

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Centro de Investigaciones Químicas

**“COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE Y
Escherichia coli PATÓGENA EN GERMINADO DE ALFALFA Y EVALUACIÓN DE
LA EFICIENCIA DE TRES DESINFECTANTES SOBRE GERMINADO DE ALFALFA
CONTAMINADO CON *E. coli* PATÓGENA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

MARÍA CONCEPCIÓN DE LA ROSA HERNÁNDEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de ésta Universidad.



Dedicatoria

Éste trabajo lo dedicó con todo mi cariño a mis Padres y mis Hermanos.

A mis Padres por toda la confianza, cariño y apoyo que me han brindado durante todos los años de mi vida y por que nunca han dejado de creer en mí.

A mis Hermanos por estar siempre que he necesitado palabras de aliento, por todos los momentos que hemos pasado juntos y por haber ser un buen ejemplo ha seguir.

Gracias a ustedes he llegado ser quien soy en este momento. Los quiero mucho.

Agradecimientos

En primer lugar doy gracias a Dios por permitirme llegar a este momento.

A mis Papas por quererme tanto. Y por que siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomando. Por que se que tengo su apoyo incondicional.

A mis hermanos, por tantos momentos que hemos compartido juntos, por sus consejos y también por apoyarme en todo lo que he hecho. Gracias por que además de ser mis hermanos son mis amigos.

A mi cuñada Araceli por que has sabido ser más que eso; has sido una gran amiga.

A mi cuñada Jose por ser también mi amiga y por haber traído a este mundo a esa pequeña niña que es un pingo pero que quiero mucho.

A mis sobrinos Daniela, Ramón, Carlitos y Samantha, por tantos momentos divertidos que hemos pasado juntos. Saben que cuentan conmigo para todo. Los quiero mucho.

A mis amigos: Oswaldo, Quique, Kikin, Goerge, Viviana, Víctor, Eligio, Luís Alberto, Alberto y Daniela, con los que pase momentos que nunca podré olvidar. Gracias por tantas emociones que compartimos juntos. Por los que creo fueron los mejores años de mi vida de estudiante. Nunca los voy a olvidar.

A Andrés con quien pase los últimos semestres. Por tantos momentos inolvidables. Por saber ser mi mejor amigo. Gracias por todo; en estas líneas sabes que no podría escribir todo lo que significaron tu amistad para mi, pero creo ya lo sabes.

A Aldo por las charlas tan amenas y por la amistad bonita que se ha dado en estos últimos meses.

A Tina, por tus tantas ocurrencias que hacían la estancia en el laboratorio mucho más agradable.

A mis asesores de tesis; por el tiempo que dedicaron para que este trabajo pudiera llegar a ser finalmente plasmado. En especial al Dr. Javier.

A mis compañeros de trabajo: Pancho, Norma, Piedad y Olivia. Quienes hacen que la tarea diaria de trabajar mucho más placentera.

Al Q.F.B. Moisés E. Jiménez Mayorga por el apoyo que me ha brindado en la elaboración de este trabajo.

Y por último y no por eso el menos importante: Carlos a quien conocí no precisamente en mis años de estudiante. Has llegado a formar parte muy importante de mi vida y de mi corazón. Gracias por apoyarme y estar conmigo siempre. ΣΑΣ ΑΓΑΠΩ

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas.....	i
Índice de gráficas.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	3
2.1. Enfermedades transmitidas por los alimentos.....	3
2.2. Agentes de riesgo asociados al consumo de alimentos.....	5
2.3. Elementos implicados en ETAs causadas por microorganismos.....	7
2.3.1. El microorganismo.....	8
2.3.2. El alimento.....	9
2.3.3. El individuo.....	9
2.4. Factores que afectan la sobrevivencia y desarrollo microbiano en los alimentos.....	11
2.5. Las verduras como vehículos de enfermedad.....	14
2.5.1. Sobrevivencia/desarrollo de bacterias patógenas en las verduras.....	15
2.5.2. Algunos brotes de enfermedad por verduras... ..	16
2.6. Germinados de semillas.....	17
2.6.1. Composición nutricional, obtención y consumo... ..	17
2.6.2. Microorganismos patógenos en germinados.....	19
2.6.3. Comportamiento de bacterias patógenas en germinados.....	21
2.7. Desinfectantes.....	23
2.7.1. Cloro.....	23
2.7.2. Yodo.....	25
2.7.3. Plata coloidal.....	26
2.8. Microorganismos indicadores de calidad sanitaria del alimento.....	27
2.8.1. Bacterias mesófilas aerobias (BMA).....	27
2.8.2. Organismos coliformes (OC).....	28
2.8.2.1. Significado en los alimentos.....	29
2.9. <i>Escherichia coli</i>	29
2.9.1. Características generales.....	29
2.9.2. <i>Escherichia coli</i> no patógena.....	30
2.9.2.1. Significado en los alimentos.....	30

2.9.3.	<i>Escherichia coli</i> patógena.....	31
2.9.3.1.	<i>Escherichia</i> enteropatógena (ECEP).....	32
2.9.3.2.	<i>Escherichia</i> enterotoxigénica (ECET).....	33
2.9.3.3.	<i>Escherichia</i> enteroinvasiva (ECEI).....	35
III.	OBJETIVOS.....	37
IV	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1.	Material de laboratorio.....	38
4.2.	Equipos.....	39
4.3.	Reactivos.....	39
4.4.	Medios de cultivo.....	40
4.5.	Material biológico.....	40
4.6.	Métodos.....	42
1.	Determinación del comportamiento de organismos coliformes, bacterias mesofilas.....	42
1.1.	Obtención del germinado a partir de semilla recién hidratada.....	42
1.2.	Obtención del germinado a partir de semilla con 24 h de hidratación.....	43
1.3.	Muestreo y recuento de OC y BMA	43
2.	Comportamiento de <i>E. coli</i> enteropatógena, enteroinvasiva y enterotoxigenica.....	44
2.1.	Preparación del inóculo.....	44
2.2.	Inoculación de los patógenos.....	45
2.2.1	Contaminación de la semilla.....	45
2.2.2.	Contaminación al brotar el tallo.....	45
2.3.	Muestreo y recuento de los grupos patógenos de <i>E.coli</i>	46
3.	Sobrevivencia de grupos patógenos en germinado de alfalfa almacenado en refrigeración.....	46
3.1.1	Muestreo y recuento.....	47
4.	Evaluación de la eficiencia de desinfectantes químicos en la desinfección del germinado de alfalfa.....	47
4.1.	Preparación de los germicidas.....	47
4.2.	Fuente del germinado.....	48
4.3.	Efecto de los germicidas.....	48
V	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
5.1.	Comportamiento de organismos coliformes y bacterias mesófilas aerobias.....	50

5.2.	Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena, enteroinvasiva y enterotoxigenica.....	53
5.3.	Comportamiento de <i>E. coli</i> enteropatógena, etneroinvasiva y enterotoxigenica en germinado mantenido en refrigeración.	57
5.4.	Evaluación de los germicidas en la desinfección del germinado de alfalfa.....	62
VI	CONCLUSIONES.....	67
VII	REFERANCIAS.....	68

Índice de Tablas

Tabla 1	Agentes nocivos a la salud asociados al consumo de alimentos.....	6
Tabla 2	Casos y brotes de enfermedades transmitidas por alimentos según etiología. Estados Unidos de Norte América. 1998-1992.....	7
Tabla 3	Casos y brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos según microorganismo involucrado. Estados Unidos de Norte América. 1998-1992.....	8
Tabla 4	Valor D de las esporas de <i>C. botulinum</i> según pH del medio.....	13
Tabla 5	Brotes reportados de intoxicación alimentaría asociados al consumo de germinados de semilla. 1973-1998.....	22
Tabla 6	Efecto de dos concentraciones y dos tiempos de contacto en la reducción de niveles de <i>Escherichia coli</i> desarrollada en germinado de alfalfa con tres desinfectantes diferentes cloro, yodo y plata coloidal.....	65
Tabla 7	Efecto de dos concentraciones y un tiempo de contacto en la reducción de niveles de <i>Escherichia coli</i> desarrollada en germinado de alfalfa con tres desinfectantes diferentes cloro, yodo y plata coloidal.....	65

Índice de Gráficas

Gráfica 1	Comportamiento de BMA, OC en germinado de alfalfa hidratado 4 horas.....	51
Gráfica 2	Comportamiento de BMA, OC en germinado de alfalfa con 24 hrs. de hidratación.....	52
Gráfica 3	Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> en germinado de alfalfa inoculados inmediatamente después de 4 horas.....	54
Gráfica 4	Comportamiento de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> inoculados inmediatamente después de 24 horas de hidratación.....	58
Gráfica 5	Comportamiento en germinado mantenido en refrigeración de tres grupos patógenos de <i>E. coli</i> desarrolladas en germinado de alfalfa.....	61



Introducción

I. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, como en todo el mundo, la generación de alimentos es una prioridad. En los últimos años se han desarrollado tecnologías encaminadas a la obtención de alimentos con una mejor calidad comercial, incluido un aumento significativo en la vida de anaquel. No obstante, por lo general a la inocuidad de los alimentos, tanto los productores como los comerciantes, no suelen darle una importancia relevante acorde con los efectos que tiene en la población (Fernández, 2000). Esta falta de inocuidad trae como consecuencia la presentación de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), principalmente de etiología microbiana. El problema, aunque con matices distintos, ocurre en todo el mundo incluso en países desarrollados que destinan considerables recursos para generar alimentos con buena calidad sanitaria (Bean *et al.*, 1996; Beckers, 1998).

En los países en vías de desarrollo como el nuestro, esta falta de atención a la inocuidad alimentaría es más acentuada. Se ha estimado, por ejemplo, que en México el número de ETAs ascienden a poco más de 200 millones por año (Fernández, 2000; Archer, 1990).

Se aprecia de esta forma, la necesidad de contar con medidas cada vez más eficientes que permitan asegurar la inocuidad de los alimentos y abatir la incidencia de ETAs. Para lograr este objetivo de inocuidad, se han desarrollado procedimientos que sólo difieren en acciones menores, pero que parten de principios similares y se encaminan hacia objetivos comunes. Tales sistemas, como el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés), han sido concebidos, desarrollados y perfeccionados por especialistas en inocuidad de los alimentos (Fernández, 1997; Archer, 1990).

Específicamente, para el caso de la inocuidad microbiana, los elementos que conducen a la pérdida de la inocuidad de un alimento incluyen la contaminación, sobrevivencia y/o desarrollo de los microorganismos patógenos en los alimentos (Fernández, 2000). El sistema HACCP contempla estos tres componentes básicos en el aseguramiento de la inocuidad de un producto. En consecuencia, es necesario conocer las fuentes y mecanismos de contaminación de los alimentos, el tipo de flora microbiana generalmente presente y el efecto de los factores ecológicos en la sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos en el medio ambiente y en los alimentos (Fernández, 2000).

En este trabajo se abordó dos de los tres componentes que afectan la inocuidad microbiana de un alimento, en particular, el germinado de alfalfa. La naturaleza y condiciones especiales de producción, transporte, comercialización y consumo sugieren en el germinado la existencia de riesgos potenciales a la salud. Los germinados de semillas se han visto involucrados en brotes de enfermedad en diferentes partes del mundo. Desafortunadamente, en nuestro país no se cuenta con suficiente información al respecto; sin embargo, debido a las inadecuadas condiciones de preparación, comercialización y consumo que generalmente se aplican en este alimento, debe reconocerse la posibilidad de su participación en incidentes de ETAs de etiología microbiana. En el presente trabajo se estudio el comportamiento de tres grupos patógenos de *Escherichia coli* en germinado de alfalfa así como la eficiencia de tratamientos de desinfección para reducir los niveles de estos grupos patógenos en germinado contaminado. Se trabajó con los grupos patógenos de *E. coli* que más frecuentemente producen padecimientos en México (Eslava *et al.*, 1993).



Antecedentes

II. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

El interés por evitar las enfermedades asociadas al consumo de los alimentos surge con la práctica misma de la ingestión de alimentos. Esta preocupación se manifiesta históricamente de muy diversas maneras. La necesidad de preservar los alimentos contra el deterioro, constituyó un medio que indirectamente contribuyó a proteger su inocuidad (Fernández, 2000). En los últimos años se han desarrollado tecnologías encaminadas a la obtención de alimentos con una mejor calidad comercial, incluido un aumento significativo en la vida de anaquel. A la inocuidad de los alimentos, tanto los productores como los comerciantes, no suelen darle una importancia relevante acorde con los efectos que tiene en la población. Esta desatención trae como consecuencia la manifestación de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), principalmente de etiología microbiana (Bean *et al.*, 1990; Bean *et al.*, 1996; Beckers, 1998; Todd, 1978; Todd, 1985).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema mundial. En muchos casos el cuadro clínico es ligero y de limitada mortalidad. Sin embargo, el impacto socioeconómico puede llegar a ser alto. Todos estos incidentes generan pérdidas económicas tanto para los productores cuyos alimentos se ven implicados, como a las personas afectadas, ya que el costo de los brotes no se restringe a los gastos de atención médica de los pacientes; hay que considerar también la pérdida de productividad o el cierre de empresas y el decomiso de grandes volúmenes de alimento (Archer & Kyenberh, 1985; Kyenberg & Archer, 1987; Tood, 1985; Todd,

1985; Tood, 1989). Debido a toda esta situación, actualmente en muchos países existe gran interés en la obtención de alimentos con una completa calidad sanitaria.

Es interesante señalar que el concepto de calidad sanitaria de un alimento no se limita únicamente a la ausencia de agentes nocivos; involucra otros atributos que le confieren calidad comercial y nutricional. Para que un alimento pueda ser considerado de buena calidad sanitaria debe poseer los siguientes atributos (Fernández, 1997):

- a) **Nutritivo:** lo ideal en un alimento es que este no pierda su capacidad nutricional por causas asociadas a su preparación, procesamiento o almacenaje. En algunas ocasiones debido al procesamiento el alimento puede llegar a perder o disminuirse la concentración de algunos nutrientes; esta pérdida se debe tomar en cuenta en las formulaciones del producto.
- b) **Idóneo:** este atributo se refiere a que la información que se expresa en la etiqueta corresponda a la naturaleza y composición del alimento; de lo contrario se está cometiendo un fraude.
- c) **Fresco:** es la plenitud de las características organolépticas que presenta el producto recién cosechado, procesado o preparado. La frescura se puede perder sin que se llegue al extremo del deterioro.
- d) **Sensorialmente aceptable:** son parámetros de calidad y condiciones de fabricación que el fabricante de alimentos ha establecido. La alteración de tales parámetros conduce a un alimento sensorialmente diferente, inaceptable.
- e) **Larga vida de anaquel:** el alimento tiene que conservar el mayor tiempo posible la plenitud de los atributos descritos anteriormente; esto se logra con la aplicación de

tecnologías, encaminadas a este fin; sin que estas puedan comprometer otras cualidades del alimento.

- f) Inocuo: el término de inocuo se refiere a la ausencia en el alimento de agentes nocivos al humano, ya sean físicos, químicos o biológicos.

En general los elementos que conducen a la pérdida de la inocuidad de un alimento incluyen la contaminación, sobrevivencia y/o desarrollo de los microorganismos patógenos en los alimentos. La falta de inocuidad se traduce en un alto número de brotes de ETAs principalmente de etiología microbiana; éste problema que ocurre en todo el mundo. A pesar de los grandes esfuerzos que se realizan en países desarrollados para generar alimentos de buena calidad sanitaria, la incidencia anual de ETAs de etiología microbiana en estos países es elevado; por ejemplo, en los Estados Unidos de Norte América (EE.UU.) la incidencia anual de ETAs se estima entre: 24 - 81 millones de casos; de los cuales 5000 resultan en muertes (Archer & Kyvenberg 1985).

2.2. Agentes de riesgo asociados al consumo de alimentos.

Es evidente que una buena alimentación es fundamental para preservar y promover la salud. La cualidad más aparente de los alimentos es su capacidad nutricional, no obstante su consumo indiscriminado, aún cuando satisfaga plenamente el apetito puede dar lugar a problemas de sobrepeso. El consumo insuficiente de manera prolongada también compromete la salud en forma de padecimientos carenciales.

Desde un enfoque preventivo, existen riesgos adicionales asociados al consumo de alimentos que pueden afectar la salud; más específicamente, los efectos nocivos asociados al consumo de alimentos están determinados por agentes que son de naturaleza física, química o biológica (Fernández, 2000).

Tabla 1. Agentes nocivos a la salud asociados al consumo de alimentos

Agente	Ejemplo
Biológicos	
Infecciosos (bacterias, virus) Toxicogénicos (bacterias, hongos)	<i>Salmonella Typhi</i> , virus de la hepatitis <i>Clostridium botulinum</i>
Parásitos (forma infectante microscópica)	<i>Entamoeba histolytica</i>
Productores de amina	<i>Klebsiella, Proteus</i>
Químicos	
Residuos industriales	Mercurio
Aditivos alimentarios	Sulfito de sodio
Residuos de medicamentos	Penicilina
Residuos de la sanidad	Hidróxido de sodio
Físicos	Partículas metálicas

Adaptado de: Fernández, 2000

De la lista general de riesgos, la opinión generalizada entre los especialistas coincide en que son los de naturaleza biológica son los que representan una amenaza mayor a la salud cuando se consumen alimentos (Fernández, 2000).

