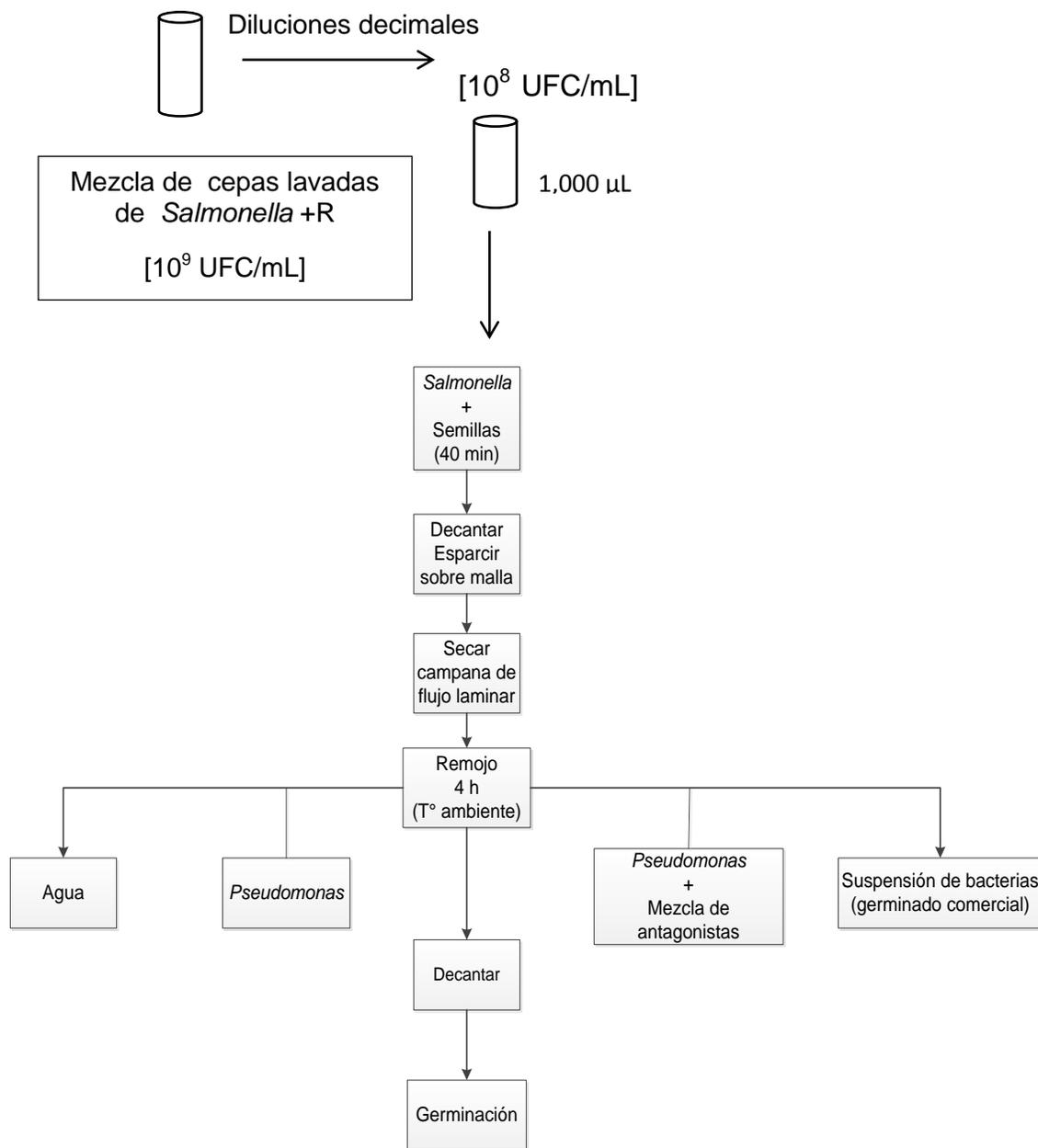
El esquema general para la contaminación de semillas con el patógeno fue similar al descrito en la Figura 14, excepto que en este caso se tomaron 1,000  $\mu\text{L}$  de la suspensión que contenía  $10^8$  UFC/mL de la mezcla de *Salmonella* +R.

### Inoculación de microorganismos antagonistas.

Cada suspensión de microorganismos antagonistas contenida en bolsas de plástico se agregó a 140 g de semillas de alfalfa contaminadas con *Salmonella* y se mantuvieron en contacto por 4 h. Se decantó el líquido de cada bolsa, se pesaron 10 g de semillas que equivalían a 4 g de semilla seca y se colocaron en los vasos de germinación. Se prepararon triplicados para cada día de germinación.

### Recuento del patógeno.

En cada día de germinación se realizó un muestreo por triplicado. El recuento se efectuó a las 48 h a 22°C mediante la técnica de vertido en placa en ASB +R (**Figura 16**)



**Figura 16.** Inoculación de *Salmonella* y microorganismos antagonistas en semillas para la obtención de germinado.

#### **IV.6.2 Comportamiento de *Salmonella* frente a dos concentraciones de microorganismos antagonistas durante la germinación.**

El control biológico de *Salmonella* durante la germinación puede atribuirse a factores como la producción de metabolitos que pueden afectar el desarrollo de patógenos, por cambios en el microambiente, competencia por efecto del espacio biológico y agotamiento de nutrientes (Brook, 2002).

De la mezcla de los 5 microorganismos antagonistas mencionada en la página 59 inciso (b), se prepararon dos concentraciones en bolsas de plástico. En una se agregaron 100µl a 1L de agua de la llave estéril, para obtener una concentración de  $10^5$  UFC/mL; en la segunda se agregaron 2mL a 200 mL de agua de la llave estéril para obtener una concentración de  $10^8$  UFC/mL

Contaminación de semillas con *Salmonella* +R.

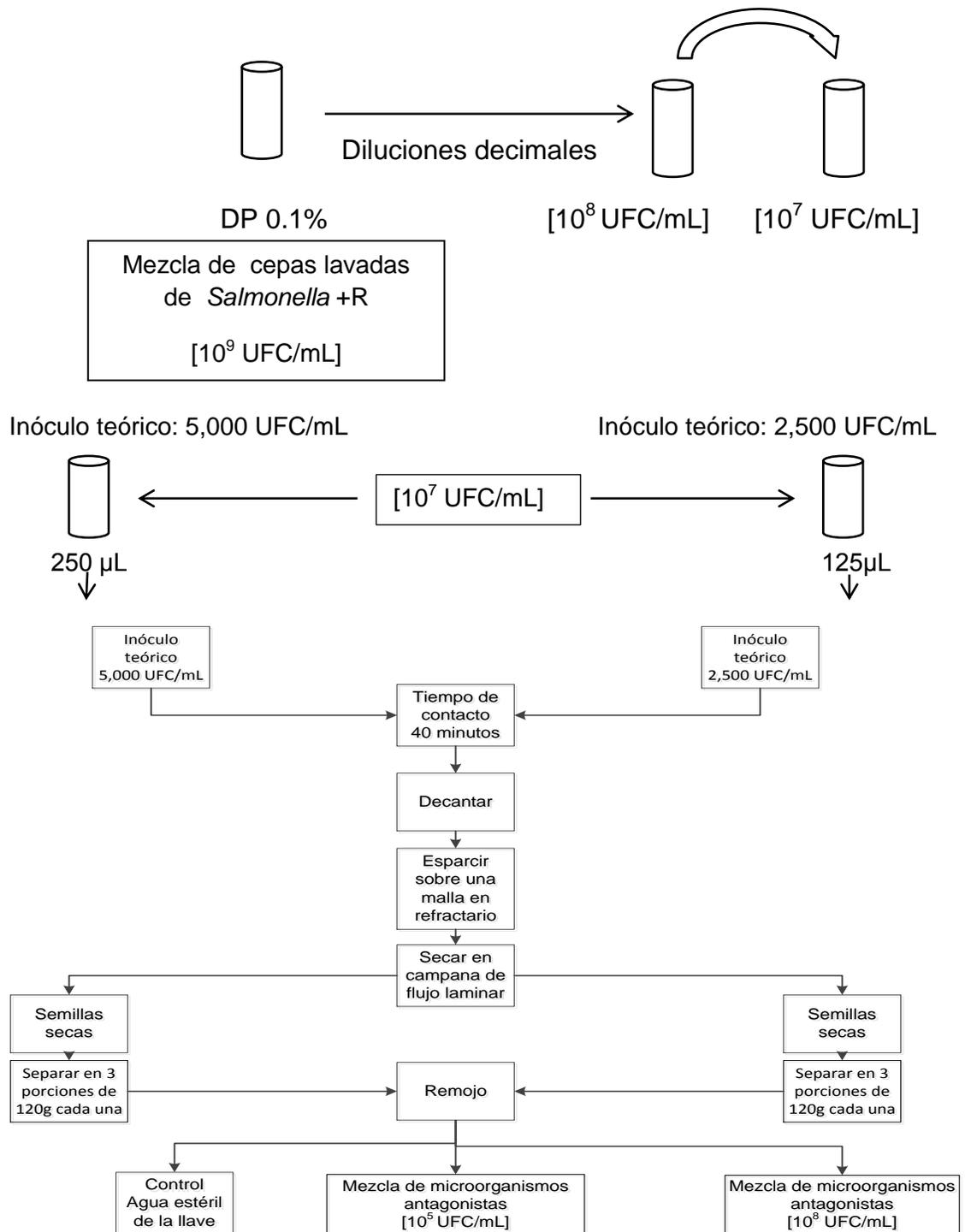
Se prepararon 2 concentraciones de la mezcla de *Salmonella* siguiendo el procedimiento descrito en la página 19. Se prepararon suspensiones con  $10^7$  UFC/mL, se tomaron 250 y 125 µL y se colocaron por separado en bolsas de plástico que contenían 500 y 200 mL de DP respectivamente. Se agregaron 400 g de semilla a cada bolsa y se continuó con el mismo esquema de contaminación descrito en la Figura 14.

Inoculación de microorganismos antagonistas.

Se obtuvieron dos lotes de semilla, cada uno de 400 g inoculado con un nivel diferente de *Salmonella*, se distribuyeron en 4 porciones de 120 g, cada una se colocó en bolsa de plástico con las suspensiones de microorganismos antagonistas mencionados por 4 h, se decantó, se pesaron 10 g de semilla hidratada y se colocaron en los vasos de germinación por triplicado para cada día.

Recuento del patógeno.

Los recuentos se hicieron por triplicado a las 48 h a 22°C mediante la técnica de vertido en ASB +R (**Figura 17**)



**Figura 17.** Inoculación de semillas con *Salmonella* y dos concentraciones de microorganismos antagonistas.

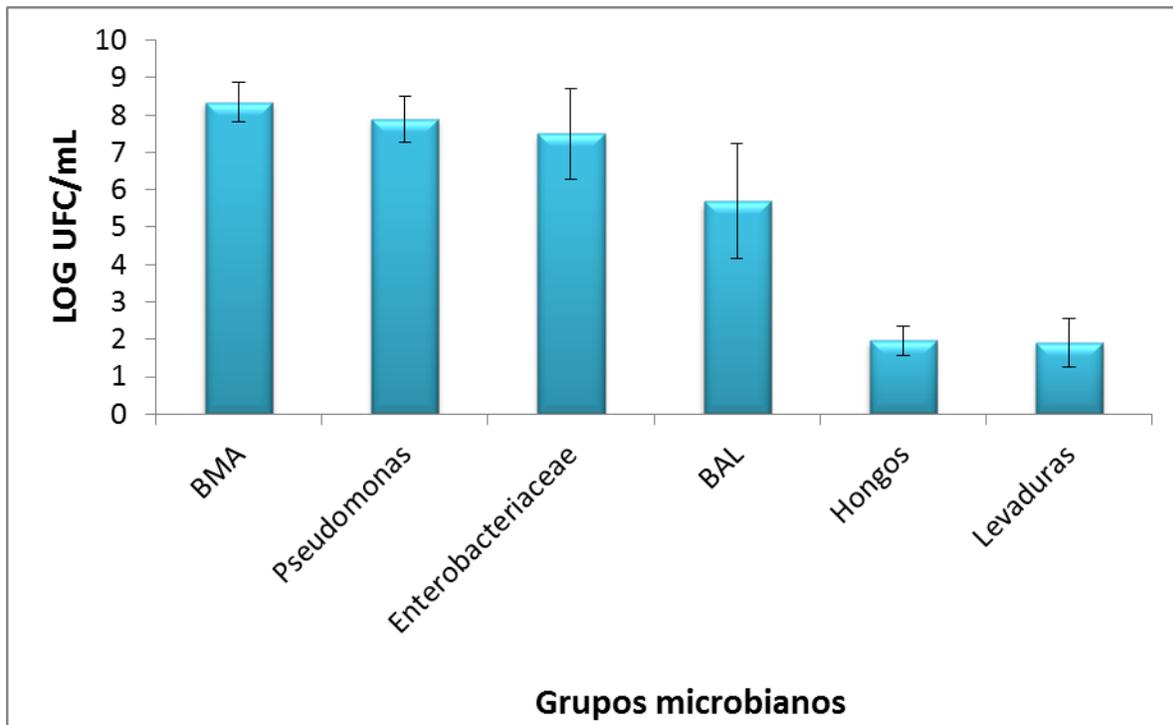
## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 Contenido microbiano de germinado de alfalfa comercial.

