

**Evaluación de la eficiencia de dióxido de cloro
para reducir niveles de *Listeria*
monocytogenes en germinados de alfalfa**

Andrea Suazo Rosales

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación de la eficiencia de dióxido de cloro para reducir niveles *Listeria monocytogenes* en germinados de alfalfa

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Andrea Suazo Rosales

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Evaluación de la eficiencia de dióxido de cloro para reducir niveles de *Listeria monocytogenes* en germinados de Alfalfa

Andrea Suazo Rosales

Resumen. Los germinados de alfalfa son semillas que iniciaron su primera etapa de desarrollo, estos son consumidos crudos o ligeramente cocidos para evitar la pérdida de valor nutricional. Se evaluó la eficiencia del dióxido de cloro a 3 ppm como desinfectante para reducir niveles de *Listeria monocytogenes*, estableciendo tratamientos durante 5 días por 10 minutos, así mismo, conduciendo un control con agua destilada. Cada día se tomaron muestras antes y después de tratamiento para luego ser procesadas por un homogenizador. Esta etapa del experimento fue analizada mediante un Diseño Experimental Completamente al Azar con medidas repetidas en el tiempo. En el día 5 se tomaron muestras del control para tratarla con dióxido de cloro a 3 ppm por 10 min, para luego separar los germinados en hoja, tallo y raíz para determinar la prevalencia del patógeno. Se analizó la prevalencia del patógeno mediante Bloques Completos al Azar. El tratamiento durante los 5 días no obtuvo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las reducciones de muestras tratadas con agua (0.35 log UFC/g) y el desinfectante (0.38 log UFC/g). *Listeria monocytogenes* se distribuyó equitativamente en cada una de las partes del germinado. El dióxido de cloro a 3 ppm reduce 83.40% del patógeno inoculado. Este estudio sugiere probar diferentes desinfectantes siguiendo las regulaciones del FDA y de esta manera no comprometer la salud del consumidor.

Palabras clave: Crecimiento, desinfección, patógeno, productos frescos.

Abstract. Alfalfa sprouts are germinated seeds, which are consumed raw or lightly cooked to avoid the loss of nutritional value. The efficiency of chlorine dioxide at 3 ppm was evaluated as a sanitizer to reduce levels of *Listeria monocytogenes*, treating them during 5 days for 10 minutes, as well as carrying out a control with distilled water. Each day samples were taken before and after the treatment and then were processed by a homogenizer. This phase of the experiment was analyzed with a Completely Randomized Design with repeated measures over time. On day 5, samples from the control were taken to treat them with chlorine dioxide at 3 ppm for 10 min, then the sprouts were separate in leaf, stem and root to determine the prevalence of the pathogen using a Randomized Complete Block Design. The treatment during the 5 days did not obtain significant differences ($P > 0.05$) between reduction of samples treated with distilled water (0.35 log CFU/g) and chlorine dioxide (0.38 log CFU/g). Chlorine dioxide at 3 ppm reduce up to 83.40% of the inoculated pathogen. *Listeria monocytogenes* was distributed equally in each of the parts of the sprout. This study suggests testing different disinfectants according to FDA regulations and thus do not compromise consumers' health.

Key words: Fresh produce, growth, pathogen, sanitization.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS.....	18

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Cuadro de formulación del agar selectivo para <i>Listeria</i> (Agar Oxford)	5
2. Recuentos de <i>Listeria monocytogenes</i> durante la germinación de semillas de alfalfa inoculadas y desinfectadas con agua destilada y dióxido de cloro (3 ppm)	7
3. Distribución de los recuentos de <i>Listeria monocytogenes</i> en semillas de alfalfa inoculadas, germinadas y desinfectadas con dióxido de cloro.....	9

Figuras	Página
1. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en germinados de alfalfa, tratados con agua destilada (control).....	10
2. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en germinados de alfalfa, tratados con dióxido de cloro a 3 ppm.....	10

Anexos	Página
1. Resumen del análisis estadístico para la distribución de partes del germinado de alfalfa (hoja, tallo y raíz) inoculado con <i>Listeria monocytogenes</i> , tratados al quinto día con dióxido de cloro a 3 ppm durante 10 min.	18
2. Tabla resumen del análisis estadístico para germinados de alfalfa inoculados con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratados con agua destila (control) y dióxido de cloro a 3ppm.	18

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria lucha constantemente contra los microorganismos que podrían causar enfermedades a los seres humanos por medio de los alimentos. Cada año alrededor del mundo se reportan brotes asociados con alimentos contaminados que pueden llegar a causar enfermedades o incluso la muerte, estos son causados por microorganismos patógenos como bacterias, virus u hongos (CDC 2017). Un brote de enfermedad transmitida por los alimentos es cuando dos o más personas se enferman por haber consumido el mismo alimento o bebida. Los oficiales de salud pública se encargan de investigar el brote para detenerlo y prevenir que más personas se contaminen (CDC 2018). En 1996 fue la primera vez que se reportó un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, debido al consumo de germinados. Según la base de datos de enfermedades transmitidas por los alimentos, la mayoría de los brotes con germinados son causados por *Samonella* seguidos por *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Clark 2018). Estos microorganismos se encuentran en todas partes, sin embargo, dependen de condiciones ideales que les permitan sobrevivir y multiplicarse. Estas se dividen en factores extrínsecos e intrínsecos. Algunos factores extrínsecos son la humedad del medio y la temperatura, mientras que los intrínsecos son la actividad de agua, acidez, potencial de óxido reducción, composición química del alimento y otros (OMS 2016).

