



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE GERMINADOS DE
ALFALFA EXPENDIDOS EN RESTAURANTES Y CENTROS DE
ABASTO, ANTES Y DESPUÉS DEL USO DE DESINFECTANTES**

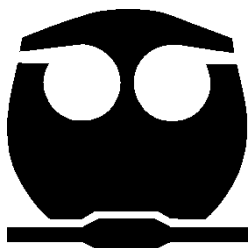
T E S I S

Que para obtener el título de:

Químico de Alimentos

Presenta:

Luis Gerardo Sánchez Pacheco



México, D. F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Profesora María del Carmen Wachter Rodarte
Vocal	Profesora Adriana Guadalupe Mejía Chávez
Secretario	Profesor Miguel Ángel Hidalgo Torres
Primer suplente	Profesor Luciano Hernández Gómez
Segundo suplente	Profesora Rosalba Esquivel Cote

Lugar donde se realizó la investigación:

- (I) Laboratorios 4-A y 4-C, del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM
- (II) Laboratorio de medios de cultivo, 1-A, del Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

Asesora del Tema:

Q.F.B. Adriana Guadalupe Mejía Chávez _____

Sustentante:

Luis Gerardo Sánchez Pacheco _____

Sólo podría dedicar este trabajo a la causa y razón de mi vida,

A ella, que sabe ser fuerte como la roca,

Y dulce como la miel,

A mi Madre

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme en sus aulas y conocer un mundo maravilloso de cultura y saber.

A los profesores del jurado por la atención que le pusieron a este trabajo y a mi asesora por su apoyo y ayuda.

A mis profesores, por haber tenido la bondad de compartir su sabiduría.

A mis amigos del laboratorio B-201 por todo lo que me enseñaron y la paciencia que siempre tuvieron conmigo, pero sobre todo, porque su amistad fue una luz que me iluminó incondicionalmente. Gracias a Hilda Calderón, Pandiyán Thangarasu, Rolando García, Gabriela Moranchel y Adriana Cruz.

A la gran e insustituible amistad de mi querido K.

A mis compañeros y amigos de la licenciatura Flor Vázquez, José Aguilar y Manuel Hidalgo.

A mis amigos de la maestría Sandra Guzmán y Rodrigo Cocina porque juntos somos mucho más que tres.

A la superlaboratorista del 4-A: Lety, gracias por todas sus atenciones.

Esta tesis es la culminación de muchos esfuerzos y el logro de muchas personas que me han ayudado a llegar a esta meta. Mi gratitud a todos ellos, a los que han creído en mi, a veces mucho más que yo mismo.

A todos aquellos que me han acompañado por esta mágica senda que es el vivir.

<i>ÍNDICE</i>	<i>Página</i>
1.0 Resumen	1
2.0 Justificación	3
3.0 Hipótesis	3
4.0 Objetivos	4
5.0 Antecedentes	5
5.1 Problemática	5
5.2 Origen de la alfalfa	7
5.3 Botánica	8
5.4 Proceso de germinación	9
5.4.1 Requisitos para que ocurra la germinación	9
5.5 Propiedades nutrimentales	14
5.6 Desinfectantes	15
5.6.1 Plata coloidal	16
5.6.2 Compuestos de cloro	18
5.6.3 Aceites vegetales	20
5.7 Microorganismos en productos vegetales	21
5.8 Bacterias patógenas para el hombre	23
5.9 Algunas enfermedades gastrointestinales causadas por la ingestión de bacterias patógenas	24
5.10 Gastroenteritis de origen alimentario producidas por <i>Salmonella</i>	25
5.11 Serovariedades del género <i>Salmonella</i> de importancia médica	28
5.12 Crecimiento y destrucción de <i>Salmonella</i>	32
5.13 Microorganismos indicadores de contaminación en alimentos	35
5.13.1 Mesófilos aerobios	37
5.13.2 Coliformes totales	38
5.13.3 coliformes fecales	39

5.13.4 Ventajas y desventajas de los microorganismos coliformes como indicadores	40
5.14 Placas petrifilm ^{MR}	41
5.15 Legislación	42
6.0 Metodología	43
6.1 Materiales y reactivos	43
6.2 Aparatos e instrumentos	44
6.3 Diagrama de trabajo (Determinación de calidad microbiológica en restaurantes y centros de abasto)	45
6.4 Lugares de muestreo	46
6.5 Determinación de la eficiencia de algunos agentes desinfectantes sobre germinados de alfalfa	47
6.6 Prueba de eficiencia de hipoclorito en pH ácido	48
6.7 Condiciones de transporte al laboratorio	50
6.8 Determinación de mesófilos aerobios	50
6.9 Determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> (petrifilm ^{MR})	50
6.10 Determinación de <i>Salmonella spp</i>	51
7.0 Resultados y discusión	52
7.1 Calidad microbiológica en centros de abasto	52
7.2 Calidad microbiológica de germinados de alfalfa en restaurantes de la ciudad de México	55
7.3 Pruebas de la acción de desinfectantes comerciales y mezcla de tratamientos en germinados de alfalfa	58
7.3.1 Empleo de tensoactivos en la desinfección de germinados de alfalfa	59
7.3.2 Efecto de la combinación detergente-desinfectante sobre germinados de alfalfa	61
7.3.3 Efecto de tensoactivo-hipoclorito de sodio-vinagre en la desinfección de germinados de alfalfa	62

8.0 Conclusiones	66
9.0 Sugerencias	67
10.0 Bibliografía	68
Apéndice A. Temperaturas y tiempos empleados con Petrifilm	75

RESUMEN

La incidencia de infecciones gastrointestinales ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados, genera la necesidad establecer medidas que garanticen su inocuidad, o en su defecto, alertar a la población acerca de los riesgos que conlleva el consumo de éstos (principalmente en aquellos casos en que son consumidos sin tratamientos que permitan eliminar microorganismos patógenos). Dentro de los productos de consumo directo se encuentran las semillas germinadas, las cuales han ganado una gran popularidad desde mediados del siglo pasado. Recientemente se ha detectado la presencia de microorganismos como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus* en semillas germinadas, de las cuales varias cepas de *Salmonella sp* y *Bacillus cereus* son los agentes causales de brotes documentados asociados con el consumo de estos alimentos (Robertson y col., 2002.) La contaminación es, en algunos casos, evitable, sin embargo el empleo de aguas negras para riego aumenta la posibilidad de contaminación de las semillas y de los germinados. El consumo de algunos germinados como soya, trigo lenteja y frijol representa un menor riesgo para la salud de los consumidores, que el de alfalfa, mostaza y rábano, ya que los primeros se consumen cocidos en la mayoría de los casos, en tanto que los segundos no reciben ningún tratamiento térmico que permita la eliminación de microorganismos patógenos (NACMCF, 1999).

Por lo antes mencionado es obligatorio al empleo de sustancias germicidas antes del consumo de los germinados crudos de semillas pequeñas (alfalfa, rábano, etc.) que permitan asegurar su inocuidad. Sin embargo, es sabido que los agentes disponibles en el mercado no tienen la misma efectividad sobre los microorganismos cuando se pretende desinfectar diferentes verduras. En el mercado se pueden adquirir, principalmente, soluciones de hipoclorito de sodio y de plata coloidal en diversas concentraciones y presentaciones.

En virtud de la ausencia de estudios relacionados, en México, se determinó la calidad microbiológica de germinados de alfalfa consumidos en fresco, tal como llegan al consumidor final, adquiridos en restaurantes y centros de abasto de la Ciudad de México; así como la efectividad de tres agentes antimicrobianos comerciales en la eliminación de microorganismos, principalmente de *Salmonella spp.* En el estudio se determinó la presencia de *Salmonella spp.* Así como altos niveles de microorganismos indicadores en todas las muestras de germinado de alfalfa analizadas, sin importar la procedencia de estas, así como una absoluta ineficacia de los productos comerciales probados para su eliminación. Puede concluirse que el consumo de germinado de alfalfa, en fresco, es riesgoso para la población por lo que se requiere control de las condiciones de cultivo para evitar la contaminación de estos productos con microorganismos patógenos.

2.0 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha detectado la presencia de microorganismos como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* y *Staphylococcus aureus* en semillas germinadas de alfalfa, de las cuales varias cepas de *Salmonella sp* y *Bacillus cereus* son los agentes causales de brotes documentados y asociados con el consumo de estos alimentos sin cocción previa (Robertson y col., 2002). Se realizaron ensayos microbiológicos para mesófilos aerobios, coliformes, *Escherichia coli*, dada la importancia que ha cobrado en alimentos en los últimos años y *Salmonella spp.* por su probada capacidad infectiva y presencia en estudios anteriores. Es necesario resaltar que el incremento de los grupos naturistas ha causado un incremento en el consumo de estos productos.

3.0 HIPÓTESIS

De acuerdo con la información recopilada, se espera encontrar mayor contaminación bacteriana, y eventualmente patógenos como *Salmonella spp.*, en los germinados expendidos en mercados populares, no así en los adquiridos en restaurantes donde, se presupone, han sido sometidos a tratamientos germicidas.

4.0 OBJETIVOS

4.1 General

- Evaluar la calidad microbiológica de los germinados de alfalfa de restaurantes y centros de abasto antes y después del uso de desinfectantes y la eficiencia de tres desinfectantes en la eliminación de algunos microorganismos patógenos.

4.2 Particulares

- Conocer la calidad microbiológica de germinados de alfalfa en dos cadenas de restaurantes y seis centros de abasto en la Ciudad de México.
- Cuantificar microorganismos coliformes totales y *Escherichia coli* usando Petrifilm^{MR}
- Evaluar la eficiencia de tres productos comerciales en la desinfección de germinados.

5.0 ANTECEDENTES

5.1 Problemática

Los germinados de alfalfa se han reconocido como un vehículo importante en la transmisión de enfermedades gastrointestinales en los últimos años, principalmente por la contaminación de *Salmonella* (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for foods (NACMCF, por sus siglas en inglés, 1999). Los estudios epidemiológicos indican que las semillas son el medio más frecuente de contaminación (Mahon y col., 1997; Van Beeden y col., 1999), de donde fue aislado el patógeno.

En los Estados Unidos de Norteamérica, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), estableció una serie de medidas aplicables a la producción de germinados de alfalfa, entre los que se encuentran el uso de Buenas Prácticas Agrícolas (GAP, por sus siglas en inglés). La publicación de la FDA: “Guía para Minimizar los Riesgos Microbianos en Alimentos Seguros. Frutas Frescas y Hortalizas” establece normas para el acondicionamiento, almacenaje y transportación de las semillas, los cuales deben ser de una manera que reduzca al mínimo la probabilidad de que las semillas sean contaminadas con patógenos. La producción del Germinado de Alfalfa debe llevarse a cabo en lugares que protejan contra la contaminación. Se exige un tratamiento para la desinfección de la semilla. El tratamiento de rutina aprobado para este fin

implica el uso de 20.000 p.p.m. de hipoclorito de calcio en agua, con lo cual, asegura esta publicación, es probable reducir el nivel de la contaminación si esta llegara a presentarse.

Adicionalmente la FDA exige análisis microbiológicos, tanto de los germinados obtenidos, como de las aguas de irrigación empleadas durante la germinación de las semillas. Los análisis deben ser llevados a cabo por personal calificado en un laboratorio independiente que esté separado de las áreas de la producción de alimentos. El agua debe someterse a pruebas microbiológicas para *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria sp.* Los resultados de las prueba deben conocerse antes del envío de cada lote.

En nuestro país la Secretaría de Salud no ha emitido recomendaciones específicas para el manejo, antes, durante y después, de la cosecha de semillas germinadas, siendo la única referencia disponible la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

No existen estudios específicamente relacionados con el consumo de germinados de alfalfa que nos permitan conocer la incidencia de gastroenteritis infecciosa por el consumo de estos en nuestro país o en la Ciudad de México.

Para evitar que las semillas germinadas representen un riesgo para la salud pública el Comité Asesor Nacional de Criterios Microbiológicos en Alimentos (NACMCF, 1999), de E.E.U.U.A. en el documento “Recomendaciones y evaluaciones microbiológicas de seguridad para semillas germinadas”, informa que las semillas germinadas se han identificado como un problema especial debido a la posibilidad de desarrollo de patógenos durante la germinación. Si existen patógenos en las semillas, el proceso y condiciones ambientales que las semillas requieren durante la germinación son también favorables para la multiplicación de éstos. Concluye que no se han encontrado, hasta el momento, tratamientos que permitan eliminar a la totalidad de los patógenos en condiciones experimentales (incluyendo las 20, 000 p.p.m. de hipoclorito de calcio que la FDA sugiere), sin afectar la capacidad de germinación de las semillas. Por otra parte se ha demostrado que la adición de diferentes agentes antimicrobianos a las aguas de irrigación, empleadas durante el proceso de germinación, no reduce el número en las poblaciones microbianas nativas de las semillas, sin embargo, en la aplicación de muchas de las sustancias estudiadas con este propósito se observaron fuertes efectos de fitotoxicidad (Fett, W.F., 2002).

5.2 Origen de la alfalfa

La alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Caúcaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán.

Los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a. C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa (*Burck et al 1959*).

5.3 Botánica

La alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*. Se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto.

-Raíz. La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 m. de longitud), con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos.

-Tallos. Son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega.

-Hojas. Son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados.

-Flores. La flor característica de esta familia es la de la subfamilia *Papilionoidea*. Son de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas.

-Fruto. Es una legumbre indehisciente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm. de longitud.

5.4 Proceso de germinación

La germinación es una secuencia de eventos que dan como resultado la transformación de un embrión en estado quiescente en una plántula. Este proceso puede dividirse arbitrariamente en varios eventos:

- (1) Embibición
- (2) Activación
- (3) División y elongación celular.
- (4) Ruptura de la cubierta seminal por el embrión.
- (5) Establecimiento de la plántula como ente autónomo.