Tabla 2. Casos y brotes de enfermedades transmitidas por alimentos según etiología. Estados Unidos de Norte América. 1988 – 1992

Etiología	Brotos		Casos	
	Número	%	Número	%
	841	34.7	35 607	46
Microbiana				
Química	143	5.9	927	1.2
Parasítica	17	0.7	379	0.5
Vegetal	0.0	0.0	0.0	0.0
	1 001	41.3	36 890	47.7
Total conocido				
Desconocido	1 422	58.7	40 483	52.3

Adaptado de: Bean *et al.*, 1996

Generalmente, en los países desarrollados los brotes de ETAs producen grandes pérdidas económicas; el monto económico de las demandas contra las compañías o establecimientos identificados como responsables del manejo del alimento ha sido muy elevado (Archer & Kyenberg, 1985; Kyenberg & Archer, 1987; Todd, 1985; Tood, 1989). Debido a las grandes pérdidas económicas que han ocasionado los brotes de ETAs a los productores o fabricantes de alimentos en los países industrializados, el interés por generar alimentos inocuos ha ido en ascenso. Sin embargo, a pesar de los suficientes recursos económicos y humanos que estos países invierten para prevenir las ETAs, no se ha logrado una reducción sustancial (Bean *et al.*, 1996).

2.3. Elementos implicados en ETAs causadas por microorganismos.

El que un individuo enferme como consecuencia del consumo de un alimento contaminado con un microorganismo patógeno, depende justamente de tres elementos implicados y su interrelación (Fernández, 2000):

- Microorganismo
- Alimento
- Individuo

2.3.1. El Microorganismo

El perfil de las causas microbianas de las ETAs muestra en la actualidad matices muy singulares. La lista de patógenos se ha incrementado notablemente. En algunos casos se trata de microorganismos recientemente descubiertos. En otros, son microorganismos que perdieron vigencia de acuerdo con los reportes epidemiológicos, pero que han resurgido y se reportan cada vez con mayor frecuencia (Fernández, 2000). En la tabla 3 se muestra el número de casos y brotes transmitidos por alimentos según el microorganismo involucrado.

Tabla 3. Casos y brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos según microorganismo involucrado. Estados Unidos de Norte América. 1988 - 1992.

Etiología	No. Brotes	No. Casos	No. Muertes
Bacterias			
<i>Bacillus cereus</i>	21	163	0
<i>Campylobacter</i>	25	732	2
<i>Clostridium botulinum</i>	60	133	11
<i>Escherichia coli</i>	11	244	0
<i>Salmonella</i>	549	21 17	38
<i>Shigella</i>	25	4 788	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	1 678	0
Total bacterias	796	33 206	55
Parásitos			
<i>Trichinella spiralis</i>	10	195	0
Virus			
Hepatitis A	43	2 109	6

Adaptado de: Bean *et al.*, 1996

Las bacterias patógenas del intestino muestran variados mecanismos de patogenicidad: invasivo, citotóxico, toxigénico, adhesivo así como también de diferentes dosis infectante; que varían según cada microorganismo implicado en las ETAs (Fernández, 2000).

2.3.2. El alimento

La naturaleza del alimento influye en el riesgo de enfermar cuando es consumido. Si sus características no son propicias para la multiplicación de un patógeno exotoxigénico, el daño que este pueda causar es nulo, aún cuando el microorganismo sea ingerido con el alimento. Ciertos componentes del alimento pueden facilitar el tránsito por el estómago del patógeno infeccioso (como ocurre con los productos grasos en la salmonelosis) e incrementan el riesgo de enfermar (Fernández, 2000).

Muchos agentes patógenos, aún en elevado número, no afectan la apariencia o sabor del alimento. Aún tratándose de productos perecederos, la regla general es que estos no muestren signos de deterioro, incluso si las bacterias patógenas que contengan se han multiplicado hasta decenas, y en ocasiones cientos de millones por gramo (Beuchat *et al*, 1994).

2.3.3. El individuo

Ante el acoso permanente de los microorganismos del medio ambiente con los que entra en contacto, un individuo responde con cierta capacidad no específica e innata que impide los efectos nocivos de la actividad de tales microorganismos o sus

productos tóxicos (Fernández, 2000).

Pueden distinguirse dos tipos de poblaciones a este respecto:

- Individuos con mecanismos normales de defensa.
- Individuos hipersensibles.

Las barreras de protección son diversas; en los primeros existen y se expresan de manera regular; en los segundos es evidente un deterioro de variada magnitud.

De manera particular se encuentran en el intestino mecanismos naturales de defensa (Petska, 1993):

- a. Secreciones: ácido del estómago, ácidos biliares, enzimas proteolíticas y moco.
- b. Físicas: mucosa íntegra y movilidad del intestino.
- c. Macrófagos y polimorfonucleares.
- d. Ciertas proteínas que realizan funciones que se traducen en un efecto directo contra microorganismos.
- e. Flora microbiana intestinal.

La respuesta inmune ante los agentes patógenos que ingresan al tracto digestivo es a través de dos mecanismos. Uno que es de tipo específico o innato (inmunidad específica); cuando se rebasa este recurso y no se suprime al agente de riesgo, el individuo activa un mecanismo que tiende a su remoción o destrucción; inmunidad específica (Fernández, 2000).

2.4. Factores que afectan la sobrevivencia y desarrollo microbiano en los alimentos.

Una vez que se ha contaminado un alimento, la perspectiva que se presenta en el comportamiento de los microorganismos es:

- a) Sobrevivencia, sin afectar el número de los microorganismos viables
- b) Disminución en el número
- c) Desarrollo

Eventualmente, un factor específico por sí sólo llega a ser decisivo en el destino de los microorganismos presentes. Sin embargo, la regla general es que permanentemente el microorganismo resulte afectado por una activa interacción entre más de dos factores ecológicos o ambientales. Las perspectivas de inactivación, sobrevivencia y desarrollo generalmente son distintas para cada grupo, género, especie, biotipo, e incluso cepa contaminante en el mismo alimento; este suele ser escenario de un proceso permanente de actividad microbiana cuya dinamicidad está determinada por la composición del alimento, la diversidad y número de los microorganismos presentes y las condiciones ecológicas prevalentes. Los cambios químicos que van teniendo lugar, da lugar a condiciones favorables o adversas para los diferentes microorganismos (Fernández, 2000).

El comportamiento de los microorganismos en el medio ambiente y en los alimentos depende de una serie de factores conocidos como factores ecológicos. Estos son: pH, temperatura, actividad de agua, potencial de oxido-reducción, osmolaridad, composición de la atmósfera, radiaciones, sustancias antimicrobianas, número inicial y estado fisiológico del microorganismo, disponibilidad de nutrientes y

antagonismo microbiano (IAMFES, 1991). Para cada uno de los factores ecológicos, existe un mínimo por abajo del cual la actividad se suspende, se afecta la integridad estructural y fisiológica de la célula o se inactiva de manera irreversible; un óptimo para desarrollar y un máximo arriba del cual la actividad nuevamente cesa (IAMFES, 1991; ICMST, 1996). El pH y la temperatura, son dos de los factores que en los alimentos tienen un efecto más evidente sobre la dinámica de los microorganismos. Se ha demostrado claramente que la mayor parte de los microorganismos se desarrollan mejor con valores de pH alrededor de 7, aunque algunos como *Salmonella*, son capaces de desarrollar por abajo de 4, o como *V. cholerae* en valores de pH cercanos 11 (IAMFES, 1991). El efecto del pH sobre la actividad microbiana, depende además del tipo de ácido presente, por ejemplo una reducción del 90 % de la población de *Staphylococcus aureus* presente en leche pasteurizada, se logra a pH 5.2 con ácido acético, a 4.9 con ácido láctico, a 4.7 con fosfórico y a 4.6 con clorhídrico (Petska, 1996). La forma no disociada del ácido es la que ejerce efecto sobre el microorganismos (Petska, 1993; Park & Sandrs, 1992). La toxicidad por tanto, depende en parte de la disociación del ácido; así mientras mayor sea ésta, el efecto sobre el microorganismo será menor (Petska, 1993). Es importante señalar que por lo general los límites para un factor ecológico en particular, se obtienen de estudios efectuados en el laboratorio en donde los restantes factores se mantienen en su nivel óptimo. Generalmente el límite se acorta en cuanto otro factor se aparta del óptimo. *Salmonella* por ejemplo, a una actividad de agua (aw) de 0.986, puede desarrollar con un valor de pH de 5.0; mientras que para un valor de 0.971 de aw el pH mínimo de desarrollo es de 5.8 (Petska, 1993). Esto también se observa con *C. botulinum*, el cual para un valor de 0.99 de aw presenta un pH mínimo de 5.3; y para

una aw. de 0.94 el valor mínimo es de 5.3 (Petska, 1993). El tratamiento térmico que se aplica para inactivar las esporas de *C. botulinum*, varia según el pH del medio como se puede apreciar en la tabla 4; se advierte claramente que la acidez potencializa el efecto del calor. El valor D o tiempo de muerte térmica disminuye conforme el pH desciende. En otras palabras, los datos de la tabla indican que conforme el pH del medio donde se encuentran las esporas desciende, se requiere un menor tiempo a una temperatura constante, para inactivar al 90 % de las esporas.

En el desarrollo de medidas o tratamientos tendientes a lograr la inocuidad de los alimentos, es importante considerar las características del alimento. Se podrían producir alimentos estériles, pero sin las características organolépticas apropiadas o con detrimento nutricional. Las nuevas tecnologías y proceso de alimentos se enfocan a obtenerlos con una completa calidad sanitaria, mediante la combinación de 2 o más factores ecológicos que en conjunto, tendrán un mayor efecto sobre la viabilidad o desarrollo de los microorganismos que de manera individual. De esta forma se logra un mayor efecto sobre el microorganismo con el mínimo nivel de los factores, causando mínima alteración al alimento (Park & Sanders, 1992).

Tabla 4. Valor D de las esporas de *C. botulinum* según pH del medio.

pH	Valor D (min.)
4.0	0.128
4.2	0.143
4.4	0.163
4.6	0.223
4.8	0.226
5.0	0.260
6.0	0.491
7.0	0.515

Fuente: Petska, 1993

2.5. Las verduras como vehículos de enfermedad.

Recientemente algunos brotes se han asociado a productos que se consumen crudos. En la década pasada múltiples brotes fueron ligados a germinados crudos en muchos países alrededor del mundo. Durante su desarrollo en el campo las verduras se mantienen expuestas a la contaminación directa por la tierra y el agua; la fauna y los humanos también tienen participación. Las frutas suelen estar protegidas por una cubierta externa que les preserva del ingreso de microorganismos. La población microbiana se encuentra principalmente sobre las partes externas de frutas y verduras, que por lo general corresponde a la que existe en el entorno.

La presencia de microorganismos patógenos está determinada por las prácticas sanitarias que se apliquen durante el cultivo, incluida la cosecha de los productos. Sobre las verduras pueden identificarse microorganismos intestinales diversos: bacterias, virus, quistes y huevecillos de parásitos (Fernández, 2000). Estas son consumidas con frecuencias crudas y sin un tratamiento antimicrobiano efectivo previo a su consumo. Suelen consumirse en forma de ensaladas o como ingredientes de alimentos cocinados. Se advierte claramente el riesgo a la salud que esta práctica representa.

Numerosos autores han demostrado que la contaminación de los cultivos con bacterias patógenas o indicadores de contaminación fecal puede ocurrir por irrigación con aguas negras o residuales, y por la fertilización de la tierra con estiércol no tratado (Robinson & Adams, 1971). Se ha observado que el 10 % de cultivos de alfalfa irrigados con agua negras presentó contaminación con *L. monocytogenes* (3-5 UFC/g), mientras que a partir de los cultivos no irrigados con estas aguas, el

microorganismo no se aisló (Adams *et al.*,1989). Sin embargo, debe considerarse que la contaminación de los cultivos con microorganismos patógenos por éste tipo de aguas, no siempre sucede como regla universal. Las deficientes condiciones de sanidad entre los manejadores durante el cultivo, cosecha, transporte o almacenamiento, pueden propiciar también la contaminación de las verduras con enterobacterias (Geldreich & Bordner, 1971; Kaferstein, 1976; Park & Sanders, 1990).

2.5.1. Sobrevivencia / desarrollo de bacterias patógenas en las verduras.

Es evidente que la presencia de bacterias patógenas en un alimento constituye un riesgo al consumidor. Sin embargo, los niveles del riesgo están en función de la capacidad del microorganismo para sobrevivir y desarrollar en el alimento. Este último punto es un factor que incrementa el riesgo ya que cualquier incremento en los niveles del patógeno en el alimento, lo hacen más riesgoso al consumidor.

La sobrevivencia de las bacterias patógenas en el campo va a depender de una serie de factores como el tipo de suelo, flora competitiva, pH, penetración de la luz solar y aire en el suelo (Mounteeery & Wilbur, 1971). No existen reportes en la literatura sobre la capacidad de las bacterias patógenas para el hombre, de provocar daño en las frutas o verduras y penetrar al interior de las frutas o verduras. Sin embargo, una alteración de la cáscara de los vegetales, puede favorecer la penetración de los microorganismos. Una vez dentro, el patógeno puede entrar en actividad e incrementar su número. De hecho se sabe que la actividad microbiana es más alta en verduras cortadas que en las íntegras (Beuchat & Brackett, 1990; Brackett, 1997). Por otro lado, una diversidad de microorganismos puede subsistir y multiplicarse en la superficie del vegetal a expensas de los escasos nutrientes (sales,

vitaminas, carbohidratos, proteínas) que se disuelven en el agua de exudación (Brackett, 1997; Todd, 1985). En caso de las bacterias patógenas, existen reportes donde se señala que tanto las verduras sin procesar como las mínimamente procesadas son un sustrato para el desarrollo microbiano.

En las frutas y verduras existen suficientes nutrientes para sostener la multiplicación de microorganismos, tanto deterioradores como patógenos. Por ejemplo, *E. coli* O157:H7 desarrolla bien sobre lechuga cortada y pepinos rebanados y en cubos de melón y sandía conservados a 25° C. Los germinados de semillas de diversos vegetales como soya, lenteja, alfalfa y otras en general contienen nutrientes muy fácilmente aprovechables por las bacterias (Fernández, 2000).

2.5.2. Algunos brotes de enfermedad causadas por el consumo de verduras.

En los EE.UU. de 1986 a 1993 los brotes de ETAs por el consumo de verduras y ensaladas crudas, ocuparon un lugar importante (Bean *et al.*, 1996). La frecuencia y extensa distribución de brotes por ETAs causadas por productos contaminados ha sido reconocido como un problema en Estados Unidos. Estos productos incluyen frambuesas, fresas, melón, lechuga, germinados de alfalfa y tomates (Fernández, 2000). Diversos microorganismos se han asociado con brotes de enfermedad por consumo de verduras; por ejemplo, en el 2002 a partir de muestras de verduras recolectadas en dos restaurantes de Minnesota se aisló *E. coli* enterotoxigénica (ECET) de perejil asociado a brotes por su consumo (Naimi *et al.*, 2002). De germinados de semillas como soya, lenteja, alfalfa y otras se tienen registros de brotes de gastroenteritis debidos a *B. cereus*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. En México, existe escasa información al respecto, sin embargo, es de esperar que la

incidencia de enteropatógenos en las verduras y brotes por el consumo de verduras o ensaladas crudas, ocupen un lugar importante (Fernández, 2000).

2.6. Germinados de semillas.

2.6.1. Composición nutricional, obtención y consumo.

En los últimos años, en muchas partes del mundo (incluido México), se ha presentado un claro incremento en la demanda de germinados de semillas (Klaus, 1980). Los germinados tienen una composición nutricional rica en carbohidratos, proteínas, lípidos, algunos aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales (Fordman *et al.*, 1975; Hitchins, 1992; Kakade & Evans, 1966; Klaus, 1980; Kylen & McCready, 1975; Ranhota *et al.*, 1977). Aunque muchas semillas contienen algunos factores antinutricionales (como inhibidores de tripsina), éstos prácticamente desaparecen durante la germinación de la semilla (Gupta & Wagle, 1980).

Los germinados se pueden preparar a partir de diferentes semillas como trigo, soya, frijol, lenteja, cebada, mostaza, alfalfa, entre otras. Los de soya y alfalfa son los de mayor consumo a nivel mundial. La germinación de las semillas, es relativamente fácil de obtener. Con frecuencia la producción de germinado se realiza en el hogar sin técnicas ni aparatos sofisticados, únicamente empleando algunos utensilios de cocina (Klaus, 1980). Para una producción a nivel industrial, existen normas y técnicas en lo referente a disposición de espacio, instalaciones, higiene, producción, transporte y venta (Whyte, 1973). En nuestro país en general no se cuenta con este tipo de normas y la mayoría de las veces, se producen en sitios e instalaciones inadecuadas y con una pobre higiene. Existen diferentes métodos de germinación de semillas (Klaus, 1980; Whyte, 1973); en todos ellos, las semillas son hidratadas hasta

aumentar aproximadamente 4 veces su tamaño o hasta que el agua las satura. El tiempo de saturación varía dependiendo del tipo y tamaño de la semilla. Una vez hidratada, el exceso de agua es drenado y las semillas son colocadas en una capa uniforme dentro de contenedores en donde germinan a temperaturas entre 22 y 30°, con irrigación periódica. Los geminados alcanzan un tamaño comercial entre los 4-10 días después de la hidratación de la semilla. El tiempo va a depender del tipo de semilla y del proceso de germinación empleado (Klaus, 1980). En los EE.UU; una vez que los germinados han alcanzado el tamaño deseado, por lo general se colocan en pequeñas charolas de polietileno y son cubiertos con una película de algún material plástico. De esta forma son mantenidos en refrigeración. En algunos casos además son empacados bajo atmósferas modificadas (Trevor & Harris, 2004).