Listeria monocytogenes es una bacteria, no formadora de spora, bacilo, Gram positiva y anaeróbica facultativa (Farber y Peterkin 1991). Esta bacteria es capaz de sobrevivir a temperaturas de refrigeración y resistir a ambientes de estrés (alta salinidad y pH bajos), convirtiéndola de alta preocupación para las industrias alimentarias. Puede ser encontrada en el suelo, ambientes agrícolas y alimentos de origen animal. La enfermedad causada por este patógeno es llamada listeriosis, personas inmunocomprometidas, niños recién nacidos y mujeres embarazadas son los de mayor riesgo a esta enfermedad (FDA 2018). La listeriosis es la tercera causa de muerte por enfermedades transmitidas por los alimentos (CDC 2016). De acuerdo con el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, mueren 260 personas por año por la contaminación de *Listeria monocytogenes* (CDC 2017).

Los germinados como su nombre lo indica son semillas que iniciaron su primera etapa de desarrollo, durante la que presentan características propias de las hortalizas. Estos se consumen crudos o ligeramente cocidos para evitar la pérdida del valor nutricional en la cocción (Barron *et al.* 2009). Son una gran fuente de nutrientes, tales como proteína, enzimas, clorofila, vitaminas, minerales, entre otros. Los germinados más populares son alfalfa y frijol mungo (Newgent 2015). Para la producción de germinados es necesario tener en cuenta varios factores, entre los cuales se incluyen mantener un ambiente húmedo agregando constantemente agua y una temperatura entre 21 y 26 °C durante su período de crecimiento. Estarán listos para ser cosechados de 4 a 5 días después la germinación de la

semilla. Para desinfectarlos se les rocía un desinfectante ya sea con un clorado, agua ozonizada o cualquier otro desinfectante Schrader 2002). Un producto comúnmente utilizado es el dióxido de cloro, utilizado como agente antimicrobiano (Pubchem 2005).

Se han realizado estudios para reducir la prevalencia de patógenos en los germinados de alfalfa utilizando diferentes tipos de desinfectantes. En un estudio, se utilizaron altas concentraciones de dióxido de cloro para medir la supervivencia del patógeno (Taormina y Beuchat 1998). Singh *et al.* (2002); evaluaron la eficacia del aceite esencial de tomillo, agua ozonizada y dióxido de cloro en diferentes niveles, para reducir *E. coli* O157:H7 de semillas y de alfalfa. Se aplicó el desinfectante individualmente y en un lavado secuencial, utilizando suspensión de aceite de tomillo seguido de agua ozonizada y dióxido de cloro acuoso. La desinfección secuencial tuvo mejores resultados al lograr una reducción de 4.181 log ufc/g. En el 2009 Kim *et al.*, realizaron una investigación combinando ácido fumárico, dióxido de cloro en solución acuosa e irradiación con UV-C, para reducir *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Los germinados de alfalfa y trébol se trataron con las siguientes combinaciones, UV-C con ácido fumárico, y dióxido de cloro con ácido fumárico. La combinación de UV-C con ácido fumárico dio como resultado una reducción en 3.03, 2.88 y 2.81 log ufc/g después de 3, 5 y 10 minutos de exposición respectivamente. La combinación de dióxido de cloro y ácido fumárico dio como resultado una reducción de 2.39, 2.67, 2.95 y 3.18 log ufc/g después de 1, 3, 5 y 10 minutos de exposición respectivamente.

A lo largo de los años se han realizado muchos estudios para la reducción de patógenos en los germinados, sin embargo, no hay un estudio con dióxido de cloro utilizando el máximo permitido (3 ppm), para reducir niveles de *Listeria monocytogenes* (FDA 2017). La presente investigación tuvo como objetivos:

- Evaluar la eficacia del dióxido de cloro como tratamiento para reducir la presencia de *Listeria monocytogenes* durante la germinación de semillas de alfalfa aplicando el tratamiento durante el crecimiento y post germinación.
- Evaluar la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en las diferentes partes del germinado, hoja, tallo y raíz.
- Determinar la tasa de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en condiciones de germinación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

La investigación se realizó en la Universidad Estatal de Luisiana, Baton Rouge, Luisiana, Estados Unidos de América. Dicho estudio tomó lugar en el laboratorio de inocuidad alimentaria de la institución antes mencionada.

Preparación del inóculo.

Para este estudio, se utilizó un cóctel de *Listeria monocytogenes*. Las cepas utilizadas son V7 aisladas de la leche (Ryser 1989), 101M aisladas de la carne (Flynn 2018) y LCDC aisladas de vegetales (Berrang *et al.* 1989). El primer día, se inoculó 0.1 ml de cultivo de *Listeria monocytogenes* en 10 ml de caldo triptona de soya más extracto de levadura al 0.6% (TSBYE) y se incubaron durante 18 a 24 horas a 37 °C. El segundo día, se inoculó 1 ml de cada cultivo bacteriano en 10 ml de caldo TSBYE y se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 h. El tercer día, se inoculó 0.1 ml del cultivo previo en 10 ml de TSBYE y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Las células se lavaron, colocando 10 ml de cada cultivo en tubos falcón y se centrifugaron durante 5 minutos a 6,500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y luego las células se lavaron con 10 ml de buffer fosfato salino (PSB). El sedimento se mezcló con 10 ml de PBS y se agitó en vórtex para mezclar bien. Para el cóctel, se usaron 10 ml de inóculo de cada cepa y se mezclaron en un tubo falcón de 50 ml, del cual se tomó la absorbancia a 600 nm.