La flora nativa de los germinados puede provenir de la semilla estando albergada en el interior o en la superficie de esta e incrementar su número durante la germinación condicionado por: temperatura, humedad, etc., que ahí prevalecen (Pönka *et al.*, 1995).

Se planeó un muestreo de germinado de alfalfa en el comercio con el objetivo de obtener una imagen acerca del contenido microbiano y conocer de manera general el sustrato y el ambiente en donde el patógeno ingresaría en los futuros experimentos. Sin embargo, esta imagen sería un tanto imprecisa porque no se disponía de información sobre el tiempo y las condiciones de almacenamiento durante la comercialización. Se seleccionaron como posibles candidatos antagonistas diversos microorganismos. La literatura reporta que *Pseudomonas* es un grupo de microorganismos que se ha empleado en el control biológico de patógenos en plantas, que destacan debido a la producción de metabolitos como antibióticos y sideróforos que inhiben procesos biológicos de bacterias y hongos (Brennerova y Crowley, 1999). Las bacterias lácticas están reconocidas como fuertes antagonistas hacia bacterias deterioradoras y patógenas (Gasson y Fitzgerald, 1994). Por otra parte en Europa el grupo de las *Enterobacteriaceae* ha sido usado ampliamente como indicador de la calidad sanitaria de los alimentos. Los hongos y levaduras suelen asociarse a fuentes de contaminación objetables. (Escartín, 2008)

Las concentraciones de cada grupo microbiano estudiado, en 46 muestras fueron: BMA  $8.34 \pm 0.53$  Log UFC/g, *Enterobacteriaceae*  $7.5 \pm 0.62$  Log UFC/g, *Pseudomonas*  $7.9 \pm 1.22$  Log UFC/g, BAL  $5.69 \pm 1.54$  Log UFC/g, Hongos  $1.91 \pm 1.86$  Log UFC/g, Levaduras Log  $1.96 \pm 0.66$ UFC/g (Figura 18)



**Figura 18.** Flora nativa seleccionada en germinado de alfalfa comercial. Las barras representan la media de un triplicado.

En la literatura se consigna que tanto las *Enterobacteriaceae* como *Pseudomonas* son los principales microorganismos nativos en varios tipos de germinado (Becker y Holzapfel, 1997). El contenido de BMA tanto de germinados obtenidos en el laboratorio como los comerciales en general son similares (Piernas y Guiraud, 1998). Es notable una ligera dispersión de las cifras de incidencia de la flora nativa entre las muestras no obstante provenir de diferentes condiciones de temperatura de almacenamiento y forma de presentación del producto (granel, empacado). Se trata de un producto por naturaleza con alto contenido microbiano que no afecta necesariamente su frescura. Aparentemente los microorganismos desarrollan muy activamente en el germinado y alcanzan una población con un máximo que ya no

se modifica ostensiblemente al prolongarse la etapa de comercialización, justo cuando fueron obtenidas las muestras.

#### Detección y cuantificación de *Salmonella*

A pesar de que la semilla es la fuente de contaminación más común en los brotes de enfermedad reportados, el proceso de obtención del germinado a menudo ofrece una variedad de oportunidades para que ocurra la contaminación, deben mencionarse el uso de aguas no tratadas o mal tratadas, equipos mal saneados, presencia de fauna y prácticas de trabajo inadecuadas. De las 46 muestras de germinado estudiadas dos resultaron positivas a *Salmonella*, con una concentración del patógeno en ambas muestras de 0.12 NMP/g. La baja concentración y heterogénea distribución del patógeno que puede existir en el germinado, dificulta ponerlo de manifiesto en la porción analizada. Por esta razón no es posible asegurar que el patógeno se encuentre ausente en el resto del alimento. Algunas explicaciones de la baja incidencia de *Salmonella* podrían ser: 1) generalmente un número muy bajo y cierta condición de estrés fisiológico asociado a las condiciones del procesamiento y almacenamiento del alimento (Rusell, 1988) 2) probablemente mermó su vitalidad ante la intensa actividad de la flora asociada, o al menos se vio afectada su capacidad para competir favorablemente con ellos. Las normas nacionales e internacionales condenan un producto que contenga *Salmonella*, independiente de su concentración, virulencia o del serovar (FAO, 2008).

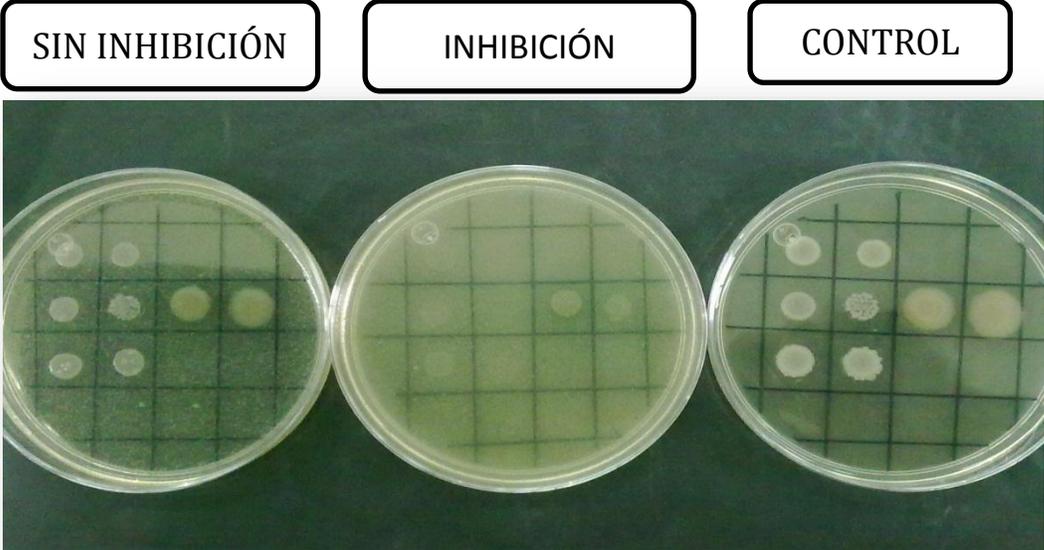
## **V.2 Aislamiento y valoración de la capacidad antagónica de cepas aisladas contra *Salmonella*.**

En la naturaleza, todas las poblaciones de microorganismos suelen ser mixtas, inevitablemente se presentan relaciones de antagonismo y sinergismo en ciertos ambientes. Seleccionamos algunos sustratos para aislar microorganismos con potencial antagónico que incluyeron semillas de leguminosas, hortalizas, tierra, composta, materia fecal de lactantes sanos y exudados vaginales de mujeres sanas, debido a que en estos ambientes ordinariamente ocurren relaciones naturales de antagonismo. Específicamente la competencia de los microorganismos en la tierra puede reducir el nivel de microorganismo patógenos en el estiércol (Ingaham *et al.*, 2004). La vagina de una mujer sana sexualmente madura se encuentra intensamente colonizada por lactobacilos (bacilos de Doderlein), estos conforman un ambiente fuertemente hostil para la instalación de microorganismos patógenos.

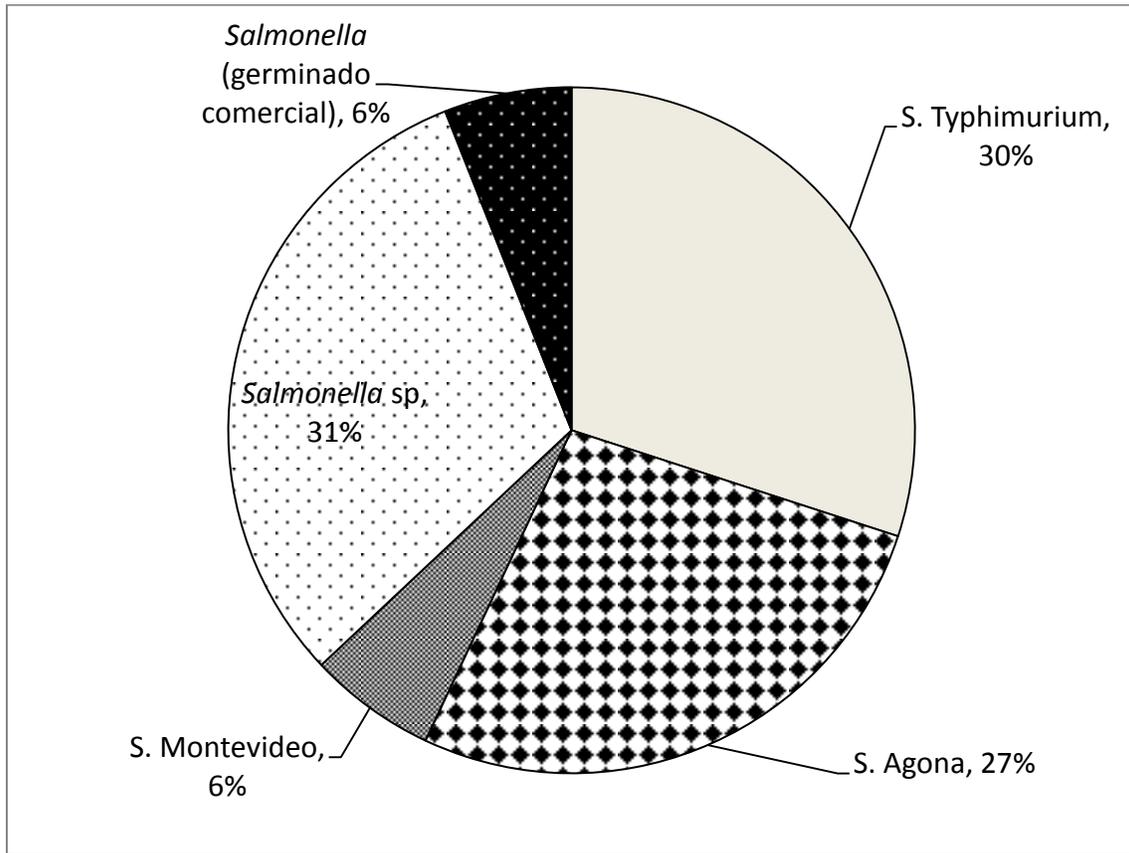
El antagonismo es un fenómeno común en ambientes en los que coexisten mezclas activas de microorganismos. Aun en ausencia de competencia por nutrientes o producción de sustancias antimicrobianas, puede presentarse competencia por el espacio biológico (Wood y Holzapfel, 1995). El resultado final suele ser el predominio de un solo grupo de microorganismos, y en ocasiones de una cepa particular sobre el resto de la flora. Aunque se han desarrollado diferentes métodos físicos y químicos para detectar y cuantificar el antagonismo, el bioensayo sigue siendo el método de elección, porque mide el efecto sobre el patógeno de interés (Daeschel, 1989).

Se aislaron 285 cepas y se probó su efecto antagónico utilizando la técnica del botón (Figura 19). Como se sabe, los resultados del efecto antagónico están fuertemente determinados por la concentración relativa de los microorganismos involucrados, así que se probaron diferentes niveles de los microorganismos antagónicos aislados:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  Log UFC/mL. El antagonismo se consideró por la inhibición del desarrollo mayor al 75% sobre niveles de  $10^5$  y  $10^4$  Log UFC/g del patógeno. Solo 27 cepas mostraron capacidad inhibitoria. El 30% inhibió tanto a *Salmonella* Typhimurium, como a una de serovar desconocido; el 27% inhibió a S.

Agona, mientras que sólo el 6% inhibió a *S. Montevideo* y a la cepa aislada de un germinado comercial (Figura 20).