El consumo de germinados crudos ha llegado a ser el centro de atención desde la década pasada. A pesar del aumento de información sobre el cultivo y manejo de este tipo de alimento que ha proporcionado la administración de drogas y alimentos (FDA) en los Estados Unidos, los brotes por enfermedades transmitidas por alimentos continúan (Monteville & Schaffner, 2003). La mayoría de los brotes están relacionados con germinados de alfalfa, aunque también se registran brotes por germinados de diversas semillas como las de trébol y semillas de soya (Beuchat, 1996). El brote más grande que se ha registrado involucra aproximadamente 6000 personas y fue asociado con el consumo de germinado de rábano contaminado (Gandhi & Matthewes, 2003).

En México es frecuente observar en mercados públicos y supermercados los germinados expuestos al público sin ninguna protección y fuera de refrigeración. Algunos autores señalan que estas prácticas favorecen la contaminación de las verduras con microorganismos patógenos y favorecer su desarrollo (Mountey & Wilbur, 1971). Los germinados de semillas son consumidos de una diversidad de formas: ensaladas, sopas, sandwiches, postres, bocadillos, licuados con otras verduras o frutas y en muchos platillos de comida oriental (Klaus, 1980). Con frecuencia son consumidos crudos y sin un tratamiento antimicrobiano terminal previo. Esta práctica conlleva el riesgo de ingerir microorganismos patógenos activos que pueden afectar la salud del consumidor (Castro-Rojas, 1998).

2.6.2. Microorganismos patógenos en germinados.

Como se mencionó, las verduras son vehículos frecuentes de microorganismos patógenos al humano y han sido causa de brotes de ETAs. Diferentes estudios muestran que los organismos patógenos pueden exceder a 10^7 UFC por gramo de germinado sin afectar en forma negativa su apariencia. Diferentes microorganismos patógenos se han aislado de semillas germinadas. En Tailandia se han aislado diferentes serotipos de *Salmonella* (Lexington, Orion, Senftenberg, Tennessee, Poona y Weltevreden) a partir de germinado de soya con una frecuencia del género de 8.7 % (Fordman *et al.*, 1975). *S. bovismorbificans* y *S. java* se han aislado de germinado de alfalfa cultivado en Finlandia (Jong & Anderson, 1995, Kuhmonen & Pitkaelae, 1991). *S. arizonae* se ha detectado en germinado de soya en el Reino Unido (Rowe, 1966). Diferentes autores reportan el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* de germinado de alfalfa y de soya (Park & Sanders, 1990; Patterson & Woodburn, 1890), de germinado

de soya también se han aislado otros microorganismos patógenos como *Bacillus cereus* (Harmon *et al.*, 1987) *L. monocytogenes* (Castro-Rosas, 1998) y *S. aureus* coagulasa positivo con una frecuencia del 24 % (Kuhmonen & Pitkaelae, 1991; Prokopowich & Blank, 1991). Por otro lado, en Canadá se han aislado coliformes fecales de germinado de alfalfa con límites de 7.3×10^2 a 1.1×10^3 UFC/g, y organismos coliformes en un intervalo de 3×10^3 a 4×10^6 UFC/g (Prokopowich & Blank, 1991).

El consumo de ensaladas y germinados de semillas crudos constituye un riesgo elevado a la salud, luego de una evaluación microbiología de este tipo de alimentos (Geiges *et al.*, 1990). Otros autores reportan niveles elevados de bacterias mesófilas aerobias y organismos coliformes en germinado tanto de alfalfa como de soya (Kuhmonen & Pitkaelae, 1991; Prokopowich & Black, 1991). En 90 muestras colectadas en comercios de la ciudad de Querétaro se detectó *E. coli* en 74 % y *Salmonella* en 1.1 %; el contenido de coliformes osciló entre 7.3 y 8.5 log₁₀ UFC/g en cuanto a BMA se hallaron de 3.8 a 9.0 log₁₀ UFC/g y < 1 a 7.7 de coliformes (Castro-Rosas & Fernández, 2000).

Los germinados son muy susceptibles a la contaminación microbiana que puede llegar por diferentes mecanismos y en distintas etapas desde su cultivo hasta el consumo. Las semillas tienen una flora microbiana variable que va a depender en parte del tipo de semilla, del manejo y tratamientos a los que se ha sometido (Park & Woodburn, 1890; Patterson & Woodburn, 1890; Piernas & Guirand, 1997). La contaminación de la semilla con bacterias patógenas puede suscitarse desde el campo o por las personas que cultivan éste producto. La contaminación puede ocurrir por el uso de agua contaminada con microorganismos patógenos para irrigar la

plántula. Durante la cosecha, transporte y comercialización del alimento, la fuente de contaminación más importante en nuestro medio al parece es la humana ya que en estas etapas existe un mayor contacto del humano con el alimento. Otras en menor grado, también pueden estar participando como los utensilios, superficies y el equipo (Castro-Rosas, 1998).

2.6.3. Comportamiento de bacterias patógenas en germinados.

Aunque la mera presencia de un microorganismo patógeno en el alimento es suficiente para condenarlo y tomar acciones para evitar la presentación de un brote, cualquier incremento de los niveles del patógeno en el alimento incrementa el riesgo de adquirir una enfermedad. Esto es, para que un microorganismo patógeno desencadene un cuadro clínico en el huésped, entre otras cosas, debe de ingresar en él en una concentración suficiente; concentración conocida como dosis mínima infectante. Concentraciones del patógeno inferiores a la mínima infectante, disminuyen la probabilidad de adquirir la enfermedad por el consumo del alimento. Por el contrario, niveles muy por arriba de la mínima infectante o muy cercanos a esta, aumentan la probabilidad. En consecuencia un alimento es más o menos riesgoso dependiendo de la concentración de patógeno que contenga. Se ha encontrado que los germinados son un sustrato que soporta bien el desarrollo de bacterias patógenas. *Salmonella stanley* y *S. enteritidis* por ejemplo, se multiplican activamente en germinado de alfalfa durante las primeras horas de desarrollo de la plántula (Andrew *et al.*, 1982; Geiges *et al.*, 1990). *Bacillus cereus* también incrementa su número en aproximadamente 4 log en las primeras horas de germinación (Fernández, 1997), al igual que *K. pneumoniae* (Park & Sandres, 1990).

C. botulinum (tipo B,E y F) no se multiplica en germinado de soya contaminado con esporas del patógeno (Carlin & Peck, 1996). *A. hydrophila* y *L. monocytogenes* en germinado de alfalfa empacado con atmósferas modificadas y mantenido en refrigeración durante 7 días, presentándose una ligera disminución en los niveles de ambos patógenos, y que fue mayor para *L. monocytogenes* (Aytac & Gorris). También se reporta nulo crecimiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento de germinado de soya a 4 y 22°C (Geiges *et al.*, 1990).

Ante la diversidad de comportamientos con la que responden los microorganismos podemos pensar que es debido a una gran diversidad de factores el pH, actividad de agua, flora asociada, temperatura, etc. Los niveles de estos factores conforme transcurre el tiempo pueden variar y crearse ahora condiciones favorables o desfavorables para la sobrevivencia y desarrollo de un determinado grupo microbiano.

Tabla 5. Brotes reportados de intoxicación alimentaria asociados al consumo de germinados de semilla. 1973 – 1998.

Año	Patógeno	Casos confirmados	Localización	Tipo de germinado
1994	<i>S. bovis</i>	595	Sweden, Finland	Alfalfa
1995	<i>S. stanley</i>	242	U.S. states, Finland	Alfalfa
1995-96	<i>S. newport</i>	133	U.S. states, Canada, Denmark	Alfalfa
1996	<i>S. montevideo</i>	~500	U.S. states	Alfalfa
1997	<i>S. meleagridis</i>	78	Canada	Alfalfa
1997	<i>S. infantis</i> and <i>S. anatum</i>	109	U.S. states	Alfalfa
1997	<i>E. coli</i> O157:H7	85	U.S. states	Alfalfa
1998	<i>E. coli</i> O157:H7	8	U.S. states	Trébol y/o alfalfa
1998	<i>S. havana</i> , <i>S. cubana</i> , <i>S. tennessee</i>	34	U.S. states	Alfalfa

Adaptado de: Taormina *et al.*, 1999

2.7. Desinfectantes

La industria de alimentos cuenta con una diversidad de agentes germicidas. Sus virtudes y limitaciones obligan a seleccionar cuidadosamente aquellos que mejor se ajusten a cada necesidad particular (Fernández, 2000). La inactivación del germen en las plantas procesadoras de alimentos es un requisito básico para controlarlo e impedir su acceso al producto terminado (Álvarez, 1998). Lo común es que un germicida se considere efectivo cuando demuestra capacidad para inactivar al menos 3 Log_{10} de una suspensión de microorganismos en 30 segundos (Fernández, 2000).

2.7.1. Cloro

En general los compuestos que liberan cloro son desinfectantes potentes y de amplio espectro de actividad. Son sensibles a estos compuestos tanto las bacterias gram positivas, como las gram negativas; además estos compuestos presentan cierta actividad frente a las esporas bacterianas (Forsythe & Hayes, 2000); y no muestran toxicidad al humano a bajas concentraciones. Debido a que son de los más económicos, se emplean ampliamente en la industria de los alimentos. (Álvarez, 1998).

Las soluciones de cloro como hipoclorito de sodio ó bióxido de cloro, son ampliamente utilizadas por la industria de alimentos como desinfectante. Los dos son oxidantes fuertes que actúan a nivel de las membranas y otros constituyentes celulares (Harmon *et al.*, 1987). No obstante, el primero presenta la desventaja de reaccionar fácilmente con la materia orgánica, por lo que se inactiva más rápido. En el segundo la interferencia es mínima (Castro-Rosas, 1998). La principal desventaja del

hipoclorito de sodio es que la humedad, el calor, la luz y sobre todo la presencia de materia orgánica, incrementan la tasa de pérdida de cloro libre. La actividad germicida del cloro generalmente ha sido atribuida al ácido hipocloroso (HOCl), el cual es generado en soluciones acuosas de hipoclorito de sodio y otros compuestos que contengan cloro. El HOCl puede disociarse en ion hipoclorito (OCl⁻) (que es el ion responsable de las propiedades bactericidas de los hipocloritos) y en Ion hidrógeno (H⁺), dependiendo del pH de la solución; la carga eléctrica neutra del HOCl sugiere que ésta molécula puede penetrar más fácilmente la pared celular, que el ion OCl⁻. Después de difundirse al interior de la célula, el HOCl inactiva al organismo a través de la inducción de ciertas especies de oxígeno tóxico, o combinándose con proteínas, lo cual puede inhibir las reacciones enzimáticas y alterar la permeabilidad de la membrana celular (Álvarez, 1998).

Los desinfectantes se pueden incorporar al agua de lavado y de esta forma contribuir a la reducción de la carga microbiana. La efectividad del hipoclorito no solamente es afectada por el tiempo de exposición y la concentración del cloro libre, si no por otros factores como la temperatura, el pH, el tipo de cepa, la presencia de materia orgánica y el tipo de materia orgánica (Álvarez, 1998); Se observó que al sumergir hojas de lechuga en una solución con 300 ppm cloro libre, se lograba un reducción de bacterias mesófilas de 3 log; este efecto no se presentó con zanahorias (Garg *et al.*, 1990). Se observó que al sumergir germinados en soluciones de 100 y 200 ppm se presentaban reducción significativa de *Salmonella* (Fernández, 2000). Por otro lado, se subraya que después de pocos días de almacenamiento, los niveles de BMA entre frutas o verduras tratadas y no tratadas prácticamente es el mismo Algunos autores señalan que la eficiencia del hipoclorito en la reducción de

microorganismos patógenos presentes en verduras es limitada (Adams *et al.*, 1989).

2.7.2. Yodo

El yodo es uno de los desinfectantes más antiguo y eficaces. Se usa tradicionalmente en las formas conocidas como tinturas o yodóforos. Las tinturas son soluciones de yodo en alcohol o en agua. Los yodóforos son mezclas de yodo con agentes tensioactivos que actúa como transportador del yodo; poseen las características germicidas del yodo y la ventaja adicional de producir muy poca irritación y de ser detergentes (Fernández, 2000). Es un agente que destruye rápidamente un amplio espectro de bacterias; a diferencia del cloro, el yodo o sus compuestos conservan actividad razonable en presencia de materia orgánica con tal que el pH no sea mayor de 4 y la cantidad de los primeros no sea excesiva; sin embargo, frente a las esporas son menos activos que los hipocloritos (Forsythe & Hayes, 2000)

Además posee propiedades fungicidas y antivirales importantes. El mecanismo antimicrobiano del yodo no ha sido explicado claramente. Se ha sugerido que su acción involucra la halogenación de las unidades de tirosina de las enzimas y otras proteínas celulares que necesitan tirosina para su actividad (Patterson & Woodburn, 1890). El yodo también es un agente oxidante y esto cuenta en parte para su actividad antimicrobiana. Los yodóforos son ampliamente usados en la industria de alimentos para desinfectar principalmente superficies, maquinaria, equipo, utensilios y en menor grado frutas y verduras. La eficacia de los yodóforos al igual que muchos otros germicidas, está en función de la concentración, la temperatura de tratamiento, el tiempo de contacto y el tipo de alimento o superficie. Son ampliamente utilizados en

la industria de alimentos por su poder detergente (Reid, 1990). Los yodóforos no son corrosivos, ni irritantes, ni tóxicos y tienen un ligero olor. Algunos materiales plásticos absorben el yodo y se colorean al exponerlos a estos compuestos, por lo que deben evitarse los contactos prolongados con los yodóforos para prevenir la posible tinción de los alimentos (Forsythe & Hayes, 2000).

2.7.3. Plata coloidal

Las propiedades desinfectantes de la plata son conocidas desde hace varios siglos (Laubusch, 1971). La historia muestra como ejemplo el uso de la plata por sus propiedades de purificación. Por sus propiedades desinfectantes se utiliza para el control microbiológico en particular en la reducción de microorganismos patógenos para prevenir riesgo a la salud. La plata es efectiva contra bacterias, protozoarios, virus y helmintos.

Los iones de plata tienen tres diferentes mecanismos para controlar el crecimiento microbiológico.

a) Remueve los átomos de hidrogeno desde grupos sulfidrilos (-SH) sobre bacterias o virus.

Los átomos de azufre participan en la respiración celular y en la transferencia de electrones de las células microbianas.

b) inhiben la replicación del DNA por medio de la interferencia con el desdoblamiento de DNA.

c) alteran la membrana bacteriana por medio de mecanismos enzimáticos (Gerg, 2005).

A las concentraciones usadas para destruir bacterias en estado vegetativo, muestra pobre acción germicida contra esporas y casi nulo sobre los virus, quistes y huevecillos de parásito (Forsythe & Hayes, 2000). La presencia de materia orgánica interfiere con la acción germicida; a mayor contenido de este material (tejidos de animales, alimentos) el efecto rápidamente se desvanece. Tiene sin embargo, marcado efecto residual. Si se deposita sobre la superficie interna de un recipiente, las micelas se adsorben firmemente; el agua que subsecuentemente se recibe en el recipiente se expone a iones de plata que lentamente se liberan hasta agotar las reservas. En concentraciones eficientes ordinarias no se afectan las características sensoriales del agua. La concentración bactericida es tan baja como 15 mg/L, con efecto muy lento. Ventajas adicionales de la plata sobre el cloro es que no escapa por volatilización, no forma compuestos objetables como los trihalometanos, ni es corrosivo (Fernández, 2000).

2.8. Microorganismos indicadores de calidad sanitaria del alimento.

2.8.1. Bacterias mesófilas aerobias (BMA)

Los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos. Se incluye en él a todos aquellos que muestran capacidad para formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de la prueba (medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación). Es evidente que en una situación particular podrían quedar incluidos microorganismos patógenos.

El recuento de BMA en el agua, alimentos y otros materiales relacionados pueden tener, según el caso, algunas aplicaciones de interés que pondrían de manifiesto (Fernández, 2000):

- La exposición a fuentes de contaminación.
- Las condiciones de almacenamiento.
- El nivel de frescura.
- La eficiencia de tratamientos antimicrobianos.
- Las condiciones higiénicas que prevalecían durante la obtención, preparación, transporte o comercialización de un alimento.
- La predicción de la vida de anaquel.
- El cumplimiento de normas microbianas.
- La calidad microbiológica.

2.8.2. Organismos coliformes (OC).

Los organismos coliformes se definen como bacilos cortos, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de gas. Las principales especies de bacterias coliformes son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*; no obstante, las especies que es posible que se ajusten a estos criterios, son más de veinte, encontrándose entre las especies de otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* e incluso especies de *Aeromonas* (Frazier & Westhoff, 1993).

Los organismos coliformes son el grupo indicador con mayor tradición en la microbiología sanitaria. *E. coli* es el típico coliforme en el sentido de que se trata de una bacteria cuyo hábitat natural es el contenido intestinal de los animales de sangre caliente. Por tal razón, su hallazgo en un alimento o en el agua es más significativo desde el punto de vista sanitario, que el de cualquier otro coliforme (Fernández, 2000).