Inoculación de semillas de alfalfa.

El cóctel de cepas se diluyó con agua peptonada 0.1% hasta 10^{-4} , se tomó 30 ml de inóculo diluido para ser mezclado con 270 ml de PBS. Luego se colocó en una bolsa con filtro que contenía 300 gramos de semillas de alfalfa orgánicas de la marca Handy Pantry. Se mezcló con las manos continuamente durante cinco min. Las semillas inoculadas se colocaron en placas Petri estériles (150 x 20 mm). Para secarlos, se situaron las placas de Petri dentro de la campana de bioseguridad y se removían las semillas cada 30 min hasta que estuvieran secas (aprox 2.5-3 hrs).

Preparación de dióxido de cloro.

Para realizar la solución desinfectante de dióxido de cloro se combinaron 2.5 g de cloruro de sodio con 250 ml de agua destilada y se mezcló hasta ya no ver precipitado. Luego se transfirió 225 ml de la solución a una botella nueva con una barra magnética de agitación. A los 225 ml de solución se adicionó 10.5 ml de ácido clorhídrico 1.0 N. La solución no debe estar expuesta a la luz, por lo tanto, se cubrió la botella con papel aluminio. Se mezcló

la solución en una placa de agitación durante 1 hora sin calor a 150 rpm. La determinación de la concentración del ClO_2 se realizó mediante un colorímetro. Primero se realizó una medición en blanco. Para realizar el blanco se colocó 10 ml de agua destilada en el frasco de muestra. El tubo se limpió con un pañuelo de papel y se insertó en el colorímetro. Se presionó el botón con el nombre de ZERO y la pantalla mostró 0.00 mg/ml de ClO_2 . Para medir la concentración del concentrado se mezcló 100 ml de agua destilada con 0.25 ml de concentrado de ClO_2 . De esta nueva solución se agregó 10 ml en otro frasco de muestra, a este se le adicionaron 4 gotas de glicina y se mezcló. Luego se añadió un sobre de polvo de cloro libre DPD (dietil-1,4 fenilendiamina sulfato), este se mezcló hasta que desapareció el precipitado. Antes de insertarlo en el colorímetro se esperó un minuto. Se limpió con un pañuelo de papel y se colocó en el colorímetro presionando el botón llamado READ. Con el resultado obtenido se realizó los cálculos necesarios para obtener una concentración de 3 ppm un volumen determinado, utilizando la ecuación 1.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad [1]$$

Aplicación del tratamiento.

Se recolectaron seis botellas estériles de boca ancha de 500 ml y se colocó 50 gramos de semillas en cada una de las botellas. A estas se les colocó 500 ml de agua destilada (10 veces el peso de la semilla). Las semillas inoculadas estuvieron en remojo durante 4 horas para inducir la germinación. Se les retiró el agua y los frascos se identificaron por mitad para su respectivo tratamiento (tres para ClO_2 y tres para agua destilada). Se trataron las semillas con un volumen diez veces mayor a su peso durante 10 minutos. El tratamiento se repitió una vez al día durante los 5 días que dura la germinación.

Germinación.

Los germinados (10 gramos) se colocaron en botellas, las cuales se almacenaron en una incubadora a 25 °C con una humedad relativa entre el 60-70%. Durante la mañana de cada día se realizó un enjuague, el cual consistía en agregar un volumen de agua destilada estéril 10 veces mayor a su peso y luego retirar el agua. Esto ayudó a mantener la humedad en los germinados.

Muestreo y análisis microbiológico.

El muestreo para el primer día del experimento consistió en tomar dos muestras de 10 gramos, pertenecientes de los frascos que estuvieron en remojo antes del tratamiento. Las muestras fueron colocadas en frascos de muestreo con 90 ml de agua peptonada al 0.1%, para ser procesadas en el homogeneizador (Omni Tissue Homogenizer) por 1-2 min. Ya homogenizada la muestra, se prosiguió a tomar 400 μL , 200 μL , 100 μL , se colocaron en platos de Agar Oxford (Cuadro 1) previamente preparados y se realizó la siembra por superficie. Después de aplicar el tratamiento por 10 min, se tomaron dos muestras de semillas de cada tratamiento (dióxido de cloro y agua destilada), a las cuales se les realizó el procedimiento previamente descrito. Se incubaron los platos por 18- 24 horas a 37 °C.

Para el segundo día, se esterilizaron 34 botellas de las cuales 18 se enumeraron y rotularon con el nombre de D/W (agua destilada). Los 16 restantes se enumeraron y rotularon con el nombre de ClO₂, para indicar el respectivo tratamiento que recibieron. A cada botella se le agregó 10 gramos de germinados de acuerdo al tratamiento recibido el día anterior. A partir de ese día hasta el día cinco se tomaron dos muestras de cada tratamiento para ser procesadas antes y después de ser tratadas. Muestras de 10 gramos y con un volumen de 90 ml de agua peptonada al 0.1%. Se realizaron las respectivas diluciones y siembra por superficie con 0.1 ml. Después del muestreo rutinario en el día cinco, se tomaron dos botellas con rotulación de D/W, una de ellas fue tratada con ClO₂ por 10 minutos. Los germinados de ambas botellas fueron separados en tallo, hoja y raíz, para ser homogenizados con agua peptonada al 0.1% teniendo una proporción de 1:20. De igual manera se realizaron diluciones y siembra por superficie en agar Oxford con 0.1ml. Se incubaron los platos a 37 °C por 18- 24 horas.