**Figura 19.** Inhibición microbiana mediante la técnica de botón.

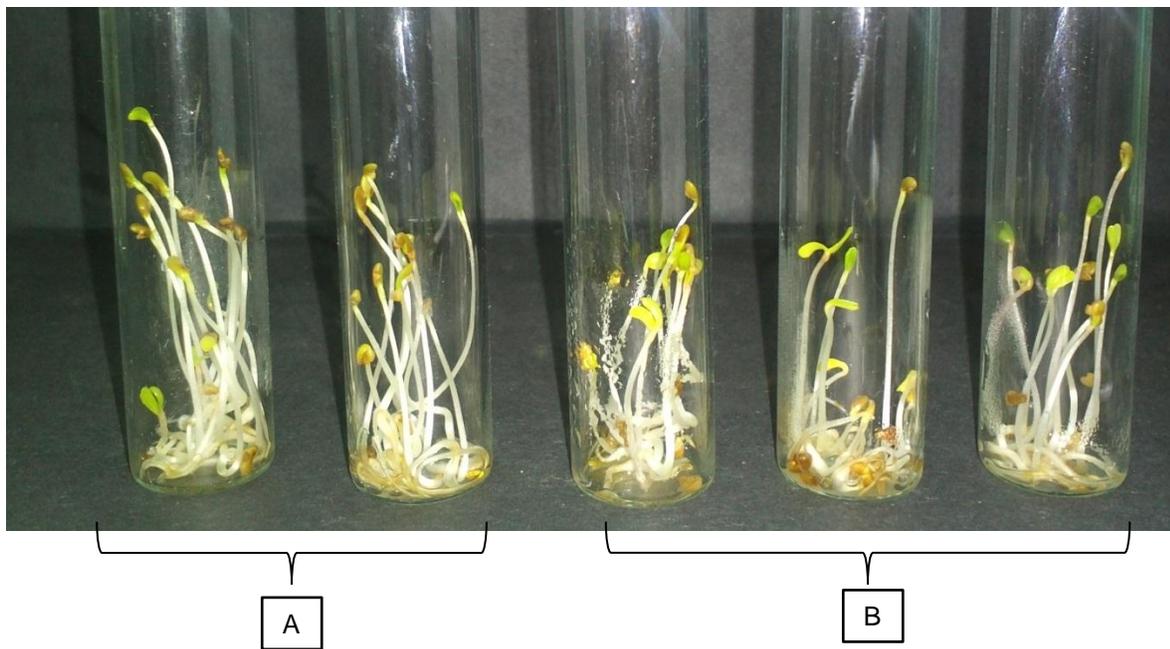


**Figura 20.** Porcentaje de bacterias con capacidad antagónica contra 5 serovares de *Salmonella*.

### V.3 Obtención del modelo de germinación

Crecimiento de germinado en tubo.

En el proceso de valorar la mejor respuesta de los tratamientos aplicados a los 96 tubos (aeración, volumen de agua, base del tubo, número de semillas) la selección de la respuesta, se observó en tubos de base plana, sellados herméticamente y con 400  $\mu$ l de agua con una longitud de la plántula (6-7 cm) y más semillas germinadas,. En la Figura 21, se observa la diferencia en el crecimiento de la plántula con un tratamiento de 300 y 400  $\mu$ l de agua en tubos de base plana y tapa cerrada.



**Figura 21** Germinación en tubo. A. 400 $\mu$ l, B. 300  $\mu$ l agua.

Crecimiento de germinado en vaso.

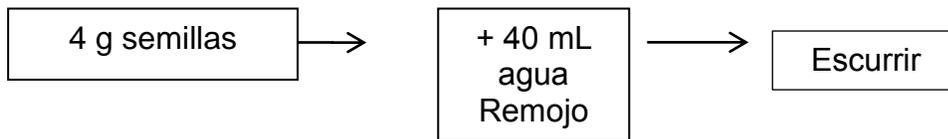
En base a los resultados observados en los tubos, se decidió incrementar la cantidad de semillas, observando su comportamiento durante la germinación bajo los siguientes factores: cantidad de semillas (3 y 4 g), aeración (con y sin película de plástico), volumen de riego (3, 4, 6 mL), frecuencia de riego (1,2 ,3 veces al día).

Se recurrió al uso de una película de polietileno para mantener la humedad que necesita la planta, tomando como referencia el resultado obtenido en los tubos, donde la mejor respuesta se había detectado en los tubos cerrados, además se comparó su comportamiento bajo las mismas condiciones pero sin la película de polietileno. Los riegos se efectuaron por la mañana y por la noche. El volumen de agua de riego en los tres primeros días no debe ser excesivo y sólo deben mantenerse húmedas las semillas, ya que el exceso de agua imposibilita el crecimiento de la plántula. A partir del 5to. y 6to. día de germinación, la plántula requiere de un volumen de agua mayor **(Figura 22)**



**Figura 22** Germinación con película de polietileno (A), sin película de polietileno (B).

La mejor respuesta de los tratamientos consistió en utilizar 4 g de semillas, cubriendo el vaso con una película de polietileno a 22°C y siguiendo el siguiente esquema:



Días de germinación		
0 	2  3 mL agua a.m. y p.m.	3  3 mL agua a.m. y p.m.
4  3 mL agua a.m. y p.m.	5  6 mL agua a.m. y p.m.	6  6 mL agua a.m. y p.m.

## Selección del proveedor

Se estudió el comportamiento de 4 lotes de semillas, con el objetivo de seleccionar aquel que presentará mayor porcentaje de germinación (fertilidad) y de talla de la plántula al 6to. día de germinación. La mejor respuesta se observó en los lotes **A** y **D** con un porcentaje de germinación entre 80-100% (**Cuadro 5**). La talla de la plántula fue de 6.9 y 5.9 cm respectivamente (**Cuadro 6**)

**Cuadro 5.** Porcentaje de germinación de lotes de semillas

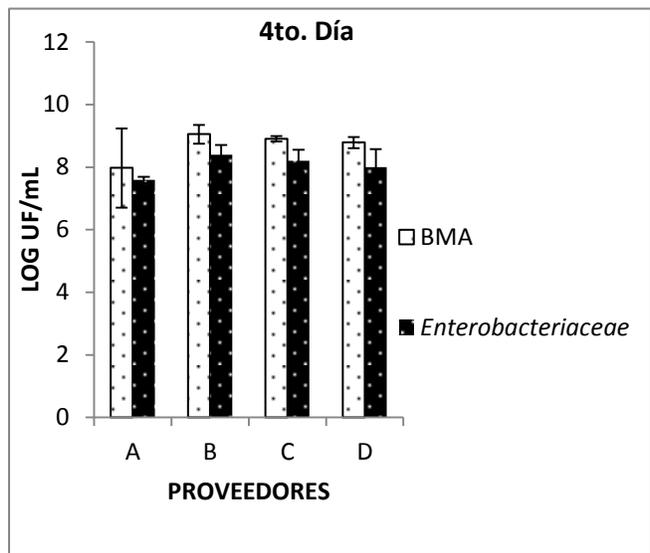
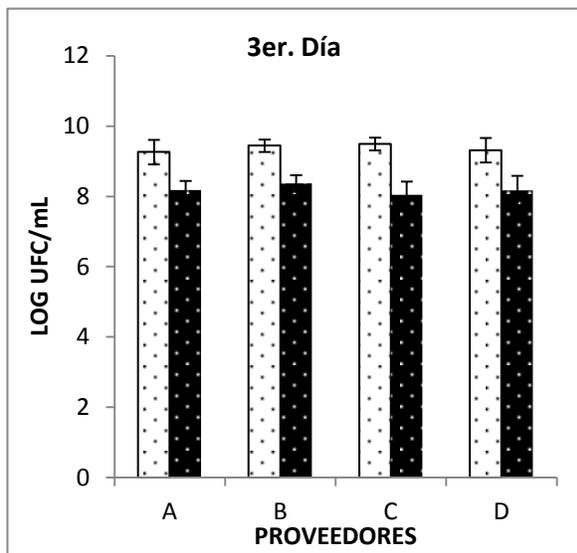
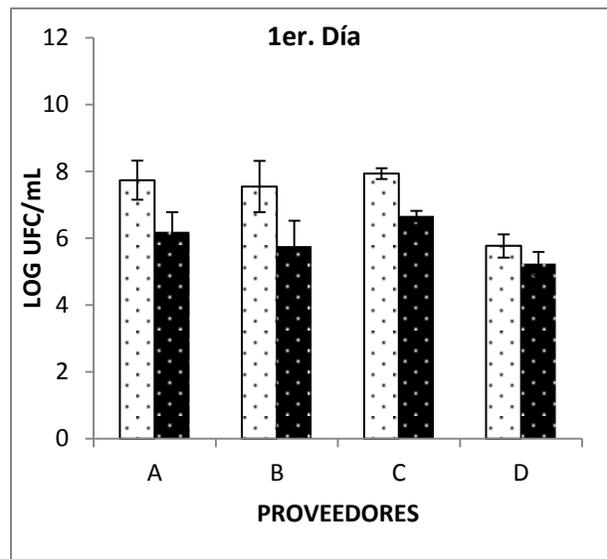
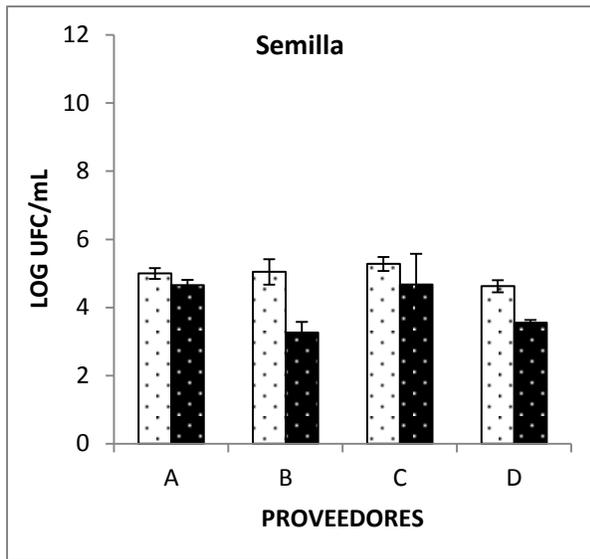
día	Proveedores de semilla			
	A	B	C	D
1	+	+	+	+
2	++	++	+	++
3	++	++	++	++
4	+++	++	++	+++
5	+++	++	++	+++

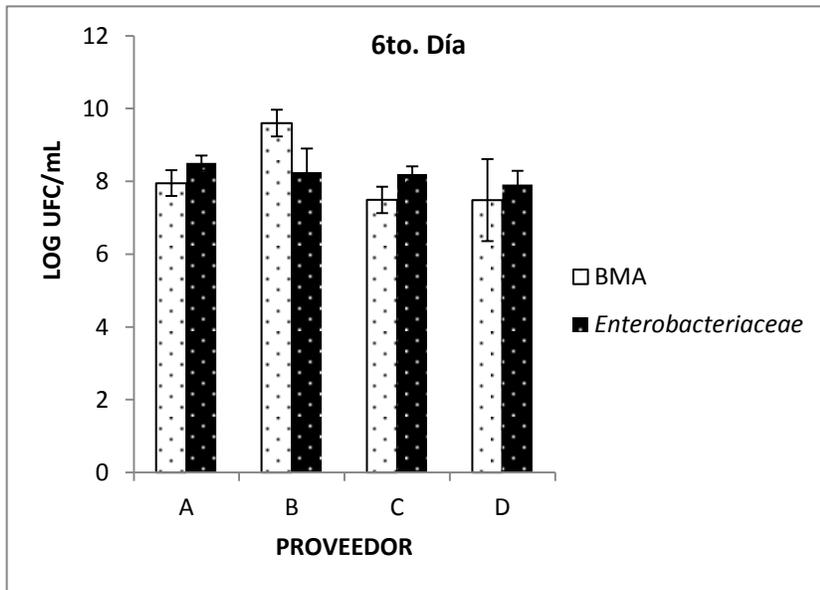
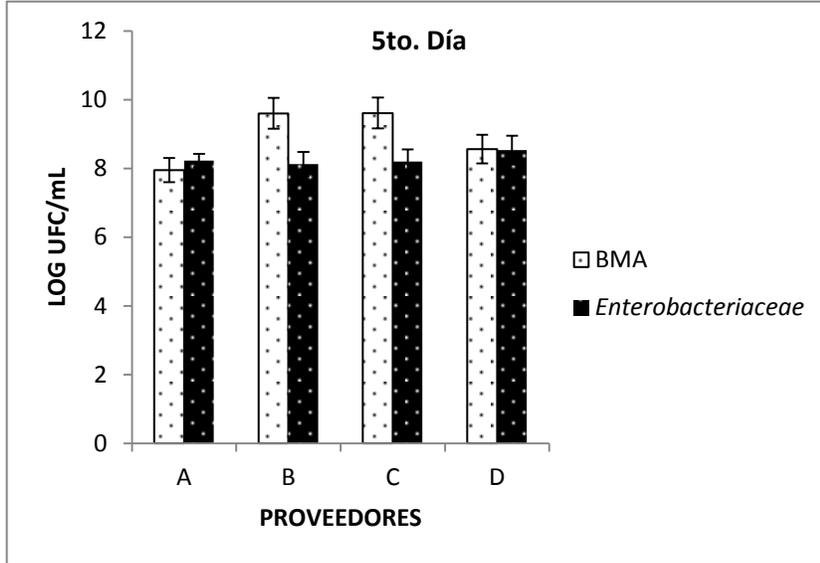
clave	% germinación
+	0
++	10 -40
+++	50 -70
++++	80 - 100

**Cuadro 6** Talla de la plántula al 6to día de germinación.

crecimiento (cm)	Proveedores de semilla			
	A	B	C	D
	6.9	3.6	5	5.9

El criterio de selección del proveedor se consideró, además de poseer un alto porcentaje de germinación y una talla aproximada entre 5-6 cm al sexto día de germinación, una menor carga microbiana de BMA y *Enterobacteriaceae* (Figura 23). En promedio la concentración de BMA y *Enterobacteriaceae* fue muy similar entre los proveedores; en las semillas fue de 5 y 4 Log UFC/4g respectivamente. Al sexto día de germinación, ambos grupos microbianos alcanzaron concentraciones de 8 Log UFC/4g. En ningún lote se detectó *Salmonella*. Por tanto, la selección del proveedor, se efectuó en base al porcentaje de germinación y tamaño de la plántula; por tal motivo se seleccionó el lote **A**.