2.8.2.1. Significado en los alimentos

Tienen valor como indicadores de operaciones sanitarias objetables y para seguir la eficiencia de un proceso de sanidad del equipo, o de desinfección de algún producto como el agua. Esta postura se apoya en la susceptibilidad de los coliformes al calor y a los agentes germicidas de uso común en la industria alimentaria. En general, si en la preparación de un alimento se recurre a un tratamiento térmico tan severo como la pasteurización o mayor, el hallazgo de coliformes en el producto terminado constituye una evidencia consistente de deficientes prácticas sanitarias (Fernández, 2000).

2.9. *Escherichia coli*.

2.9.1. Características generales.

E. coli es un bacilo corto, móvil, gram negativo (90); es considerada generalmente como integrante de la flora normal del tracto intestinal del hombre y de los animales (Frazier & Westhoff, 1993); sin embargo, muchas cepas de *E. coli* son más o menos patógenas para el hombre (Lindquist, 2001) pero una cualidad sobresaliente que diferencia a las cepas patógenas de *E. coli* con respecto a las no patógenas es la limitada capacidad de las primeras para fermentar la lactosa. Esta varía desde una negatividad total hasta una fermentación lenta (más de 48 h), o positiva a 37°, pero negativa a 44.5°. La situación es similar con la producción de indol a 44°. Típicamente *E. coli* es positiva a la prueba (99%), en tanto que entre las cepas patógenas la cifra es variable, pero claramente menor (Fernández, 2000).

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, con un intervalo de crecimiento de 10 a 40°C. Su pH óptimo de crecimiento es de 7.0 a 7.5, con un pH mínimo de crecimiento de valor 4.0 (Frazier & Westhoff, 1993).

La *E. coli* está serológicamente dividida en serogrupos y serovares, esto basado en su composición antigénica:

- Somático o antígeno O por serogrupos y flagelar o antígeno H (excepto las cepas inmóviles)
- Por serovares (Campos *et al.*, 2004), y propios de las fimbrias F (Fernández, 2000)
- Capsular o antígeno k (Campos *et al.*, 2004)

Los antígenos O y K son polisacáridos complejos, en tanto los H y F son proteínas. Se reconocen en esta bacteria 174 diferentes antígenos O, 56 H y 80 K. La más virulenta es *E. coli* O157:H7 (enterohemorrágica) se caracteriza por poseer el antígeno somático 157 y el flagelar 7 (Fernández, 2000).

2.9.2. *E. coli* no patógena.

2.9.2.1. Significado en los alimentos

E. coli es habitante casi universal de las vías intestinales de los humanos y los animales de sangre caliente, aunque no significa que sea el organismo dominante en estos hábitats. *E. coli* tiene un papel nutricional en las vías intestinales sintetizando vitaminas, en especial vitamina K, como aerobio facultativo es probable que también ayude a consumir oxígeno; por tanto, se vuelve el gran anaerobio intestinal (Bronk *et*

al., 1988).

Su hallazgo en los alimentos no puede sin embargo, establecerse de manera universal como indicador de una contaminación fecal directa debido a su capacidad para multiplicarse en muchos de ellos. En verduras crudas por ejemplo, su presencia es sugestiva de contaminación fecal reciente considerando que en ausencia de materia fecal no suele existir en estos productos y que muy pobremente, si acaso, se multiplica en ellos, y más bien tiende a morir. En la leche la situación es distinta. Esta bacteria eventualmente existe en residuos de suciedad sobre el equipo mal saneado usado que contiene la leche ya tratada térmicamente. Aún puede multiplicarse si el nivel de humedad se lo permite. Con todo, es el indicador más confiable de contaminación fecal en alimentos, especialmente aquellos que han recibido algún tratamiento antimicrobiano severo. En alimentos destinados a poblaciones hipersensibles, no debe tolerarse la presencia de *E. coli* con positividad de porciones de 0.1 g o menos (Fernández, 2000).

2.9.3. *E. coli* patógena.

E. coli es la bacteria más estudiada y la más conocida de todas. Esta fue descrita por primera ocasión en 1885 por Theodor Escherich un pediatra Alemán, quien noto que predominaba en la microflora intestinal de individuos sanos y tiene alto potencial para causar enfermedad cuando se inocula directamente en sitios extraintestinales (Castro-Rosas, 1998). Evolucionó en la mente de los microbiólogos de un saprofito propio del contenido intestinal, a bacteria indicadora de contaminación fecal en los alimentos, prototipo y conejillo de indias en estudios de genética bacteriana, hasta reconocerse como agente patógeno particularmente violento

asociado al consumo de alimentos (Fernández, 2000).

La mayoría de las cepas no son patógenas. Algunas sin embargo, pueden causar enfermedades diarreicas por varios mecanismos, y en la actualidad se identifican seis tipos o cepas de *E. coli* capaces de producir diarrea (Castro-Rosas, 1998):

- 1) Enteropatógena *E. coli* (ECEP)
- 2) Enterohemorrágica *E. coli* (ECEH)
- 3) Enterotoxigenica *E. coli* (ECET)
- 4) Enteroinvasiva *E. coli* (ECEI)
- 5) Enteroagregativa *E. coli* (ECEG)
- 6) Enteroadherente *E. coli* (ECEA)

Recientemente la ECEP ha sido dividida en típica ECEP (t-ECEP) y atípica ECEP (a-ECEP) (Kylen & McCready, 1975).

2.9.3.1. *E. coli* enteropatógena (ECEP).

E. coli enteropatógena (EPEC) es la principal causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, contribuyendo a la alta mortalidad (Beckers, 1988). En países industrializados, la frecuencia de estos han disminuido, pero continúan siendo una importante causa de diarrea (Kylen & McCready, 1975).

E. coli enteropatógena es miembro de un grupo de microorganismos patógenos que se adhieren a las células de la mucosa intestinal mediada por un plásmido, a la que se asocia la producción de una toxina similar a la colérica, e incluso una endotoxina que interfiere con procesos metabólicos de absorción celular (Fernández, 2000). Se adhieren al ribete en cepillo de las células del epitelio intestinal y causan un tipo específico de daño celular que se denomina lesión de aclaración.

Las lesiones de aclaración, o lesiones AE (de attaching-effacing; anclaje y aclaramiento) representan la destrucción de las microvelocidades del ribete en cepillo circundante del lugar donde la bacteria se adhiere. Esta destrucción celular lleva a la diarrea (Hictchis, 1992).

La transmisión ocurre a través del consumo de alimentos contaminados o directamente siguiendo la ruta ano-mano-boca. La enfermedad en los niños se caracteriza por diarrea acuosa, en ocasiones vómito y fiebre baja. En los menores de 6 meses la condición puede prolongarse por más de 14 días y terminar lentamente. Los serogrupos más comunes incluidos entre estas cepas patógenas son: O55, O86, O11, O119, O125, O126, O127, O128ab y O142 (Fernández, 2000).

2.9.3.2. *E. coli* enterotoxigénica (ECET).

E. coli toxigénica de origen bovino se clasifican en tres categorías: enterotoxigénica (ECET), verotoxigénica (ECVT) y necrotoxigénica (ECNT), que constituyen uno de los grupos más importantes de *E. coli* causantes de diarrea. Estas son consideradas como la mayor causa de diarrea infantil en los países desarrollados como el agente etiológico responsable más frecuente de la conocida diarrea del viajero (Quinto & Cepeda, 1997). En la década de los 80s se aislaron aproximadamente 800 cepas ECET en pacientes que viajaron a otros países y enfermaron (Mitsuda *et al.*, 1998).

Hasta el momento se identifican dos enterotoxinas diferentes de *E. coli* enterotoxigénica que se distinguen por su estabilidad frente al calor: la enterotoxina termoestable (ST) que resiste los 100°C durante 15 minutos, y la enterotoxina termolábil (LT) que se inactiva a 60°C en 30 minutos (Forsyte & Hayes, 2000). Los

genes para producir ST y LT y los factores de colonización suelen ser portados por plásmidos. La ST se liga a un receptor glicoproteico que está ligado a la guanilato ciclasa sobre la superficie de las células del epitelio intestinal. La activación de la guanilato ciclasa estimula la producción de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que lleva a la secreción de electrolitos y agua a la luz del intestino delgado, que se manifiesta en forma de diarrea acuosa, característica de la infección por ECET. La LT se liga a gangliósidos específicos sobre las células epiteliales y activa la adenilato ciclasa ligada a membranas, que lleva a un aumento de la producción de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) a través de un mecanismo similar al utilizado por la toxina del cólera dando como resultado hipersecreción de electrolitos y agua a la luz intestinal (Prescott *et al.*, 2002). Las cepas de ETEC pueden producir cualquiera de las dos toxinas, o ambas a la vez (Fernández, 2000).

Aparte del potencial toxigénico de este grupo patógeno de *E. coli*, las cepas deben poseer capacidad para colonizar el intestino. Este proceso se conforma mediante fimbrias de la bacteria a través de las cuales se adhiere a los enterocitos del intestino delgado proximal (Krogfelt, 1991). La naturaleza de estas fimbrias provee una especificidad de huésped en la colonización de animales o del hombre por el microorganismo (Fernández, 2000). Las cepas ECET han estado implicadas en brotes que afectaron a muchas personas y cuyas fuentes fueron el agua y muchos alimentos distintos (por ej: productos cárnicos, puré de patatas, leche y queso) (Forsythe & Hayes, 2000). La dosis infectante, calculada en voluntarios humanos, es elevada: 10^8 – 10^{10} células. Es necesaria entonces una contaminación seguida de multiplicación del microorganismo, lo que implica deficientes condiciones de

almacenamiento de los alimentos (Fernández, 2000).

El período de incubación oscila entre 8 y 44 h con mediana de 26. El individuo presenta náusea con moderado dolor abdominal y diarrea, que en los casos agudos conduce a una acentuada deshidratación. No hay respuesta inflamatoria ni se observa invasión de neutrófilos en el tejido intestinal. En los primeros el cuadro puede ser muy severo e interferir con la absorción de nutrientes (Fernández, 2000). En los adultos se le identifica como una forma común de la diarrea del viajero, quizá el 60-70% de los casos. La probabilidad de adquirir el padecimiento se incrementa al prolongarse la estancia en 50% el riesgo en estancias de 14 días (Neil *et al.*, 1994). Las infecciones por esta bacteria confieren inmunidad, según se demuestra en voluntarios humanos. Sugieren que anticuerpos locales contra los factores de adhesión del germen podrían proteger el proceso infeccioso en las células epiteliales del intestino delgado proximal (Fernández, 2000).

2.9.3.3. *E. coli* enteroinvasiva (ECEI).

Este grupo especialmente, muestra semejanzas bioquímicas y posee antígenos que comparte con *Shigella*. Una proporción elevada de cepas de ECEI son anaerogénicas y fermentan la lactosa dentro de 48 h. Pueden invadir las células epiteliales del colon, proliferar dentro de ellas y destruirlas (Fernández, 2000) frecuente induce enfermedades más graves, como colitis y una forma de disentería acompañada de fiebre y de heces sanguinolentas (Forsythe & Hayes, 2000), ocasionalmente aparece vómito. A ECEI se les han atribuido muchos brotes, siendo los alimentos más frecuentemente incriminados los quesos, la leche y las carnes (Fernández, 2000). La cepas de *E. coli* enteroinvasiva causan diarrea penetrando en

las células del epitelio intestinal y multiplicándose en su interior. La capacidad de infectar las células epiteliales se acompaña de la presencia grande; las ECEI pueden producir también una citotoxina y una enterotoxina (Prescott *et al.*, 2002). El período de incubación en los brotes es de 2 a 48 h con mediana de 18. La dosis infectante suele ser suficiente con menos de 1,000 (Fernández, 2000).



Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el comportamiento de microorganismos indicadores de higiene y de tres grupos patógenos de *Escherichia coli* en germinado de alfalfa así como evaluar la eficiencia de tres desinfectantes en la reducción de *E. coli* patógena presentes en germinado de alfalfa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a. Determinar el comportamiento de organismos coliformes, bacterias mesófilas aerobias, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enterotoxigénica en germinado de alfalfa.

- b. Evaluar la eficiencia del hipoclorito sodio, yodo y plata coloidal en la reducción de los niveles de dos grupos patógenos de *E. coli* presentes en el germinado de alfalfa.



Materiales y Métodos

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material de Laboratorio

Agitador tipo vortex Genie 2

Asa bacteriológica

Atomizador de agua

Bolsas de plástico no estériles sin marca comercial

Cajas para puntas de plástico

Cajas petri desechables, Phoenix Biomedical ®

Charolas de plástico

Espátula

Frasco boca ancha de vidrio con tapón de rosca

Frascos de plástico con tapón de rosca tipo vial

Frascos graduados de vidrio de 500, 1000 ml; Pyrex ®

Gradillas de alambre y plástico

Masking tape

Matraz erlermeyer Kimax de 500ml

Mechero tipo bunsen

Micropipetas 1000 μ l, Transferpette ®

Papel aluminio sin marca comercial

Pipeta graduadas de 5 y 10 ml Kimax ®

Probeta graduada de 100 ml Kimax ®

Probeta graduada de plástico de 500 ml

Puntas para micropipetas azules y amarillas

Recipientes de plástico

Termómetro, Lauka ®

Tubos de cultivo con tapón de rosca 16x150 mm

Vaso de precipitado de plástico de 5000 ml, Nalgene ®

Vaso de precipitado de vidrio de 250, 500, 1000 ml Kimax ®

4.2. Equipos

Autoclave eléctrica, Metron ®

Autoclave, Sterilizer SSM 200 eléctrica Yamato ®

Balanza analítica, Mettler Pc 2000 ®

Campana de flujo laminar, Labconco ®

Centrifuga digital, Hermle Labnet Z 323 K ®

Cuenta colonias, Darkfield Québec, American Optical ®

Incubadora bacteriológica, Blue M ®

Parilla de agitación y calentamiento, Thermolyne ®

Refrigerador, Lab-line Environeers Inc.

Stomacher ® 400, Culator Seward

4.3. Reactivos

Agua estéril

Alcohol metílico Sigma Chemical ®, USA.

Cloro al 6% Clorox ®

Cloruro de sodio Analytyca de México®

Germicida Gadacin ® Argentum

Rifampicina Eurifam ®

Solución salina estéril al 0.85% de NaCl (SSI)

Tiosulfato de sodio

Yodo resublimado Analítica de México ®

4.4. Medios de cultivo

Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV), Bioxon ®

Agar Cuenta Estandar (ACE), Bioxon ®

Agar Soya Trypticaseina (AST), Bioxon ®

Agar de Eosina y Azul de Metileno, Bioxon ®

Peptona de caseína (PC), Bioxon ®

4.5. Material biológico

Cepas:

Escherichia coli enteropatógena:

872 TL 489 3 EP R+

EP 52 GM 291 1 EP R+

EP 873 TL 489 2 EP R+

Escherichia coli enteroinvasiva:

232 GM 89-4 5 ET R+

TL 3 4 EI

4VC 81-5 6 EI R+

Escherichia coli enterotoxigénica:

ETEC 10 ET

150 TL 419 ET

1620 TL 326 11 ET R+

Todas las cepas fueron donadas por el departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, México D.F. y se marcaron previamente con resistencia a Rifampicina (Rojas, 2005).

Semilla de alfalfa obtenida en Pachuca de Soto Hidalgo.

4.6. MÉTODOS

La metodología abarca cuatro tipos de estudios:

- 1.- Determinación del comportamiento de organismos coliformes, bacterias mesófilas aerobias en germinado de alfalfa.
- 2.- Determinación del comportamiento de *Escherichia coli* enteropatógena, enteroinvasiva y enterotoxigénica desarrolladas en germinado de alfalfa.
- 3.- Determinación del comportamiento en germinado mantenido en refrigeración de tres grupos de *Escherichia coli* desarrolladas en germinado de alfalfa.
- 4.- Evaluación de la eficiencia de desinfectantes químicos en la desinfección del germinado de alfalfa.

Estudio 1.- Comportamiento de organismos coliformes y bacterias mesófilas aerobias.

La determinación del comportamiento de OC y BMA se estudio en dos etapas diferentes de germinación de la semilla: **a)** a partir de semilla recién hidratada; **b)** a partir de semilla con 24 h de hidratación.

1.1. Obtención del germinado a partir de semilla recién hidratada.

50g de semilla de alfalfa se colocaron en un matraz erlenmeyer; en éste la semilla se lavó 3 veces con agua potable agitando vigorosamente durante 1min; en cada ocasión se desecho el agua de lavado. La semilla lavada se desinfectó con una solución de 100 ppm de hipoclorito de sodio durante 5 min, posteriormente, se drenó el desinfectante y se lavó con agua potable estéril como se describió anteriormente. Finalmente, la semilla mantuvo en reposos por 4 h en agua potable estéril a

temperatura ambiente (hidratación). Después de hidratada la semilla, se drenó el agua y la semilla se extendió en charolas de plástico formando una monocapa; las charolas se cubrieron con una película plástica para evitar la pérdida rápida de humedad. Finalmente, las charolas se almacenaron a 25°C por 4 días, hidratando la semilla por medio de aspersión cada 24 h con agua potable estéril.

1.2. Obtención del germinado a partir de semilla con 24 h de hidratación.

La hidratación de la semilla se realizó como se mencionó anteriormente, con la variante de que posterior a las 4 h de hidratación la semilla, está se recolectó en una coladera estéril y se drenó agitando periódicamente la coladera durante 10 min. La semilla se distribuyó en toda la superficie de la coladera y ésta se colocó sobre un vaso estéril de acero inoxidable conteniendo agua destilada. Este “sistema” se cubrió y encerró completamente con una bolsa de polietileno para evitar la pérdida de humedad (Castro-Rosas, 1998; Castro-Rosas and Escartín, 1999; Castro-Rosas and Escartín, 2000). La germinación de la semilla se consiguió almacenando este “sistema” durante 24 h a $22^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Posterior a este paso se continuó con la germinación de la manera en que especifica en 1.1.