Cuadro 1. Formulación del agar selectivo para *Listeria* (Agar Oxford).

Formula	gramos/litro
Base de agar sangre (Columbia)	39
Esculina	1
Citrato férrico amónico	0.5
Cloruro de Litio	15
Agar	2

Fuente: Acumedia 2013

Diseño experimental y análisis estadístico.

En este estudio se utilizó un diseño Completamente al Azar con medidas repetidas en tiempo y se realizó una separación de medias Duncan. Estos análisis se realizaron para determinar si hay diferencia estadística entre el tratamiento de dióxido de cloro y el control (agua destilada) en el crecimiento de las bacterias. Se establecieron tres repeticiones por tratamiento y se realizaron duplicados de muestras. El modelo lineal se indica en la ecuación 2.

$$Y_{ij} = \mu + TRT + Time_{ij} + TrT*Time + E_{ij} \quad [2]$$

En cada botella hay 10 gramos de semillas, las unidades experimentales serán 34 botellas. De esas 34 botellas, 16 tratadas con ClO₂ (3 ppm), 18 tratadas con agua destilada (control). Las variables independientes son ClO₂ (3 ppm durante 10 min), agua destilada, el tiempo entre el enjuague y el tratamiento, y las partes de las plantas (raíz, tallo, hojas). La variable dependiente es el recuento de colonias (UFC/g). Para la distribución de la planta el diseño utilizado fue un diseño de Bloques Completos al Azar con una separación de medias Tukey. Los bloques son hojas, raíces, tallos y los tratamientos son agua destilada y ClO₂ (Lyman y Longnecker 2010). El modelo lineal se indican en la ecuación 3.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij} \quad [3]$$

Curvas de crecimiento.

Se realizaron curvas de crecimiento mediante el programa en línea Combase con complemento DMFit en Excel. Se insertaron las medias obtenidas de los resultados después del tratamiento, junto con su respectiva cantidad de horas. Luego se prosiguió a analizar las curvas de crecimiento del control y con tratamiento de dióxido de cloro.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los germinados de alfalfa fueron tratados durante cinco días consecutivos con dióxido de cloro (ClO₂) a 3 ppm y con agua destilada (control), no tuvieron diferencia significativa (P < 0.05). En el cuadro 2, se muestra un resumen del experimento con su respectiva media y desviación estándar en cada día y tratamiento. Podemos inferir observando el cuadro 2 que el dióxido de cloro con el agua tiene la misma capacidad reductora. Han *et al.* en el 2001 realizaron un estudio el cual consistió en tratar pimientos con dióxido de cloro en su forma gaseosa y líquida (3 ppm). Los pimientos fueron inoculados con *Listeria monocytogenes*, estos eran enteros sin ninguna herida y los demás se encontraban con heridas en la superficie. Para el estudio se realizó un control de tratamiento con agua destilada. Los resultados mostraron que el dióxido de cloro suministrado en forma gaseosa, obtuvo la mayor reducción con 3.05 log. Mientras que el dióxido de cloro líquido logro una reducción de 0.54 log y el agua destilada 0.51 log. En el agua y el dióxido de cloro no existió una diferencia significativa. La literatura reportada por Han *et al.* (2001), concuerda con los resultados obtenido en este estudio con germinados de alfalfa; de tal forma que el dióxido de cloro y el agua tuvieron el mismo efecto y las reducciones oscilaron entre 0.35 log para agua destilada y 0.38 log para el dióxido de cloro.

En el cuadro 2 se detalla la concentración inicial del día uno que fue de 2.90 log ufc/g, al día siguiente este incrementó su número por casi 3 log, después de haber sido tratados el día anterior. El aumento de número de las bacterias se dio debido a las condiciones en las cuales los germinados crecen, estos fueron puestos en una incubadora a 25 °C con una humedad relativa entre el 60 y 70%. Además de estas condiciones los germinados cuentan con una gran cantidad de nutrientes, favoreciendo la multiplicación acelerada de *Listeria*. Al hacer la comparación de cada día después de tratamiento con dióxido de cloro y agua destilada, se puede determinar que las diferencias son mínimas y no significativas (P > 0.05).

Cuadro 2. Recuentos de *Listeria monocytogenes* durante la germinación de semillas de alfalfa inoculadas y desinfectadas con agua destilada y dióxido de cloro (3 ppm).

Día	Log UFC/g [‡]		Log UFC/g [‡]	
	Agua destilada		Dióxido de Cloro	
	Antes	Después	Antes	Después
1	2.90 ± 0.49	2.64 ± 0.79	2.90 ± 0.49	2.48 ± 1.15
2	6.14 ± 0.58	5.99 ± 0.28	5.97 ± 0.32	5.80 ± 0.31
3	7.14 ± 0.14	6.66 ± 0.46	7.29 ± 0.23	6.69 ± 0.39
4	7.33 ± 0.36	7.12 ± 0.37	7.31 ± 0.63	7.05 ± 0.36
5	7.30 ± 0.82	6.65 ± 0.93	7.16 ± 0.68	6.69 ± 0.81

[‡] No hay diferencias significativas entre tratamientos y días de muestreo (P > 0.05)
Los resultados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

El objetivo de tratar los germinados todos los días es lograr una mayor reducción, sin embargo, el microorganismo incrementó en el número de células por día. En el día 4, empieza a haber una pequeña reducción, debido a esto se infiere que pudo haber sido ocasionada por una disminución de nutrientes. Se recomienda hacer un estudio en el cual se haga un conteo bacteriano en días posteriores al quinto día y de esta manera confirmar si existe un declive en el número de bacterias.