**Figura 23.** BMA y *Enterobacteriaceae* de diferentes proveedores de semillas durante su germinación. Cada barra representa la media de un triplicado.

#### **V.4 Determinación de los cambios cuantitativos en la flora nativa durante la germinación.**

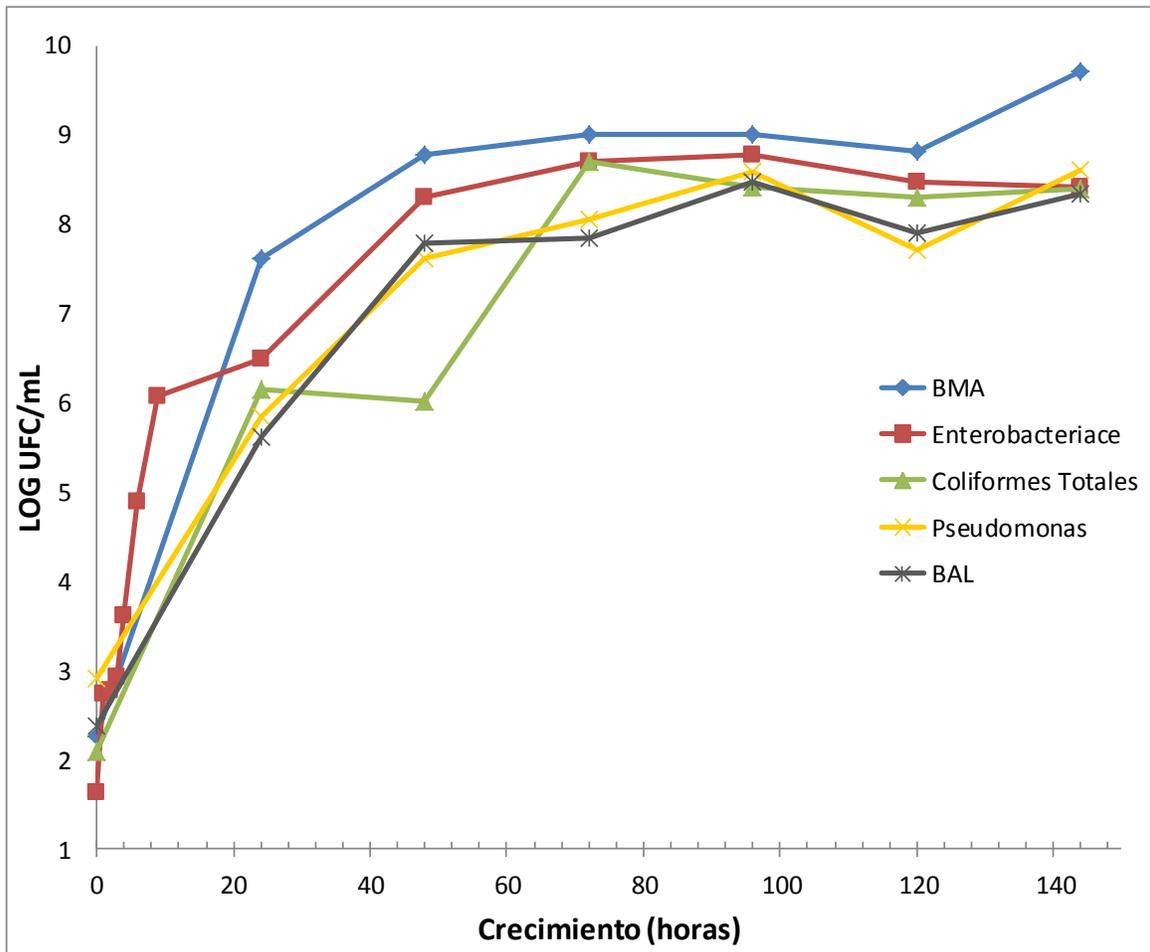
Las superficies de los germinados mostraron elevados niveles de poblaciones de microorganismos nativos generados según la temperatura favorable, la frecuencia de riego y la lixiviación de nutrientes de las semillas y raíces que se liberan durante la germinación, que favorecen el rápido crecimiento de estos microorganismos (Andrews *et al.*, 1982). Existen reportes que indican que hay un incremento significativo después del 2do día de germinación (3 a 5 Log UFC/g) (Castro y Escartín, 2000). El género de bacterias predominante durante el proceso de germinación puede cambiar con el tiempo. Molbak *et al.* (2003) reportaron que *Erwina* y *Paenibacillus spp.* predominaron en el primer día pero son gradualmente remplazados por *Pseudomonas*, que predominará en los días 3 y 5. Los coliformes fecales a menudo se encuentran en las superficies de las plantas, tanto en las semillas como en el propio germinado; su presencia no es un buen indicador de contaminación fecal reciente (Patterson y Woodburn, 1980). Las bacterias lácticas aparecen normalmente en minoría con respecto al total de la microflora durante la germinación (Skowronek *et al.*, 1998), mientras que las BMA se encuentran entre 7 y 9 Log<sub>10</sub> UFC/g (Prokopowich y Blank., 1991). El grupo de las *Enterobacteriaceae* a pesar de que no son indicadores de la presencia de enteropatógenos como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* en los alimentos, comparten ciertas características bioquímicas como la fermentación de glucosa. Por tanto, es muy probable que los enteropatógenos se multipliquen en el germinado.

Resultó importante conocer la dinámica de los microorganismos mencionados durante la germinación porque permitió observar las condiciones del ambiente a las que se enfrentaría el patógeno inoculado en posteriores experimentos (Figura 24).

Debe señalarse que se alcanzaron las máximas poblaciones de cada grupo microbiano hacia los días 3 y 4 de la germinación, probablemente cuando al patógeno le resulta más difícil desarrollar debido a la escases de nutrientes y espacio biológico (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Máximas poblaciones alcanzadas de 5 grupos microbianos durante la germinación

3er y 4to día de germinación (Log UFC/4g)				
BMA	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes Totales	<i>Pseudomonas</i>	BAL
9	8.7	8.7	8.0	7.8
9	8.8	8.4	8.6	8.5



**Figura 24.** Comportamiento de cinco grupos microbianos durante la germinación a temperatura ambiente.

## V.5 Evaluación de la influencia de la concentración de *Salmonella* y los microorganismos antagonistas adicionados al modelo de germinación.

### V.5.1 Efecto de la rifampicina sobre el contenido de BMA al 3er. y 4to. día de crecimiento del germinado de alfalfa

El germinado de alfalfa (como se ha mencionado) posee una gran variedad y cantidad de microorganismos, así como capacidad de sostener su desarrollo (Altekruse *et al.*, 1997), de manera que cualquier patógeno que ingrese alimento enfrentará una competencia de grado variable que pudiera afectar intensamente su tasa de desarrollo y sobrevivencia. Por otro lado, los niveles de microorganismos que se alcanzan incluso ya desde las primeras 24 h de germinación (Viswanathan, 2001), podrían interferir en el recuento de *Salmonella* durante su monitoreo en el germinado; por tal motivo, se indujo la resistencia a rifampicina, con el objetivo de facilitar el estudio del patógeno inoculado favoreciendo la inhibición de la flora nativa.

El mayor efecto inhibitorio del antibiótico sobre el contenido de BMA se alcanzó utilizando 400 ppm (3.2 y 4 Log UFC/4g) en el 3er y 4to día respectivamente (Cuadro 8)

**Cuadro 8.** Efecto inhibitorio de rifampicina sobre BMA.

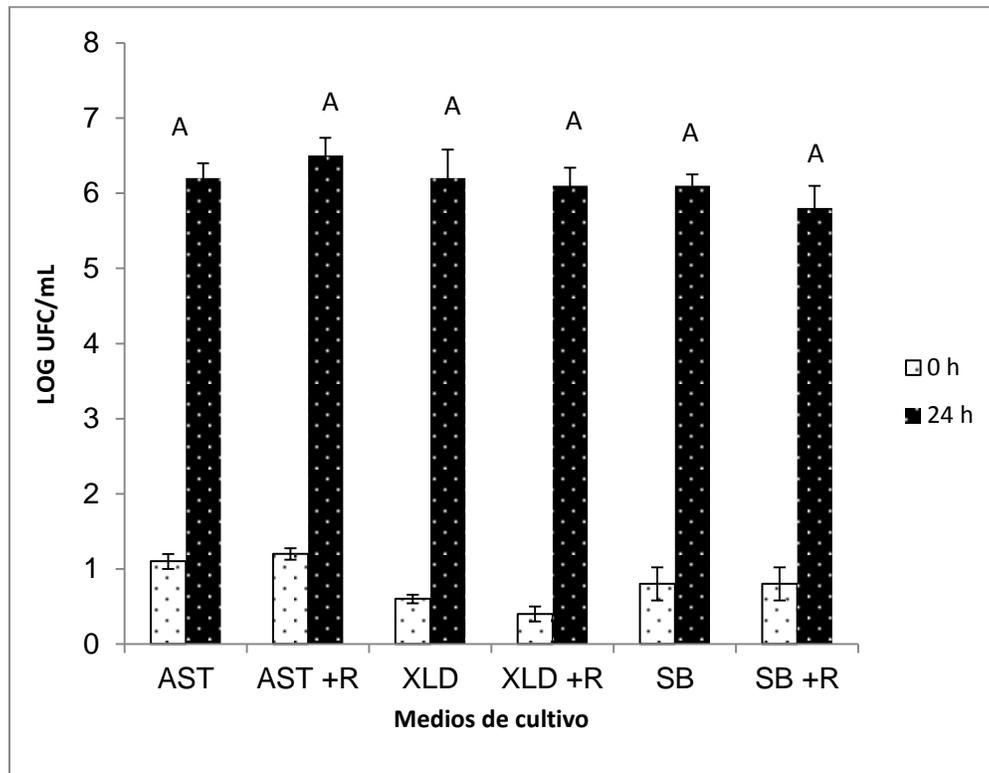
	3er. Día de crecimiento.		
Concentración de rifampicina	200 ppm	300 ppm	400 ppm
Log UFC/4g	4.6	4	3.2

	4to. Día de crecimiento.		
Concentración de rifampicina	200 ppm	300 ppm	400 ppm
Log UFC/4g	5	4.8	4

### **V.5.2 Efecto de la rifampicina adicionada en diferentes medios de cultivo sobre *Salmonella* inoculada en extracto de germinado**

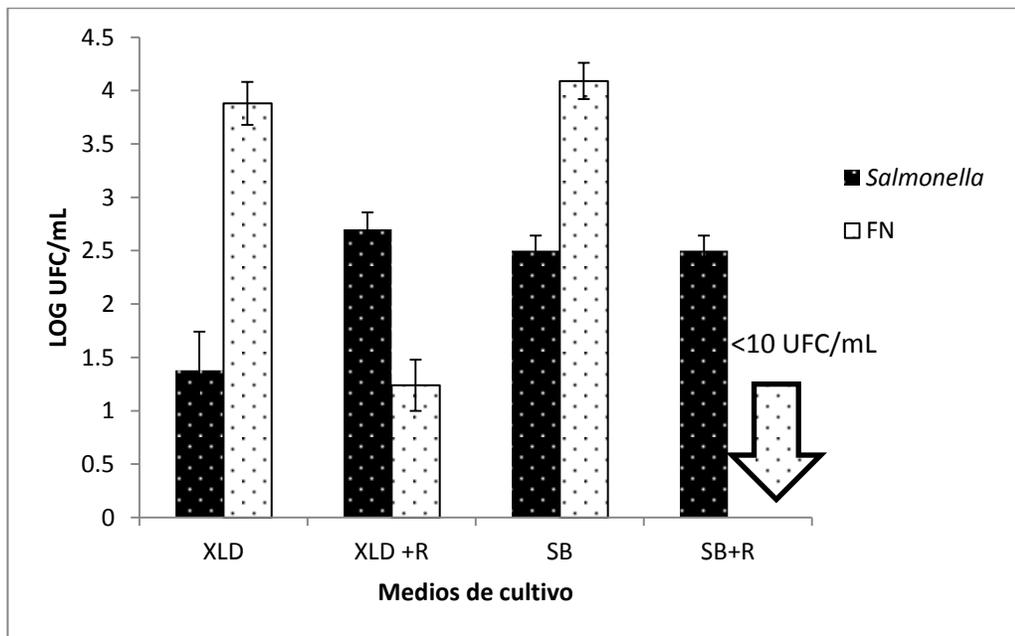
Para estudiar el comportamiento de *Salmonella* durante la germinación, tendría que inducirse la resistencia del patógeno a rifampicina hasta 400 ppm; sin embargo, el uso de altas concentraciones del antibiótico podría llegar a afectar las características propias de *Salmonella*. Se decidió utilizar otros medios de cultivos selectivos y diferenciales para el recuento de *Salmonella* como son agar XLD y agar sulfito bismuto ASB adicionándoles 100 ppm de rifampicina. Se comparó la recuperación de *Salmonella* en estos medios con y sin la adición de rifampicina con el objetivo, por un lado: saber si la adición de rifampicina a estos medios que son por naturaleza selectivos e inhibitorios de la flora afectaba el desarrollo de la propia *Salmonella*, y por otro, que resultaran lo bastante inhibitorios de la flora asociada para facilitar su recuento e identificación.