5.4.1 Requisitos para que ocurra la germinación

Asumiendo que no existen mecanismos de latencia que impidan germinación, se requiere de la concurrencia de varios factores para que el embrión contenido en la semilla reinicie su desarrollo.

Absorción de agua

Embibición: Es un caso especial del fenómeno físico de difusión, y como tal, se da si existe un gradiente. Se caracteriza por un aumento de volumen de la sustancia o cuerpo que embibe y está íntimamente relacionado con las propiedades de materiales coloidales. La tasa de embibición se ve afectada por varios factores que pueden determinar la respuesta a germinación de las semillas.

1. Permeabilidad de la cubierta seminal

El caso más evidente es el de semillas cuyas cubiertas son totalmente impermeables al agua, v. gr. semillas duras de leguminosas, de algodón, etc. Sin embargo, también se dan ejemplos en que la penetración de agua es restringida y no impedida.

2. Concentración del agua

En general, la embibición es más rápida cuando la semilla está en contacto con agua pura que cuando el agua contiene solutos. El principio que opera es el de presión de difusión del agua. De aquí que las semillas absorben agua más lentamente en suelos secos o salinos, no solo porque hay menos agua, sino que también es causa de una menor presión de difusión del agua.

3. Temperatura

El calor es una forma de energía. Cuando se calienta el agua que está en contacto con la semilla, parte de la energía suministrada se invierte en

aumentar la difusión de agua, por lo tanto, aumenta la tasa de absorción de agua, dentro de ciertos límites. Se ha encontrado experimentalmente que un aumento de aproximadamente 10°C en la temperatura duplica la tasa de absorción al inicio del proceso de embibición.

4. Presión hidrostática

Conforme el agua penetra en las semillas, ésta provoca un aumento de volumen y presión en las membranas celulares. Igualmente, las membranas celulares oponen resistencia de igual magnitud, la que resulta en un aumento de la presión de difusión del agua interna, aumentando su difusión hacia afuera y por lo tanto disminuyendo la tasa de absorción de la semilla.

5. Área de la semilla en contacto con agua

Considerando otros factores constantes, la tasa de absorción de agua es proporcional a la magnitud del área de las semillas en contacto con el agua. En algunas clases de semilla ciertas regiones son más permeables que otras. V. gr. el hilo en las semillas de leguminosas.

6. Fuerzas intermoleculares

Son en general fuerzas de naturaleza electrostática. Cualquier aumento en estas fuerzas disminuye la presión de difusión del agua y por tanto la tasa de absorción de las semillas. El efecto de estas fuerzas es más

evidente en el suelo. Suelos de bajo contenido de agua sujetan tenazmente la humedad mediante fuerzas intermoleculares.

7. Diferencias entre especies

Algunas especies absorben agua más rápidamente que otras. V. gr. semilla de algodón absorbe agua más lentamente que la semilla de frijol.

8. Absorción diferencial por órganos de la semilla

Las semillas están compuestas de diversos órganos. Estos se pueden agrupar, arbitrariamente en las siguientes categorías:

- a) Cubierta seminal (testa, pericarpio, etc.)
- b) Tejidos nutritivos de reserva (cotiledones, endosperma, perisperma, etc.)
- c) Eje embrionario (compuesto de radícula, plúmula y estructuras asociadas).

Estos componentes absorben agua a diferentes velocidades y magnitudes. Se ha hallado que en semillas de algodón, maíz y frijol la máxima hidratación ocurre en las primeras 24 horas de embibición, y que: (a) la cubierta seminal funciona como órgano de transporte de agua, con su curva característica de absorción; (b) el endospermo y los cotiledones absorben agua lentamente; actúan como reservorios de agua y no como estructuras activas de absorción; (c) el eje embrionario absorbe agua rápida y continuamente.

Contenido de humedad mínimo para que ocurra germinación.

Cada especie necesita absorber un cierto mínimo de humedad (tabla1), para que ocurra germinación. Se ha encontrado que las semillas con alto contenido de proteína necesitan un contenido de humedad mayor que semillas con niveles bajos de proteína; esto se puede observar en los siguientes ejemplos (tabla 1).

Tabla 1. Contenido de humedad necesario para que ocurra la germinación de algunas semillas de especies cultivadas.

Cultivo	Contenido de humedad (%)
Maíz (<i>Zea mays</i>)	30.5
Soya (<i>Glycine max</i>)	50
Remolacha (<i>Beta ssp.</i>)	31
Algodón (<i>Gossypium spp.</i>)	50-55
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	32-35
Avena (<i>Avena sativa</i>)	32-36
Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	50-55
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	50

Adaptado de Burck et al. 1959.

Efecto de la temperatura

El proceso de germinación, como todos los procesos fisiológicos es afectado por la temperatura. Para cada clase de semillas existe una temperatura mínima y una máxima en la que ocurre la germinación (ver tabla 2),. Además, dentro del intervalo temperatura mínima-máxima, existe un punto en el que se obtiene máxima germinación y ésta ocurre más rápidamente; este punto corresponde a la temperatura óptima. Estas temperaturas se conocen como las temperaturas cardinales de germinación.

Intervalo de temperaturas de germinación

1. Temperatura mínima. Por debajo de esta temperatura los procesos de germinación no se pueden detectar visualmente, dentro de un período razonable de tiempo. Bajas temperaturas pero por encima del punto de congelación no son letales a las semillas.
2. Temperatura máxima. Es la temperatura por encima de la cual los mecanismos de germinación no operan y por lo tanto no se da crecimiento del embrión. En contraste con la temperatura mínima, la máxima es fácil de determinar ya que temperaturas superiores a la máxima causan daños irreversibles a las semillas (excepción a esta regla son las semillas que entran en latencia a altas temperaturas).
3. Temperatura óptima. Esta se puede definir como la temperatura a la cual se da el porcentaje máximo de germinación en un mínimo de tiempo.

Tabla 2 Temperaturas cardinales de algunas semillas (°C)

CULTIVO	TEMPERATURA MÍNIMA	TEMPERATURA ÓPTIMA	TEMPERATURA MÁXIMA
Arroz	10-12	30-37	40-42
Maíz	8-10	32-35	40-44
Trigo	3-5	15-31	38-43
Tomate	20	20-35	35-40
Soya	8	32	40
Alfalfa	8-10	28-35	40-42

5.5 Propiedades Nutrimientales

Las semillas germinadas poseen un gran atractivo por sus características organolépticas, además de que poseen vitaminas, minerales y proteínas

fácilmente asimilables. La digestibilidad de las proteínas de los germinados es mayor que la de las semillas en algunos casos, particularmente en el caso de la alfalfa, el valor biológico de la proteína sufre un incremento como efecto de la germinación. La composición media de nutrimentos presentes en la semilla de alfalfa germinada se puede apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición nutrimental de alfalfa (*Medicago sativa*) de acuerdo con el INNSZ.

COMPONENTE	CANTIDAD EN 100 GRAMOS
Energía (KJ)	125
(Kcal)	30
Humedad (%)	86.50
Cenizas (%)	1.4
Extracto etéreo (g)	0.48
Proteína bruta (g)	3.66
Carbohidratos (g)	4.84
Ca (mg)	12
P (mg)	15
Fe (mg)	5.3
Carotenos (b) (mg)	0.74
Tiamina (mg)	0.13
Riboflavina (mg)	0.14
Niacina (mg)	0.46
Ácido ascórbico (mg)	130

5.6 DESINFECTANTES

Si bien existe una gran variedad de compuestos y productos con propiedades desinfectantes, sólo algunos tienen una distribución masiva en los centros comerciales del país, con fines domésticos, de los cuales

sólo unos cuantos pueden emplearse para la desinfección de agua y verduras. Los más populares tienen como principio activo cloro y plata en estado coloidal. Recientemente han surgido en el mercado productos formulados a partir de aceites de cítricos, como consecuencia de la aversión de grupos de consumidores (cada vez más numerosos), al empleo de productos químicos sintéticos.

5.6.1 Plata coloidal

Las preparaciones de plata ionizada soluble en agua son generalmente corrosivas, astringentes e irritantes, la mejor forma de minimizar tales propiedades ha sido el uso de sales coloidales, tales como el cloruro, yoduro y óxidos complejados con proteínas y recientemente con variedades de purinas, pirimidinas y otras especies complejantes. Los preparados coloidales de la plata metálica se obtienen por reducción química o por electro reducción de las sales de plata y se estabilizan por la adición de un derivado proteínico (Russell, 1982). La actividad antimicrobiana parece deberse a la liberación gradual de los iones de plata, los cuales actúan sobre la pared celular, enzimas y ácidos nucleicos, por lo cual las aplicaciones son similares a las sales solubles, pero menos dañinas para los tejidos (Block 1977).

La plata es un metal blanco lustroso y blando, insoluble en agua y en los álcalis. La plata se ioniza fácilmente por electrólisis, y esta propiedad constituye la base de algunos sistemas que la emplean en la desinfección de agua. La eficiencia en la desinfección puede aumentarse o disminuirse

variando el flujo de corriente, las concentraciones empleadas en el tratamiento de agua se encuentran comprendidas entre 0.025 y 0.075ppm. (Zinsser, 1990). La acción antiséptica de los coloides no es proporcional al contenido total de plata, pero es función de la concentración de los iones plata que liberan (Jiménez, 1994).

Mecanismos de acción

Los iones plata, de manera análoga con muchos metales pesados, pueden formar complejos con grupos funcionales que contengan azufre, oxígeno o nitrógeno. En los sistemas biológicos éstos están presentes como tioles, carboxilatos, fosfatos, hidroxilos, aminas, imidazoles, indoles, singularmente o en una gran variedad de combinaciones. Un polipéptido puede contener todos los grupos funcionales citados en una sola molécula.

Muchas enzimas bajo condiciones *in vitro* son inhibidas por la plata, y en varios estudios la inhibición es más eficiente que con compuestos organomercuriales. La gran eficacia observada por la plata comparada con la del mercurio algunas veces es atribuida a la gran habilidad para unirse a los grupos sulfhidrilo de las proteínas de las bacterias (Jiménez, 1994).

Las formas solubles de la plata, inhiben la actividad enzimática al formar mercaptanos con los grupos sulfhidrilos. La reacción inicial es reversible pero después de un contacto prolongado o en concentración elevada, se

forma una combinación irreversible que mata a los microorganismos. La plata coloidal actúa también sobre la superficie celular bacteriana y causa la muerte de la bacteria por alteraciones en la pared celular y la membrana citoplasmática, desintegrando el ADN de la misma. Algunos autores consideran que estos compuestos son más eficaces como agentes bacteriostáticos que como bactericidas aunque en realidad, cuando las soluciones de sales de plata coloidal estable se aplican, ejercen un inmediato efecto bactericida y germicida. Luego pequeñas cantidades de plata iónica derivan en una acción bacteriostática. Esta acción de la plata coloidal es común a muchos metales pesados y se llama oligodinámica. El efecto antiséptico de las sales de plata disminuye por la reacción con proteínas y por los cloruros presentes en el medio circundante (Zinsser, 1990).

Toxicidad

Los intervalos de toxicidad oral aguda van de 2 a 30 mg /kg del ión Ag^+ ; la toxicidad subaguda es aparentemente rara. La absorción también puede ser por el tracto respiratorio, pero es primero por vía oral. Los síntomas de toxicidad por ingestión incluyen: gastroenteritis y reacciones graves tales como: coma, convulsiones, parálisis y disturbios severos en la respiración. El tratamiento es con sal común, jabón, y estimulantes para mantener la circulación. (Gosselin, 1985).

5.6.2 Compuestos de cloro

Los compuestos de cloro son los más extensamente usados para la desinfección de agua para beber, frutos y verduras. El cloro y muchos de sus compuestos son agentes fuertemente oxidantes y su reactividad puede ser fácilmente dispersada en reacciones con materiales orgánicos e inorgánicos en el agua antes que pueda ocurrir una eficiente desinfección. El cloro es menos reactivo conforme se incrementa el pH y aumenta con la elevación de la temperatura y es paralela a la cantidad de ácido hipocloroso no disociado.

La acción germicida de los compuestos de cloro parece estar relacionada con la formación de ácido hipocloroso. La disociación del ácido hipocloroso depende del valor de pH y el equilibrio entre HOCl y OCl⁻ se mantiene aún cuando el ácido hipocloroso es consumido constantemente a través de su función germicida. EL hecho de que soluciones alcalinas de compuestos de cloro con muy pequeñas cantidades de HOCl y grandes cantidades de OCl⁻ presenten capacidad germicida, sugiere que el ión OCl⁻ puede ser un factor que contribuye a la desinfección ya que posee cloro activo.

Se ha sugerido que el efecto bactericida se lleva a cabo en dos fases sucesivas: 1) La penetración de un ingrediente activo germicida a la célula y 2) La reacción química de este ingrediente con el citoplasma de la célula para formar complejos tóxicos (compuestos N-cloro), lo cual destruye al organismo.

Existe una gran variedad de sustancias químicas que pueden afectar los componentes celulares (figura 1) causando la muerte de los microorganismos, o bien evitando su reproducción dependiendo de las estructuras que ataque cada sustancia. En alimentos solo algunas de estas sustancias están permitidas.