Las bacterias se adhieren a la superficie de las frutas y vegetales y a medida que pasa el tiempo estas van incrementando su número. Ijabadeniyi *et al.* (2010) realizaron una investigación, cuyo objetivo era medir la adherencia de *Listeria monocytogenes* en la superficie de tomates y espinaca durante de 30 min, 24, 48 y 72 horas. Después de 24 horas los resultados fueron de 3.81 log UFC/tomate, a las 72 horas se obtuvo la mayor cantidad de bacterias con 4.78 log UFC/tomate. En la espinaca se encontró que de igual manera que en el tomate la bacteria tiene la misma capacidad de adhesión. Los investigadores determinaron que *Listeria monocytogenes* es capaz de adherirse a la superficie en 30 min al estar en contacto con el vegetal.

Todas las plantas poseen una recubierta, la cual en las primeras etapas de desarrollo es conocida como procutícula y con el paso del tiempo se convertirá en cutícula. Esta provee protección a la planta reduciendo la pérdida de agua y difusión de gases (Tafolla *et al.* 2012). Se infiere que debido a la procutícula que poseen los germinados, la penetración del dióxido de cloro a 3 ppm en 10 minutos es baja, ya que esta actúa como barrera y el tiempo de exposición es corto. El dióxido de cloro tiene un mejor efecto en su fase gaseosa que acuosa, esto se debe a que el gas es capaz de penetrar la capa exterior de las plantas (Han *et al.* 2001).

La concentración de dióxido de cloro es un factor importante para la reducción de un patógeno, en este caso la reducción de *Listeria monocytogenes*. En este estudio se analizó la reducción a 3 ppm, sin embargo, hay estudios que se han realizado con concentraciones más altas y en otros productos frescos. Keskinen *et al.* (2009), evaluaron la eficiencia de diferentes desinfectantes tales como el cloro, dióxido de cloro y agua ácida electrolizada en la desinfección de lechuga. El dióxido de cloro fue utilizado a 100 y 200 ppm, este fue el más efectivo al reducir *E. coli* O157:H7 al reducir 1 log UFC/g. Sin embargo, el desinfectante a esas concentraciones afectó la coloración de las hojas de la lechuga, disminuyendo su color. Keskinen *et al.* (2009), sugieren que la reducción de un microorganismo depende de cómo se encuentre la superficie del alimento y no solo del desinfectante. Ya que si la superficie se encuentra con una fisura la bacteria entrara en esta. Las estomas, tricomas, cortes en las orillas y daños en el tejido de la hoja son lugares de difícil acceso para los desinfectantes, por lo tanto, se encuentra ahí la mayor concentración de bacteria.

Taorima y Beuchat (1998), utilizaron diferentes tratamientos en semillas de alfalfa para reducir *E. coli* O157:H7. Entre los desinfectantes utilizados estaba el dióxido de cloro acidificado a 500 ppm. Los tratamientos fueron agregados directamente a las semillas para luego producir los germinados. Este obtuvo reducciones de 2 log UFC/g, sin embargo, se vio afectado el porcentaje de germinación, lo que se atribuye al pH del desinfectante pues este se encontraba en 2.9 ± 0.3 .

En la segunda parte del experimento se separó el germinado en hoja, tallo y raíz. En el cuadro 3 se muestran los resultados antes y después de tratamiento. No se encontró diferencia significativa entre las diferentes partes la planta. Las bacterias se encuentran equitativamente en todo el germinado. Sin embargo, se encontró una diferencia significativa antes y después del tratamiento de dióxido de cloro, cabe recalcar que estos fueron tratados con agua destilada durante cuatro días y en el quinto día se aplicó el tratamiento.

Cuadro 3. Distribución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en semillas de alfalfa inoculadas, germinadas y desinfectadas con dióxido de cloro (3 ppm).

Parte del germinado	Log UFC/g [‡] germinado sin tratar	Log UFC/g [‡] germinado tratado con ClO ₂	Reducción [‡]
Raíz	7.96 ± 0.99 ^A	7.18 ± 0.06 ^B	83.40%
Tallo	7.85 ± 0.90 ^A	7.16 ± 0.37 ^B	79.58%
Hoja	7.73 ± 0.44 ^A	7.21 ± 0.61 ^B	69.80%

Los resultados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

[‡] No hay diferencias significativas entre secciones del germinado (P>0.05).

^{AB} Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

[‡] % Reducción = [1 - (UFC/g del tratamiento/UFC/g del control)] × 100

La supervivencia de *L. monocytogenes* en germinados de alfalfa fue evaluada por Palmi y Buchanan (2002), quienes determinaron que dicha bacteria es capaz de proliferarse en 24 horas y alcanzar un número elevado de células, en condiciones de germinación (≥ 30 °C). Después de dos días, los germinados fueron almacenados a 4 °C durante 7 días para evaluar el comportamiento de *Listeria*. Los resultados mostraron que la bacteria mantuvo su número de células durante el tiempo determinado. Los procesos de germinación de semillas son un alto riesgo de contaminación, debido a las condiciones provistas para las semillas que son de igual manera ideales para las bacterias.

