

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE SEMILLAS GERMINADAS DE

Phaseolus vulgaris

Rita Cava, Elba Sangronis, Marta Rodríguez y Jhoana Colina

RESUMEN

Las semillas germinadas tienen un valor nutricional mejorado pero han sido involucradas en muchos brotes infecciosos ocasionados por productos alimenticios. En este estudio se realizó el recuento de bacterias aerobias, coliformes totales, *Escherichia coli*, levaduras y mohos en semillas sin germinar y germinadas de dos variedades de *Phaseolus vulgaris*. Adicionalmente se hizo la enumeración de *Bacillus cereus* en las semillas germinadas. También se investigó la presencia de *Salmonella spp.*, *Listeria*

monocytogenes y *E. coli O157:H7*. La población de aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras incrementó en las semillas germinadas con respecto a las semillas sin germinar en las dos variedades de *P. vulgaris*. No se detectó la presencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes* o *E. coli O157:H7* en las semillas de *Phaseolus* sin germinar ni en las germinadas. Se observaron altos recuentos de *B. cereus*, lo cual representa un riesgo a la salud de los consumidores.

Introducción

En los últimos años, la producción y consumo de semillas germinadas se ha incrementado a nivel mundial. Solo en Corea, la producción de guisantes germinados está en el orden de 179 billones ton/año (Lee *et al.*, 2007). La ventaja adicional de una semilla germinada es su calidad nutricional mejorada; se ha observado un incremento en la biodisponibilidad de proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, carbohidratos y minerales tales como Ca, Fe y Mg (Sangronis y Machado, 2007). A pesar de estas ventajas, la ingesta de germinados puede representar un riesgo para la salud, ya que se han visto involucrados en brotes asociados a enfermedades transmitidas por alimentos. La Administración de Drogas y Alimentos de los EEUU (FDA, por sus siglas en inglés) ha reportado que en el periodo 1999-2005, el 40% del total de las enfermedades

transmitidas por alimentos estaban relacionados con semillas germinadas (Powel, 2005). También han sido reportados brotes en Japón, Finlandia, Dinamarca, Suiza y Canadá con alfalfa, rábano y judías germinados (Prokopowich y Blank, 1991; Honish y Nguyen, 2001).

La microbiota característica de los granos germinados puede ocasionalmente contener bacterias patógenas. *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* y *Escherichia coli O157:H7* han sido aislados de semillas germinadas, incluyendo alfalfa, judías, berro, rábano, soya y mostaza (Taormina y Beuchat, 1999; Beuchat, 1996; Aabo y Baggesen, 1997). El origen de la contaminación puede variar. El agua de la irrigación, la manipulación inadecuada de los agricultores que dañan la estructura de la semilla y la hacen más susceptibles a la contaminación son algunas

causas de contaminación. Se ha observado que algunos de los microorganismos patógenos pueden sobrevivir dentro de las semillas durante un largo tiempo (Moline y Kulik, 1997). Las condiciones asociadas al proceso de germinación, tales como la alta humedad de la semilla y el ambiente, la temperatura, un pH cercano a la neutralidad, la disponibilidad de carbohidratos y otros nutrientes, favorecen el crecimiento de las bacterias que se encuentran dentro o fuera de la semilla (Buck *et al.*, 2003).

En muchos casos la detección de patógenos es difícil por su distribución desigual en la totalidad de las semillas, o por una extracción inadecuada del microorganismo en estudio de la muestra. La cubierta externa de las semillas puede tener un efecto protector para el crecimiento de algunas bacterias (Charkowski *et al.*, 2001). Se ha observado contaminación cruzada entre las mismas semillas de un mismo lote (Patterson y Wo-

odburn, 1980). El agua utilizada para mantener la humedad de los germinados también puede ser una fuente de contaminación (Hara-Kudo *et al.*, 1997).

Las buenas prácticas de saneamiento son necesarias como un procedimiento de operación estándar, a fin de proteger contra la contaminación en todas las etapas del proceso de producción de germinados (FDA, 1999). Varios métodos se han recomendado para reducir o eliminar las bacterias patógenas en los germinados. El uso de agua clorada, desinfectantes, radiación, calor y altas presiones son efectivos (Gandhi y Matthews, 2003; Peñas *et al.*, 2008); sin embargo, hasta ahora, no hay procedimiento que sea capaz de eliminar totalmente a los patógenos bajo las condiciones experimentales utilizadas (NACMCF, 1999).