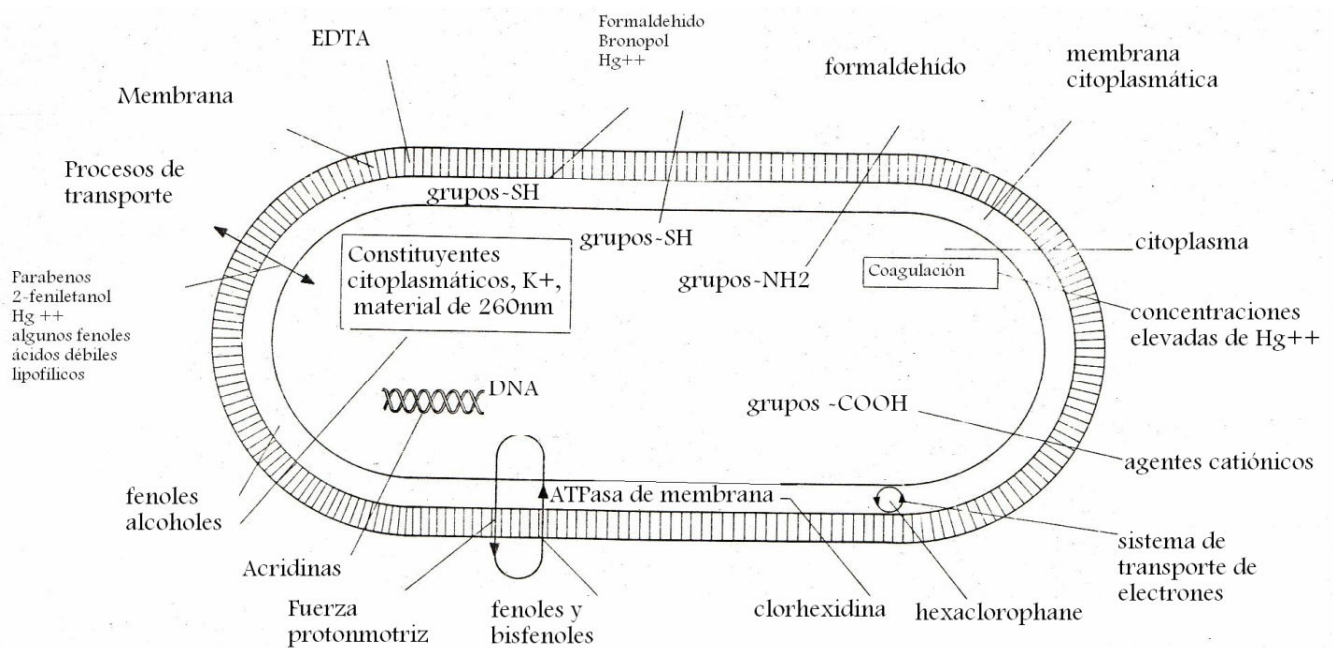


Figura 1. Daños que generan diferentes agentes químicos en los microorganismos procariotas (Denyer & Hugo. 1991)

5.6.3 Desinfectantes a base de aceites vegetales

La acción bactericida y bacteriostática que poseen algunos aceites vegetales, como en el caso del aceite de pino y cítricos, puede ser una opción para la desinfección de superficies, sin embargo, ofrecen el reto de lograr una emulsión estable durante la formulación y aplicación del

producto. Si bien el mecanismo de acción no es claro, se cree que los aceites atraviesan fácilmente las membranas, llegando al citoplasma celular donde actúan sobre las enzimas y proteínas, causando el efecto tóxico que puede desencadenar la muerte del microorganismo o únicamente su inactivación. En el mercado mexicano van cobrando popularidad las formulaciones a partir de aceites y extractos vegetales, principalmente entre los grupos naturistas, vegetarianos y orgánicos.

5.7 Presencia de microorganismos en productos vegetales

Los vegetales se mantienen libres de microorganismos en su interior, en tanto no exista pérdida en la continuidad de los tejidos exteriores, sin embargo, en la superficie pueden adherirse cantidades elevadas de microorganismos, los cuales pueden depositarse por diferentes mecanismos. Las partes externas de la planta se encuentran en mayor contacto microbiológicamente hablando que el interior de la misma (Muller, 1991).

El suelo es una mezcla compleja de materia sólida inorgánica (rocas y minerales), materia orgánica, agua, aire y organismos vivos; es uno de los principales reservorios de vida microbiana, aunque tengan baja tasa de reproducibilidad y se encuentren en vida latente (Tortora, 1995). El contacto directo de los vegetales y sus semillas con el suelo representa una importante fuente de contaminación bacteriana, aunque un contacto

indirecto con éste, por medio de polvos y lluvia, también favorece la adquisición de una microbiota banal.

La alfalfa crece exclusivamente en contacto inmediato con el suelo. La recolección de las semillas se lleva a cabo una vez que éstas han madurado, si la recolección no se lleva a cabo de manera cuidadosa puede ocurrir una fuerte contaminación. Durante la recolección se pueden adherir microorganismos autótrofos, heterótrofos, mesófilos, termófilos, psicrotrofos, aerobios y anaerobios, degradadores de celulosa y oxidantes del azufre, fijadores de nitrógeno y degradadores de proteínas; entre los géneros que destacan se citan *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter* (Pelczar, 1990).

Si bien no todos los microorganismos patógenos son capaces de sobrevivir en el suelo es común encontrar bacterias formadoras de esporas, como en el caso de varias especies de *Clostridium* y *Bacillus*. Estos microorganismos se adhieren a frutas y hortalizas, desarrollándose en ellas cuando existen condiciones adecuadas (Tortora, 1995).

Los géneros de bacterias que suelen formar parte de la flora “normal” del agua son: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter* y *Escherichia* (Banwart, 1990).

Los microorganismos patógenos transmitidos con mayor frecuencia por el agua, producen infecciones del aparato digestivo, tales como, fiebre tifoidea, paratifoidea, disentería y cólera. Los agentes etiológicos de éstas se encuentran en las materias fecales y en la orina de los infectados y cuando son eliminadas pueden llegar a un depósito de desemboque en una fuente de agua (Pelczar, 1990).

Si el agua de riego se encuentra contaminada o proviene en parte o en su totalidad de una red colectora de aguas residuales los productos recolectados pueden ser peligrosos para la salud (Jiménez, 1994). Además, aguas residuales sin ningún tratamiento previo, constituyen un gran peligro, ya que pueden servir de vehículo a microorganismos patógenos tales como: *Salmonella*, *Vibrio*, estreptococos, y enterobacterias (Muller, 1991).

5.8 Bacterias patógenas para el hombre

Patogenicidad es la capacidad de los microorganismos para producir enfermedades o provocar lesiones progresivas. Existen dos mecanismos básicos mediante los cuales las bacterias causan enfermedad:

1.- Infecciones

a) con invasión de tejidos

b) sin invasión de tejidos

2.- Intoxicaciones, por la producción de toxinas: exotoxinas o endotoxinas.

Las bacterias que causan las enfermedades naturales son patógenas y relativamente transmisibles. Esta última propiedad indica la facilidad con la que la infección se transmite de una persona a otra ya directamente o bien por medio de un agente intermediario. La transmisión indirecta puede realizarse, entre otras formas, a través de los alimentos contaminados, leche o agua, o por medio de aguas negras o el arrastre por los vientos de los microorganismos en forma de partículas de polvo.

Existe otro tipo de microorganismos denominados “oportunistas”, éstos normalmente son saprófitos pero pueden causar efectos nocivos severos cuando tienen acceso a organismos con defensas bajas.

5.9 Enfermedades gastrointestinales causadas por la ingestión de bacterias patógenas

En la República Mexicana la fiebre tifoidea es la más representativa de las infecciones entéricas, como indicador de una deficiencia en la higiene ambiental, especialmente en lo referente al saneamiento básico del agua potable. Según información proporcionada por el Instituto Mexicano del Seguro Social sobre los casos reportados de enfermedades gastrointestinales, entre los padecimientos más frecuentes en 2000 y 2002 se encuentra: enteritis, fiebre tifoidea, salmonelosis, entre otras enfermedades diarreicas, con cantidades más elevadas en algunas delegaciones del Valle de México, Chiapas y Puebla. La gastroenteritis o diarrea infecciosa aguda es un síndrome cuya etiología puede ser

bacteriana, viral o parasitaria. Los organismos invasores fundamentalmente son *Shigella sp.* y *Salmonella sp.*, existe además un gran predominio de bacterias productoras de enterotoxinas especialmente *Escherichia coli*.

5.10 Gastroenteritis de origen alimentario producidas por Salmonella

Entre los bacilos gramnegativos que producen gastroenteritis de origen alimentario, los más importantes son los representantes del género *Salmonella*. En 1880, Eberth publicó el hallazgo de encontrar un bacilo Gram (-) en tejidos de personas muertas por fiebre tifoidea. Los miembros del género *Salmonella* penetran casi siempre por vía digestiva mediante la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas, multiplicándose activamente en el tejido linfoide del intestino delgado, de donde pueden pasar a vasos linfáticos y al torrente sanguíneo para localizarse en cualquier órgano. Las manifestaciones clínicas varían desde una enteritis leve hasta los de una septicemia rápidamente mortal. El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, comprende varias especies y centenares de serotipos diferentes, todos los cuales pueden ser patógenos (Guerrero, 2002).

Patología

Casi todos los miembros del género *Salmonella* son potencialmente patógenos para el hombre, además de infectar a múltiples mamíferos, aves reptiles, y otros animales, debido a que son parásitos obligados. Las especies *S. Typhi*, *S. Enteritidis* serotipo Paratyphi A, se encuentra solo en

el hombre, *S. Paratyphi B, C* y *S. Sendai*, tienen como reservorio primario al hombre, el resto de las salmonellas tienen como reservorio primario a los animales constituyendo un riesgo de infección al hombre. Estas bacterias se asocian comúnmente con trastornos gastrointestinales y fiebres entéricas presentes en todo el mundo. La fiebre entérica más conocida a nivel histórico e internacional es la fiebre tifoidea. La salmonelosis puede presentarse en cualquiera de sus tres diferentes entidades clínicas: gastroenteritis, septicemia con lesiones focales y fiebres entéricas (Olvera, 1991).

- Gastroenteritis: se presenta aproximadamente 18 horas después de ingerir al microorganismo. Se caracteriza por vómitos agudos, fiebre, diarrea y dolor abdominal. Se adquiere por lo general en la ingestión de alimentos contaminados y se le conoce como intoxicación alimentaria por *Salmonella*. Se necesitan aproximadamente 10^6 bacterias para causar la enfermedad, dependiendo de la virulencia de la cepa, la susceptibilidad del huésped y la protección que el vehículo proporciona a la acidez gástrica (Lennette, 1982 y Murray 1996).
- Septicemia: Es una complicación derivada de la gastroenteritis. La septicemia causada por *Salmonella* es prolongada y se caracteriza por fiebres, escalofríos, anorexia y anemia. Pueden desarrollarse lesiones locales en cualquier tejido produciendo osteomielitis, neumonía, abscesos pulmonares, meningitis o endocarditis (Lennette, 1982 y Murray 1996).

- Fiebres entéricas: Son enfermedades severas, distribuidas principalmente en países del tercer mundo. Para diagnosticar acertadamente las fiebres entéricas, es necesario el aislamiento e identificación del agente etiológico. Fiebre tifoidea: Es producida por *Salmonella Typhi*; esta bacteria es un parásito humano obligado y se considera que no puede multiplicarse en la naturaleza fuera de su huésped. Es excretado por enfermos o portadores en heces y en ocasiones orina; penetra en un huésped susceptible y a través de alimentos, aguas, objetos contaminados o en forma directa (fecal – oral). Se requieren niveles elevados de la bacteria para causar la enfermedad (10^5) en un 25 % de las personas expuestas al agente, y se requiere de un nivel de 10^9 microorganismos para aumentar la tasa de infección al 95 %. Sin embargo, cabe señalar que son excretadas hasta 10^{10} bacterias por gramo de heces en pacientes con la fiebre y en portadores los niveles fluctúan de 10^4 a 10^{11} bacterias por gramo de heces. La fiebre tifoidea comienza con la colonización del tracto intestinal. Penetrando el epitelio y multiplicándose en los ganglios mesentéricos. Algunas bacterias son transportadas a través de la linfa torácica hacia el torrente sanguíneo y de ahí se diseminan a diversos tejidos, incluyendo zonas del tejido reticuloendotelial donde son fagocitados pero no destruidos por los monocitos. Es en estos tejidos se multiplican y permanecen en espera. En esta etapa los síntomas son fiebre, letargo, malestar y dolores generalizados. Posteriormente las bacterias regresan al torrente sanguíneo en mayor número,

provocando una bacteremia prolongada sumamente severa, caracterizada por la elevación de la temperatura corporal a 39 °C. Para el tratamiento de enfermos de fiebre tifoidea se utilizan ampicilina, cloranfenicol, amoxicilina (análogo a ampicilina) y trimetoprim-sulfametoxazol. En el caso de portadores crónicos se utiliza solo ampicilina cuando no existe enfermedad vesicular; si esta existe, es necesario extirpar la vesícula y aplicar ampicilina (Lennette, 1982 y Murray, 1996).

- Fiebre paratifoidea: Es una enfermedad muy similar a la fiebre tifoidea pero de gravedad menor. Se caracteriza por un comienzo súbito con escalofríos, fiebre, diarrea, náuseas y vómito, se presenta cefalea y rigidez del cuello. Es producida por las salmonelas paratíficas: *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A, B, C. El único método que existe para la diferenciación de esta enfermedad con la fiebre tifoidea es el aislamiento del agente causal (Lennette, 1982 y Murray 1996).

5.11 Serovariedades del género Salmonella de importancia médica.

- *Salmonella* Typhi
- *Salmonella* Cholerae-suis
- *Salmonella* Enteritidis

Características morfológicas

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos cortos y gruesos, de 0.5 a 0.8 micrómetros de grosor y de 1 a 3.5 micrómetros de longitud. Son activamente móviles, debido a la presencia de flagelos peritricos o

inmóviles, bacilos Gram negativos, no esporulados, no capsulados, aero-anaerobios facultativos. Como todas las bacterias, las *Salmonellas* están constituidas por una serie de sustancias químicas diversas, que forman la estructura celular de la bacteria. Además, algunas de estas sustancias tienen la propiedad de ser antigénicas. Estos antígenos se utilizan para preparar sueros que contienen anticuerpos específicos, lo que permite hacer el diagnóstico serológico. Una *Salmonella* está compuesta de tres grupos de antígenos: Somático (“O”), de Superficie (“K”) capsular y Flagelar (“H”) .