1.3. Muestreo y recuento de OC y BMA.

Para el estudio del germinado de alfalfa en las dos etapas diferentes; semilla con 4 h o 24 h de hidratación se utilizó el mismo procedimiento. De la semilla hidratada o germinado se retiró por triplicado 3 porciones de 10g. Se realizaron seis diluciones decimales de cada porción y el conteo se efectuó por medio de la técnica

de vertido en placa sembrando diluciones seleccionadas. Los medio de cultivo que se emplearon para el análisis de BMA y OC fueron: Agar Soya Trypticaseina (AST) y Agar Bilis y Rojo Violeta (ABRV), respectivamente. Las cajas petri se incubaron a 35°C durante 24 h. Posteriormente, cada 24 h se tomaron nuevamente tres porciones independientes de germinado proveniente de cada estudio y por separado se realizó el muestreo y recuento siguiendo el procedimiento antes mencionado.

Estudio 2. Comportamiento de *E. coli* enteropatógena, enteroinvasiva y enterotoxigenica.

El comportamiento de los tres grupos patógenos de *E. coli* se estudió en tres etapas diferentes de germinación de la semilla: **a)** a partir de semilla recién hidratada; **b)** a partir de semilla con 24 h de hidratación y **c)** en germinado de tamaño comercial (5-6cm de longitud aproximadamente) almacenado en temperatura de refrigeración.

Se trabajó con 3 cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ECET): 1620 TL 326, 10 ET, 150 TL 419; 3 cepas de *E. coli* enteroinvasiva (ECEI): 4VC81-5, 323GM894, TL3, y 3 cepas de *E. coli* enteropatógena (ECEP): 872 TL 489, 873 TL 489, 52 GM 291.

2.1. Preparación del inóculo.

Todas las cepas patógenas de *E. coli* resistentes a Rifampicina (R+) fueron inoculadas en CST a 37°C durante 24 h, para su desarrollo. Bajo estas condiciones de cultivo las cepas de *E. coli* alcanzan una concentración aproximada de 9 log UFC/mL. Posteriormente, los cultivos fueron lavados dos veces en solución salina isotónica (SSI) a 3500 rpm/20 min. Las tres cepas de cada grupo patógeno fueron

mezcladas en volúmenes iguales de 1 mL en un tubo de ensaye estéril; **de esta forma se tuvo una mezcla de *E. coli*, de ECET, otra de ECEI y una más de ECEP.**

2.2. Inoculación de los patógenos.

El germinado se contaminó en dos etapas de su desarrollo: en la semilla recién hidratada y en semilla con 24 h de hidratación.

2.2.1. Contaminación de la semilla.

Al término de las 4 h de hidratación de la semilla, ésta se colocó en una coladera estéril y se dejó drenar el exceso de agua durante 10 min, con agitación manual periódica de la coladera. **A partir de cada mezcla de los grupos patógenos**, se preparó una suspensión de 1 L con una concentración de 10^4 UFC/mL. Para cada mezcla de cada grupo patógeno se preparó una suspensión independiente. La coladera conteniendo la semilla se sumergió, por separado, en la suspensión de cada mezcla de los grupos patógeno y se mantuvo sumergida durante 10 min. Posteriormente, se retiró la coladera de la suspensión y se dejó drenar durante 10 min el exceso de agua contenida en la semilla, agitando suavemente la coladera de forma manual. Finalmente, el germinado fue depositado en charolas de plástico como se describió anteriormente para continuar la germinación.

2.2.2 Contaminación al brotar el tallo.

La semilla con 24 h de germinación presentó un brote (plántula) con aproximadamente 0.5 cm de longitud del tallo. La coladera conteniendo esta semilla se sumergió también completamente en la suspensión de las mezclas de cada grupo

patógeno de *E. coli* durante 15 min. Posteriormente, se retiró la coladera de la suspensión y se dejó drenar el exceso de agua durante 10 min, agitando suavemente la coladera de forma manual. Finalmente, el germinado fue depositado en charolas de plástico como se describió anteriormente.

2.3. Muestreo y recuento de los grupos patógenos de *E. coli*.

Al inicio del estudio y posteriormente cada 24 h, se tomaron al azar y de manera independiente tres porciones de 10 g de semilla ó germinado y se colocaron en diluyente de peptona (DP); el análisis de los microorganismos se realizó por medio de la técnica de vertido en placa utilizando AST con 100 mg/L de Rifampicina e incubando las cajas inoculadas durante 24-48 h /35°C.

En estudios preliminares, se encontró que 100 mg/L de Rifampicina eran suficientes para inhibir el 99.99999 % de la microflora nativa del germinado de alfalfa tanto comercial como preparado en el laboratorio. Las cajas se incubaron a 35°C/24h.

Estudio 3. Sobrevivencia de grupos patógenos en germinado de alfalfa almacenado en refrigeración.

Germinado con 7 días de desarrollo (6-8 cm de longitud del tallo) que había sido contaminado desde la semilla con los grupos patógenos de *E. coli* como se describió en 2.2.1, se almacenó en refrigeración (3-7°C) durante 30 días en charolas de plástico cubiertas con una película de polietileno.

3.1. Muestreo y recuento.

Antes (0 días), durante (10 días) y al finalizar la refrigeración (días 30), se efectuó el conteo de los grupos patógenos de *E. coli* de la misma forma como se describió en 2.3.

Estudio 4. Evaluación de la eficiencia de desinfectantes químicos en la desinfección del germinado de alfalfa.

Se efectuó un estudio para conocer el efecto del hipoclorito de sodio, yodo y plata coloidal en la reducción de los niveles de grupos patógenos de *E. coli* presentes en germinado de alfalfa. Los tratamientos consistieron en poner en contacto el germinado contaminado con los desinfectantes bajo estudio a tiempos y concentraciones diferentes. Para el hipoclorito y yodo los se emplearon: 50 y 200 ppm con 3 y 10 min de contacto. Para el caso de la plata coloidal se evaluaron dos concentraciones 1 y 4 ppm también a 3 y 10 min de contacto; se calculó que la concentración final que recomiendan los fabricantes del desinfectante comercial a base de plata coloidal es de 1 ppm.

4.1. Preparación de los germicidas.

Las soluciones de hipoclorito se prepararon a partir de hipoclorito comercial concentrado diluyendo con agua destilada estéril. Las soluciones de Yodo se prepararon a partir de yodo grado reactivo. La concentración de cloro y yodo libre se determinó por el método yodométrico (APHA, 1980; Richardson, 1985). Para calcular la concentración de plata, nos basamos en el procedimiento que se recomienda en la etiqueta de la suspensión comercial; en esta se recomienda adicionar 5 gotas de la

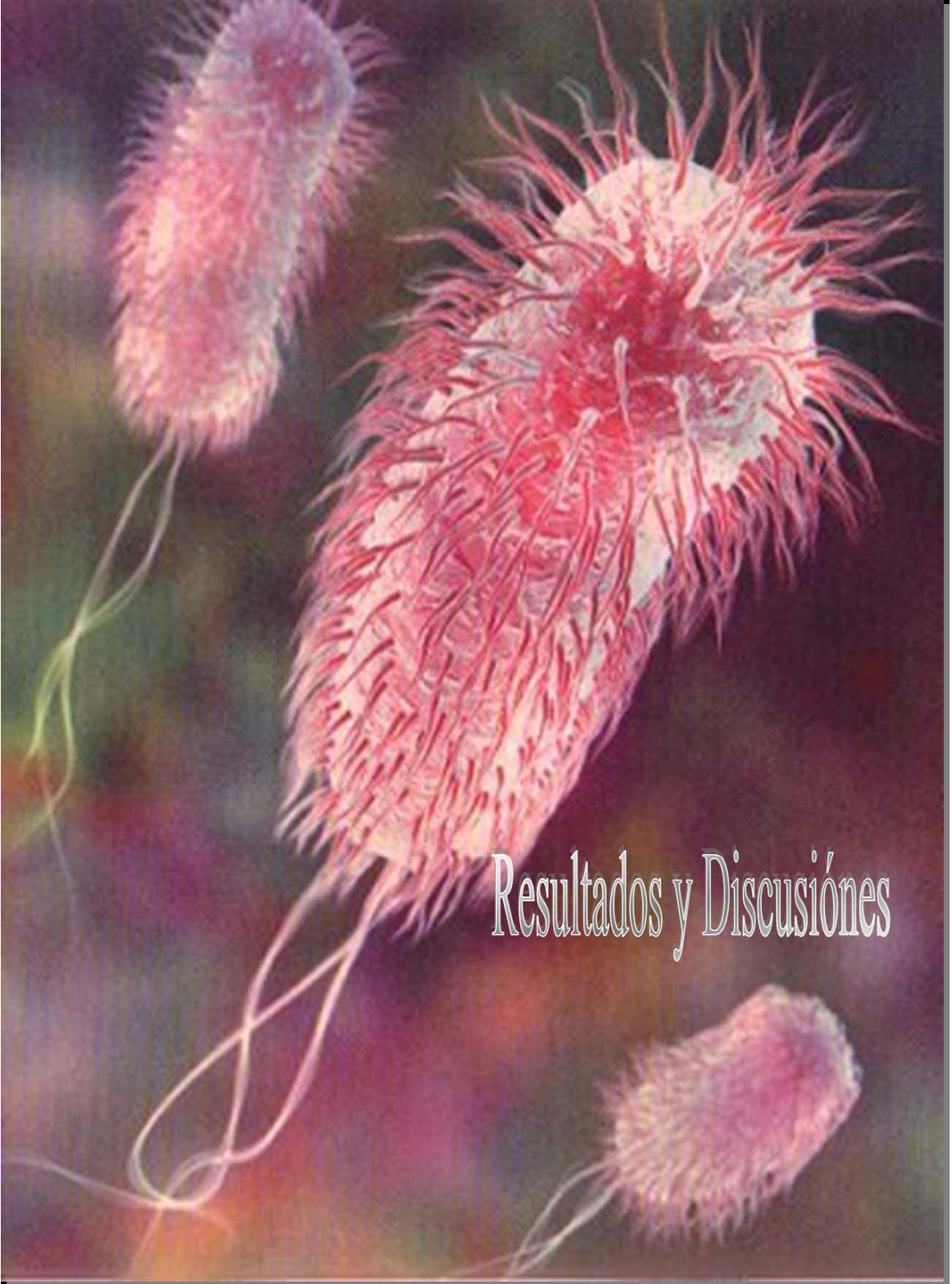
suspensión comercial de plata coloidal por litro de agua, en esta solución se introduce la verdura a desinfectar. En el laboratorio determinamos el volumen en mL que representan estas 5 gotas en promedio y se cuantifico la concentración de palta coloidal en ese volumen (1mg/mL). Finalmente se calculo la concentración de plata coloidal que se alcanzaba al adicionar 5 gotas de la solución comercial en 1L de agua destilada.

4.2. Fuente del germinado de alfalfa.

En el estudio se empleó germinado contaminado con los grupos patógenos de *E. coli*, este germinado fue contaminado desde la semilla como se describió en 2.2.1. Se empleó germinado de tamaño comercial (aproximadamente 6-8 cm de longitud del tallo).

4.3. Efecto de los germicidas.

Por triplicado, los 10 g de germinado contaminado se colocaron en una coladera estéril y por separado sumergió en las soluciones de los germicidas durante 3 ó 10 min. Para cada porción de germinado, se utilizó una solución del germicida recién preparada y valorada. El recuento de los microorganismos se efectuó antes y después de cada tratamiento. Luego de las exposición a los germicidas, el germinado se depositó en bolsas de plástico que contenían 90 mL de diluyente de peptona estéril adicionado de tiosulfato sodio al 0.1%. La mezcla se homogeneizó en Stomacher durante 2 min a velocidad de 200 rpm. El conteo de los microorganismos se efectuó de la misma forma como se describió en 2.3.



Resultados y Discusiones

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

En general, la simple presencia de un microorganismo patógeno en un alimento es razón suficiente para rechazarlo (Fernández, 2000). La razón es que algunos como *Shigella* tienen dosis infectante muy baja. Cualquier factor que favorezca la multiplicación de los microorganismos en el alimento incrementa el riesgo. En otras palabras, un alimento es más o menos peligroso dependiendo del tipo de microorganismo patógeno que contenga y de las facilidades que presente para su eventual desarrollo. Existen diferentes estudios que muestran la capacidad que tienen diferentes microorganismos patógenos para multiplicarse en los germinados de semillas (Pelczar, 1983; Fernández 1997); sin embargo, el comportamiento de los grupos patógenos de *E. coli* diferentes a *E. coli* O157:H7, no se ha investigado.

Para evaluar el comportamiento de los tres grupos patógenos de *E. coli* se emplearon cepas resistentes al antibiótico Rifampicina (Castro-Rosas & Fernández, 2000). El recurso de emplear cepas resistentes a un antibiótico para monitorear su comportamiento en diversos materiales es muy utilizado para abatir la interferencia de la flora asociada (Castro-Rosas & Fernández, 2000).

El comportamiento de los grupos patógenos de *E. coli* se evaluó en tres etapas diferentes del germinado de alfalfa: **a)** a partir de semilla contaminada inmediatamente después de su hidratación; **b)** a partir de semilla contaminada después de 24 h de ser hidratada y **c)** en germinado de tamaño comercial almacenado en temperatura de refrigeración.

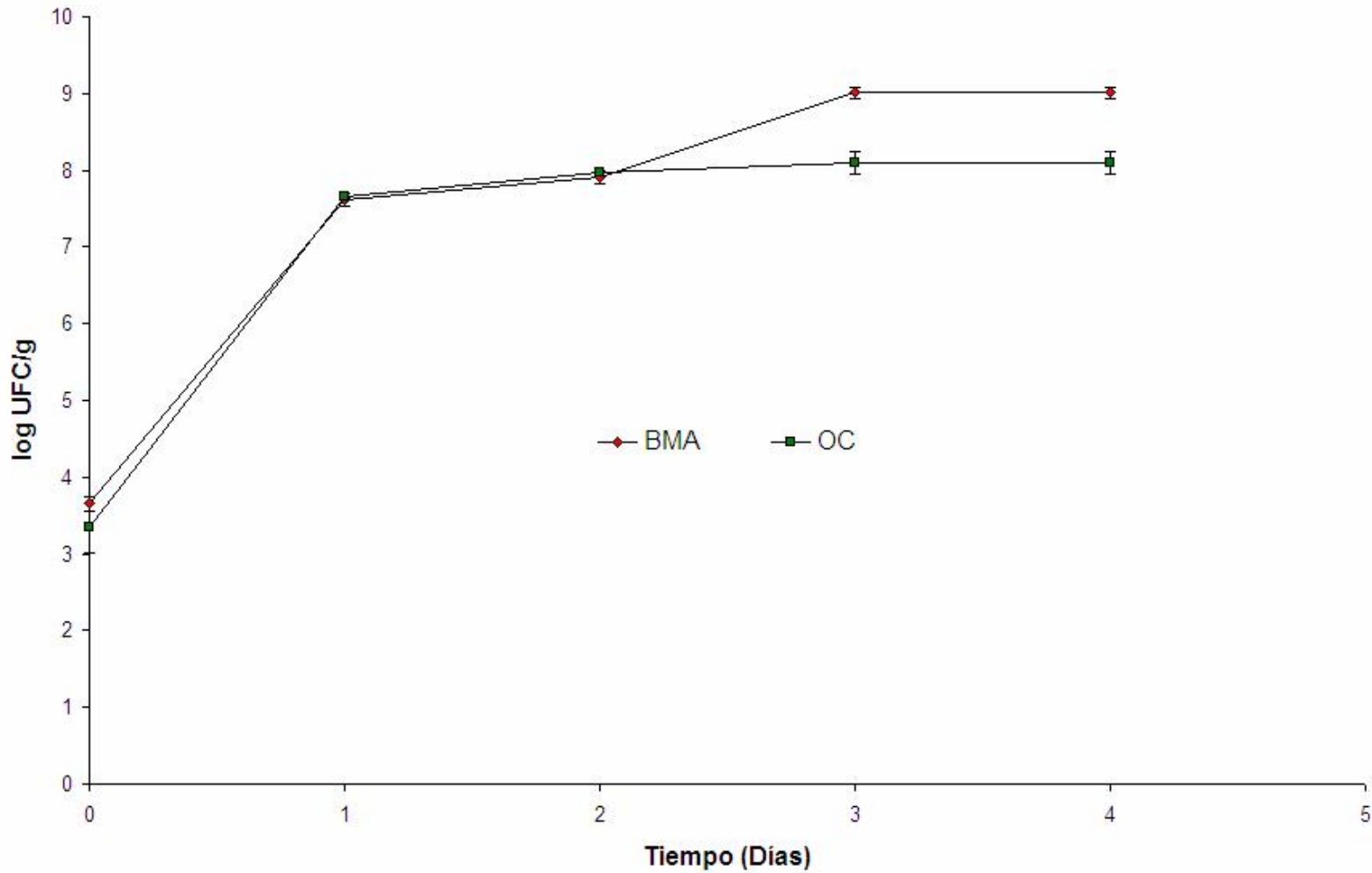
5.1. Comportamiento de organismo coliformes y bacterias mesófilas aerobias nativas.