En los países desarrollados, así como en África, Asia y Latinoamérica, las leguminosas son importantes componentes de la

PALABRAS CLAVE / Germinados / Leguminosas / *Phaseolus* blancas / *Phaseolus* negras /

Recibido: 28/01/2009. Modificado: 02/11/2009. Aceptado: 04/11/2009.

Rita Cava. Licenciada en Ciencias Biológicas y Estudiante de Doctorado, Universidad de Murcia, España. M.Sc. en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela.

Elba Sangronis. Farmacéutica, UCV, Venezuela. M.Sc. en

Ciencia de los Alimentos, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. Ph.D. en Ciencia de los Alimentos, Washington State University, EEUU. Profesora, USB, Venezuela. Dirección: Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Edif. Au-

las. Piso 3. Ofic. 316B. USB. Sartenejas, Baruta. Apartado 89000. Caracas, Venezuela. e-mail: esangron@usb.ve.

Marta Rodríguez. Licenciada en Biología y M.Sc. en Ciencia de los Alimentos, (USB), Venezuela.

Jhoana Colina. Ingeniera Química, Universidad Nacional Experimental Politécnica "Antonio José de Sucre", Venezuela. M.Sc. en Ciencia de los Alimentos, USB, Venezuela. Profesora, USB, Venezuela.

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF GERMINATED SEED OF *Phaseolus vulgaris*

Rita Cava, Elba Sangronis, Marta Rodríguez and Jhoana Colina

SUMMARY

Sprouts have an improved nutritional value but have been involved in many foodborne infectious outbreaks. Aerobic bacteria, coliforms, generic *Escherichia coli*, yeasts and moulds were counted in dry seeds and in sprouts of two varieties of *Phaseolus vulgaris*. *Bacillus cereus* was counted in sprouts. The presence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, and *E. coli* O157:H7

was investigated. Populations of aerobic mesophiles, coliforms, moulds and yeasts increased in the sprouts with respect to the dry seeds in the two varieties of *P. vulgaris*. The presence of *Salmonella*, *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 was not detected in the dry beans nor in sprouts. However, high counts of *B. cereus* were obtained, which represents a health risk.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SEMENTES GERMINADAS DE *Phaseolus vulgaris*

Rita Cava, Elba Sangronis, Marta Rodríguez e Jhoana Colina

RESUMO

As sementes germinadas têm um valor nutricional melhorado mastem sido envolvidas em muitos surtos infecciosos ocasionados por productos alimentícios. Neste estudo se realizou a contagem de bactérias aeróbias, coliformes totais, *Escherichia coli*, leveduras e mofo em sementes sem germinar e germinadas de duas variedades de *Phaseolus vulgaris*. Adicionalmente foi realizada a enumeração de *Bacillus cereus* nas sementes germinadas. Também foi investigada a presença de *Salmonella* spp, *Listeria*

monocytogenes e *E. coli* O157:H7. A população de aeróbios mesófilos, coliformes totais, mofo e leveduras incrementou nas sementes germinadas em relação às sementes sem germinar nas duas variedades de *P. vulgaris*. Não foi detectada a presença de *Salmonella*, *L. monocytogenes* o *E. coli* O157:H7 nas sementes de *Phaseolus* sem germinar nem nas germinadas. Observaram-se altas recontagens de *B. cereus*, o qual representa um risco à saúde dos consumidores.

dieta del hombre, por ser una valiosa fuente de proteína que complementa la de los cereales (Heiser, 1995), siendo *Phaseolus vulgaris* la leguminosa más consumida en Latinoamérica y África (Sangronis *et al.*, 2004). En Venezuela se le denomina "caraota negra" al *P. vulgaris* y es un producto de alto consumo en todos los estratos socioeconómicos (Quintana, 2001), formando parte importante de los hábitos alimenticios de la población, y representan 52-58% de las leguminosas consumidas.