- Antígenos somáticos: Se encuentran localizados en el soma o cuerpo de la bacteria. Son carbohidratos resistentes al calentamiento a 100 °C y a la acción del alcohol y de los ácidos diluidos (Guerrero, 2002).
- Antígenos de superficie: Comprenden los antígenos que se encuentran en la cápsula. Los antígenos capsulares tienen un papel poco importante en la clasificación serológica dentro de las *Salmonellas*, pero un papel importante en la patogenicidad del microorganismo que lo posee. Se presenta solo en las especies *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Parathypi y en algunas de *S. Enteritidis*, y se le denomina como antígeno Vi o de virulencia. Los antígenos de superficie junto con las diferentes toxinas y su capacidad de invasividad, constituyen los elementos básicos de patogenicidad (Olvera, 1991).
- Antígenos flagelares: Se encuentran compuestos por proteínas y son los constituyentes químicos de los flagelos, pueden presentarse en dos

formas: Antígeno de fase 1 y de fase 2. Los antígenos de fase 1 llamados también específicos, son compartidos por solo unos cuantos microorganismos y reaccionan con sueros homólogos, en cambio los de fase 2 son comunes en muchos microorganismos y pueden presentar reacciones cruzadas con antisueros heterólogos (Olvera, 1991). Los lipopolisacáridos de la pared celular (antígeno “O”), se comportan como endotoxinas típicas y se liberan al destruirse la bacteria. Mediante la hidrólisis con ácidos débiles se obtiene una fracción lipoidea, llamada lípido “A” a la que se le ha atribuido la acción tóxica (Guerrero, 2002).

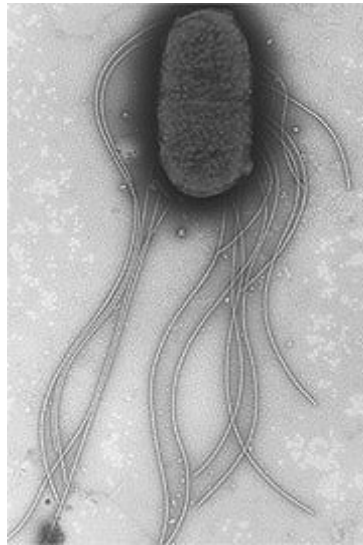


Figura 2. Salmonella sp. (Gillmor, 2007)

Características fisiológicas y bioquímicas

Salmonella crecen muy bien a 37 °C en los medios de cultivo SS, agar bilis verde brillante. Tienen la propiedad de desarrollarse en presencia de sustancias como el verde brillante, el tetracionato y el desoxicolato de

sodio que son capaces de inhibir a las bacterias coliformes. Son destruidas a temperaturas de 60°C por 20 minutos.

Su requerimiento nutricional no es complejo, pueden utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa, piruvato o lactato como fuente de carbono. Son quimiorganótrofos, poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Con producción de ácido sulfhídrico y gas durante la fermentación de la glucosa o de otros hidratos de carbono, pero no fermentan la lactosa. Son catalasa positivos, oxidasa negativos. Tampoco licuan la gelatina, ni hidrolizan la urea , ni peptonizan la leche (Bourgeois, 1994).

Las Salmonellas se multiplican bien en medios ordinarios, tales como agar Salmonella – Shigella (SS), agar verde brillante (VB), agar sulfito bismuto (SB), por mencionar algunos. Las colonias son visibles al cabo de 18 a 24 horas, con 2 a 3 mm de diámetro, salvo por algunos serotipos que producen siempre colonias pequeñas (*abortusovis*, *abortusequi*, *typhisuis*) (Bourgeois, 1994).

Factores ambientales para el desarrollo de Salmonella

- Temperatura: La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 y 37 °C, sin embargo, las Salmonellas pueden multiplicarse de 25 a 47 °C, aunque a temperaturas inferiores a 10 °C el crecimiento

sufre un retraso considerable. Las Salmonellas, como la mayoría de las bacterias gram negativas, presentan una cierta sensibilidad al calor. La pasteurización a 72 °C /15 segundos asegura su destrucción en la leche. Las temperaturas de refrigeración permiten la supervivencia de las salmonellas, en tanto que la congelación provoca un descenso considerable del número de ellas, aunque no produce nunca su completa desaparición (Bourgeois, 1994).

- pH: Estos microorganismos soportan un rango de pH entre 4.5 y 9 con un óptimo de 6.5 a 7.5 (Bourgeois, 1994).
- Actividad acuosa A_w : Estos microorganismos se desarrollan bien a valores de a_w de 0.945 a 0.999. A valores muy bajos (del orden de 0.2), correspondientes a productos deshidratados, sobreviven largo tiempo. En los alimentos pueden multiplicarse hacia valores de a_w iguales a 0.93 (Bourgeois, 1994).

5.12 Crecimiento y destrucción de Salmonella

Estos microorganismos se diferencian de las demás bacterias gramnegativas por ser capaces de crecer en un gran número de medios de cultivo y producir colonias perfectamente visibles en 24 horas en temperaturas próximas a 37°C. Generalmente son incapaces de fermentar la lactosa, la sacarosa o la salicina, si bien fermentan la glucosa y algunos otros azúcares con producción de gas. A pesar de que normalmente utilizan aminoácidos como fuente de nitrógeno, en el caso de *S. Typhimurium*, los nitritos, los nitratos y el amoníaco serán utilizados

como fuente de nitrógeno. Si bien estos microorganismos no suelen fermentar la lactosa, algunas serovariedades son capaces de utilizar este azúcar.

Con respecto a la destrucción por el calor, todas las salmonelas son destruidas fácilmente a la temperatura de pasteurización de la leche.

Escherichia coli.

Son bacilos Gram negativos con diámetro de 1.1 – 1.5 por 2.0- 6.0 de ancho μm . Son microorganismos móviles con flagelos peritricos, anaerobios facultativos, unicelulares, no esporulados. Crecen fácilmente en medios nutritivos simples, en agar nutritivo las colonias pueden ser lisas, brillantes, húmedas, convexas, incoloras o ligeramente grises y forman emulsión fácilmente con solución salina; o bien pueden ser rugosas, mate, y granulosa y no forman fácilmente emulsión con solución salina. Puede utilizar acetato, pero no citrato como fuente de carbono. Muchas especies son saprófitas, mientras que otras habitan en el intestino como parte de la flora normal bacteriana, por lo cual su presencia en el agua de consumo y alimentos indica contaminación fecal. Puede causar gastroenteritis, cistitis, peritonitis (cuando llega a la vejiga y peritoneo, respectivamente).

El género *Escherichia* consta de al menos cinco especies, siendo *E. coli* la que se aísla con más frecuencia. *E. coli* está presente en gran cantidad en el tracto gastrointestinal y es la que con más frecuencia causa sepsis

bacteriana, meningitis neonatal, infección del tracto urinario y gastroenteritis entre los viajeros que visitan otros países con deficientes condiciones sanitarias. La mayoría de las infecciones (con la excepción de la gastroenteritis) son endógenas; es decir, que se producen por la microbiota normal del individuo en condiciones en las que las defensas del huésped están comprometidas.

La composición antigénica de *E. coli* es compleja, con más de 170 antígenos O, 56 antígenos H y numerosos antígenos K. La clasificación serológica de las cepas de *E. coli*. Resulta útil para su estudio epidemiológico. Se conocen algunos serotipos específicos asociados a una mayor virulencia.

Síndromes clínicos asociados a *Escherichia coli*

Septicemia. *E. coli* es el bacilo gram negativo que se aísla con más frecuencia en el paciente séptico. El foco de infección suele ser gastrointestinal y la mortalidad por septicemia depende de la enfermedad subyacente, inmunocompromiso, o de infecciones que producen perforaciones intestinales.

Gastroenteritis. Las cepas que producen gastroenteritis se han dividido en cuatro grupos: enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteropatogénica y enterohemorrágica.

La gastroenteritis producida por *E. coli* enterotoxigénica es mediada por exotoxinas termolábiles y termoestables. La acción de la toxina termolábil es similar a la de la toxina del *Vibrio cholera*, produciéndose una hipersecreción de fluidos y electrolitos en el intestino delgado al activarse la adenilciclasa. La toxina termoestable activa la guanilciclasa y estimula la secreción de fluidos.

E. coli enteroinvasiva invade y destruye el epitelio del colon produciendo una enfermedad que se caracteriza por fiebre y dolor abdominal, con sangre y leucocitos en las heces.

E. coli enteropatogénica. Agente etiológico de la diarrea en niños, sobre todo en los países pobres. La enfermedad se debe a la adherencia del microorganismo a la membrana plasmática y a la destrucción de los microbili adyacentes.

E. coli enterohemorrágica. Produce una citotoxina denominada veratoxina, que ha recibido este nombre porque posee efecto citopático en las líneas celulares vero. La *E. coli* enterohemorrágica causa colitis hemorrágicas con dolor abdominal grave, diarrea sanguinolenta y febrícula, aunque puede presentarse ausencia de fiebre, la enfermedad es más frecuente en los meses cálidos siendo mayor la incidencia en los niños menores de cinco años.

5.13 Microorganismos indicadores de contaminación de alimentos

Los indicadores microbianos son grupos de microorganismos de enumeración fácil, y cuya presencia en cierto número es indicativo de que los alimentos se encontraron expuestos a condiciones no higiénicas que permitieron la proliferación de microorganismos inocuos y patógenos (Santaella, 2002).

El principio de microorganismo indicador es una necesidad, y no se ha encontrado un organismo conocido específico del hombre que pueda utilizarse para indicar todos los riesgos potenciales a la salud, ya que pueden contener una gran variedad de especies de microorganismos que actúan como contaminantes. El objetivo del examen microbiológico de los alimentos, es determinar si éstos han sido expuestos a una contaminación fecal, la cual puede ser la causa de un serio problema para la salud pública (Santaella, 2002).

Desde siempre, los organismos indicadores han sido empleados para determinar alguna condición microbiológica objetable de la comida, tal y como sucede en la contaminación fecal, la presencia de patógenos potenciales, la proliferación potencial de los microorganismos en los alimentos, y las situaciones sanitarias durante el procesamiento, almacenamiento o transporte de alimentos (Acevedo, 1998).

Los microorganismos indicadores presentan las siguientes características:

- Se encuentran como flora normal en la fuente de contaminación, independientemente de que haya o no microorganismos patógenos.
- Son más resistentes y sobreviven en el agua mas tiempo que los patógenos.
- Su detección en el laboratorio es más rápida, fácil y confiable.

Durante los tratamientos de proceso de los alimentos, el microorganismo indicador debe comportarse de una manera similar a los patógenos, si este fuese más estable, podría persistir mucho más tiempo de destrucción. Muchos grupos de microorganismos han sido sugeridos como organismos indicadores de contaminación fecal incluyendo bacterias, virus y protozoarios en general. Bacterias tales como los coliformes, enterobacterias, enterococos, pseudomonas, clostridios, estafilococos, hongos, levaduras, y la cuenta aeróbica en placa, se han sugerido como organismos indicadores Debido a lo anterior, se hace necesario conocer la fuente usual, la asociación con patógenos entéricos, métodos para la enumeración, condiciones de desarrollo, supervivencia durante el almacenamiento y procesamiento y sobre todo el significado de estos microorganismos en los alimentos, o en un alimento en particular. Entre los microorganismos indicadores de contaminación se agrupan de manera general a las bacterias coliformes, coliformes fecales y a los microorganismos mesófilos aerobios. (Banwart, 1990).

5.13.1 Mesófilos aerobios

Los microorganismos mesófilos presentan un crecimiento óptimo a temperaturas entre los 25 y 40°C. Los organismos que se han adaptado a vivir dentro del cuerpo de los animales incluyendo al hombre comúnmente tienen una temperatura óptima cercana a la de su huésped. La temperatura óptima para muchas bacterias patogénicas es de 37°C. El número de microorganismos mesófilos aerobios (“recuento en placa”) encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad de los alimentos más comúnmente utilizados. Los mesófilos aerobios reflejan la exposición de la muestra a la contaminación en general, la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos y la presencia de materia orgánica. La flora aerobia mesófila resulta útil en muchos elementos por diversos motivos, como por ejemplo, es indicativa de la limpieza, desinfección y el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial (Santaella, 2002; Tortora, 1995).

5.13.2 Coliformes Totales

Se define como microorganismos coliformes a las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas que fermentan la lactosa con formación de gas a las 48 horas de haberlas colocado en caldo con lactosa a 35 °C. Habitan en el tracto intestinal del

hombre y de los animales de sangre caliente, sin causar generalmente enfermedades gastrointestinales. Dentro de estos bacilos, que en cierta forma son similares a *Escherichia coli*, encontramos los siguientes géneros y especies: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. La utilización de microorganismos coliformes como indicadores de calidad sanitaria de alimentos, pueden ser indicadores falsos, en relación a los daños que pudieran ocasionar a la salud del hombre, ya que la correlación de estos coliformes con la contaminación fecal suele no ser adecuada, ya que no son específicos de materia fecal; sin embargo las bacterias de este grupo pueden ser provenientes tanto de materia fecal como no fecal, por lo que estos organismos pueden encontrarse en grandes cantidades en el suelo contaminado con materia fecal. Bajo ciertas condiciones tienden a morir en el suelo pero con nutrimentos adecuados y humedad pueden incrementar su número. El polvo del suelo puede diseminar los coliformes en la atmósfera. La lluvia acarrea la contaminación superficial del suelo a los ríos y lagos. Los miembros del grupo coliforme pueden persistir en agua, suelo o en alimentos por largos periodos de tiempo (Tortora 1995).