DMFit es un complemento de Excel, que sirve para realizar curvas de crecimiento de los microorganismos, basado en conteos de log UFC y tiempo (horas). Mediante este complemento se puede obtener tasa de crecimiento, fases de crecimiento, número población de máxima y mínima esperada. En la investigación se hizo uso de esta herramienta para observar el comportamiento del patógeno bajo tratamiento de dióxido de cloro en comparación con el control. En la figura 1 se observa la curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* siendo tratada únicamente con agua destilada (control). De acuerdo con el programa DMFit, se determinó que la población mínima de microorganismo fue de 2.643 log CFU/g (conteo del día uno) y su población máxima fue de 7.121 log ufc/g (conteo a las 72 horas). La curva obtuvo un R-cuadrado de 0.978, por lo tanto, el 97.8% de nuestros datos se ajustaron al modelo. La tasa de crecimiento es de 0.1421 h⁻¹, siendo la velocidad de crecimiento de la bacteria.

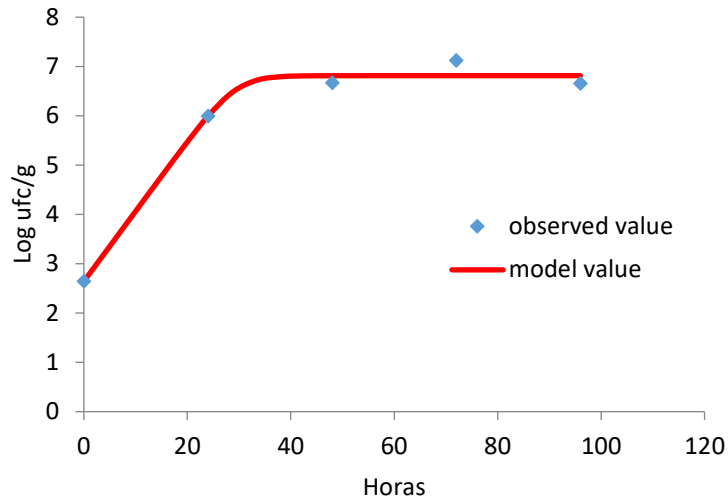


Figura 1. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en germinados de alfalfa, tratados con agua destilada (control).

Para la curva de crecimiento que corresponde al tratamiento de dióxido de cloro (figura 2), la población mínima de microorganismo fue de 2.482 log UFC/g (conteo del día uno) y su población máxima fue de 7.05 log UFC/g (conteo a las 72 horas). La curva obtuvo un R-cuadrado de 0.987, por lo tanto, el 98.7% de nuestros datos se ajustaron al modelo. La tasa de crecimiento es de 0.140 h⁻¹. Ambas curvas de crecimiento obtuvieron resultados parecidos, teniendo poca variación entre un tratamiento y otro.

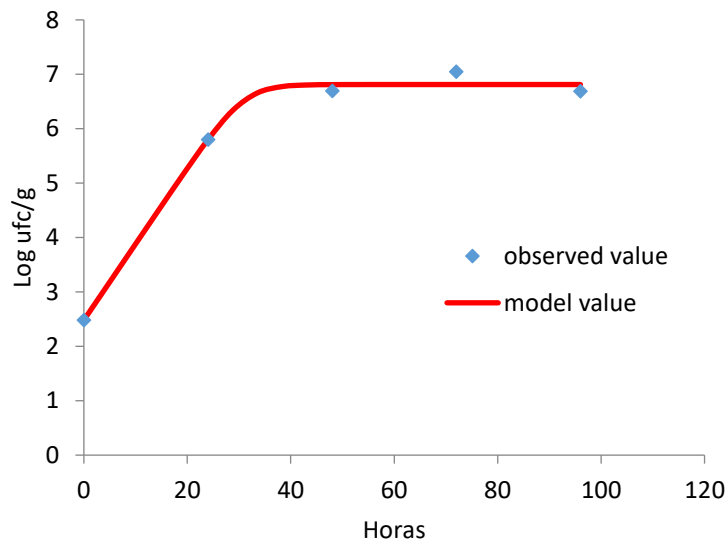


Figura 2. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en germinados de alfalfa, tratados con dióxido de cloro a 3 ppm.

En un estudio realizado por Wu y Kim (2007), se comparó la concentración de dióxido de cloro en solución y fue puesta en arándanos, así mismo, se midió sin el fruto. Las concentraciones iniciales fueron de 1, 3, 5, 10 y 15 ppm en 24 horas. Los resultados mostraron que en 24 h la solución con arándanos que contenía las concentraciones de 1-5 ppm se degradó por completo. Concluyendo que el dióxido de cloro se degrada en presencia de materia orgánica. Por lo tanto, se recomienda realizar estudios en los cuales se describa la relación entre la materia orgánica y el dióxido de cloro, como esta afecta el cloro hasta degradarlo por completo. En el mismo estudio se analizó el efecto del desinfectante en las mismas concentraciones para reducir hongos, levaduras y cinco patógenos; con tiempos de 10 s, 1, 5, 10, 20 y 30 min; 1 y 2 horas. La investigación demostró que el dióxido de cloro tiene una mejor eficiencia al reducir *Listeria monocytogenes*, 4.88 log UFC/g de reducción con 2 horas de tratamiento a 15 ppm. Se concluyó que es más eficiente utilizar concentraciones altas durante un periodo mayor de tiempo que utilizar concentraciones bajas en un corto tiempo.