Dado los beneficios de la germinación y la alta aceptabilidad del *Phaseolus*, resulta interesante explorar otras formas de consumo a fin de diversificar su uso e incentivar su producción, pero sin olvidar que al introducir nuevos procesos, la salud del consumidor pudiera estar comprometida. El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad microbiológica de semillas germinadas de dos variedades de *P. vulgaris*.

Materiales y Métodos

Muestras

Se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* v. Tacari-

gua, las cuales son de color negro, y *P. vulgaris* v. Canadian: Matterhorn, de color blanco, suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Venezuela. Comúnmente, en Venezuela las semillas del género *Phaseolus* son conocidas como caraotas. Las seleccionadas fueron consideradas variedades puras.

Germinación

Las semillas de *Phaseolus* fueron enjuagadas con agua, desinfectadas por remojo en una solución de hipoclorito de sodio 2% y nuevamente lavadas. Las semillas saneadas se remojaron en agua potable en una relación 1:3 (p/v) durante 6h y luego se extendieron sobre bandejas previamente lavadas y desinfectadas en una capa de ~3cm de espesor y germinadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ a la luz del día en un ambiente con humedad relativa de $78 \pm 4\%$ durante 5 días. Las semillas fueron rociadas diariamente con agua potable. El fondo de las bandejas estaba perforado para permitir que drenara el exceso de agua. En la Figura 1 se muestra el esquema de procesamiento y los análisis realizados a las semillas sin ger-

minar y germinadas. El proceso de germinación fue repetido 5 veces. Con fines comparativos, se analizaron las semillas secas sin germinar.

Análisis microbiológicos

La muestra (25g) se pesó asepticamente en una bolsa estéril con una cantidad apropiada de agua peptonada tamponada (Difco, Detroit, MI, EEUU)

para obtener la dilución 10^{-1} y se homogenizó durante 2min en un Stomacher®. Se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada tamponada al 0,1%, para hacer el recuento de bacterias aerobias mesófilas totales, coliformes totales, *Escherichia coli*, mohos y levaduras en semillas sin germinar y germinadas. Se investigó la presencia de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Se

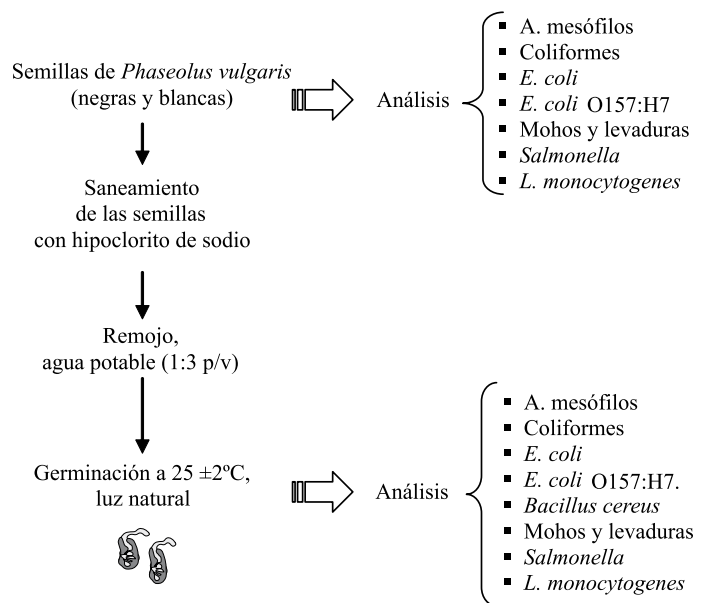


Figura 1. Procesamiento y análisis microbiológicos de los granos de *Phaseolus*.

hizo conteo de *Bacillus cereus* solo en las semillas germinadas. Los análisis se realizaron por duplicado.

Aerobios mesófilos. Se emplearon placas de recuento rápido Petrifilm™ 3M™ (3M, St. Paul, Minn., EEUU) para aerobios mesófilos (APHA, 1998). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24h. Las unidades formadoras de colonias (UFC) típicas de aerobios mesófilos (color rojo) fueron enumeradas usando un contador de colonias Darkfield Quebec® (American Optical Corporation, Buffalo, NY, EEUU).