Se inoculó una concentración de 500 UFC/ mL del patógeno en extracto de germinado estéril y se efectuó su recuento al cabo de 24 h de incubación. Se compararon los recuentos, en los medios con y sin rifampicina. Los resultados fueron muy similares; en su mayoría mantuvieron niveles de  $7 \pm 0.20$  Log UFC/mL, sin embargo mediante la prueba de Tukey (con un valor de  $p= 0.05$ ), se demostró que no existían diferencias significativas en la recuperación del patógeno en los medios utilizados (Figura 25).



**Figura 25.** Recuperación de *Salmonella* +R inoculada en extracto de germinado estéril en diferentes medios de cultivo. Prueba estadística de Tukey ( $p=0.05$ ): letras iguales NO son significativamente diferentes. Cada barra representa la media de un triplicado.

Se valoró la capacidad inhibitoria de cada medio de cultivo con y sin rifampicina (100 ppm) sobre la flora nativa del germinado; el efecto se observó inoculando una concentración de 500 UFC/mL de *Salmonella* en extracto de germinado sin esterilizar. El efecto inhibitorio sobre el recuento de la flora nativa en los medios se comparó después de 24 h, así como la recuperación de *Salmonella* en cada uno de ellos. El mayor efecto se observó en ASB+R (<10 Log UFC/mL), y facilitó considerablemente el recuento de *Salmonella* sin menoscabo de la sensibilidad y especificidad en los ensayos (Figura 26).



**Figura 26.** Efecto de la rifampicina sobre *Salmonella* +R y la flora nativa en extracto de germinado de alfalfa en medios de cultivo selectivos. Cada barra representa la media de un triplicado.

### V.5.3 Comportamiento de *Salmonella* en extracto de germinado

Es notable la capacidad del germinado de alfalfa para favorecer el desarrollo microbiano. Prokopowich *et al.* (1991) observaron activa multiplicación de BMA y organismos coliformes (OC) durante las primeras horas de germinación de diversas semillas.

Se estudio el comportamiento de *Salmonella* en dos niveles de inóculo, bajo y alto (20 y 600 UFC/mL) en extracto de germinado tanto estéril como sin esterilizar durante 24h. El objetivo principal consistió en conocer si los nutrientes del germinado son capaces de sostener el desarrollo del patógeno, y decidir qué tanto se afecta este por la presencia de la flora asociada en su conjunto.

Ambos niveles de inóculo a las 24 h alcanzaron concentraciones de 8 Log UFC/mL en el extracto estéril, pero hubo diferencias en el extracto no estéril, con el inóculo bajo se alcanzó una concentración de 3.5 Log UFC/mL a las 24 h, mientras que el alto de 5.5 Log UFC/mL (Figura 27). Hubo una notable diferencia en el comportamiento de *Salmonella* en presencia de la flora nativa (extracto sin esterilizar) y en ausencia de esta (extracto estéril). En el nivel bajo del patógeno de 4.2 Log UFC/mL y en el alto de 2.3 Log UFC/mL

Se sabe que en productos cárneos o lácteos, el antagonismo microbiano puede ser el resultado de generación de sustancias como ácido láctico (Flippim y Mickleson, 1960), acético (Soreells y Speck, 1970), diacetilo (Hargrove *et al.*, 1969), producción de bacteriocinas (Stevens *et al.*, 1992) y antibióticos por parte de la flora nativa (Vincent *et al.*, 1959). De igual forma, en el germinado se pueden formar algunas de estas sustancias, o bien puede haber una competencia por nutrientes. Podemos concluir que los nutrientes del germinado aparentemente sostienen bien el desarrollo del patógeno

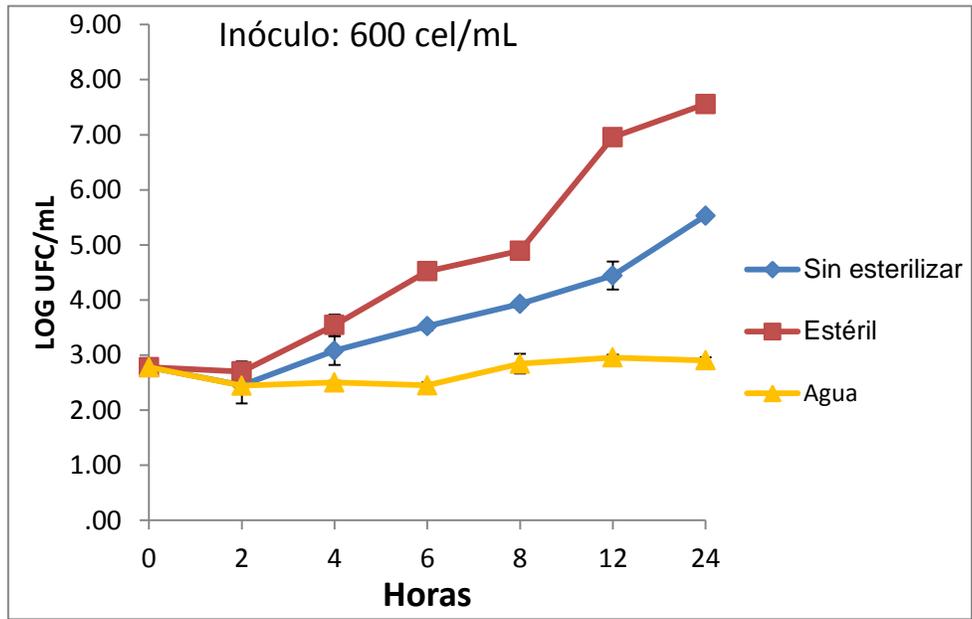
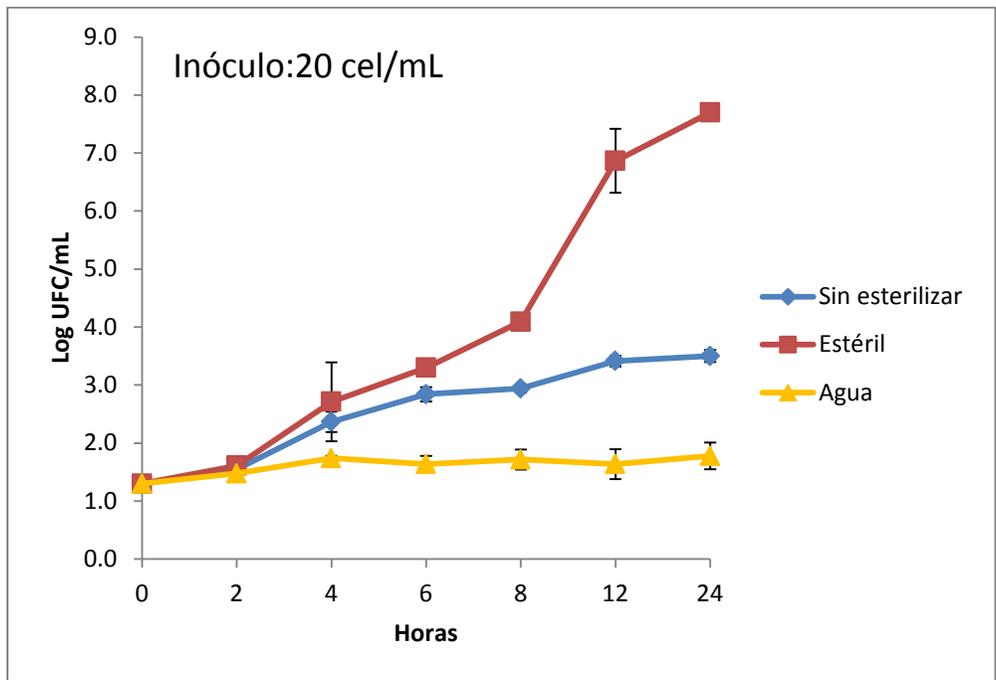
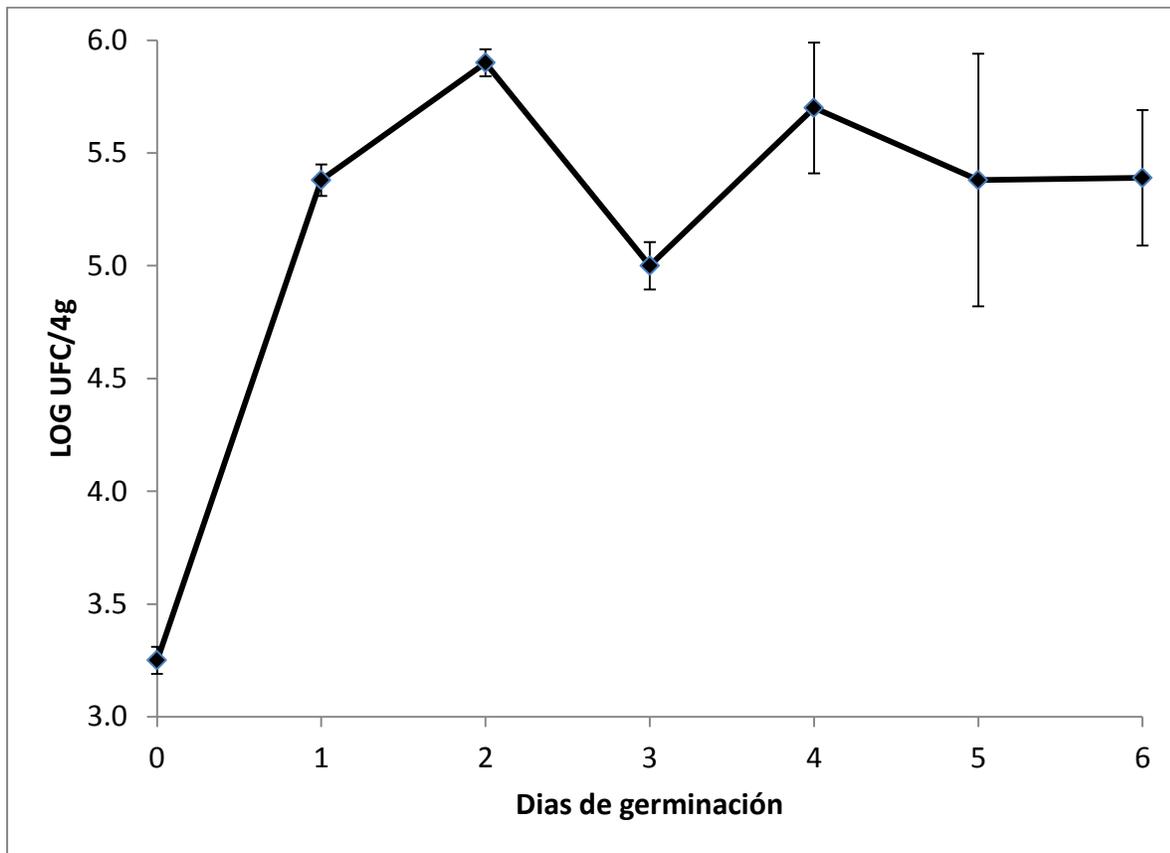


Figura 27. Dinámica de dos niveles de inóculo de *Salmonella* en extracto de germinado estéril y sin esterilizar. Cada punto representa la media de un triplicado, las barras la desviación estándar.

#### **V.5 4 Comportamiento de *Salmonella* durante la obtención del germinado**

En general, la demostración de un microorganismo patógeno en un producto es razón suficiente para condenarlo (FDA, 2007). La mayoría de los patógenos suelen manifestar potencial para desarrollar en los alimentos, lo que depende de una diversidad de factores ecológicos (Barak, 2002). Procesos como la obtención del germinado, comercialización o almacenamiento, tienen efecto sobre el destino del patógeno; cuando se realiza su detección puede resultar positiva (sobrevivencia/ desarrollo) o negativa (inactivación) dependiendo de las condiciones prevalentes al momento de ingresar al alimento y de su manejo ulterior. En general, se ha mencionado que el germinado de alfalfa es un producto con un ambiente muy dinámico debido a la presencia de humedad constante, generación de nutrientes a partir de la semilla e incluso la propia flora nativa, que es muy variada y cambiante durante la germinación, por tal motivo se estudió el comportamiento de *Salmonella* durante la germinación. Se inoculó la semilla con  $10^3$  UFC/4g. La máxima concentración alcanzada fue cercana a  $10^6$  UFC/4g en el segundo día de germinación; una vez que se alcanzó este nivel hacia los días 3 y 6 se observó una disminución de un logaritmo en la concentración del patógeno. Una explicación plausible es que el tercer día de germinación se ha incrementado la concentración de la flora nativa cuyo efecto antagónico se manifiesta más notoriamente (Figura 28).