Para el estudio realizado con germinados de alfalfa tratados a 3 ppm se recomienda que se haga una medición del dióxido de cloro después de 10 min de tratamiento, con el fin de identificar una reducción en la concentración del dióxido de cloro. De esta manera hacer una relación entre el efecto del dióxido de cloro y el agua destilada en los 10 minutos de tratamiento.

La capacidad de adherencia de los microorganismos en las diferentes superficies de los alimentos está en constante estudio. La adherencia de los microorganismos en los alimentos depende de la bacteria y del tiempo de contacto con la superficie. Garrood *et al.* (2004) determinaron que entre más tiempo esté en contacto una bacteria con la superficie más células se van a adherir. En su estudio se compara la capacidad de adhesión y separación de la superficie, entre *Listeria monocytogenes*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas fluorescens*. Se concluyó que *Listeria monocytogenes* fue la más fácil en ser removida de la superficie de tejidos de papa a 10 °C, en cuestión de 2 minutos. Sin embargo, al pasar el tiempo esta se mantuvo constante. Se recomienda realizar un estudio en el cual se evalué si la adhesión está relacionada con que las bacterias sean Gram positivas o Gram negativas. Así mismo, determinar si hay algo en su pared celular que les permita tener una mayor adhesión a la superficie.

Al momento de comparar el estudio anterior con esta investigación podemos inferir que *Listeria* fue solamente removida de la superficie. La separación de la superficie del germinado y la bacteria fue realizada de igual manera por el desinfectante (dióxido de cloro) y el agua. Los germinados estuvieron en contacto con la bacteria durante 5 días lo cual no indica que al tener mayor tiempo de contacto una mayor proporción de la bacteria se adhirió hasta llegar a una adhesión fuerte a lo largo de los días.

Los germinados de alfalfa estuvieron en una incubadora a 25 °C durante los 5 días. En el estudio realizado por Gorski *et al.* (2003) evaluaron la adhesión de *Listeria monocytogenes* en tejidos de rábano a diferentes temperaturas, las temperaturas utilizadas fueron de 10, 20, 30 y 37 °C. La mayor adhesión ocurrió en temperaturas entre 20 y 30 °C. Además de la temperatura, se evaluó el tiempo (0, 1, 2, 4 y 24 horas). Entre más tiempo estaba en contacto la bacteria con la superficie del tejido, en temperaturas de 20 y 30 °C, mayor era el número

de células adheridas. La temperatura es un factor importante que ayuda a regular la virulencia y genes ambientales en *Listeria monocytogenes*. En el estudio se demostró que la temperatura sí tuvo un efecto en la adhesión de la bacteria en la superficie. Gorski *et al.* (2003) sugieren que una posible explicación para esto es que a 37 °C la motilidad y la biosíntesis flagelar son afectadas negativamente, por lo tanto, no son capaces de moverse y adherirse a una mayor superficie. Se infiere que *Listeria monocytogenes* tiene un mayor poder de adhesión y movilidad entre temperaturas de 20 y 30 °C, haciendo más difícil su remoción por el dióxido de cloro utilizado.

4. CONCLUSIONES

- El dióxido de cloro en concentraciones de 3 ppm es capaz de reducir los niveles de *Listeria monocytogenes* al igual que el enjuague con agua destilada.
- *Listeria monocytogenes* se distribuye equitativamente en todo el germinado, por lo tanto, no tiene efecto significativo retirar alguna de las partes.
- *Listeria monocytogenes* incrementa 1 log cada 7 horas en condiciones de germinación.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la eficiencia del dióxido de cloro gasificado a 3 ppm para reducir los niveles de *Listeria monocytogenes* en germinados.
- Realizar un estudio en el cual se haga un lavado frecuente con agua destilada y medir los niveles de *Listeria monocytogenes* después de cada lavado con el propósito de buscar una reducción de *Listeria*.
- Eliminar el proceso de cortado de los germinados.
- Realizar muestreos de las semillas antes de la germinación y de esta manera realizar un control preventivo para cualquier posible patógeno.
- Medir la concentración del dióxido de cloro después de los 10 minutos de tratamiento.

6. LITERATURA CITADA

Acumedia. 2013. Oxford *Listeria* agar base. [consultado 2018 jun 10] http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7428_pi.pdf

Barrón MR, Villanueva C, García MR, Colinas MT. 2009. Valor nutricional y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), canola (*Brassica napus* L.) y amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson syn. *Hypochondriacus* L.). Revista Chapingo. 15(3):237-243.[consultado 2018 may 09] <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=>

Berrang ME, Brackett RE, Beuchat LR. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. J Food Prot. 52 (10): 702–705. DOI: 10.4315/0362-028X-52.10.702.