Coliformes/Escherichia coli. Se utilizaron placas para el recuento rápido de *E. coli*/coliformes Petrifilm™ 3M™ (3M, St. Paul, Minn., EEUU; APHA, 1998). Para los coliformes, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24h y se contaron colonias rojas asociadas a burbujas de gas. Para *E. coli* se incubaron a 37°C durante 48h y se contaron las colonias azules con producción de gas.

Mohos y levaduras. Se utilizaron placas para recuento rápido de mohos y levaduras Petrifilm™ 3M™ (3M, St. Paul, Minn., EEUU; APHA, 1998), y se incubaron a 25°C por 3 a 5 días. Se enumeraron colonias filamentosas verdes con bordes irregulares típicas de mohos y colonias azules con bordes bien definidos como levaduras.

Listeria monocytogenes. Se utilizó la prueba rápida de antígeno-anticuerpo OXOID Listeria Rapid Test FT0401, con dos pasos de enriquecimiento, seguidos por un inmunoensayo con el formato Clearview™ y resultados visibles en 20min. La muestra de 25g fue mezclada con 225ml de caldo Fraser (FB) CM0895, homogeneizada en un Stomacher® durante 2min e incubada a 30°C durante 24h. Luego, 0,1ml de este caldo fue transferido a 10ml del caldo BLEB (*Buffered Listeria Enrichment Broth*, CM0897, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, RU) suplementado (*Selective Enrichment Supplement*, SR0141) e incubado a 30°C durante 21-24h. Se tomaron 2ml

del tope del tubo que contiene el caldo BLEB, se transfirieron a tubos estériles y se calentaron en un baño a 80°C durante 20min, siendo posteriormente enfriados a temperatura ambiente. Sobre el dispositivo con anticuerpos específicos se colocaron 135µl del caldo BLEB, que contiene el antígeno extraído, sobre la ventana de muestra y se esperaron 20min para así evidenciar la presencia presuntiva de *L. monocytogenes* por la aparición de una línea azul en el área de la muestra (reacción positiva antígeno-anticuerpo) que subsecuentemente fue confirmada siguiendo el método de Hitchins (1998).

Salmonella. Se utilizó el kit comercial OXOID *Salmonella* Rapid Test FT0201 diseñado para la detección presuntiva de salmonelas móviles (Andrews y Hammack, 1998). Se hizo un pre-enriquecimiento de 25g de muestra en 225ml de agua peptonada tamponada a 35°C durante 18h, el cual se inoculó en un envase que contenía dos tubos para pruebas rápidas (A y B) y se incubó a 41°C durante 24h. Los tubos contienen en el fondo un medio selectivo para *Salmonella* y en la parte superior un medio indicador, separados entre sí por una membrana porosa. La presencia de *Salmonella* se evidenció por su migración desde la parte más baja a la parte más alta en uno o en ambos tubos, provocando un cambio de color del medio indicador. Las muestras positivas para *Salmonella* fueron confirmadas de acuerdo a la metodología estándar (Andrews y Hammack, 1998).

E. coli O157:H7. Una muestra de 25g fue mezclada con 225ml de caldo de enriquecimiento para enterobacterias (EEB; Difco), homogeneizados en un Stomacher® e incubados a 30°C durante 24h. Posteriormente se realizó una siembra en superficie de 0,1ml de caldo en Agar MacConkey Sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (TC SMAC; Difco) y se incubó a 35-37°C durante 18-24h. Las bacterias fermentadoras del sorbitol aparecen como colonias rosadas en el medio TC

SMAC. Las colonias típicas de *E. coli* O157:H7 son neutras o grises con un punto oscuro en el centro y un diámetro de 1-2mm. Estas colonias se confirmaron empleando la metodología estándar (Feng *et al.*, 1998).

Bacillus cereus. Se utilizó el método de siembra en superficie usando el agar yema de huevo sal polimixina (MYP; APHA, 1998). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24h y las colonias rosadas, rodeadas de una zona turbia indicativa de la producción de la lecitinasa, se consideraron presuntivas de *B. cereus*. Cinco de estas colonias fueron transferidas a agar nutritivo inclinado para la confirmación de *B. cereus* (Rhodehamel y Harmon, 1998).