**Figura 28.** Comportamiento de *Salmonella* durante la germinación. Cada punto representa la media de un triplicado, las barras la desviación estándar.

### **V.5.5 Comportamiento de *Salmonella* en presencia de una cepa de *Pseudomonas* y una mezcla de microorganismos antagonistas durante la germinación**

Como se ha mencionado, se cuenta con el registro de una larga lista de brotes de enfermedad asociada al consumo de germinados de semillas. Los tratamientos químicos y físicos para controlar los patógenos implicados han resultado tener beneficios limitados, ninguno los elimina por completo. El control se interesa en la aplicación de cepas de microorganismos con capacidad antagónica que puedan limitar el crecimiento de los patógenos, e idealmente dañar su sobrevivencia.

Nuestro estudio valorativo se inicio con 4 porciones de 140 g de semillas con concentración de  $10^3$  UFC/4g de *Salmonella*. Cada porción se sometió a un remojo de 4 h con las siguientes suspensiones de microorganismos antagonistas: 1) cepa de *Pseudomonas* aislada de semilla de amaranto, 2) mezcla de 4 cepas de microorganismos antagonistas más una cepa de *Pseudomonas*, cada una de las suspensiones en una concentración de  $10^5$  UFC/mL, 3) suspensión bacteriana proveniente de germinado de alfalfa comercial, (el recuento de BMA y su concentración fue de  $10^9$  UFC/mL). Esta suspensión se utilizó considerando que poseía una flora nativa más robusta y proveniente del mismo sustrato donde posiblemente ejercería cierto efecto en el crecimiento de *Salmonella*. Una de las porciones sólo se sometió al remojo con agua de la llave estéril como control. Después de las 4 h de remojo hubo incremento aproximadamente de 1Log de la concentración de *Salmonella* en todos los tratamientos incluyendo al control. La mayor concentración de *Salmonella* alcanzada en las semillas sin ningún tratamiento durante la obtención del germinado ocurrió en el 4to día de germinación ( $7.6 \pm 0.07$  Log UFC/4g). Sin embargo, cuando se utilizó un consorcio de cepas antagónicas la concentración de *Salmonella* fue de  $6.3 \pm 0.54$  Log UFC/4g en el 3er. día de geminación, el efecto de esta diferencia podría deberse a que en los días 3 y 4 de la germinación, se alcanzan mayores concentraciones de flora nativa. Por tanto, si se presenta la competencia por nutrientes este efecto se refuerza con el consorcio de cepas. El mayor efecto sobre la concentración de *Salmonella* durante la germinación se observó en el sexto día con el empleo de la suspensión bacteriana proveniente del germinado comercial, lo que sugiere que la flora nativa del

germinado forma rápidamente sustratos que pueden llegar a antagonizar a *Salmonella* (Figura 29).

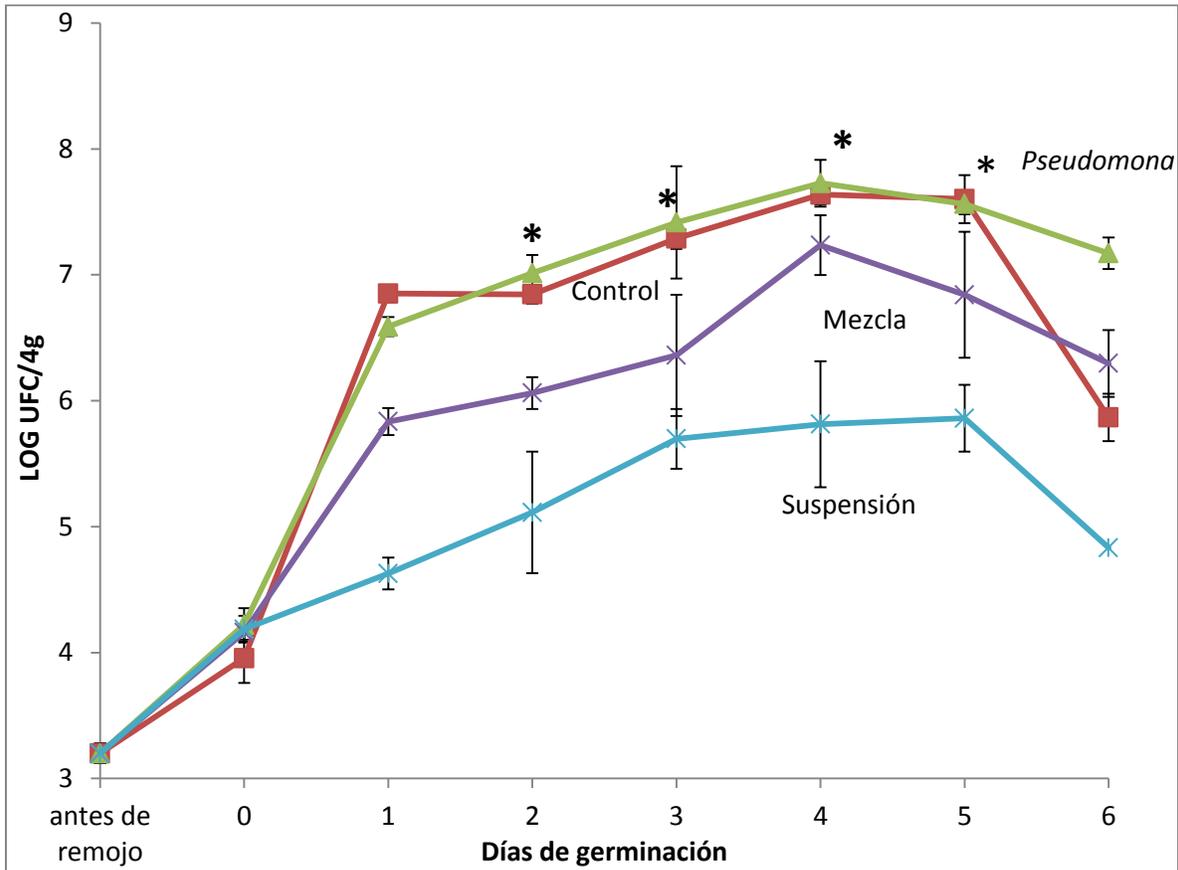


Figura 29. Comportamiento de *Salmonella* frente a microorganismos antagonistas y una suspensión de bacterias durante la germinación. Prueba estadística de Dunnett's ( $p=0.05$ ): (\*) NO son significativamente diferentes. Cada punto representa la media de un triplicado, las barras la desviación estándar.

### **V.5.6 Comportamiento de *Salmonella* frente a dos concentraciones de microorganismos antagonistas durante la germinación**

Diversos estudios reportan que los microorganismos patógenos humanos son buenos competidores en las superficies de los germinados y pueden incrementarse en niveles significativos durante la germinación ya sea en semillas inoculadas o contaminadas naturalmente (Schoeller *et al.*, 2002). Sin embargo, la exclusión competitiva ocurre de manera natural. Castro y Fernández (2000), detectaron 1 Log menos de patógenos inoculados en germinados en el 1er al 5to. día de germinación. Con este antecedente y lo observado en el experimento anterior que revela que no hubo ningún efecto significativo sobre el comportamiento de *Salmonella* durante la germinación con la inoculación de una sola cepa con capacidad antagónica probada en medios de cultivo (*Pseudomonas* aislada de semilla de amaranto), ni de la mezcla de antagonistas en una concentración [ $10^5$  Log UFC/mL] se decidió estudiar el efecto de la misma mezcla de antagonistas pero en una concentración más alta y con niveles más bajos de *Salmonella* en las semillas.

Se contaminaron dos porciones de semilla (400 g cada una de ellas) partiendo con una concentración de *Salmonella*, alta y baja de 180 UFC/4g y 70 UFC/4g respectivamente. Cada porción de semillas se distribuyó en 4 porciones de 120 g y se sometieron a un remojo por 4 h; el agua de remojo fue inoculada con dos concentraciones de la mezcla de microorganismos antagonistas con  $10^5$  y  $10^8$  UFC/mL de manera independiente.

El efecto de las dos concentraciones de la mezcla de microorganismos antagonistas ( $10^5$  y  $10^8$  UFC/mL) sobre la porción de semillas inoculadas con el nivel alto de *Salmonella*, consistió en una diferencia de 1.7 y 1.2 Log UFC/4g, respectivamente. Por otro lado, las semillas inoculadas ante un bajo nivel del patógeno la reducción fue de 1.6 y 1.4 Log UFC/4g, en el tercer día de germinación. No se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones de la mezcla de microorganismos antagonistas sobre *Salmonella*. Ambos niveles del patógeno en las

primeras 24 h alcanzan casi la misma concentración ( $10^5$  UFC/4g). (Figura 30) y (Figura 31).

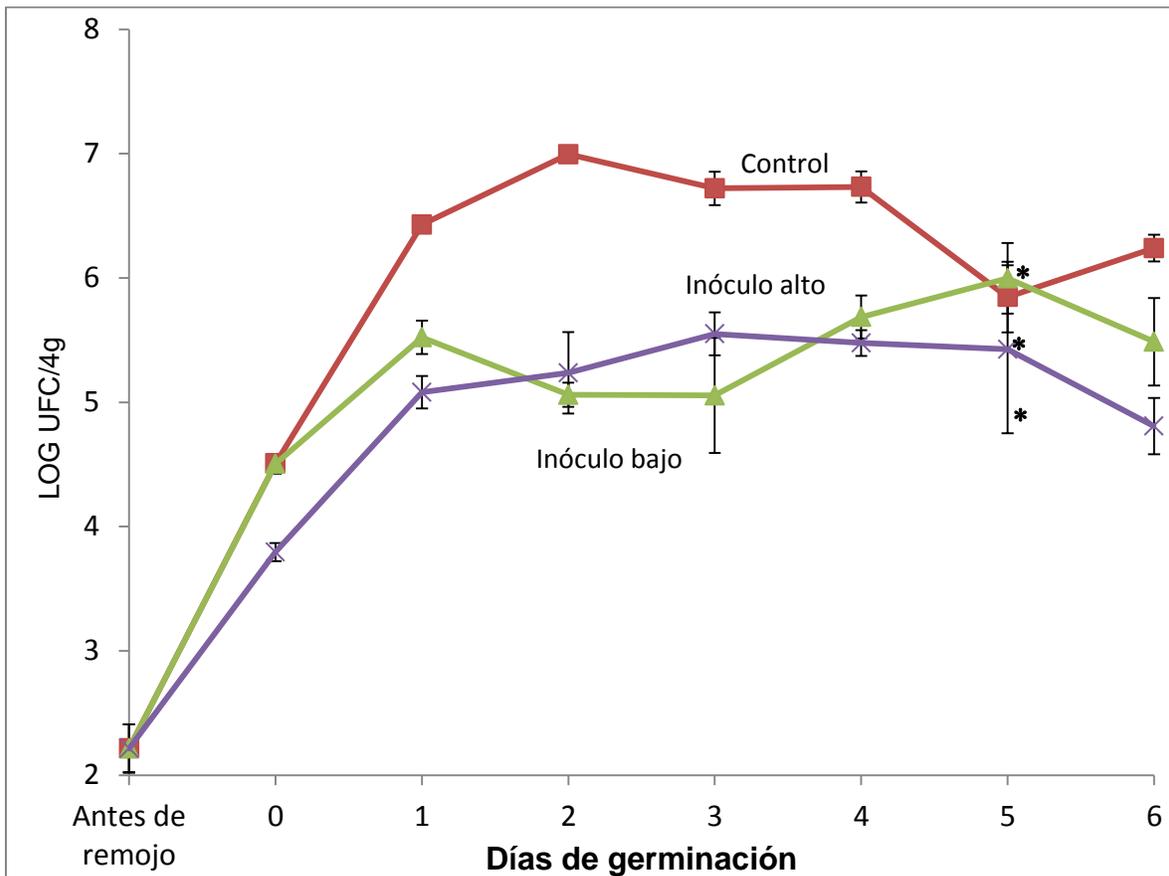


Figura 30 Comportamiento de un nivel alto de *Salmonella* frente a dos concentraciones de una mezcla de microorganismos antagonistas. Prueba estadística de Dunnett's ( $p=0.05$ ): (\*) NO son significativamente diferentes. Cada punto representa la media de un triplicado.