Desafortunadamente como algunos miembros no son de origen fecal, la presencia de esos miembros en los alimentos podría no indicar contaminación fecal o patógenos entéricos potenciales. Sin embargo, se puede orientar este predicamento diciendo que los microorganismos coliformes no fecales dan un margen de seguridad extra. Debido a que los

coliformes pueden multiplicarse fuera de los cuerpos de los animales, su presencia en cantidades elevadas en un producto alimenticio podría no ser indicativo de contaminación original, pero sí de una inapropiada manipulación, la cual promovió la multiplicación de los microorganismos (Taylor, 1990).

5.13.3 Coliformes fecales

Los microorganismos coliformes fecales son un grupo de microorganismos que son seleccionados mediante la incubación, de un inóculo derivado de un medio de enriquecimiento de coliformes, a una temperatura más alta de la normal (45.5 °C). La detección de contaminación fecal en alimentos siempre ha sido tema de discusión. Los coliformes capaces de crecer a 44.5 °C han sido considerados como organismos indicadores. De estos, *Escherichia coli* es todavía la especie más asociada a materia fecal, *siendo su presencia en alimentos un indicativo de contaminación fecal*, sin embargo, no hay evidencia que permita saber el origen de la contaminación, ya que puede ser humana, animal o ambiental (Beerens, 1998).

5.13.4 Ventajas y desventajas de los microorganismos coliformes como indicadores

Las ventajas de analizar al grupo coliforme y no al de patógenos específicos son las siguientes:

- 1) Los organismos coliformes se encuentran constantemente, tanto en los intestinos de humanos sanos como en enfermos en gran número, y miles de millones de estos microorganismos, son excretados diariamente por una persona. Se estima que por cada bacilo tifoideo u otro patógeno (por ejemplo *Entamoeba histolytica* o virus de la polio o hepatitis), en suministros de agua contaminada, usualmente hay millones de microorganismos coliformes especialmente *Escherichia coli*.
- 2) Los microorganismos del grupo coliforme sobreviven por más tiempo en un ambiente acuático que la mayoría de los patógenos intestinales, por lo tanto es posible localizar una contaminación reciente o no tan reciente.
- 3) La ausencia de coliformes es una evidencia de la potabilidad del agua y sanidad de los alimentos desde el punto de vista microbiológico.
- 4) El aumento en la cantidad es aproximadamente proporcional al grado de contaminación.
- 5) Los miembros del grupo coliforme no son patógenos excepto algunas cepas.

Las desventajas del grupo coliforme como índice de contaminación son las siguientes:

- 1) Algunos miembros del grupo coliforme se distribuyen ampliamente en el medio ambiente en comparación a su presencia en los intestinos de animales de sangre caliente.
- 2) No es posible determinar con precisión el momento en que principió la contaminación.
- 3) Algunas de las especies pueden multiplicarse en aguas contaminadas.
- 4) A veces la flora bacteriana no coliforme impide el crecimiento de los coliformes (Prueba falsa negativa), o produce gas sin haber microorganismos coliformes (prueba falsa positiva) (Santaella, 2002).

5.14 Placas Petrifilm^{MR}

Existen en el mercado algunas alternativas para facilitar el trabajo en el laboratorio microbiológico, entre ellas podemos encontrar las placas Petrifilm. Las placas Petrifilm para Recuento de E. coli / Coliformes contienen nutrientes, Bilis y Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de la actividad de glucuronidasa, y un indicador que facilita la enumeración colonial. La mayoría de las E. coli (cerca del 97%) producen beta-glucuronidasa la cual produce un precipitado azul asociado con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por los coliformes que fermentan la lactosa. Cerca del 95% de las cepas de E. coli producen gas, indicado por las colonias de color

rojo a azulado asociadas con el gas atrapado sobre la placa Petrifilm EC (con el diámetro aproximado de una colonia).

5.15 Legislación

La Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1997 posee un apéndice informativo (B) en el que se establecen recomendaciones sobre las cuentas microbianas de un determinado tipo de alimentos y platillos listos para servir y consumirse. Entre estas recomendaciones se encuentran las correspondientes a ensaladas verdes crudas, teniéndose los siguientes conteos máximos permisibles para los siguientes microorganismos: mesófilos aerobios: 150,000 UFC/g y coliformes fecales: 100 NMP/g, así como ausencia del patógeno *Salmonella spp.*

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Materiales y Reactivos

- Matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 ml
- Utensilios estériles para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc. Vasos para licuadora con tapa
- Agua peptonada al 1% para diluciones
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm
- Pipetas 10,0 5,0 y 1.0 ml protegidas con tapón de algodón
- Cajas de petri estériles desechables
- Rejillas para tubos de ensaye
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Mecheros Bunsen o Fisher
- Caldo lactosado
- Caldo Selenito-Cistina
- Caldo tetracionato
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar bilis verde brillante (VB)
- Agar entérico de Hektoen (HE)
- Agar sulfito de bismuto (SB)
- Agar para *Salmonella* y *Shigella* (SS)
- Agar hierro triple azúcar (TSI)
- Agar hierro-lisina (LIA)
- Caldo Urea
- Medio sulfuro –indol-manitol (SIM)
- Agar citrato de Simmons
- Caldo manitol
- Caldo malonato
- Caldo Rojo de metilo Vogues – Proskawer (RM-VP)
- Reactivo de Kovac's
- Solución de rojo de metilo
- Solución de reactivo de (RM-VP) No 1
- Solución de reactivo de (RM-VP) No 2
- Solución de yodo-yoduro
- Juego de colorantes para la tinción de Gram

6.2 Aparatos e instrumentos

Incubadora con termostato con precisión de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, con termómetro calibrado; horno. (Felisa); contador de colonias de campo oscuro, placa cuadrículada y lente amplificador; microscopio óptico de campo claro; baño de agua con circulación mecánica (Osyma); autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas (Labconco); licuadora de dos velocidades controladas por un reóstato (Osterizer). Homogeneizador peristáltico (Stomacher). Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C (Corning).

6.3 Diagrama de Trabajo (Determinación de calidad microbiológica en restaurantes y centros de abasto)

Para conocer la calidad microbiológica de los germinados de alfalfa que se expenden para consumo humano se determinó la cuenta de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales, así como la presencia de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* en muestras adquiridas en los restaurantes y centros de abasto listados posteriormente. De manera similar, se trabajó con los desinfectantes comerciales y las diferentes condiciones propuestas.

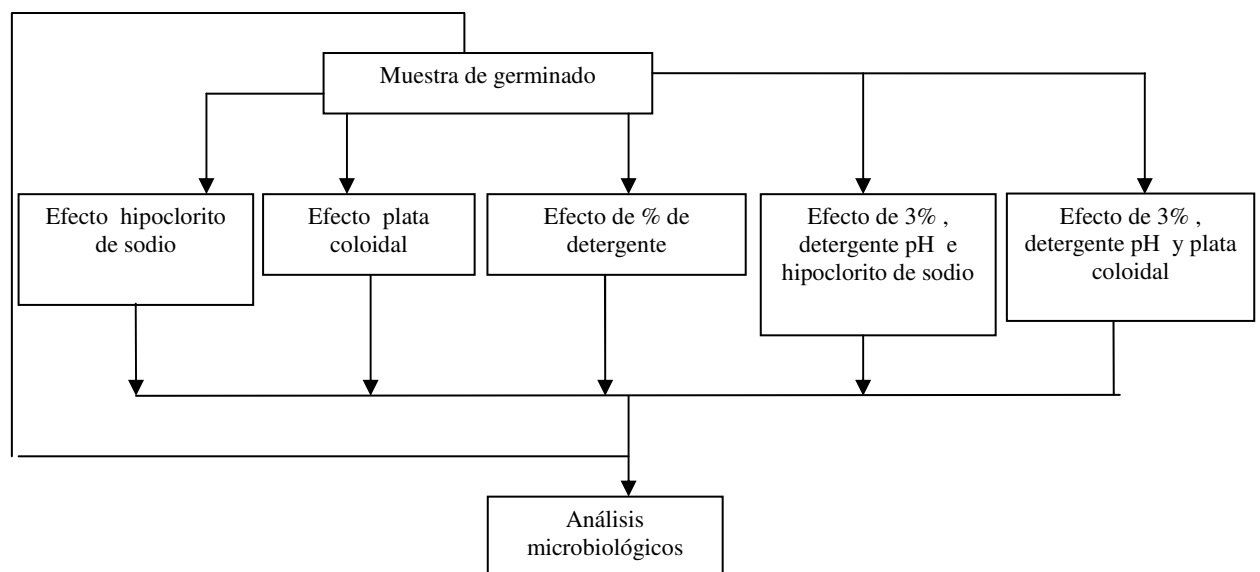


Diagrama 1. Esquema general del trabajo

Las muestras de germinados de alfalfa provenientes de centros de abasto y restaurantes fueron sometidas a análisis microbiológico sin someterse a ningún tratamiento (diagrama 1), en tanto que muestras provenientes de

la central de abasto fueron sometidas a la acción de tres desinfectantes; de un detergente; e hipoclorito de sodio y plata coloidal con detergente, así como hipoclorito de sodio y detergente con pH igual a cuatro.

6.4 Lugares de muestreo

El muestreo fue llevado a cabo en los siguientes puntos de la Ciudad de México entre los meses de octubre del 2002 a junio del 2003. Se adquirieron tres muestras de cada uno de los puntos.

Tabla 4. Lugares de muestreo en la Ciudad de Mexico

Restaurantes	Centros de abasto
1 Madero	1 Central de abasto cd. de México
1 Buenavista	2 Mercado de Sn. Juan (Centro)
1 Plaza Universidad	3 Mercado de la bola (Copilco el alto)
2 Universidad (Universidad y Miguel Ángel de Quevedo)	4 Tianguis Copilco
2 Buenavista	5 Supermercado Av. Universidad
2 Madero (Centro histórico)	6 Supermercado La Viga

6.5 Determinación de eficiencia de agentes desinfectantes sobre germinados de alfalfa

Para determinar el efecto que tienen los agentes desinfectantes sobre los microorganismos presentes en las semillas germinadas se adquirieron soluciones comerciales (que es la forma en que estos productos llegan a los consumidores). En el mercado existen soluciones de hipoclorito de sodio y de plata coloidal estabilizada con grenetina. Los productos comerciales se aplicaron de acuerdo con las instrucciones dadas por los fabricantes, en las etiquetas de los productos, siguiendo los tiempos y dosis señalados por éstos.

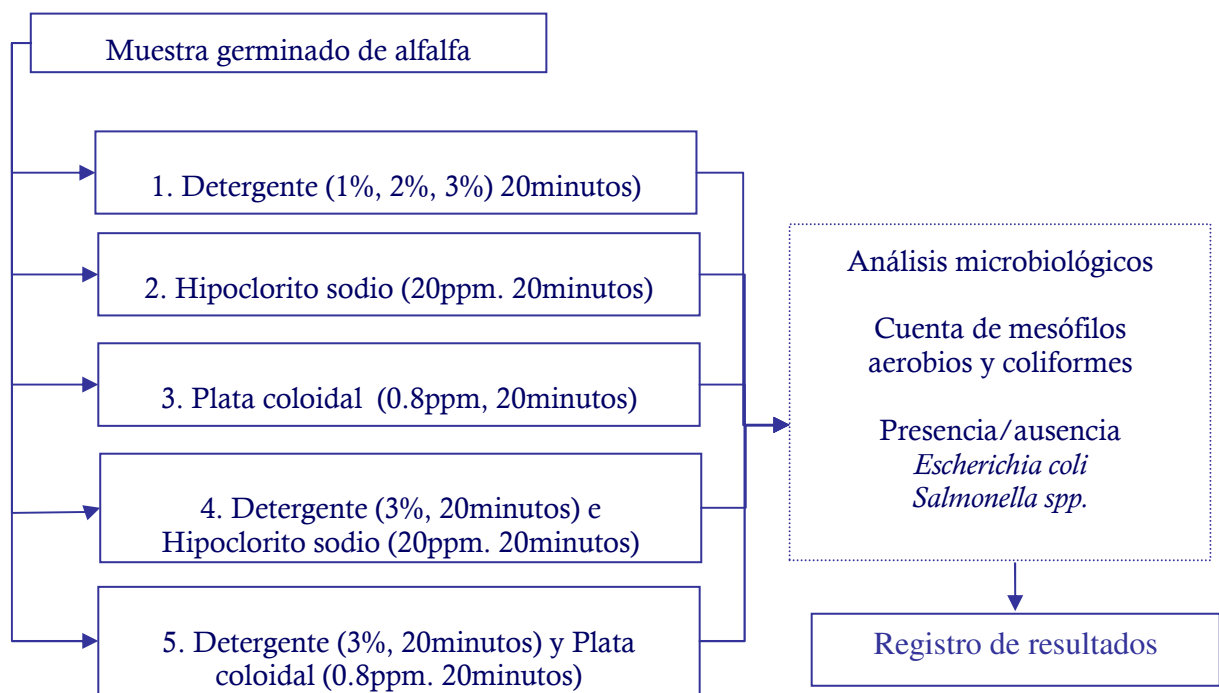


Diagrama 2. Condiciones para la evaluación de la acción de diferentes desinfectantes sobre germinados de alfalfa

Las muestras de germinados de alfalfa (100g), fueron sometidas a cada una de las condiciones de prueba y lavadas posteriormente con agua destilada estéril en abundancia. 10 gramos de la muestra fueron colocadas en un vaso de licuadora estéril con 90ml de agua peptonada y

se licuaron. Tras realizar diluciones sucesivas (1:10), se procedió a sembrar 1mL de dilución en cajas petri con agar cuenta estándar (Difco) y 1ml en placas petrifilm para coliformes / *E. coli*.