Análisis estadístico

Se calculó el promedio y la desviación estándar de los resultados de las cinco repeticiones del proceso de germinación. Las muestras se compararon empleando un ANOVA con un nivel de significación de 95%. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 1.4.

Resultados y Discusión

En la Figura 2 se presentan los resultados de los recuentos de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras en semillas sin germinar de *Phaseolus* negras y blancas. Las poblaciones de coliformes y mohos en los granos sin germinar fue-

ron mayores en los granos negros. Los recuentos de aerobios mesófilos de ambas variedades fueron similares a los de semillas de alfalfa (Prokopowich y Blank, 1991), germinados de judías y granos de arroz (Piernas y Giraud, 1997). Las diferencias entre las dos variedades de *Phaseolus* para todos los microorganismos estudiados pueden ser atribuidas al origen de las semillas, suelos contaminados, agua de irrigación, manipulación y almacenamiento inadecuado (NACMCF, 1999). La probabilidad de contaminación se reduce con la aplicación sistemática de las buenas prácticas de la agricultura (BPA) en la producción, acondicionamiento, almacenamiento y transporte de los granos. Las discrepancias observadas entre los recuentos de mohos también pueden estar influenciadas por los valores de actividad de agua (a_w), el cual fue 0,494 para las semillas blancas y 0,650 para las negras. Tales valores previenen el crecimiento de bacterias pero no el de mohos, siendo las especies *Aspergillus* y *Eurotium* algunas de las que causan problemas en productos alimenticios secos (Barckett, 1992).

En las Figuras 3 y 4 se muestran las poblaciones de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras en las semillas negras y blancas, sin germinar y germinadas, respectivamente. Las poblaciones de aerobios mesófilos fueron del orden de $2,10 \times 10^{10}$ UFC/g para los germinados de *Phaseolus* negras y $8,0 \times 10^8$ UFC/g para los de *Phaseolus* blancas, lo cual representa un incremento

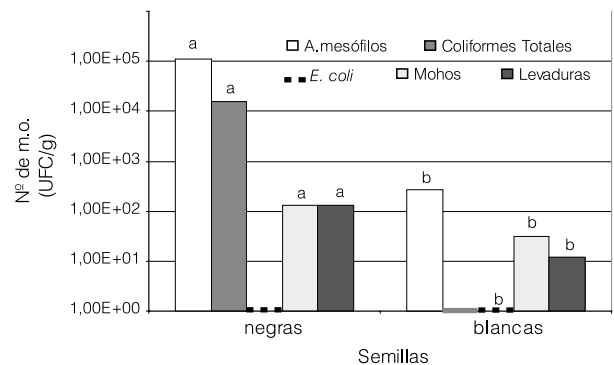


Figura 2. Recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras en semillas sin germinar de *Phaseolus* negras y blancas. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

de 5 y 6 unidades logarítmicas comparados con los granos sin germinar. Un incremento similar ha sido observado en germinados de alfalfa y judías (Prokopowich y Blank, 1991; Fu *et al.*, 2001).

Altos recuentos de aerobios mesófilos en germinados se deben a que los microorganismos se reproducen rápidamente en la superficie del grano por las condiciones favorables provistas por el proceso de germinación. El remojo de las semillas también favorece el incremento del recuento de microorganismos presentes inicialmente. Según Prokopowich y Blank (1991) se ha observado un incremento de 10 veces en el recuento de aerobios mesófilos como efecto del remojo en agua durante la noche. Recuentos mayores a 10^7 UFC/g, límite máximo permitido de acuerdo a las directrices para la manufactura higiénica y venta al por menor de semillas germinadas del Reino Unido (Brown y Oscroft, 1989), revelan una deficiente calidad sanitaria de los granos o del proceso de germinación. La desinfección de los granos secos con una solución al 2% de hipoclorito de sodio disminuye la microbiota natural. Es necesario utilizar en la producción de germinados las buenas prácticas de fabricación (BPF; Gabriel *et al.*, 2007). La combinación de tratamiento con dióxido de cloro y atmósferas modificadas es útil para inhibir la contaminación microbiana y mantener la calidad de semillas germinadas durante el almacenamiento (Jin y Lee, 2007).