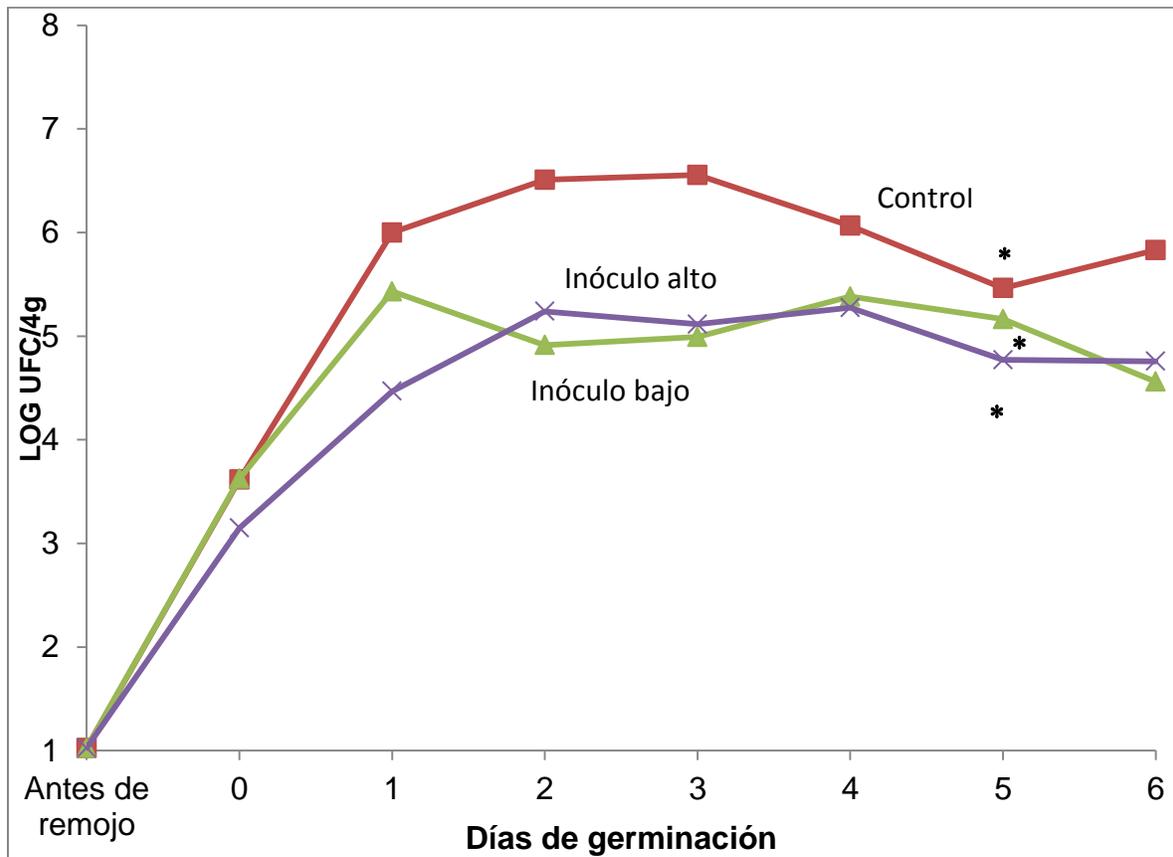


Figura 31. Comportamiento de un nivel bajo de *Salmonella* frente a dos concentraciones de una mezcla de microorganismos antagonistas. Prueba estadística de Dunnett's ( $p=0.05$ ): (\*) NO son significativamente diferentes. Cada punto representa la media de un triplicado, las barras la desviación estándar.

## VI Conclusiones.

1. El germinado de alfalfa comercial es un producto con un contenido microbiano relativamente alto.
2. *Salmonella* se multiplica activamente durante la obtención del germinado de alfalfa.
3. La flora nativa del germinado de alfalfa reduce 1 Log la concentración de *Salmonella* en el 3er. día de germinación.
4. El empleo del medio agar sulfito de bismuto adicionado de rifampicina facilitó considerablemente el recuento de *Salmonella* rifampicina resistente en los germinados, sin menoscabo de la sensibilidad y especificidad de los ensayos.
5. La concentración de *Salmonella* en el germinado de alfalfa (0.12 NMP/g) es baja. Podría asociarse a un efecto antagónico propiciado por la abundante flora asociada que contiene. Es posible la generación de sustancias antimicrobianas generadas por la misma flora.
6. El empleo de una cepa de microorganismos antagonistas seleccionados no mostró efecto inhibitorio de la *Salmonella* durante la germinación.
7. El efecto de las dos concentraciones del consorcio de las cepas de microorganismos antagonistas probados ( $10^5$  y  $10^8$ ), en promedio reducen la concentración de *Salmonella* aproximadamente 1Log en el tercer día de germinación.

8. No se observó una relación franca entre la actividad antagónica contra *Salmonella* demostrada por cepas bacterianas aisladas de fuentes muestreadas en los ensayos *in vitro*, y en el germinado de alfalfa.
9. A pesar de que no se observó una relación de la actividad antagónica de las cepas aisladas contra *Salmonella* tanto en los ensayos *in vitro* como en el germinado de alfalfa, de ninguna manera es evidencia de que el enfoque del biocontrol para procurar la inocuidad de los germinados carece de perspectiva. Mas bien destaca la necesidad de realizar valoraciones de capacidad antagónica natural con muestreos mas extensivos de las fuentes de aislamiento e incluso, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, para generar cepas capaces de mostrar un potencial antagónico más riguroso.

## VII Bibliografía

- Eroski consumer*. (26 de Abril de 2007). Recuperado el 20 de Abril de 2011, de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/entrevistas/>
- Adams, M., Hartley, A. and Cox, L. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol.*, 6:69-77.
- Altekruse, S., Yang, B., Timbo, B. and Angulo, F. (1999). A multi-state survey of consumer food-handling behaviors. *Am. J. Prev. Med.*, 16:216-221.
- Altekruse, S. Timbo, B. and Mowbray, J. (1997). Emmerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis* , 3:425-434.
- Andrews W., W. C. (1982). Microbial hazards associated with bean sprouting. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 65:241-248.
- Andrews, W., Wilson, P., Poelma, P. and Mislivec. (1979). Bacteriological survey of sixty health foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:559-566.
- Barak, J., Whitehand, C., and Charkowski, O. (2002). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa sprouts . *Appl Environ. Microbiol.*, 68:4758-4763.
- Bari, M., Al-Haq, M., Kawasaki, T., Nakumana, S. and Isshiki, K. (2003). Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on ready to eat radish and mung bean sprouts. *J. Food. Prot.*, 66:767-774.
- Bari,. M., Nazuka, E., Sabina, Y. and Isshiki, K. (2003). Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa, radish, and mung bean seeds. *J. Food. Prot.*, 66:4758-4763.
- Becker, B. and Holzapfel, H. (1997). Microbiological risk of prepacked sprouts and mesures to reduce total counts. *Arch Lebensmittelhygiene*, 48:81-84.
- Beuchat, L. (1996). Pathogenic microorganism associated with fresh produce. *J. Food. Prot.*, 59:204-216.

- Beuchat, L. and Scouten, J. (2002). Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.*, 92:392-395.
- Breidt, F. and Fleming, H. (1997). Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.*, 51:44-49.
- Brennerova, M. and Crowley, D. (1994). Direct detection of rhizosphere colonizing *Pseudomonas* spp using an *Escherichia coli* rRNA promoter in a Tn7-lux system. *FEMS Microbiol Ecol* 14, 14:319-330.
- Brennerova, M. and Crowley, E. . (1994). Direct detection of rhizosphere colonizing *Pseudomonas* spp using *Escherichia coli* rRNA promoter in a Tn7-lux system. *FEMS. Microbiol. Ecol*, 14.
- Brook. (2002). Efectos de la Terapia Antibacteriana sobre la Flora microbiana de los Adenoides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:1331-1337.
- Buchanan, R. (1999). U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC. Personal Communication.
- Buck, J., Walcott, R. and Beuchat, L. (21 de January de 2003). *Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables*. Recuperado el 18 de Febrero de 2011, de <http://www.planthealthprog.com>
- Buck, J., Walcott, R. and Beuchat. L. (2001). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Prog. [online]*.
- Burnett, A y Beuchat. R. (2001). Comparism of sample preparation methods for recovering *Salmonella* from raw fruits, vegetables, and herbs. *Comparison of sample preparation methods for recovering Salmonella from raw fruits, vegetables and herbs*, 64:1459-1465.
- Burnett, S., Chen, J. and Beuchat, L. (2000). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4679-4687.
- Campbell, R. (2003). Biological Control of Microbial Plant pathogens. *Cambridge University Press*.
- Cao, G. Sofic, E. and Prior, R. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food. Chem.*, 44:3426-3431.

- Castro, J. y Escartín, E. . (2000). Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* y *E. coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *J. Food Sci.*, 65:162-165.
- CDC. (13 de Mayo de 2000). *Foodborne Illness-Adding Fresh Fruits and Vegetables to the Equation*. Recuperado el 20 de Octubre de 2011, de Throughout the Food System: <http://foodsafety.psu.edu>.
- CDS/FDA. (1998). National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Microbiological Safety Evaluations and Recommendations on Fresh Produce. *Food Control*, 10:321-347.
- Chao, W., Ding, J. and Chen, R. (1988). Survival of *Yersinia enterocolitica* in the environment. *Can. J. Microbiol.*, 34:753-756.
- Charkowski, A., Barak, J. and Mandrell. (2002). Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3114-3120.
- Charkowski, A., Sarreal, Z. and Mandrell. (2001). Wrinkled alfalfa seeds harbor more aerobic bacteria and are more difficult to sanitize than smooth seeds. *J. Food Prot*, 64:1292-1298.
- Cover, T. and Aber, C. (1989). *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.*, 321:16-24.
- Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol*, 43(1):164-167.
- Donlan, R. and Costerton, W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganism. *Clin. Microbiol. Rev*, 15:167-193.
- Enomoto, K., Ishikawa, N. and Suzuki, T. (2002). Hot-water treatments for disinfecting alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli* ATCC 25922. *Food. Sci. Technol. Res.*, 8:247-251.
- Farrar, J. and Mohle-Boetani, J. (1999). California Department of Health Services. Personal communication.
- FDA. (20 de Octubre de 1989). *Seed for sprouting Prior to Food Use, i.e., Dried Mung Beans, Alfalfa seeds, etc*. Recuperado el 10 de Febrero de 2012, de [http://www.fda.gov/ora/complince\\_ref/cpg/cpgfod/cpg555-750.html](http://www.fda.gov/ora/complince_ref/cpg/cpgfod/cpg555-750.html)

- FDA. (1989). *Seeds for sprouting Prior to Food Use, i.e., Dried Mung, Beans, Alfalfa seeds, etc. Complice guide*. Recuperado el 20 de Febrero de 2011, de [http://www.fda.gov/ora/compliance\\_ref/cpg/cpgfod/cpg555-750.html](http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg555-750.html)
- FDA. (26 de October de 1998). *Food and Drug Admistration*. Recuperado el 3 de Marzo de 2011 , de Guidance for Industry: Guide to Minimize Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables.: <http://www.cfsan.fda.gov/dms/prodguid.html>
- FDA. (15 de September de 1999). *Guidace for industry: reducing microbial food safety hazard for sprouted seeds and guidance for industry: samplingand microbial testing of spent irrigation water during sprout production*. Recuperado el 20 de Enero de 2012, de <http://www.cfsan.fda.gov/dms/prodguid.html>
- FDA. (2000). Irradiation in the production, processing and handling of food. *Food and Drug Administration*, 65:64605-64607.
- FDA. (23 de December de 2003). *Food and Drug Administration and U.S. Department of Agriculture*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2011, de <http://www.cfsan,fda.gov/dns/lmr2-1.html>
- FDA. (23 de Junio de 2004). *Produce safety from production to consumption*. Recuperado el 20 de Enero de 2012, de [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_04/21cfr110\\_04.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_04/21cfr110_04.html)
- FDA. (2004). Produce safety from production to consumption: 2004 Action plan to minimize Foodborne Illness Associated with Fresh Produce Consumption. *Food and Drug Adminsitration*.
- FDA. (December de 2007). *Food and Drug Administration*. Recuperado el 15 de Febrero de 2011, de <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>
- FDA. (s.f.). *Food and Drug Administration*. Obtenido de Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., Revion A. AOAC.
- Fenlon, D., Ogden, A., Vinten, A. and Svoboda, I. (2000). The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in cattle slurry after application to land. *Symp. Ser. Soc. Appl Microbiol.*, 88:1498-5181.
- Fernández Escartín, E.,Torres Vitela, R. and Castillo Ayala, A. . (1984). Antagonismo de cepas *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* procedentes de quesos frescos no pasteurizados . *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 26:47-51.