Para la determinación de *Salmonella spp.* se procedió de acuerdo con la NOM-114-SSA1-1994, partiendo de 25 gramos de la muestra tratada (diagrama 2).

Se probó el efecto de un agente tensoactivo sobre las poblaciones bacterianas, aplicando soluciones de diferentes concentraciones (1%, 2%, 3%), en los germinados de alfalfa; así como de la mezcla de tratamientos tensoactivo-desinfectante, con la concentración de tensoactivo probada de mayor eficiencia, para evaluar la acción conjunta de dichos tratamientos en la eliminación de microorganismos (diagrama 2).

6.6 Prueba de eficiencia de hipoclorito en pH ácido

Existe una dependencia en el equilibrio de disociación del hipoclorito de sodio con el valor de pH ($pK_a = 7.54$). De manera doméstica es posible imponer un valor de pH cercano a cuatro empleando el ácido acético del vinagre, que es fácilmente accesible en el mercado y es de uso común en gastronomía para preparar aliños y como complemento de ciertos platillos.

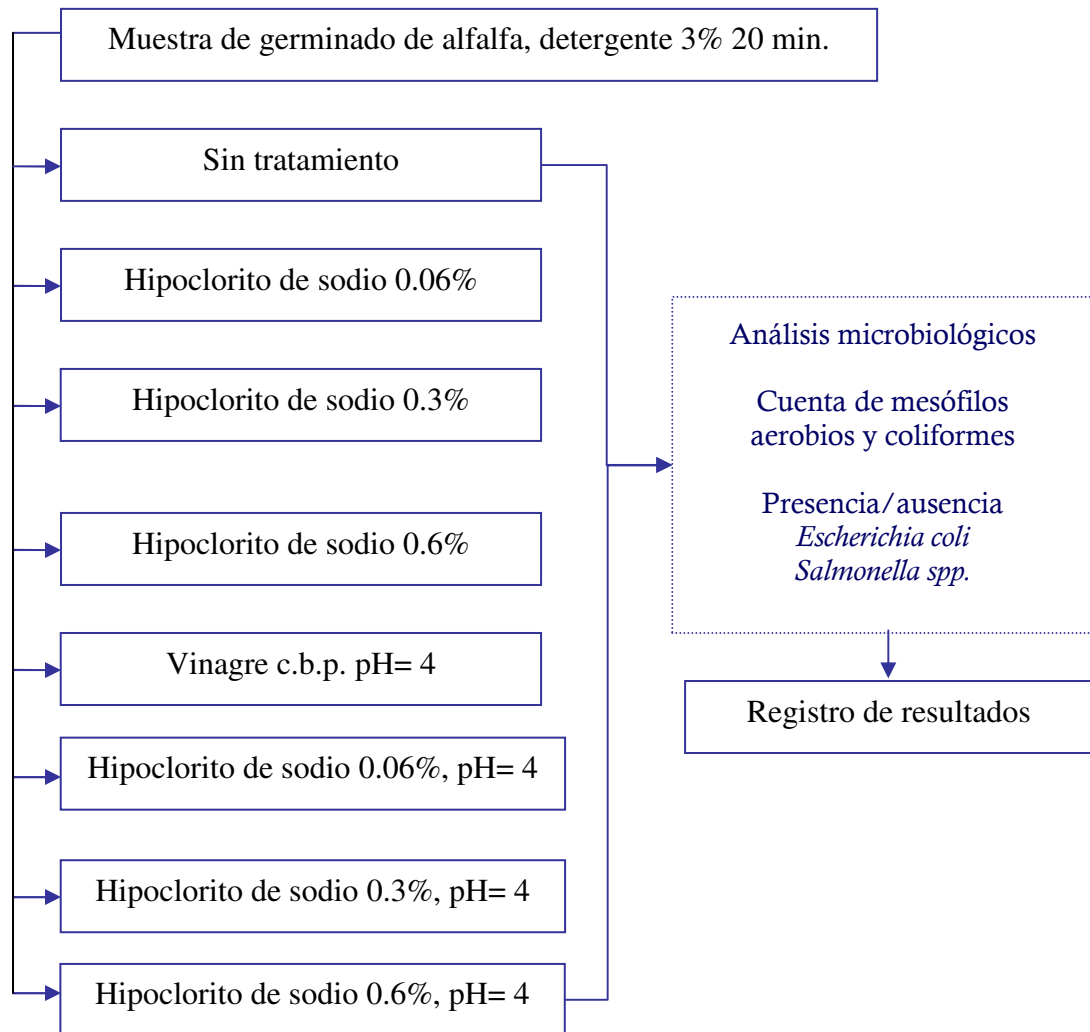


Diagrama 3. Evaluación de la acción de hipoclorito de sodio en diferentes condiciones sobre germinados de alfalfa

Se probó la acción del hipoclorito de sodio en concentraciones de 0.06%, 0.3% y 0.6% en solución acuosa con pH igual a cuatro, impuesto por ácido acético de vinagre. Muestras de 250 gramos se lavaron con detergente al 3% durante 20 minutos y se lavaron con agua destilada estéril, posteriormente se sometieron durante veinte minutos a soluciones de hipoclorito de sodio; hipoclorito de sodio con vinagre; y solución de vinagre. Finalmente se lavaron con agua destilada estéril en abundancia para eliminar las soluciones anteriores para, posteriormente someterse a

análisis microbiológicos como ya se describió anteriormente a partir de 10 gramos de muestra (diagrama 3).

6.7 Condiciones de transporte al laboratorio

Las muestras tal como se adquirieron fueron colocadas dentro de bolsas estériles de plástico y en una hielera con geles refrigerantes cerrada. Se transportaron al laboratorio y se procesaron y analizaron en cuanto llegaron al laboratorio.

6.8 Determinación de Mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994)

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección, el cual fue agar cuenta estándar (Difco), después de 24 horas y temperatura de incubación (37°C), presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo o conglomerado de microorganismos (UFC) de la muestra bajo estudio.

6.9 Determinación de coliformes totales en placa y Escherichia coli (Petrifilm_{MR})

Se utilizó el medio selectivo de cuenta rápida Petrifilm_{MR}, inoculando 1 mL de una dilución adecuada en cada placa. Se incubó a 37°C durante 24 h. Las colonias de coliformes totales desarrollan un color azul, en tanto que las colonias de E. coli desarrollan un color rojo; en ambos casos la película atrapa gas de la lactosa fermentada.

6.10 Determinación de Salmonella spp. (NOM-114-SSA1-1994)

La detección de Salmonella en germinados de alfalfa se llevó a cabo de acuerdo con la NOM-114-SSA1-1994, en donde 25 gramos de muestra se sometieron al método descrito en ésta.

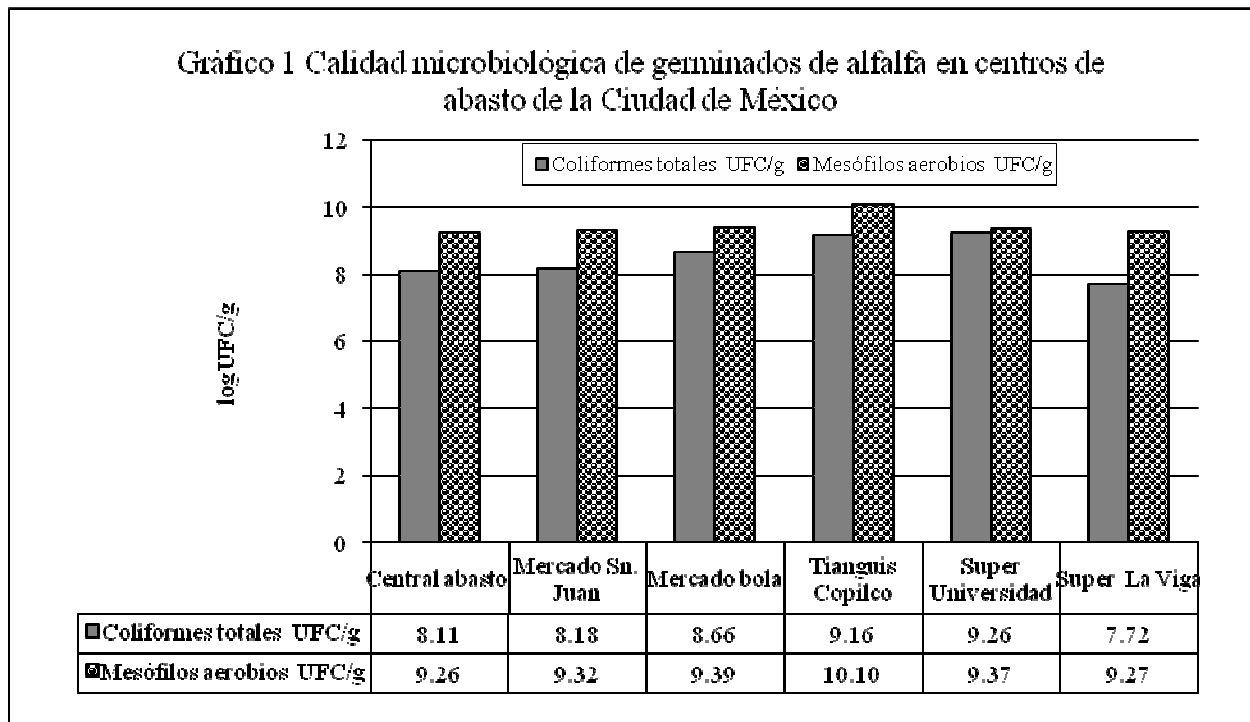
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la calidad microbiológica de germinados de alfalfa se obtuvieron muestras de dos cadenas de restaurantes, de tres restaurantes de cada una de ellas, y de seis centros de abasto de la ciudad de México. Una vez obtenidas las muestras se llevó a cabo la cuantificación de los microorganismos propuestos. Las muestras se procesaron por triplicado para tener una mayor certeza del valor real.

7.1 Calidad microbiológica en Centros de abasto

Se determinó que ninguna de las muestras de germinados provenientes de centros de abasto, sometidas a un análisis microbiológico, cumple con lo requisitos establecidos para microorganismos patógenos (tabla 5), cuentas de mesófilos aerobios y coliformes por la Secretaría de Salud en la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Las cuentas registradas para microorganismos coliformes y mesófilos aerobios en los germinados, tal como se adquirieron en los diferentes centros de abasto, son suficientes para considerar a las muestras analizadas como no aptas para consumo humano (gráfico1), en las cuales se aprecian cuentas de alrededor de 10^8 - 10^9 para coliformes totales y de 10^9 - 10^{10} para mesófilos aerobios, valores que superan en gran medida lo estipulado en la citada norma, los cuales están

alrededor de 10^5 y 10^2 , para mesófilos aerobios y coliformes fecales, respectivamente.



Sin embargo un hallazgo aún más importante es la presencia de microorganismos patógenos en todas las muestras estudiadas. En estudios previos (Fett y col.2001) demostraron la imposibilidad de eliminar a *Salmonella spp* de las semillas, cuando estas se encuentran contaminadas con este microorganismo, sin afectar significativamente su capacidad de germinación, al emplear tratamientos químicos con diversas sustancias entre las que se incluyó hipoclorito. El mismo investigador y sus colaboradores trataron también de eliminar al patógeno durante la etapa de desarrollo de la plántula sin conseguirlo, nuevamente con tratamientos químicos. Únicamente se logro apreciar un efecto tóxico sobre la plántula.

Se observa presencia de *Escherichia coli* como indicador en las muestras analizadas (salvo en las obtenidas en el Tianguis de Copilco, en la cual no se buscó al microorganismo).

Tabla 5. Estudio microbiológico de germinado de alfalfa en centros de abasto de la Ciudad de México

Centro de abasto	Coliformes totales UFC/g	Mesófilos aerobios UFC/g	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp. en 25 g</i>
Central de abasto	13±4x10 ⁷	182±21x10 ⁷	Presencia	Presencia
Mercado Sn. Juan	15±6x10 ⁷	210±16x10 ⁷	Presencia	presencia
Mercado de bola	46±5x10 ⁷	244±15x10 ⁷	Presencia	presencia
Tianguis Copilco	143±16x10 ⁷	127±18x10 ⁸	~~~~~	presencia
Supermercado Universidad	182±13x10 ⁷	236±24x10 ⁷	Presencia	presencia
Supermercado La Viga	52±8x10 ⁶	186±19x10 ⁷	Presencia	presencia

Cada valor es el promedio de tres determinaciones

Este estudio se limitó a la búsqueda de *E. coli* como organismo indicador y fue posible determinar la presencia de esta especie en las muestras analizadas gracias a las placas de detección rápida Petrifilm_{MR} (tabla 5), señal de contaminación fecal, aunque no se puede precisar el momento en que ésta se llevó a cabo.