En las semillas germinadas no se detectó *E. coli*, lo cual indica la ausencia de contaminación de origen fecal. Altos niveles de la microbiota acompañante puede limitar la detección de *E. coli* cuando sus recuentos son bajos. De acuerdo a Brown y Oscroft (1989), en cinco mues-

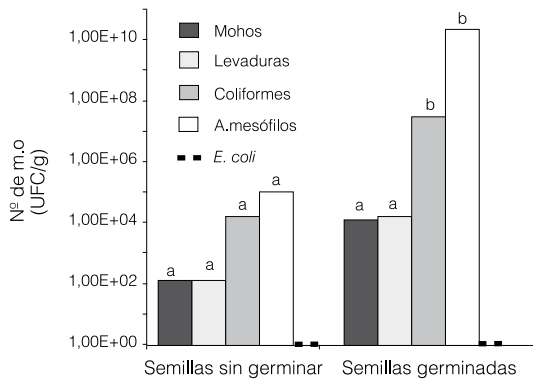


Figura 3. Recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras en semillas sin germinar y germinadas de *Phaseolus* negras. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

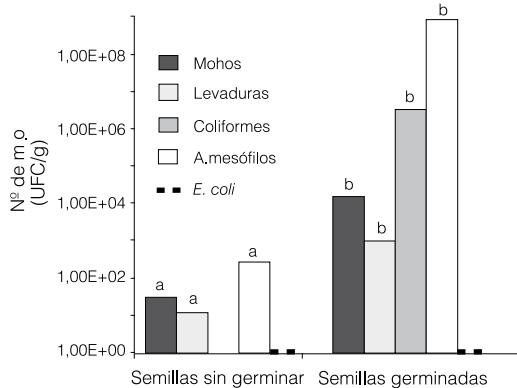


Figura 4. Recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli*, mohos y levaduras en semillas sin germinar y germinadas de *Phaseolus* blancas. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

tras de *Phaseolus* germinadas dos pueden contener un máximo de 10^3 UFC/g de *E. coli* sin que ello represente un riesgo a la salud. En un estudio de la calidad microbiológica de semillas germinadas vendidas al detal se determinó que el 40% de las muestras mostraba una alta incidencia de *E. coli* (Abadías *et al.*, 2008). En las semillas germinadas del *Phaseolus* variedad negra, la población de coliformes totales fue de $3,0 \times 10^7$ UFC/g y en la variedad blanca fue de $3,20 \times 10^6$ UFC/g, lo cual representa un incremento de 5 y 6 unidades logarítmicas, respectivamente, comparado con los granos sin germinar. Este incremento en la población de coliformes es similar a lo reportado en estudios previos (Prokopowich y Blank, 1991; Soylemez *et al.*, 2001). Altos recuentos de coliformes totales no representan un riesgo a la salud, pero debido a su naturaleza fermentativa y

proteolítica, contribuyen a la putrefacción del producto, alteración de las características organolépticas, producción de olores desagradables y disminución de la vida útil (Jay, 1998). Las semillas germinadas de *Phaseolus* negras presentaron una población de mohos de $1,3 \times 10^4$ UFC/g y de levaduras de $1,6 \times 10^4$ UFC/g, que corresponde a un incremento de 1 y 2 ciclos logarítmicos, respectivamente, comparado con los granos sin germinar. Los germinados de *Phaseolus* blancas presentaron poblaciones de mohos y levaduras de $1,5 \times 10^4$ y $1,0 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente, observando un incremento de 3 unidades logarítmicas para ambos microorganismos, comparado con los granos sin germinar. Soylemez *et al.* (2001) reportan que una de las principales causas de deterioro de los germinados de alfalfa es el crecimiento visible de mohos y su consiguiente

olor, modificando sus características sensoriales. Los tratamientos con cloro combinado con empaques perforados son efectivos en la reducción de la población microbiana de mohos y levaduras sobre las semillas y durante la germinación. El recuento de bacterias coliformes totales y fecales, psicrótrofas y mesófilas son comunes en semillas germinadas procesadas mínimamente (Martínez-Villalunga *et al.*, 2008)