CDC (Centers for disease control and prevention). 2016. *Listeria* (Listeriosis). Estados Unidos de América. [consultado 2018 mar 7] <https://www.cdc.gov/listeria/technical.html>

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2017. People at risk | *Listeria* | CDC. US Department of Health & Human Services. Estados Unidos de América. [consultado 2018 mar 11] <https://www.cdc.gov/listeria/risk.html>

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2018. List of selected multistate foodborne outbreak investigation. Estados Unidos de América.[consultado 2018 may 11] <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>

Clark M. 2018. Food borne illness database. [consultado 2018 may 11] <http://www.outbreakdatabase.com/search/?vehicle=sprout>

Farber J, Peterkin P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews [consultado 2018 may 10] 55(3): 476-511. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372831/pdf/microrev00034-0152.pdf>

FDA (Food and Drug Administration) 2017. Code of Federal Regulations. Title 21 Food and drugs. Part 173. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption, chlorine dioxide [consultado 2018 ene 31]. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.300>

FDA (Food and Drug Administration). 2018. Seguridad alimentaria para futuras mamás: durante el embarazo - *Listeria*. [consultado 2018 may 10] <https://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm083476.htm>

Flynn D. 2018. South Africa's processed meats blamed in *Listeria* outbreak. Food safety news. [consultado 2018 may 9] <http://www.foodsafetynews.com/2018/03/south-africas-processed-meats-blamed-in-deadly-listeria-outbreak/#.WqX212rOXIU>

Garrood MJ, Wilson PDG, Brocklehurst TF. 2004. Modeling the rate of attachment of *Listeria monocytogenes*, *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens* to, and the probability of their detachment from, potato tissue at 10°C. Applied and Environmental Microbiology. 70(6):3558-3565

Gorski L, Palumbo JD, Mandrell RE. 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. Applied and environmental Microbiology. 69(1): 258-266

Han Y, Linton RH, Nielsen SS, Nelson PE. 2001. Reduction of *Listeria monocytogenes* on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7°C. J Food Prot. 64(11): 1730-1738 [consultado 2018 jun 05] <http://www.jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-64.11.1730?code=fopr-site>

Ijabadeniyi OA, Minnaar A, Buys EM. 2010. Effect of attachment time followed by chlorine washing on the survival of inoculated *Listeria monocytogenes* on tomatoes and spinach. J Food Qual. 34(2):133-141

Keskinen LA, Burke A, Annous BA. 2009. Efficacy of chlorine acid electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. International Journal of Food Microbiology. 132(2-3):134-140

Kim Y, Kim M, Bin K. 2009. Combined treatment of fumaric acid with aqueous chlorine dioxide or UV-C irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* inoculated on alfalfa and clover sprouts. Food Science and Technology. 42(10):1654-1658.

Lyman R., Longnecker M. 2010. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 6th ed. Collage Station (United States of America): Brooks/Cole ISBN-13: 978-0-495-01758-5 [accessed 2018 February 14] http://www.univpgri-palembang.ac.id/perpus-fkip/Perpustakaan/Metodologi/Lyman_Ott%2C_Michael_Longnecker-An_Introduction

Newgent J. 2015. Are sprouts safe to eat. Academy of nutrition and dietetics. [consultado 2018 mar 11] <https://www.eatright.org/homefoodsafety/safety-tips/food/are-sprouts-safe-to-eat>

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2016. Peligros biológicos. [consultado 2018 mar 10] https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=

Palmai M, Buchanan RL. 2002. Growth of *Listeria monocytogenes* during germination of alfalfa sprouts. Food Microbiology. 19(2-3): 195-200

PubChem. 2005. Chlorine dioxide [consultado 2018 mar 6] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorine_dioxide#section=Top

Ryser ET, Marth EH. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. J Dairy 72 (4): 838–853. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79176-1.

Schrader W. 2002. University of California. Sprout production in California. ISBN 978-1-60107-238-2.[consultado 2018 mar10] <http://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8060.pdf>

Singh N, Singh RK, Bhunia AK. 2002. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. Food Science and Technology. 32(2):235-243 doi:10.1016/S0023-6438(02)00224-4

Tafolla JC, González A, Tiznado ME, García LZ, Báez R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. Revista Chapingo. 36(1): 3-12 [consultado 2018 jun 11] http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-7

Taorima PJ, Beuchat LR. 1998. Comparison of chemical treatments to eliminate Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. J Food Prot. 62(4):318-324. <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-62.4.318>

Wu V, Kim B. 2007. Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeast and molds on blueberries. Food Microbiology. 24(7-8): 794-800 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.010>

7. ANEXOS

Anexo 1. Resumen del análisis estadístico para la distribución de partes del germinado de alfalfa (hoja, tallo y raíz) inoculado con *Listeria monocytogenes*, tratados al quinto día con dióxido de cloro a 3 ppm durante 10 min.

Source	F Value	Pr > F	R-Square	Coeff Var
PART	0.05	0.9472	0.617731	6.915731
TRT	7.35	0.0219		
REP	4.26	0.0458		
PART*TRT	0.09	0.9152		

Anexo 2. Tabla resumen del análisis estadístico para germinados de alfalfa inoculados con *Listeria monocytogenes* y tratados con agua destilada (control) y dióxido de cloro a 3ppm.

Day	Source	Pr > F	R- Square	Coeff Var	Growth mean
1	TRT	0.8765	0.251818	30.01543	2.703267
	REP	0.3492			
	TRT*REP	0.2705			
2	TRT	0.5711	0.212768	6.731181	5.969565
	REP	0.7557			
	TRT*REP	0.6093			
3	TRT	0.0121	0.523076	4.999526	6.950000
	REP	0.6284			
	TRT*REP	0.5414			
4	TRT	0.7041	0.109593	6.831486	7.202917
	REP	0.8993			
	TRT*REP	0.9110			
5	TRT	0.4820	0.272076	12.34307	6.946667
	REP	0.3371			
	TRT*REP	0.8765			