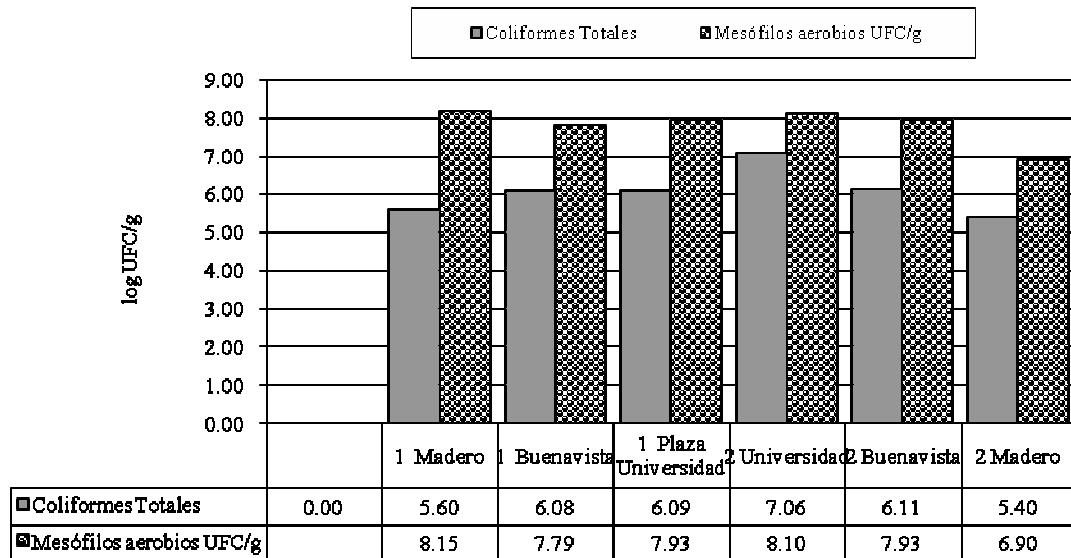
7.2 Calidad microbiológica de germinados de alfalfa en Restaurantes de la ciudad de México

Muestras de germinados de alfalfa provenientes de las dos cadenas de restaurantes seleccionadas para el estudio fueron analizadas y se puede apreciar (tabla 6), que los valores obtenidos están muy por encima de la norma ya que en esta se encuentran establecidos máximos para los siguientes microorganismos: mesófilos aerobios: 150,000 UFC/g y coliformes fecales: 100 NMP/g, así como ausencia del patógeno *Salmonella spp.* En los estudios microbiológicos llevados a cabo en los germinados de alfalfa, si bien las cuentas bacterianas son menores (gráfico 2), con respecto a las que se aprecian en los germinados provenientes de los diferentes centros de abasto de este estudio, ya que han recibido tratamientos germicidas, se observó nuevamente la presencia de *Salmonella spp.*, lo que les da, por este hecho, la categoría de no aptas para consumo humano.

En estudios relacionados únicamente se habla de los germinados de alfalfa como vehículo de transmisión de salmonella y no se encontraron reportes acerca de los valores que presentan microorganismos indicadores, sin embargo, hay que hacer

notar la capacidad de los germinados de alfalfa como potenciales agentes de transmisión de microorganismos de importancia en salud pública.

Gráfico 2 Calidad microbiológica de germinados de alfalfa en restaurantes de la C.d. de México



Una gran desventaja que presentan los germinados de alfalfa, y otros brotes en general, para una desinfección eficiente, es la gran fragilidad de estos, característica que impide que se pueda aplicar un proceso mecánico capaz de remover microorganismos sin dañar significativamente el producto.

Es notoria la necesidad de contar con proceso de desinfección que garanticen la remoción de microorganismos de importancia en salud pública, sobre todo en los casos en que los alimentos hayan sufrido contaminación con microorganismos patógenos, pero sobre todo debe enfatizarse sobre la necesidad de obtener

alimentos libres de contaminantes biológicos mediante la aplicación de buenas prácticas agrícolas.

Tabla 6. Estudio microbiológico de germinado de alfalfa en restaurantes en la Ciudad de México

Restaurantes	Coliformes Totales UFC/g	Mesófilos aerobios UFC/g	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp.</i> en 25 g
1 Restaurante Madero	$40 \pm 3 \times 10^4$	$142 \pm 16 \times 10^6$	presencia	presencia
1 Restaurante Buenavista	$120 \pm 16 \times 10^4$	$62 \pm 7 \times 10^6$	presencia	presencia
1 Restaurante Universidad	$122 \pm 14 \times 10^5$	$85 \pm 9 \times 10^6$	presencia	presencia
2 Restaurante Universidad	$115 \pm 8 \times 10^5$	$125 \pm 12 \times 10^6$	presencia	presencia
2 Restaurante Buenavista	$13 \pm 2 \times 10^5$	$86 \pm 7 \times 10^6$	presencia	presencia
2 Restaurante Madero	$25 \pm 4 \times 10^4$	$8 \pm 2 \times 10^6$	presencia	presencia

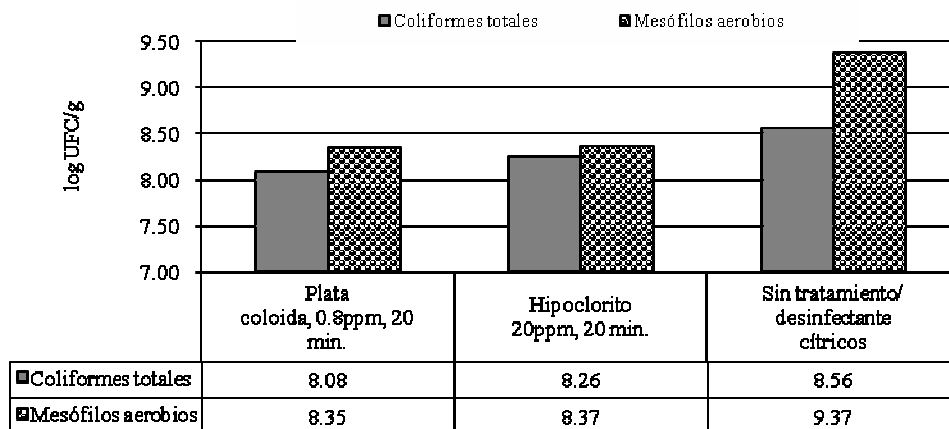
Cada valor es el promedio de tres determinaciones

1 y 2 representan a las cadenas de restaurantes

7.3 Pruebas de la acción de desinfectantes comerciales y mezcla de tratamientos en germinados de alfalfa

Se probaron tres desinfectantes comerciales cuya composición está basada en aceites cítricos, hipoclorito de sodio y plata coloidal estabilizada con grenetina, sobre germinados de alfalfa procedentes de la central de abasto de la ciudad de México. Las pruebas de eficiencia realizadas a los desinfectantes comerciales puso en evidencia la ineffectividad de la mezcla de aceites cítricos, la plata coloidal y del hipoclorito de sodio, en las condiciones de uso que los fabricantes indican, para lograr la reducción de la microbiota hasta los niveles requeridos por la NOM-093-SSA1-1994 (150,000 UFC/g y coliformes fecales: 100 NMP/g, así como ausencia del patógeno *Salmonella spp.*), además de ser insuficientes para la eliminación de *Salmonella spp* en los germinados de alfalfa.

Gráfico 3 Efecto de desinfectantes comerciales en germinados de alfalfa



En el caso de la prueba del desinfectante comercial a base de aceites de cítricos, el resultado no presenta diferencia con el de las muestras sin tratamiento, es decir

que resultó ser el menos eficiente de los tres tratamientos probados, razón por la cual se incluyen ambos de manera conjunta (gráfico 3). Por tal motivo únicamente se tomaron para los siguientes ensayos a la plata coloidal estabilizada con grenetina, desinfectante que en las condiciones sugeridas por el proveedor muestra reducciones de alrededor del 66% de los coliformes totales y 90% de los mesófilos aerobios; y al hipoclorito de sodio que logra reducir alrededor de 50% y 90%, de los coliformes totales y mesófilos aerobios, respectivamente.

7.3.1 Empleo de tensoactivos en la desinfección de germinados de alfalfa

Dada la ineficiencia de los productos disponibles en el mercado, por si solos, para disminuir las cuentas microbianas y la eliminación de salmonelas se decidió emplear otras sustancias que permitieran incrementar la eficiencia en la remoción de tales microorganismos.

Se pensó en la posibilidad de emplear un agente tensoactivo para facilitar la acción de los agentes desinfectantes en la eliminación de *Salmonella*, mesófilos aerobios y coliformes totales en los germinados de alfalfa. Se probó el efecto de tres concentraciones de detergente comercial sobre las cuentas microbianas, observándose un decremento en sus valores como función de una concentración mayor de tensoactivo, sin embargo, en las condiciones probadas el detergente por si solo no consigue la eliminación de los patógenos, pero si la reducción de

Tabla 7. Prueba de eficiencia desinfectante de productos comerciales en germinado de alfalfa

Tratamiento	Coliformes totales UFC/g	Mesófilos erobios UFC/g	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp.</i> en 25 g
Tensoactivo 1%, 20 min.	146±15x10 ⁶ (59.44)	24±5x10 ⁷ (89.83)	presencia	Presencia
Tensoactivo 2%, 20min.	89±12x10 ⁶ (75.34)	198±17x10 ⁶ (91.62)	presencia	Presencia
Tensoactivo 3%, 20 min.	16±4x10 ⁶ (95.56)	175±20x10 ⁶ (92.59)	presencia	Presencia
Hipoclorito comercial 20ppm, 20 min.	180±19x10 ⁶ (50.14)	234±23x10 ⁶ (90.10)	presencia	Presencia
Plata coloidal comercial, 0.8ppm, 20 min.	12±3x10 ⁷ (66.76)	222±12x10 ⁶ (90.60)	presencia	Presencia
Tensoactivo 3%; Hipoclorito comercial, 20ppm, 20 min c/u	25±4x10 ⁴ (99.93)	86±13x10 ⁵ (99.63)	presencia	Presencia
Tensoactivo 3%; Plata coloidal comercial, 0.8ppm. 20 min c/u	19±5x10 ⁶ (94.73)	235±26x10 ⁶ (90.05)	presencia	presencia
Sin tratamiento/desinfectante cítricos	36±6x10 ⁷ (0)	236±21x10 ⁷ (0)	presencia	presencia

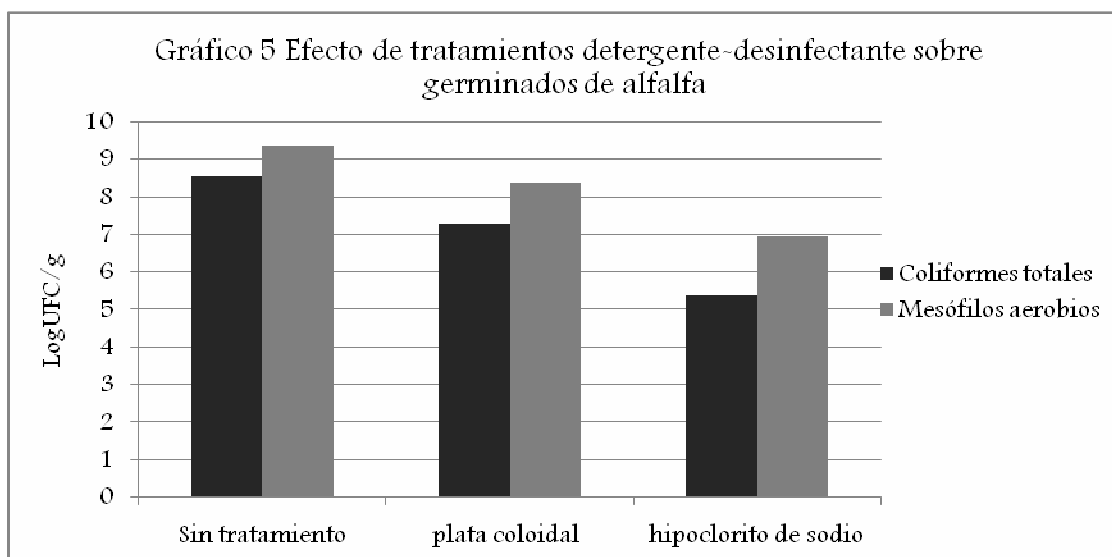
Los valores entre paréntesis representan los % de remoción

Cada valor es el promedio de tres determinaciones

coliformes totales en alrededor de 95.5% y de mesófilos aerobios en 92.5%, cuando se emplea en solución al 3%(tabla7).

7.3.2 Efecto de la combinación detergente-desinfectante sobre germinados de alfalfa

Al probar la ineffectividad de los desinfectantes y del tensoactivo, por si solos para poder cumplir con la NOM-093-SSA1-1997, se decidió probar tratamientos combinados de tensoactivo-desinfectante, con lo cual se logró un descenso en las cuentas de los microorganismos indicadores, más no la eliminación de los patógenos de interés. La mejor combinación resultó ser hipoclorito de sodio-detergente, con la cual se logró reducir las cuentas desde valores de 36×10^7 UFC/g hasta 25×10^4 UFC/g , en coliformes totales, y para mesófilos aerobios desde 236×10^7 UFC/g hasta 86×10^5 UFC/g, valores que, sin embargo, no entran dentro de lo establecido por la norma oficial mexicana.



Respecto al tratamiento realizado con plata coloidal-detergente pudo apreciarse una reducción en los valores de mesófilos aerobios desde alrededor de 10^9 hasta 10^8 , en tanto que para coliformes totales la reducción va de valores cercanos a 10^8 hasta 10^7 después del tratamiento (gráfico5).

7.4 Efecto de tensoactivo-hipoclorito de sodio-vinagre en la desinfección de germinados de alfalfa

El pH del medio puede afectar la actividad microbiana de diferentes maneras:

Puede afectar la actividad del agente antimicrobiano. Muchos agentes antimicrobianos son ácidos o bases débiles. La experiencia indica que la mayoría de los agentes son más activos en la forma no ionizada. La actividad de los agentes, entonces, dependerá del valor de su pKa en relación con el medio de suspensión. La interacción de agentes reactivos como el cloro y glutaraldehído se ve afectada por pH (Denyer & Hugo.1991).

De los desinfectantes empleados el hipoclorito de sodio posee un valor de pKa igual a 7.54, es decir que la disociación de este en agua puede verse afectada por el valor de pH del medio.