Previo a los estudios con los grupos patógenos de *E. coli*, se investigó el comportamiento de las bacterias mesófilas aerobias (BMA) y organismos coliformes (OC) nativos de la semilla, en las dos etapas de germinación y hasta que el germinado alcanzó el tamaño deseado, esto con el fin de observar el comportamiento de las BMA y OC nativos y la interferencia que puedan llegar a tener en el desarrollo de los patógenos.

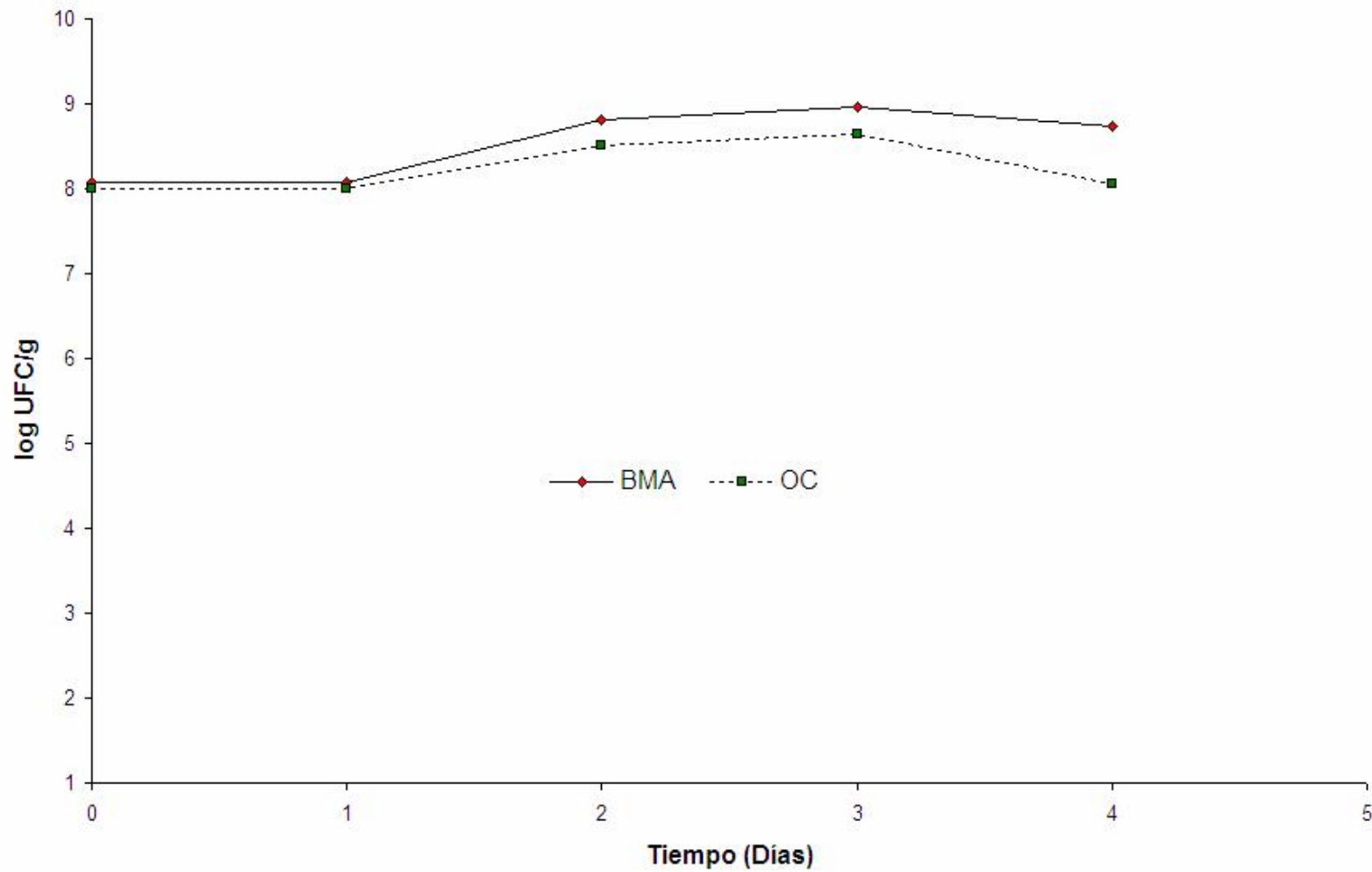
Ambos grupos microbianos se multiplicaron considerablemente durante la germinación de la semilla de alfalfa hidratada 4h. Las BMA mostraron mayor concentración que los OC; partiendo de un inóculo relativamente bajo, en sólo 24 h alcanzaron valores promedios de 1.4×10^8 y 4.6×10^7 UFC/g de BMA y OC, respectivamente. Éste germinado alcanzó un tamaño semejante al del comercio al cuarto día de crecimiento; la concentración promedio de BMA y OC que presentó el germinado en ese momento fue de 1.7×10^9 y 1×10^8 UFC/g respectivamente (Gráfica 1). En el caso de la hidratación de 24h las BMA y los OC presentaron una concentración inicial de 1.2×10^8 y 9.9×10^7 UFC/g respectivamente y la concentración final promedio fue de 5.5×10^8 y 1.7×10^8 UFC/g presentando también en este caso mayor concentración las BMA que los OC (Gráfica 2).

Es notable la capacidad del germinado de alfalfa para favorecer el desarrollo microbiano. Prokopowich & Blank (1991) también observaron activa multiplicación de las BMA y OC durante las primeras horas de germinación de diversas semillas. Este comportamiento es muy importante ya que si bien es cierto que los OC no se reconocen

Gráfica 1. Comportamiento de BMA y OC nativas en germinado de alfalfa hidratado 4 horas.



Gráfica 2. Comportamiento de BMA y OC nativas en germinado de alfalfa con 24h de hidratación.



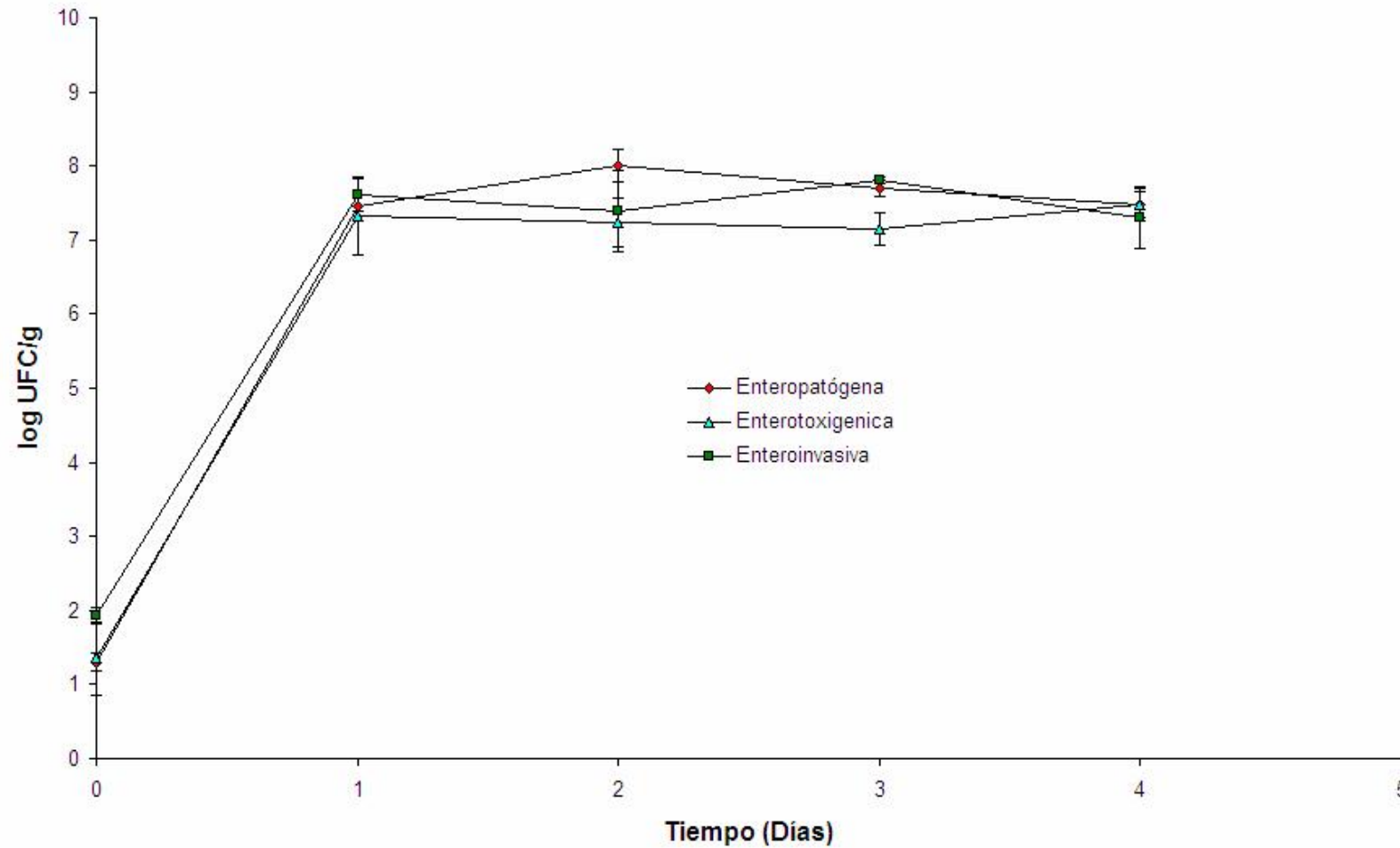
Como indicadores de la presencia de enteropatógenos en los alimentos, su comportamiento se aproxima mucho al de ellos. Por tanto, es muy probable que los enteropatógenos se multipliquen en el germinado.

5.2. Comportamiento de *Escherichia coli* enteropatógena, enterinvasiva y enterotoxigenica.

Con estos antecedentes, se procedió a contaminar la semilla de alfalfa (previamente lavada y desinfectada) con 4h de hidratación con los grupos patógenos de *E. coli*. En términos generales, al cabo de 24 h de crecimiento de la plántula, los tres grupos patógenos se multiplicaron y aumentaron considerablemente su concentración pasando de un promedio de 56 UFC/g en semilla a 3.6×10^7 UFC/g en germinado (Grafica 3). A partir de entonces, la concentración de los tres grupos patógenos de *E. coli* en el germinado se conservó prácticamente constante al menos hasta el cuarto día que duró el estudio. Como se observa, el comportamiento de los tres grupos patógenos a lo largo del crecimiento del germinado es muy similar.

Como se pudo observar, el germinado de alfalfa resultó un sustrato que favorece el desarrollo de los tres grupos patógenos de *E. coli*; la concentración final de los patógenos en el germinado de tamaño comercial constituye un riesgo severo para los consumidores. Los resultados indican que si la semilla se encuentra contaminada con estas bacterias patógenas o llegan a ella al inicio de la germinación, las bacterias patógenas encuentran un medio favorable para su multiplicación; es muy probable que en tan sólo 24 h de crecimiento del germinado y partiendo aún con cifras muy discretas del patógeno, se alcancen niveles de 10^7 UFC de patógeno/g de germinado.

Gráfica 3. Comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* en germinado de alfalfa inoculados inmediatamente después de 4 horas.



Es importante subrayar que en la Gráfica 3 los valores que se reportan son por gramo de germinado; si consideramos que una persona consumiera mínimo 50 g de un germinado contaminado con algún grupo patógeno de *E. coli*, en donde el patógeno se hubiera multiplicado durante la germinación de la semilla tal como en nuestro estudio, la concentración promedio del patógeno que estaría ingiriendo sería de entre 990, 000,000 a 2200, 000,000 UFC. Como se puede observar es una cifra muy alta y con mayor probabilidad de provocar enfermedad.

Un comportamiento similar al que exhibieron los grupos patógenos de *E. coli* en el germinado de alfalfa durante su crecimiento, ha sido reportado en la literatura. Andrews *et al.*, (1982) describen un desarrollo muy activo de 2 serotipos de *Salmonella* (Eimsbuettel y Poona) en este producto. Asimismo, *S stanley* y *S. enteritidis* incrementan su número durante las primeras horas de desarrollo de germinado de alfalfa (Andrew *et al.*, 1982; Geiges *et al.*, 1990). *Bacillus cereus* lo incrementa en aproximadamente 4 log durante las primeras horas de germinación (Harmon *et al.*, 1987), al igual que *Klebsiella pneumoniae* (Park & Sanders, 1992; Patterson & Woodburn, 1890). Por el contrario Geiges *et al.*, (1990) reportan nulo crecimiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento de germinado de soya a 4 y 22° (62). Carlin & Peck (1996) encontraron también que *C. botulinum* (tipo B,E y F) no se multiplica en germinado de soya. De igual forma Aytac & Goris (1994) observaron nulo desarrollo *A. hydrophila* y *L. monocytogenes* en germinado de alfalfa empacado en atmósfera modificada y mantenido en refrigeración durante 7 días. También Geisges *et al.*, (1990) reportan nulo desarrollo de *S. enteritidis* durante el almacenamiento de germinado de soya, pero no durante la germinación de la semilla en donde el microorganismo se multiplica activamente. Finalmente, observaron

un comportamiento de *V. cholerae*, *S. typhi* y *E. coli* O157:H7 en germinado de alfalfa muy semejante al que observamos con los tres grupos patógenos de *E. coli* en germinado de alfalfa (Castro-Rosas & Fernández, 2000).

Como se pudo observar en este estudio, durante las primeras horas de la germinación de la semilla los grupos patógenos de *E. coli* se multiplicaron a la par de las BMA, no así después de este tiempo. Este comportamiento podría deberse a que el patógeno llegó a un máximo de desarrollo (por agotamiento de nutrientes o saturación de espacio) o bien por efecto inhibitorio de la flora asociada. Es sabido que en un alimento con elevada concentración de microorganismos nativos es difícil que otros como los microorganismos patógenos para el hombre se multipliquen debido a que este no es su hábitat natural.

Este antecedente nos llevó a cuestionar si los grupos patógenos de *E. coli* eran capaces de multiplicarse cuando las BMA nativas se encontraran en niveles cercanos o superiores a 10^6 (cifras que se presentan al rededor de las 24 h de crecimiento del germinado). Conocer el comportamiento que tendrán los grupos patógenos en germinado en el cual ya se han desarrollado previamente los microorganismos nativos es interesante ya que nos permite simular una posible contaminación del germinado, con algún grupo patógeno de *E. coli*, después de las primeras 24 h de germinación de la semilla. Este estudio se justifica además ya que durante su desarrollo y comercialización el germinado esta expuesto a diversas fuentes de contaminación como por ejemplo el agua de irrigación, el humano, la fauna, entre otras.

Cuando se contaminó el germinado de alfalfa de 24 h de crecimiento (aproximadamente 0.5 cm de longitud del tallo) con los grupos patógenos de *E. coli*, sólo

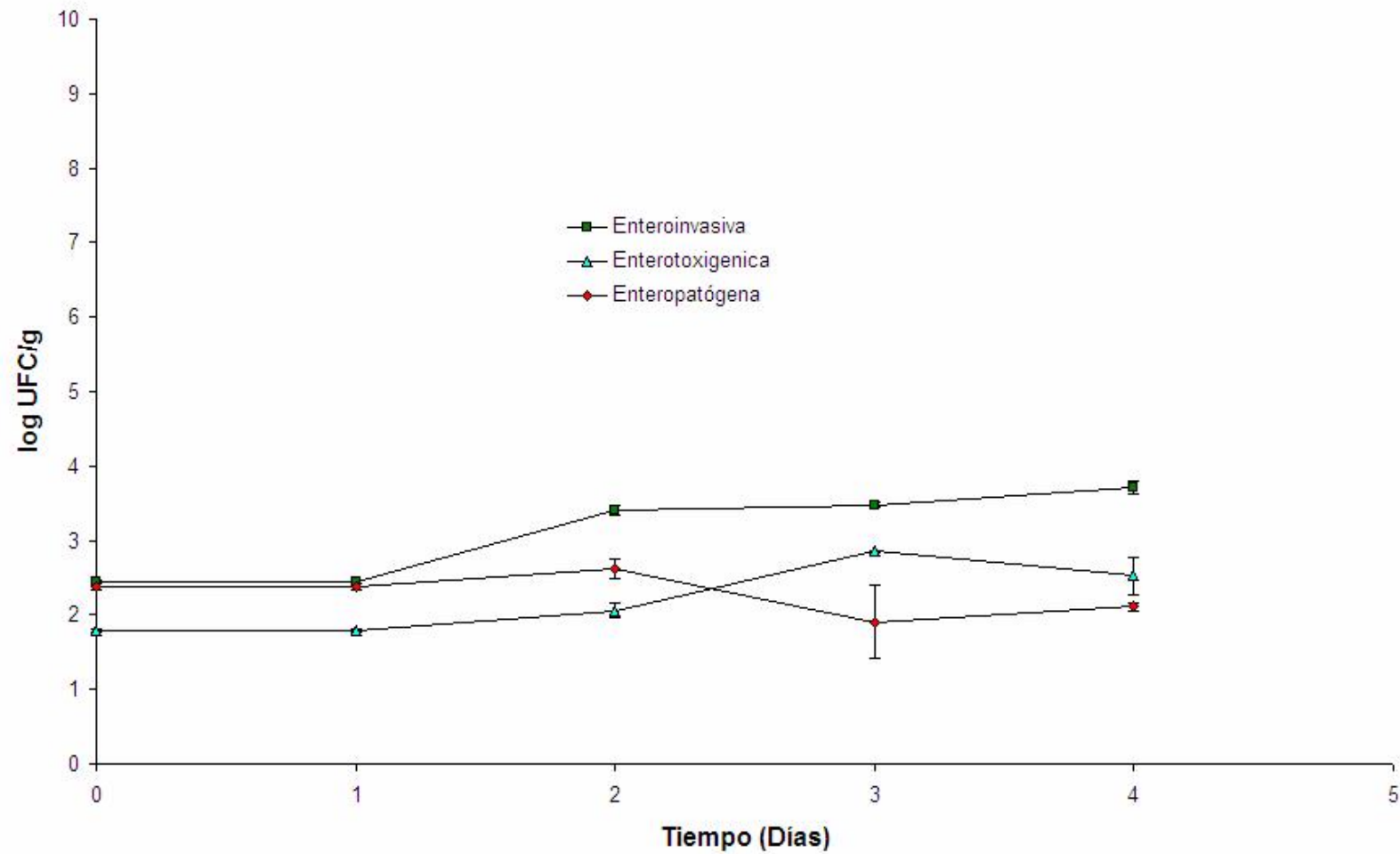
se observó un ligero desarrollo con *E. coli* enteropatógena enteroinvasiva y enterotoxigénica (Gráfica 4). Dos explicaciones pueden proponerse para este comportamiento: el efecto antagónico referido, y la síntesis de sustancias antimicrobianas por parte de la plántula tales como las fitoalexinas, que son compuestos de bajo peso molecular sintetizados en respuesta a una infección microbiana o por condiciones de estrés (Amin *et al.*, 1988; Beuchat & Brackett, 1990; Beuchat & Brackett, 1994; Beuchat & Goleen, 1989; Subba *et al.*, 1967). Quizá estas sustancias se formen o incrementen su concentración después de las primeras 48 hrs. de crecimiento de la plántula. Es muy probable la ocurrencia simultánea de ambos efectos en el germinado.