- Fernández Escartín, E. 2008. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Querétaro. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Fett, W. (2000). Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J. Food Prot.*, 63:625-632.
- Fett, W. (2002). Reduction of the native microflora on alfalfa sprouts during propagation by addition of antimicrobial compounds to the irrigation water. *J. Food Microbiol.*, 72:13-18.
- Fett, W. and Cooke, P. (2005). A survey of native microbial aggregates on alfalfa, clover, and mung bean sprout cotyledons for thickness as determined by confocal scanning laser microscopy. *Food Microbiol.*, 22:253-259.
- Fett, W. (2003). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on laboratory-inoculated alfalfa seed with commercial citrus related products. *J. Food Prot.*, 66:1158-1165.
- Flimppim, R. (1960). Use of *Salmonella* antagonists in fermenting egg white I. Microbial antagonist of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.*, 8:366-370.
- Food and Agriculture Organization of United Nations/World Health Organization. (2008). Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs. *Meetin Report, Microbiological Assessment series* , No. 14.
- Fosberg, G. (s.f.). Control of cereal seed-borne diseases by hot humid air seed treatment. Ph.D. Thesis. Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, Sweden.
- Fu, T., Stewart, D., Reineke, K. Ulaszek, J and Tortorello, M. (2001). Use of spent irrigation water for microbiological analysis of alfalfa sprouts. *J. Food Prot.*, 64:802-806.
- Fu, T., VanPelt, M and Reineke, F. (2003). Growth of *Salmonella* during sprouting of naturally contaminated alfalfa seeds as affected by sprouting conditions. *J. Food Prot* , 66:152.
- Gandhi, M and Matthews, R. (2003). Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella* . *Int. J. Food. Microbiol.*, 87:301-306.

- Gandhi, S., Golding, S., Yaron, S. and Mathews, K. (2001). Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. *J. Food Prot*, 64:1891-1898.
- Gasson, M and Fitzgerald, G. (1994). Gene transfer systems and transposition: 1-51 in Blackie Acad & Profess. NY . *Genetic and Biotechnology of Lactic acid Bacteria*.
- Gasson, M. and Fitzgerald, G. (1994). Gene transfer systems and transposition:1-51. In Genetic and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. *Blackie Acad & Profess. N.Y.*
- Gázquez, G. R. (2000). Manejo de cultivos hortícolas en sustratos vs suelo, Técnicas de cultivo sin suelo o hidropónicas. *Hortazlizas, Frutas y Flores*, 20-23.
- Hallman, J., Mahaffee, W. and Kloepper, W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol*, 43:895-914.
- Han, Y., Sherman, M., Linton, H., Nielsen, S. and Nilesen, P. (2000). The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiol.*, 17:521-533.
- Hargrove, R. Mc Donough, F. and Mattingly, W. (1969). Factors affecting survival of *Salmonella* in Cheddar and Colby cheese. *J. Milk Food Technol.* , 32:480-484.
- Harmon, S. Kautter, D. and Solomon, H. (1987). *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetable sprouts grown in a home sprouting kit. *J. Food Prot.*, 50:62-65.
- Himathongkham, S., Nuanualsuwan., Riemann,H. and Cliver, D. (2001). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in artificially contaminated alfalfa seeds and mung beans by fumigation with ammonia. *J. Food Prot*, 64:1817-1819.
- Hitchins, A.D., Hartman, P.A. and Todd, E.C.D. (1992). *Coliforms Escherichia coli and its toxins. In compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (Eds). 3th Ed. . Washington, D. C. : American Public Health Assoc.*
- Howard, M. and Hutcheson, W. (2003). Growth dynamics of *Salmonella enterica* strains on alfalfa sprouts and in waste seed irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:548-553.
- Hu, H., Churey, J. and Worobo, W. (2004). Heat treatments to enhance the safety of mung bean seeds. *J. Food. Prot*, 67:1257-1260.

- Ingham, S., Losinski, J., and Andrews, M. (2004). *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden scale studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:6420-6427.
- Itho, Y., Sugita-Konishi, F. and Kumagai, S. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1532-1535.
- Ito, Y., Sugita-Konishi, F., Kasuga, M., Noguchi, Y., Konuma, H. and Kumagai, S. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2212-2215.
- Jaquette, C., Beuchat, L. and Mahon, B. (1996). Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella stanley* inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2212-2215.
- Kapperud, G. (1991). *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int. J. Food Microbiol.*, 12:53-65.
- Kaspar, C. y. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in sea water and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:2425-2429.
- Kim, H., Hung, C., Brackett and Lin, C. (2002). Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *J. Food. Prot.*, 56: 211-236.
- Kornacki, J. and Johnson, J. (2001). *Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (pag. 69-82)*. EE.UU.: American Public Health Association.
- Kramer, J. and Gilbert, J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York*, 21-70.
- Kylen, A. and McCready, R. (1975). Nutrients in seeds and sprouts of alfalfa, lentils, mung beans and soybeans. *J. Food Sci.*, 40:1008-1009.
- Lamg, M., Ingham, H. and Ingham, C. (2000). Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *Int. J. Food Microbiol.*, 58:73-82.
- Lovett, J. (1989). *Listeria monocytogenes*. En M. Doyle., *Foodborne Pathogens* (págs. 283-310). New York: Marcel Dekker.

- Mahon, B., Ponka, A., Hall, A., et al. (1997). An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *J. Infect. Dis.*, 175:876-882.
- Matos, A., Garland, L. and Fett, W. (2002). Composition and physiological profiling of sprouts-associated microbial communities. *J. Food Prot.* , 65:1903-1908.
- Maude, R., Sharma, R., Demirei, A. and Ziegler, R. (1996). Seedborne Diseases and Their Control: principles Practice. *CAB International, Wallingford, Oxford, United Kingdom.*
- McMahon, M and Wilson, G. (2001). The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organica vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, 70:155-162.
- Mislivec, P.B., Beuchat, L.R. and Cousin, M. A. . (1992). *Yeast and moulds. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser.* Washington, D.C.: 3th. American Public Health Assoc.
- Molbak, L., Licht, R., Kvist, T. and Andersen. (2003). Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and in situ location of transconjugent cells. *Appl. Environ Microbiol.*, 69:5536-5542.
- Montville, R. and Schaffner, W. (2005). Monte Carlo simulation of pathogen behavior during the sprout production process. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:746-753.
- Muller, S. (1999). University of California, Davis. U.S. Cooperative Extension Service. *Personal communication.*
- Mundt, J. and Hinkle, F. (1976). Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ Microbiol.*, 32:694-698.
- Muthukumarasamy P., H. J. (2003). Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. *J. Food Prot.*, 66:2038-2044.
- NACMCF. (1999). Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 52:123-153.
- Nandiwada, L., Schamberger, H., Schafer, W. and Diez-González. F. (2004). Characterization of a novel E2-type colicin and its application to treat alfalfa seeds to reduce *Eschehrichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.*, 93:267-279.

- Nieto, R. (2005). *Estructura y fisiología de las semillas*. Chapingo, México: ISBN.
- Nisbet, D. (2002). Defined competitive exclusive cultures in the prevention of enteropathogenic colonization in poultry and swine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81:841-486.
- O'Mahony, M. Cowden, J. and Smyth, B. (1990). An outbreak of *Salmonella saint-paul* infection associated with bean sprouts. *Epidemiol. Infect.*, 104:229-235.
- Palmai, M. and Buchanan, L. (2002). Growth of *Listeria monocytogenes* during germination of alfalfa sprouts. *Food Microbiol.*, 19:195-200.
- Palmai, M. and Buchanan, L. (2002). The effect of *Lactococcus lactis* on the growth characteristic of *Listeria monocytogenes* in alfalfa sprout broth. *Acta Aliment.*, 31:379-392.
- Park, C and Sanders, W. (1990). Source of *Klebsiella pneumoniae* in alfalfa and mung bean sprouts and attempts to reduce its occurrence. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 23:189-192.
- Park, W., Cho, H. and Lee, D. (1998). Effect of minimal processing operations on the quality of garlic, green onion, soybean sprouts and watercress. *J. Sci. Food Agric.*, 56:13-20.
- Patterson, J. and Woodburn, J. (1980). *Klebsiella* and other bacteria on alfalfa and bean sprouts at the retail level. *J. Food Sci.*, 45:492-495.
- Peeler, J. a. (1992). *Aerobic plate count. in Food and Drug Administration. USA: Bacteriological Analytical Manual*. 7th. Ed AOAC.
- Piernas, V. and Guiraud, P. (1997). Microbial hazards related to rice sprouting. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 32:297-305.
- Pönkä, A., Siitonen, Y., Jong, B., Kuhmonen, Y. and Pakkala, P. (1995). *Salmonella* in alfalfa sprouts. *Lancet*, 345:462-463.
- Prokopowich, D and Blank, G. (1991). Microbiological evaluation of vegetable sprouts and seeds. *J. Food Prot.* 54:560-562, 54:560-562.
- Puohiniemi, R., Heiskanen, T. and Siitonen, A. (1997). Molecular epidemiology of two international sprout-borne *Salmonella* outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2487-2491.

- Rincker, C.M. et al. (1988). Seed production. Practices in Alfalfa . *American Society of Agronomy*, 29.
- Rusell, S. (1988). Bacteria associated with foodborne diseases. *Food Technol*, 42 (4):181-200.
- Saroj, S., Sachin, H., Shashidar, R. et al. (2007). Radiation processing for elimination of *Salmonella* Typhimurium from inoculated seeds used for sprout making in India and effect of irradiation on germination of seeds. *J. Food Prot.*, 70:1961-1965.
- Scholler, N., Ingham, S. and Ingham, B. (2002). Assessment of the potencial for *Listeria monocytogenes* survival and growth during alfalfa sprouts production and use of ionizing radiation as a potencial intervention treatment. *J. Food Prot.*, 65:1259-1266.
- Scouten, A. and Beuchat, L. (2002). Combined effects of chemical, heat and ultra-sound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Appl. Microbiol.*, 92:668-674.
- Singh, N., Singh, K. y Bhunia, K. (2003). Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. *LWT Food Sci. Technol.*, 36:235-243.
- Skowronwk, F. Sarkadi, S and Holzapfel. (1998). Hygenic status and biogenic amine content of mung bean sprouts. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 207:97-100.
- Soreells, K. (1970). Inhibition of *Salmonella* gallinarum by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *J.Sairy Sci*, 52:239-241.
- Splittstoesser, D. Queale, D. and Andalaro, B. (1983). The microbiology of vegetable sprouts during commercial production. *J. Food Safety*, 5:79-86.
- Stefanova, M., Ivo, P., Sala, L., Damasceno, P. and Marques, A. (1990). Optimización de la recuperación de *Pseudomonas syringe* pv tabaci por la modificación de dos medios de cultivo. *Tropical Plant Pathology*, 3, 178-181.
- Stevens, A. Klapes, A. Sheldon, W and Klaenhammer, T. (1992). Antimicrobial Action of Nisin against *Salmonella* Typhimurium Lipopolysaccharide Mutans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1786-1788.
- Supply, I. S. (15 de Mayo de 1999). *Sprout net*. Recuperado el 20 de Febrero de 2011, de <http://www.sproutnet.com/sprouts.htm>

- Takeuchi, K. and Frank, J. (2000). Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of choline treatment on cell viability. *J. Food Prot.*, 63:434-440.
- Taormina P., B. L. (1999). Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg. Infect. Dis*, 5:626-634.
- Taormina, P. and Beuchat, L. (1999). Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatment with various chemicals. *J. Food Protect.*, 62:850-6.
- Taormina, P., Beuchat, L., Slutsker. (1999). Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:626-634.
- Tkalcic, S., Zhao, T., Harmon, B., Doyle, P. y Zhao, P. (2003). Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 66:1184-1189.
- Tortorello, M. Stewart, K. Reineke, K. y Ulaszek, M. (2000). Detection of *Salmonella* in alfalfa sprout spent irrigation water by Immunoassays. *Food and Drug Administration laboratory information bulletin.*, 4214.
- Van Beneden, C. Keene, A., Strang, R., et al. (1999). Multinational outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infections due to contaminated alfalfa sprouts. *JAMA*, 281:158-162.
- Vedamuthu, E. R., Raccocn, M., Glatz, B.A. (1992). *Acid producing microorganisms. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F.* . Washington, D.C.: 3th. American Public Health. Assoc.
- Vincent, J. Veonett, R y Riley, R. (1959). Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bact*, 78: 477-484.
- Viswanathan, P. y. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *Int.J. Environ. Health*, 203:205-213.
- Wachtel, M., Whitehand, L. y Mandrell, R. (2002). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food Prot.*, 65:465-470.
- Wantabe, Y. y Ozasa, K. (1997). An epidemiological study on an outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Rinsho Byori*, 45:869-874.

- Warriner, K., Spaniolas, S., Dickinson, M., Wright, C. y Waites, M. (2003). Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *J. Appl. Microbiol.*, 95:719-727.
- Whyte, K. (1980). The Complete Sprouting Cookbook, Troubador Press, San Francisco. . *Food Sci. Nutr.*, 13:353-385.
- Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (1995). *The genera of lactic acid bacteria*. Washington, D.C.: Blackie Academic & Professional. Vol. 2 pp:1-12.
- Wu, L., Ashraf, H., Facci, M., Wand, R., Patterson, G. y Juurlink, J. . (2004). Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:7094-7099.