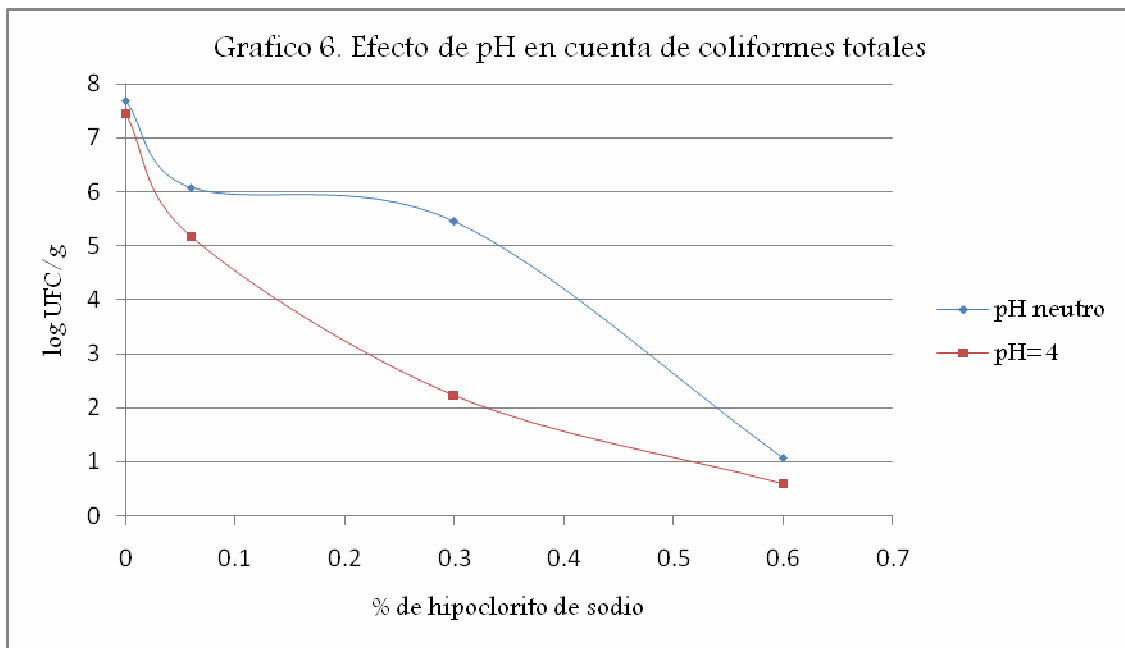
La exposición de los germinados de alfalfa a una solución de vinagre con pH igual a 4, durante 20 minutos, después de lavarlos con detergente al 3%, por si sola reduce la cuenta bacteriana de coliformes totales en 41.66%(gráfico 6) y de los mesófilos aerobios en 18.07%, lo cual se debe a la toxicidad que el ácido acético exhibe hacia ciertos microorganismos.

Tabla 8. Efecto de tensoactivo y pH en la eficiencia del hipoclorito de sodio para desinfectar germinados de alfalfa.

Tratamiento	Coliformes Totales UFC/g	Mesófilos aerobios UFC/g	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>
Detergente 3%, 20min.	48±8x10 ⁶ (86.70)	227±18x10 ⁶ (90.39)	presencia	presencia
Hipoclorito 0.06%, 20 min.	12±2x10 ⁵ (99.66)	45±8x10 ⁵ (99.80)	presencia	presencia
Hipoclorito 0.3%, 20 min.	29±4x10 ⁴ (99.91)	31±5x10 ⁴ (99.99)	presencia	presencia
Hipoclorito 0.6%, 20 min.	12±3(99.99)	103±14(99.99)	presencia	presencia
Hipoclorito 0.06%, 20 min. pH 4	15±3x10 ⁴ (99.95)	62±11x10 ⁴ (99.97)	presencia	presencia
Hipoclorito 0.3%, 20 min. pH 4	172±12(99.99)	210±22(99.99)	presencia	presencia
Hipoclorito 0.6%, 20 min. pH 4	4±2(99.99)	35±6(99.99)	presencia	presencia
Vinagre pH 4	28±6x10 ⁶ (99.99)	186±14x10 ⁶ (92.13)	presencia	presencia
Sin tratamiento	36±6x10 ⁷	236±21x10 ⁷	presencia	presencia

Los valores entre paréntesis representan el % de remoción

Cada valor es promedio de tres determinaciones



Dada la existencia de equilibrios de disociación en función del pH, en el hipoclorito de sodio, se decidió acidificar el agua para la desinfección con vinagre de alcohol (solución de ácido acético al 5%), observándose que existe una abrupta disminución en las cuentas de mesófilos aerobios y coliformes totales cuando la concentración de hipoclorito se incrementa, siendo este efecto muy marcado cuando el pH es igual a cuatro (gráfico 6). Con soluciones de hipoclorito de sodio al 0.6% se consigue obtener cuentas de coliformes totales de 12 UFC/g en pH neutro y de 4UFC/g en pH=4. Se aprecia que de esta forma es posible llegar a valores en los cuales se cumple con lo que la legislación mexicana establece, sin embargo se encontró que el método no es capaz de eliminar a *Salmonella spp* y *E. coli*, microorganismos que siguen estando presentes después del tratamiento empleado.

Después del empleo de los tratamientos antes descritos se observó la presencia de salmonella en las muestras de germinados de alfalfa, es

decir, que existe una gran resistencia de estos microorganismos al ataque por agentes desinfectantes cuando se encuentran depositados en germinados de alfalfa, lo que los hace potencialmente riesgosos para la salud, sobre todo cuando los consumidores tienen el sistema inmunológico comprometido. Es necesario llamar la atención acerca de este riesgo para implementar medidas que garanticen la obtención de productos inocuos, teniendo especial cuidado desde la obtención de la semilla, hasta el momento de la cosecha para evitar la contaminación de estos con microorganismos patógenos.

9.0 CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, los germinados de alfalfa no son aptos para consumo humano ya que no se encuentran libres de microorganismos patógenos y los niveles de microorganismos indicadores sobrepasan a los máximos establecidos en la normatividad mexicana.
- Existen problemas para desinfectar los germinados de alfalfa, lo cual se de muestra al encontrarse *Salmonella spp.* en las muestras obtenidas en los restaurantes de las dos cadenas seleccionadas, lo que les confiere la calidad de no aptos para consumo humano.
- Los desinfectantes comerciales probados (plata coloidal e hipoclorito de sodio), si bien reducen la carga microbiana (alrededor de 60% de coliformes totales y 90% de mesófilos aerobios), no son capaces de eliminar a los microorganismos patógenos en los germinados de alfalfa, cuando se emplean de acuerdo con las instrucciones del fabricante
- No se logró la eliminación de *Salmonella spp.* de los germinados de alfalfa por medio de tratamientos conjuntos de tensoactivo y desinfectantes comerciales más vendidos en el mercado, aunque cabe mencionar que los tratamientos conjuntos fueron más eficientes en la remoción de coliformes totales y mesófilos aerobios (>99.9%, en los mejores casos).

10.0 SUGERENCIAS

Aunque la investigación para lograr la eliminación de los agentes patógenos de los germinados continúa, es necesario llamar la atención de la población respecto del riesgo que el consumo de estos productos representa, principalmente para los niños y personas con el sistema inmunológico comprometido, haciendo hincapié en la necesidad de un proceso de desinfección previo al consumo de semillas germinadas y en la necesidad de establecer medidas que garanticen la obtención de semillas germinadas libres de contaminación por *Salmonella* y otros patógenos.

11.0 BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M. 1998. Desinfectantes comerciales. Un estudio comparativo de su aplicación en hortalizas. Tesis licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. México.
- Albert, L. 1990. Curso Básico de Toxicología Ambiental. Limusa, México, D. F. México pp 247-177
- Banwart, G. 1990. Microbiología Básica de los Alimentos. Ballaterra, España. pp 260-277
- Beerens, H. 1998. Bifidobacteria as indicators of fecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*, International Journal of Food Microbiology. 40 203-207.
- Beuchat, L. R. 1997. Comparison of chemical treatments to kill Salmonella on alfalfa seeds destined for sprout production. International Journal of Food Microbiology, Volume 34, Issue 3. pp. 329-333.
- Bracket, R. E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biology and Technology. Volume 15. Issue 3. pp. 305-311.
- Burck, B. and J. C. Delouche. 1959. Water absorption by seeds. Proc. AOSA 49:142
- Burgeois, C. M. 1994. Microbiología alimentaria. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 56-65.

- Ching-Hsing Liao and William F. Feet. 2003. Isolation of *Salmonella* from alfalfa seed and demonstration of impaired growth of heat-injured cells in seed homogenates. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 82, Issue 3, 15. pp. 245-253.
- Denyer, S. P. & Hugo, W. B., Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1991.
- Fett, W. F., 2002. Reduction of the native microflora on alfalfa sprouts during propagation by addition of antimicrobial compounds to the irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 72, Issues 1-2. pp. 13-18.
- Fett, W; Cooke P. 2005. A survey of native microbial aggregates on alfalfa, clover and mung bean sprout cotyledons for thickness as determined by confocal scanning laser microscopy. *International Journal of Food Microbiology*. 22: 2-3, pp 253-259
- Jiménez, M. 1994, Eficiencia de desinfectantes comerciales recomendados para la desinfección de frutas y verduras. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Estado de México, México.
- Lennette, E. 1982. *Microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. México D.F. pp 131-143.

- Mahon, B., Ponka, a., Hall, W., Komatsu, K., Dietrich,S., Siitonen A., Cage, G., Hayes P., Lambert-Fair M., Bean, N., Griffin, P., and Slutsker, L. 1997. An international outbreak of Salmonella infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *The Journal of Infectious diseases*. 175: 4. 876-885
- Megha, G. 2003. Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 86, Issue3, 1. pp. 301-306.
- Muller, G. 1991. *Microbiología de los Alimentos Vegetales*. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 59-61.
- Murray, P., Lawrence, W., Kobayashi. G., Thompson, J. 1996. *Microbiología Médica*. Mosby. México. pp 103-112
- (NACMCF) National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food. 1999. *Microbiological Safety Evaluations and Recommendations on Sprouted Seeds*. U. S. F. D. A.
- Pelczar, Michael. 1990. *Microbiología*. Editorial Mc Graw-Hill, México, D. F. México, pp. 613-68i.
- Ratna R. Sharma and Ali Demirci. 2003. Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 82, Issue 3, 15. pp. 231-237.

- Real Academia Española. 1996. Diccionario de la lengua española. Tomo I. a-g. Editorial Espasa Calpe S.A., Madrid, España, Pág. 1078.
- Remes, Alfredo. 1995. Los sanitizantes y su reactividad en la eliminación de microorganismos específicos en suspensión o en superficies. *Lácteos y Cárnicos*. 10 (6), 12-15.
- Robertson L., Johannessen G., Gjerde B., and Loncarevic S. 2002. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 75, Issues 1-2, pp. 119-126.
- Rusell, A. 1982 Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Blackwell Scientific publications. Menlo Park, California. Estados Unidos de América. pp 3-6, 107-128, 134-137.
- Sandhya, S; Uma, T.S; Subbarao, K. 1998. Dip slide technique for rapid qualitative estimation of fecal coliforms in water and wastewater, PII:SOO43-1354. 00271-1 989-994.
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Método para cuenta de bacterias aerobias en placa. México
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes Y Servicios. Practicas de higiene y sanidad en la

preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. México.

- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación e bacterias coliformes. Técnica del número más probable. México
- Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México
- Singh N., Singh, K. and Bhunia A. 2003. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. *Lebensmittel.Wissenschaft und-Technologie*, Volume 36, Issue 2. pp. 235-243.
- Soriano, J. M; Rico, H; Molto, J.C.; Mañes, J. 2000. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce

served in University restaurants, International Journal of Food Microbiology. 58 (1) 123-128.

- Taylor, Steve. 1990. Foodborne diseases. Edited by Dean O. Cliver. Food research institute, Wisconsin, United States, pp. 79-91
- Tournas, V. H. 2005. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. International Journal of Food Microbiology, Volume 99 Issue1, 1. pp 71-77.
- Tortora, Gerard. 2007. Microbiology. The Benjamin/Cummings publishing Company Inc., United States of America pp 274-278; 668-674.
- Van Beneden, C.A., W.E. Keene, R.A. Strang, D.H. Werker, A.S. King, B. Mahon, K. Hedberg, A. Bell, M.T. Kelly, V.K. Balan, W.R. MacKenzie, and D. Fleming. 1999. Multinational outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infections due to contaminated alfalfa sprouts. JAMA. 281:158-162.
- Zinsser, Hanss. 1990. Microbiología de Zinsser. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp 281-298.
- Dorothy. 2007. Tomado de las redes internacionales. <http://www.northstar.k12.ak.us/schools/tan/student/projects/micro/dorothy/mcknight.html>
- Gillmor, 2007 D. tomado de las redes internacionales <http://bayosphere.com/node/655/trackback>

- Krarup, K. 1997. Tomado de las redes internacionales:
<http://www.puc.cl/sw-edu/hortalizas/htm>.

APÉNDICE A

Temperaturas y tiempos empleados con Petrifilm

La AOAC INTERNATIONAL y el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la FDA definen a los coliformes como bacilos gram negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica. Las colonias de coliformes creciendo en la placa Petrifilm EC producen ácido el cual ocasiona que el indicador de pH tiña el gel de color rojo oscuro. El gas atrapado alrededor de las colonias de coliformes indica coliformes confirmados. Los tiempos y temperaturas de incubación varían de acuerdo al método. Los métodos más comúnmente aprobados son:

- AOAC Método Oficial 991.04

Para coliformes: incubar 24h +/- 2h en 35°C +/- 1°C

Para E. coli: incubar 48h +/- 2h en 35 °C +/- 1°C

- AOAC Método Oficial 998.08

Para E. coli (para cárnicos, pollo y comida del mar):

Incubar a 24h +/- 2h en 35°C +/- 1°C

- AFNOR Método Validado 3M 01/4 -09/92

Para E. coli: incubar 24h +/- 2h en 42°C +/- 1°C

- NMKL Método (147.1993)

Para coliformes : incubar 24h +/- 2h en 37°C

Para E. coli: incubar 48h +/- 2h en 37°C