Hasta el momento los estudios muestran la necesidad de utilizar semilla de alfalfa libre de microorganismos patógenos para la producción del germinado, ya que como se observó los microorganismos patógenos entran fácilmente en actividad pudiendo alcanzar niveles muy elevados desde las primeras horas de la germinación. En reportes recientes, se manifiesta el interés en evaluar métodos de desinfección a base de agentes físicos y químicos que permitan disponer de semilla libre de microorganismos patógenos (Beuchat, 1997; Jaquette *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 1994; Piernas & Guirand, 1997).

5.3. Comportamiento de *E. coli* enteropatógena, enteroinvasiva y enterotoxigénica en germinado mantenido en refrigeración.

La temperatura de almacenamiento es probablemente el factor más importante que afecta el crecimiento de microorganismos en vegetales mínimamente procesados como:

Gráfica 4. Comportamiento de tres grupos patógenos de *E. coli* inoculadas inmediatamente después de 24 horas de hidratación



Es en el caso del germinado de alfalfa. Beuchat y Brackett (1990) quienes demostraron que el crecimiento de bacterias mesofilas aerobias disminuyó significativamente en proporción al decremento de la temperatura de almacenamiento. Regulaciones francesas impusieron 8°C como máxima temperatura de almacenamiento para vegetales mínimamente procesados. El Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos recomienda rangos de temperatura de almacenamiento de 0-5°C para ensaladas de vegetales, con este rango de temperatura ninguno de los vegetales puede sufrir daños organolépticos (Garg., *et al* 1990). Se ha sugerido que una forma de disminuir el riesgo de salmonelosis por consumo de germinado de alfalfa, sea mantenerlo en refrigeración y consumirlo dentro de los primeros 4 días a partir del comienzo de la germinación de la semilla (Jong & Andesson, 1995).

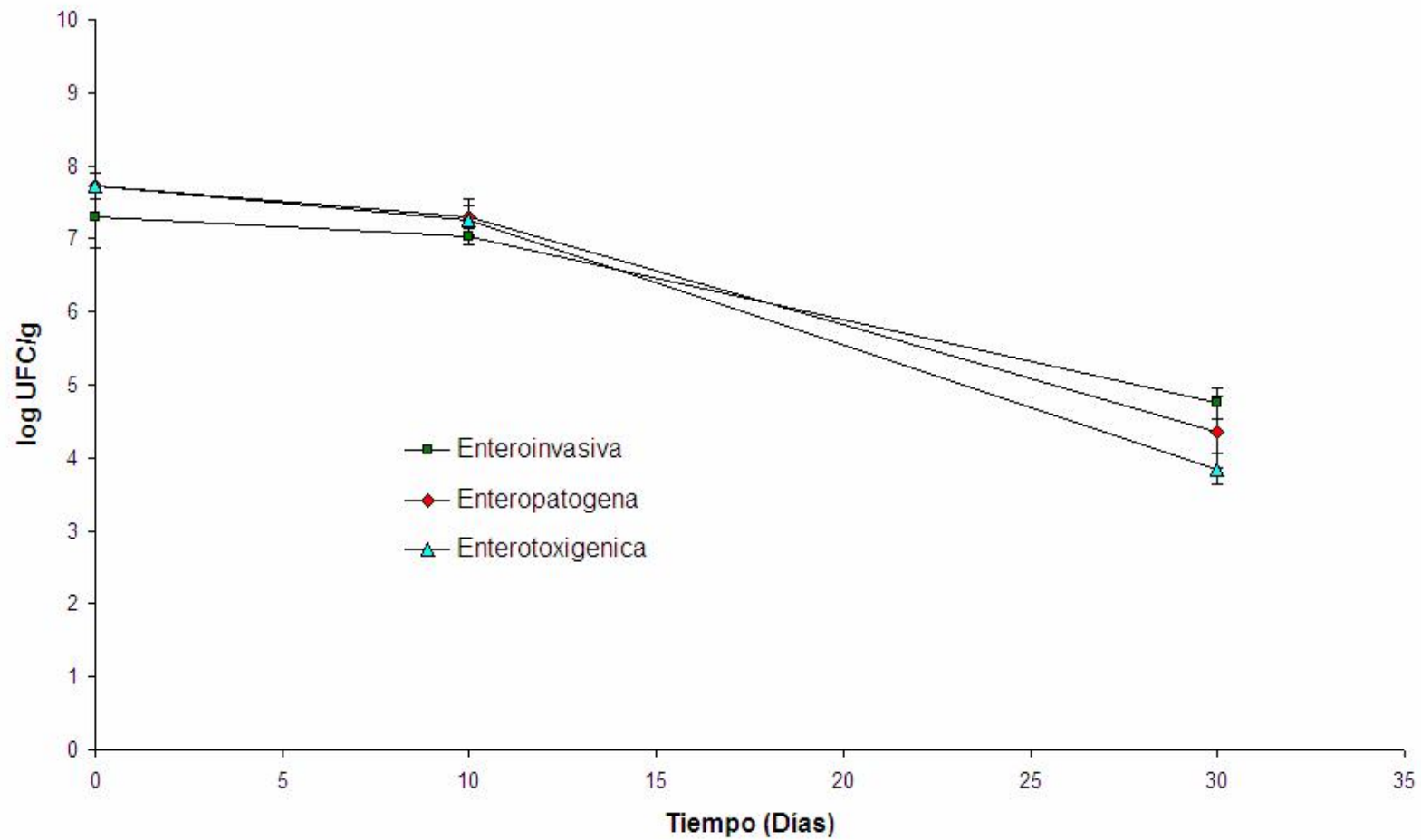
Los microorganismos patógenos mesófilos no crecen cuando el control de la temperatura es el adecuado (4°C o menos). La temperatura mínima de crecimiento para *Salmonella* esta reportado de 5.2°C (ICMSF, 1996). Como en todas las bacterias, la sobrevivencia y crecimiento de *E. coli* O157:H7 en los alimentos depende de la interacción de varios factores tales como la temperatura, pH, aw, etc. pero *E. coli* sobrevive a temperaturas de refrigeración. Es altamente tolerante a condiciones ácidas, saladas y secas especialmente a temperaturas de refrigeración, sin embargo es fácilmente destruida por el calor (Beuchat, 1996). No obstante, si el germinado se produce con semilla contaminada o el germinado se contamina en cualquier etapa de su producción, el germinado de tamaño comercial estará contaminado y la refrigeración sólo evitará que desarrollen los microorganismos más no los matará.

Se observó que a partir de germinado contaminado desde la semilla con los grupos patógenos de *E. coli*, los microorganismos se multiplicaron durante la germinación de la semilla y el germinado de tamaño comercial presentó una concentración elevada de estos grupos patógenos; éste germinado se almacenó en refrigeración y se observó que los tres grupos patógenos sobrevivieron prácticamente sin cambios en su concentración hasta los 10 días de almacenamiento, a partir de entonces, la concentración fue disminuyendo paulatinamente (Gráfica 5). Sin embargo, a pesar de la disminución en el número de los patógenos, la concentración remanente de microorganismos patógenos hasta los 30 días de almacenamiento en refrigeración todavía era elevada, la discreta disminución que se presenta, no alcanza niveles de seguridad.

Idealmente el objetivo es obtener germinado a partir de semilla libre de microorganismos patógeno y observar las prácticas sanitarias durante la producción y comercialización del germinado para evitar contaminación. Especialmente ante bacterias que pueden mostrar muy baja dosis infectante; como se observa en grupos de personas hipersensibles: niños, ancianos, mujeres embarazadas o inmunocomprometidos.

En nuestro país, anualmente se reportan numerosos caso de enfermedades diarreicas por grupos patógenos de *E. coli*, de hecho México es una área endémica de estos patógenos. Hasta el momento no se cuenta con información sobre la participación de grupos patógenos de *E. coli* en brotes asociados al consumo de germinados de semillas. Es de esperar, sin embargo, que en áreas endémicas de estos grupos patógenos de *E. coli*, como México, estos sean vehículos potenciales de tales grupos patógenos.

Gráfica 5. Comportamiento en germinado mantenido en refrigeración de tres grupos patógenos de *E. coli* desarrolladas en germinado de alfalfa.



Es importante señalar que aparte de los grupos patógenos de *E. coli* y otras bacterias patógenas, otros agentes patógenos pueden llegar al germinado, por ejemplo los parásitos o virus. Aunque incapaces de multiplicarse en él representan un riesgo de consideración; por ejemplo un sólo huevecillo de *Taenia solium* basta para provocar cisticercosis cerebral en un individuo (INDRE, 1991). Las fuentes de contaminación pueden ser variadas como por ejemplo: agua con materia fecal humana utilizada en la irrigación del germinado de alfalfa.

5.4. Evaluación de los germicidas en la desinfección del germinado de alfalfa.

Una cierta percepción de los riesgos asociados al consumo de verduras, lleva a la población a aplicar germicidas a las verduras crudas previó a su consumo. En la literatura se reportan estudios sobre evaluaciones de algunos de estos compuestos para abatir el contenido microbiano de las verduras crudas. Diversos autores señalan, sin embargo, que la eficiencia de los germicidas químicos para desinfectar verduras crudas es limitada (Adams *et al.*, 1989; Garg *et al.*, 1990; Shapiro & Holder, 1960). En un estudio reciente se observó que el bióxido de cloro, hipoclorito de sodio, un yodóforo, y Citricidin® (germicida comercial a base de semilla de toronja, al que se le atribuye un alto poder bactericida), aun en concentraciones de 200 ppm, no eliminaron o disminuyeron a un nivel seguro la concentración de *Salmonella* y *Vibrio cholerae* presentes en germinado de alfalfa (Castro-Rosas, 1998). En nuestro caso, se efectuó un estudio para conocer el efecto del hipoclorito de sodio, yodo y plata coloidal en la reducción de los niveles de grupos patógenos de *E. coli* presentes en germinado de alfalfa.

Los tratamientos consistieron en poner en contacto el germinado contaminado con el desinfectante a estudiar con tiempo y concentraciones diferentes. Los tratamientos que se utilizaron en este estudio fueron: 50 y 200 ppm con 3 y 10 min de contacto respectivamente. Para el caso de la plata coloidal se evaluaron dos concentraciones 1 y 4 ppm; según las recomendaciones del fabricante se calculó que la concentración final que recomiendan es de 1 ppm.

En general se observó un limitado efecto de los desinfectantes en la reducción de los niveles de los grupos patógenos de *E. coli* presentes en el germinado de alfalfa (tablas 6 y 7). Incluso, aun con un tiempo de contacto de 10 min y concentraciones de 200 ppm de desinfectante se observa un pobre efecto bactericida. La máxima reducción se observó con la plata coloidal. Cabe señalar que aun que con 4 veces más de la concentración de plata coloidal recomendada, el efecto que se logró fue limitado. Los germicidas probados, aunque eficientes cuando se aplican directamente en aguas limpias, claras o con bajo contenido de materia orgánica, o en la desinfección del equipo en las plantas procesadoras de alimentos, no exhiben niveles seguros de destrucción bacteriana en el alimento examinado. Los resultados muestran que la desinfección tiene un valor limitado para corregir el problema de la contaminación del germinado de alfalfa. Aun con 200 ppm de la solución de yodo (concentración a la cual aparece un tinte ligeramente café en el germinado después del tratamiento), la máxima reducción fue de 15% de la población. Esta reducción tiene escasa repercusión en términos sanitarios. Por lo general, cuando se diseñan experimentos para evaluar la eficiencia de un proceso de desinfección a base de germicidas químicos u otros agentes físicos, se emplean niveles de gérmenes que no suelen presentarse en condiciones naturales. De esta

manera se puede contar con márgenes de seguridad apreciables, ante una disminución significativa de los microorganismos indicadores. Sin embargo, en nuestro caso se utilizó germinado de alfalfa con la concentración que los propios patógenos alcanzaron sin alterar el curso de su desarrollo. En estas condiciones los germicidas no fueron capaces de reducir la concentración de los patógenos a niveles razonablemente seguros. En relación con el limitado efecto germicida sobre este producto puede especularse que el microorganismo en el alimento se circunscribe a pequeñas colonias o láminas extensas, ya sea sobre la cutícula o en áreas donde existe discontinuidad de esta (por algún daño).

En cualquier caso, estaría dispuesto en multicapas, de tal forma que las más externas tendrán mayor interacción con el medio que las internas, y por tanto, estarán menos protegidas contra factores externos como el contacto con los germicidas. En consecuencia, los germicidas pueden estar actuando más activamente sobre las células que se encuentran en las capas externas. Las células internas se encuentran en mejores perspectivas de sobrevivir. Alternativa o complementariamente, el microorganismo puede estar sintetizando compuestos (polímeros) ó una especie biopelícula (Babia *et al.*, 1996) en el que queda embebido. Este material le permite adherirse a la superficie y proporciona un medio de protección contra la acción de agentes externos. De hecho algunos investigadores han observado que las bacterias que se adhieren a las superficies de materiales y equipo de la industria de alimentos, se vuelven más resistentes a los agentes biocidas (Frank & Koffi, 1990; Quintavalla, 1990). Hay que considerar además, como señalan Adams *et al.*,(1989) , que ante la cutícula cerosa (hidrofóbica) del tallo de la planta, las soluciones germicidas no entran fácilmente en

Tabla 6 y 7.- Efecto de dos concentraciones y dos tiempos de contacto en la reducción de niveles de *E. coli* desarrollada en germinado de alfalfa con tres desinfectantes diferentes cloro, yodo y plata coloidal.

3 minutos

	Cloro			Yodo			Plata Coloidal		
	Control	3 min.		Control	3 min.		Control	3 min.	
		50 ppm	200 ppm		50 ppm	200 ppm		1 ppm	4 ppm
Invasivas	*6.30 ±0.06**	5.94 ±0.1	5.63 ±0.1	6.17 ±0.13	6.08 ±0.1	5.94 ±0.09	5.96 ±0.08	4.95 ±0.2	5.17 ±0.04
Patógenas	6.12 ±0.08	5.60 ±0.1	5.39 ±0.1	6.99 ±0.55	6.30 ±0.7	5.96 ±0.06	7.09 ±0.08	6.9 ±0.09	6.73 ±0.09

10 minutos

	Cloro			Yodo			Plata Coloidal		
	Control	10 min.		Control	10 min.		Control	10 min.	
		50 ppm	200 ppm		50 ppm	200 ppm		1 ppm	4 ppm
Invasivas	*6.30 ±0.06**	5.85 ±0.2	5.69 ±0.03	6.17 ±0.13	6.09 ±0.2	6.14 ±0.1	5.96 ±0.08	4.8 ±0.07	5.62 ±0.03
Patógenas	6.12 ±0.08	5.54 ±0.1	5.27 ±0.09	6.99 ±0.55	5.53 ±0.8	5.93 ±0.09	7.09 ±0.08	5.82 ±0.09	5.81 ±0.05

* Promedio (log)

** Desviación estándar ±

Contacto con la superficie, y la interacción con los microorganismos se ve restringida (Adams *et al.*,1989). La inactivación de los germicidas al contacto con la materia orgánica, tiene un significado menor en este alimento. Es evidente que el uso de germicidas (al menos a las concentraciones ensayadas) para corregir la contaminación de este producto con bacterias patógenas puede no ser suficiente.



Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. Los tres grupos patógenos de *E. coli* se multiplicaron durante las 24 hrs. de germinación de la semilla contaminado inmediatamente después de la hidratación. Sin embargo al contaminar después de las 24 hrs. no se observó multiplicación de los grupos patógenos.
2. La concentración alcanzada por los tres grupos patógenos de *E. coli* fue menor ó igual a la dosis mínima infectante cuando el germinado se contaminó en la semilla con 4h de hidratación.
3. Los tres grupos patógenos sobrevivieron durante 10 días a temperatura de refrigeración posteriormente la concentración disminuyó solo 3 log. La concentración final fue en promedio de 5 log.
4. La máxima reducción que se observó fue de 1-2 log con plata coloidal. Aunque fue utilizando 4 veces más la concentración recomendada.
5. Los desinfectantes no redujeron la concentración de los patógenos a niveles razonablemente seguros en el germinado de alfalfa. Reducción de 5 log al menos.



Referencias

VII. REFERENCIAS

- Adams, M. R., Hartley, A.D. and Cox, L. J.** 1989. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol.* 6:69-77.
- Al-Ghazaki, M. R. and Al-Azawi, S. K.** 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *J. Appl. Bacteriol.* 69:642-644.
- Álvarez M.B.L.** 1998. Contaminación, Sobrevivencia y desarrollo de *Listeria monocytogenes* durante el procesamiento de brócoli precocido y congelado. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de maestría.
- American Public Health Association.** 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Amin, M., F. Kurosaki, and A. Nishi.** 1988. Carrot phytoalexin alters the membrane permeability of *Candida albicans* and multilamellar liposomes. *J. Gen. Microbiol.* 134: 241-246.
- Andrew, W. H., Mislivec, P. B., Wilson, C. R., Bruce, V. R., Poelma, P. L., Gibson, R., Trucksess, M. W. and Young, K.** 1982. Microbial Hazards Associated with Bean Sprouting. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65 (2):241-248.
- Archer, D. L and Kvenberg, J. E.** 1985. Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States. *J. Food Prot.* 48:887-894.
- Archer, D. L.** 1990. The need for flexibility in HACCP. *Food Technol.* 44 (5) :174 -178.
- Aytac, S. A., and Gorris, L. G. M.** 1994. Survival of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under moderate vacuum. Abstract. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (6):670-672.
- Babic, I., Roy, S., Watada, A. E. and Wergin, W. P.** 1996. Changes in microbial populations on fresh cut spinach. *Int. J. Food Microbiol.* 31:107-119.
- Bean, N. H., Griffin, P. M., Goulding, J. S. and Ivey, C. B.** 1990. Foodborne disease outbreak, 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Prot.* 53:711-728.
- Bean, N. H., Goulding, J. S., Lao, C. and Angulo, F. J.** 1996. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks, United States, 1988-1992. *M.M.W.R.* 45 No. SS-5.
- Beckers, H. J.** 1988. Incidence of foodborne disease in the Netherlands : Annual Summary 1982 and an Overview from 1979 to 1982. *J. Food Prot.* 53:804-817.

Beuchat, L.R. and Golden D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol. 43:134-142.

Beuchat, L. R. and Brackett, R. E. 1990. Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding , chlorine treatment. Journal of Food Science 55 (3), 755–758.

Beuchat L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J. Food Prot. 59:204-216.

Beuchat L.R. and Scouten A. J. 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on alfalfa seeds. Journal of Applied Microbiology 92(3) 382-395(14)

Beuchat, L. R. 1997. Comparison of chemical treatments to kill *Salmonella* on alfalfa seeds destined for sprout production. Int. J. Food Microbiol. 34 (3):329-333.

Beuchat, L.R. and Brackett, R. E. 1990 Inhibitory effect of raw carrots on *Listeria monocytogenes*.Appl. Environ. Microbiol. 56:1734-1742.

Beuchat, L.R., Brackett R. E. and Doyle P. M. 1994. Lethality of Carrot Juice to *Listeria monocytogenes* as Affected by pH, Sodium Chloride and Temperature. J.Food Prot. 57:470-474.

Brackett E. R. Fruits, Vegetables, and Grains. En: Doyle, P. M., Beuchat. L. R. and Montuile. J. T. (eds). 1997. Food Microbiology Fundamentals and Fronters. ASM-Press, Washington D.C.

Brendan K. Rebekah D. Markus S. Dieter J. R. Elizabeth A. F. and B. Brett F. 1997. Enteropathogenic E. coli (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells.

Bronk D.T., Smith W.D., Madigan T.M. 1988. Microbiología 4ta. Edición. Editorial Prentice hall. pp 528

Carlin, F. and Peck, M.W. 1996. Growth of and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in cooked pureed vegetables at refrigeration temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 64:3069-3072.

- Campos, C.L., Franzolin M.R, Trabulsi L.R.** 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups. 99:545-552
- Castro-Rosas, J.** 1998. Algunos Factores que afectan la inocuidad microbiana del germinado de alfalfa. Tesis de Maestría. Departamento de Investigación y posgrado en alimentos, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.
- Castro-Rosas, J. and Escartín, E.F.** 1999. Incidence and germicide sensitivity of *Salmonella typhi* and *Vibrio cholerae* O1 in alfalfa sprouts. *Journal of Food Safety*. 19 : 137-146.
- Castro-Rosas, J. and Escartín, E.F.** 2000. Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *Journal of Food Science*. 65 (1): 162-165.
- Eslava C, Villaseca JM, Cravioto A.** 1993. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México, D.F. 251-265.
- Fernández E. E.** 1997. Identification and Prevention of Microbial Risks in Foods: The HACCP Approach and Priorities in México. *Environ. Health*. 40-42.
- Fernández E. E.** 1997. Manual de Curso de Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos. D.I.P.A. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Fernández E. E.** 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos.
- Fordman, J. R., Well, C. E. and Chen, L. H.** 1975. Sprouting of seed and nutrient composition of seed and sprout. *J. Food Sci.* 40:552-556.
- Frank, J. F. and Koffi, R. A.** 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53:550-554.
- Forsythe S.J. and Hayes P.R.** 2000. Higiene de los Alimentos, microbiología y HACCP 2da edición. Ed Acribia. pp 62, 63, 374, 375, 379.
- Gandhi M, and Matthews R.K.** 2003. Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella*. *Int J. Food Microbiol.* 87(3):301-6.

Frazier W.C y Westhoff D.C. Microbiología de Alimentos 4ta Edición. Ed. Acribia pp 72, 570.

Garg, N., Churey, J. J. and Splittstoesser, D. F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. J. Food Prot. 53:701-703.

Geiges, O., Staehlin, B. and Baumann, B. 1990. Microbiological evaluation of prepared salad vegetables and sprouts [Mikrobiologische Beurteilung von Schnittsalat und Sprossgemuese]. Abstract. Mitteilungen-aus-dem-Gebiete-der-Lebensmitteluntersuchung-und-Hygiene. 81 (6):648.

Geldreich, E. E. and Bordner, R. H. 1971. Fecal contamination on fruits and vegetables during cultivation and processing for market. a review. J. Milk Food Technol. 34:184-195.

Gerh R. 2005. Investigation of Silver Electrochemistry Water Disinfection Applications. McGill University. pp 4,5.

Gohil, V. S., Ahmed, M. A., Davies, R. and Robinson, R. K. 1995. Incidence of *Listeria* ssp. in retail foods in the United Arab Emirates. J. Food Prot. 58 : 102-104.

Gupta, K. and Wagle, D. S. 1980. Changes in antinutritional factors during germination in *Phaseolus mungoreous*, a cross between *Phaseolus mungo* (M₁₋₁) and *Phaseolus aureus* (T₁). J. Food Sci. 45:394-397.

Hall, M.L.M. and Rowe, B. *Salmonella arizonae* in the United Kingdom from 1966 to 1990. Epidem. Infec. 108:59-65.

Harmon, S. M., Kautter, D. A. and Solomon, H. M. 1987. *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetables sprouts grown in home sprouting kit. J. Food Prot. 50:62-65.

Hargrove, R. E. Mc Donough, F. E. and Mattingly, W. A. 1969. Factors affecting survival of Salmonella in Cheddar and Colby cheese. J. Milk Food Tecno. 32:480-484.

Hitchins, D. A. *Listeria Monocytogenes*. En: AOAC. (ed). 1992. Bacteriological Analytical Manual. 7th pp 141-159.

IAMFES. 1991. Procedures to Implement the Hazard Analisis Critical Control Point System. International Association of Milk, Food and Environmetal Sanitarians, Inc. Iowa.

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1991. Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium*. Publ. Tec. No. 4. México.

International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). 1996

- International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF).** 1980. Microbial ecology of Foods. I. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. Acad. Press.
- Jaquette, C. B., Beuchat, L. R. and Mahon, B. E.** 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.
- Jay J. M.** 1992. Microbiología Moderna de los Alimentos. Ed Acribia. pp 345-352
- Jerngklinchan J. and Saitanu, K.** 1993. The occurrence of Salmonellae in sprouts in Thailand. Abstract, Sout. Asian J. Trop. Med. Pub. Health. 24(1)114.
- Jong, B-de. and Andesson, Y.** 1995. *Salmonella bovis morbificans* in alfalfa sprouts. Abstract, Svensk-Veterinartidning. 47(2):53.
- Käferstein, F. K.** 1976. The microflora of Parsley. J. Milk Food Technol. 39:837-840.
- Kakade, M. L. and Evans, R. J.** 1966. Effect of Soaking and Germinating on the Nutritive Value of Navy Beans. J. Food Sci. 31:781-783.
- Klaus L.** 1980. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 13 : 353-385.
- Krogfelt K. A.** 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of Escherichia coli. Rev. Inf. Dis. 13:721-735.
- Kuhmonen, A. and Pitkaelae, A.** 1991. Sprouts seeds- a health hazard?. Abstract. Suomen-ElaeinlaeaeKaerilehti. 97(12):574.
- Kyenberg, J. E and Archer, D. L.** 1987. Economic impact of colonization control on foodborne disease. Food Technol. 41 (7):77-81.
- Kylen, A. M. and Mc Cready, R. M.** 1975. Nutrients in seed and sprouts of alfalfa, lentils, mung beans and soybeans. J. Food Sci. 40:1008-1009.
- Laubusch, E.J.** 1971. Water Quality and Treatment (3 rd ed.). New York: McGraw-Hill Book Company.
- Lindqvist R., Andersson Y., Lindbäck J., Wegscheider M., Eriksson Y., Tideström L., Lagerqvist-Widh A., Kjell-Olof H., Sven Löfdahl S., Svensson L., and Norinder A.** 2001. A One-Year Study of Foodborne Illnesses in the Municipality of Uppsala, Sweden

Mitsuda T., Muto T., Yamada M., Kobayashi N., Toba M., Aihara Y., Ito A., and Yokota S. 1998. Epidemiological Study of a Food-Borne Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. J. Clin Microbiol 36(3):652-6

Mohle-Boetani J.C., MD, MPH; Jeff A. Farrar, DVM, PhD; S. Benson Werner, MD, MPH; Dzovag Minassian, MPH; Ray Bryant; Sharon Abbott; Laurence Slutsker, MD, MPH; and Duc J. Vugia, MD, MPH. 1996-1998. for the Investigation Team. *Escherichia coli* O157 and Salmonella Infections Associated with Sprouts in California. Annals of Internal Medicine. 239-247.

Montville R and Schaffner W.D. 2003 Analysis of Published Sprout Seed Sanitization Studies Shows Treatments are Highly Variable. J Food Protect 2004 Apr; 67(4):758-65

Morbidity and Mortality Weekly Report. 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157 : H 7 Infection Associated with Eating Alfalfa Sprouts - Michigan and Virginia, June-July 1997. 46 (32):741-744.

Mountey, G. J. and Wilbur, A. G. 1971. Fruits and Vegetables in: Practical Food Microbiol. and Technol. AVI, Plublished by Van Nostrand R. N. Y.

Naimi S.T., Wicklund H.J., Olsen J.S., Gerard Krause G., Wells G.J., Bartkus M.J., Boxrud J.D., Sullivan M., Kassenborg H., Besser M.J., Mintz D.E., Osterholm T.M., and Hedberg W.C. 2002. Concurrent Outbreaks of *Shigella sonnei* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections Associated with Parsley: Implications for Surveillance and Control of Foodborne Illness.

Neill M. A. Tarr D. N. and Trofa A. F. 1994. *Escherichia coli*: Hui Y. H. Gorham J. R. Murrel K. D. And Cliver D. O. (Eds.) Vol. I. Marcel Dekker. Inc. N.Y. Foodborne Disease Handbook. 169-213.

Okuda, S., Aoki, M., Kikuno, R., Nishimura, T. and Nagumo, T. 1994. Preparation of germ-free bean sprout, and identification of bacteria associated with their putrefaction. Abstract, J. Antibact. Antifung. Ag. Jap. 22 (12):711-715.

O' Mahony, M., Cowden, J., Smyth, B., Lynch, D., Hall, M., Rowe, B., Teare, E. J., Tettmar, R. E., Rampling, A. M., Coles, M., Gilbert, R. J., Kingcott, E. and Barlett, C. L. R. 1990 . An outbreak of *Salmonella saintpaul* infection associated with beansprouts. Epidemiol. Infec. 10 :229-235.

- Pönkä A, Andersson Y, Siitonen A, Jong B., Jahkola M., Haikala O., Kuhmonen, A. and Pakkala, P.** 1995. *Salmonella* in alfalfa sprouts. Lancet. 345:462-463.
- Park, C. E. and Sanders, G. W.** 1990. Source of *Klebsiella pneumoniae* in Alfalfa and Mung Bean Sprouts and Attempts to Reduce its Occurrence. Abstract, Can. Int. Food Sci. Technol. J. 23:189-192.
- Park, C. E. and Sanders, G. W.** 1992. Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers outdoor markets and supermarkets. Can. J. Microbiol. 38:313.
- Patterson, J. E. and Woodburn, M. J.** 1890. *Klebsiella* and other bacteria on alfalfa and bean sprouts at the retail level. J. Food Sci. 45:492-495.
- Pelczar, J. M.** 1983. Microbiología. 2a Ed. McGraw-Hill.
- Petska J.J.** 1993. Food, diet, and gastrointestinal immune function. Adv. Food Prot. 58:624-627.
- Piernas, V. and Guiraud, J. P.** 1997. Desinfection of Rice Seed Prior to Sprouting. J. Food Sci. 62:611-615.
- Prescott L.M., Harley J. P., Klein A.D.** Microbiología 5ta edición Ed Mc GrawHill pp 1011.
- Portnoy, B. L., Goepfert, J. M. and Harmon, S. M.** 1976 . An outbreak of *Bacillus cereus* poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. Am. J. Epidemiol. 103:589-594.
- Prokopowich, D. and Blank, G.** 1991. Microbiological evaluation of vegetables sprouts and seeds. J. Food Prot. 54: 560-562.
- Quintavalla, S.** 1990. Resistance of microorganisms on metal surfaces to chemical sterilizing agents. Abstract, Rassegna-dell'Imballaggio-e-Confezionamento. 11(5):10.
- Quinto E. J. and Cepeda. A.** 1997. Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese with raw or pasteurized milk.
- Ranhota, G. S., Loewe, R. J. and Lehmann, T. A.** 1977 Breading quality and nutritive value of sprouted wheat. J. Food Sci. 42:1373-1375.
- Reid, R.** 1990. Cleaning and sanitation in the wine industry. Abstract. Food Rew. 17(5):40.
- Richardson, G. H. ed.** 1985. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 15th de. Amer. Pub. Health Assoc. Washington.

Robins-Browne R.M and Hartlan E. 2002. Advances in Pediatric Gastroenterology and Hepatology. *Escherichia coli* as a Cause of Diarrhea.

Robinson, I. and Adams, R. P. 1978. Ultraviolet treatment of contaminated irrigation water and its effect on the bacteriological quality of celery at harvest. *J. Appl. Bacteriol.* 45:83-86.

Rojas, O.M. 2005. Comportamiento de tres grupos patógenos de *Escherichia coli* en cuatro grupos de verduras crudas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Química en Alimentos.

Sharma R. R., Demirci A. 2002 Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *Int J Food Microbio* 2003; 86: 231-237.

Shapiro, J. E. and Holder, I. A. 1960. Effect of antibiotic and chemical dips on the microflora of packaged salad mix. *Appl. Microbiol.* 8:341-345.

Subba, M. S., Soumithri, T. C. and Suryanarayana Rao, R. 1967. Antimicrobial action of citrus oil. *J. Food Sci.* 32:225-227.

Taormina J.P., Beuchat L.R., and Slutsker L. University of Georgia, Griffin, Georgia, USA; and Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. 1999. Infections Associated with Eating Seed Sprouts: An International Concern, *Emerging Infectious Diseases.* 5:629-634.

Trabulsi R.L., Rogéria K. and Tânia A. T. G. 2002. Typical and Atypical Eeteropathogenic *Escherichia coli*.

Todd, E. C. D. 1978. Fodborne disease in six countries- a comparison. *J. Food Prot.* 41:559-565.

Todd, E. C. D. 1985. Economic loss from foodborne disease and nonillnes related recalls because mishandling by food processors. *J. Food Prot.* 48:621-623.

Todd, E. C. D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne diseases in the United States. *J. Food Prot.* 53:595-601.

Torres V. M. R., Navarro, H. V. y Urakami F. O. T. 1997. *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* en cilantro (*Coriandrum sativum*) fresco que se expende en mercados de la ciudad de Guadalajara. XIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal, México.

Trevor V. S y Harris J.L. 2004. Growing Seed Sprouts at Home. Universidad de California. Publicación 8151.

Varaquaux, P., Albagnac, G., Nguyen-the, C. and Varaquaux, F. 1996. Modified atmosphere packaging of fresh beansprouts. Abstract. J. Sci. Food Agric. 70 (2): 224.

Whyte, K. C. 1973 The Complete Sprouting Cookbook, Troubador Press, San Fransisco.
en: Klaus Lorenz. 1980. Cereal sprouts: Composition, Nutritive Value, Food Applications. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 13: 353-385.