Los recuentos de *B. cereus* en las semillas germinadas de *Phaseolus* negras y blancas fueron de $3,5 \times 10^5$ y $1,2 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente, excediendo el límite máximo permitido para germinados, de 10^2 UFC/ml, de acuerdo a las directrices para la manufactura higiénica y venta al por menor de semillas germinadas del Reino Unido (Brown y Oscroft, 1989). La temperatura (25°C) generada durante el proceso de

germinación favorece la activación de las esporas y la multiplicación del microorganismo, lo cual determinó un incremento de *B. cereus* entre 10^3 y 10^7 UFC/g durante la germinación de judías, alfalfa y semillas de trigo (Harmon *et al.*, 1987).

La presencia de *Salmonella* no se detectó en los granos sin germinar ni en los germinados. Este microorganismo es capaz de sobrevivir en semillas deshidratadas debido a su capacidad de resistir la desecación y la baja a_w , y puede incluso penetrar las semillas a través de las fisuras en la cáscara y permanecer durante largos periodos de tiempo sin ser detectado por los métodos tradicionales. En semillas de alfalfa, la *Salmonella* fue capaz de sobrevivir durante varios meses y multiplicarse alcanzando poblaciones de hasta 10^4 UFC/g (Stewart *et al.*, 2001). Abadías *et al.* (2008) encontraron que el 1,3% de las muestras de semillas germinadas vendidas al por menor era positivo para *Salmonella*. Sin embargo, la desinfección de las semillas con soluciones de hipoclorito de calcio (20000ppm) y cloro (100ppm) disminuye el recuento de *Salmonella* (Gandhi y Matthews, 2003).

La presencia de *L. monocytogenes* fue negativa en las dos variedades estudiadas, sin germinar y germinadas. De acuerdo a las directrices para la manufactura higiénica y venta al por menor de semillas germinadas del Reino Unido, el recuento en germinados debe ser $< 10^2$ UFC/g (Prokopowich y Blank, 1991). *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrótrófico y ubicuo, capaz de resistir temperaturas entre 50 y 55°C, y bajos niveles de a_w y pH. Durante la germinación de alfalfa, *L. monocytogenes* fue capaz de proliferar alcanzando niveles alrededor de 10^6 UFC/g en 48h y el recuento permaneció constante cuando los germinados fueron subsecuentemente almacenados a 41°C durante 7 días (Palmai y Buchanan, 2002). En semillas germinadas vendidas al por menor, *L. monocytogenes* fue encontrada en el 0,7% de las muestras (Abadías *et al.*, 2008).

La presencia de *E. coli* O157:H7 fue negativa en las

dos variedades, sin germinar y germinadas. Se ha observado que *E. coli* O157:H7 es capaz de sobrevivir en semillas y multiplicarse en germinados. En semillas de alfalfa se ha observado la capacidad de la *E. coli* O157:H7 de sobrevivir en almacenamiento a 37°C durante 8 semanas (Charkowski *et al.*, 2002).

Conclusión

La germinación de *Phaseolus vulgaris* variedades negra y blanca incrementó significativamente la población de aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras con respecto a las semillas sin germinar. No se detectó la presencia de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en las semillas germinadas, sin embargo, se observaron altos recuentos de *Bacillus cereus*, lo que representa un riesgo a la salud de los consumidores. Adicionalmente, si se considera que los germinados se almacenan en refrigeración por varios días antes de su consumo, podría esperarse que la carga microbiológica aumentara y representar un riesgo a la salud.

REFERENCIAS

- Aabo S, Baggesen D (1997) Growth of *Salmonella* Newport in naturally contaminated alfalfa sprouts and estimation of infectious dose in Sanish *Salmonella* Newport outbreak due to alfalfa sprouts. En *Salmonella and Salmonellosis '97*. Nice, France. pp. 425-426.
- Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I (2008) Microbiological quality of fresh minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 121-129.
- Andrews WH, Hammack TS (1998) *Salmonella*. En *Bacteriological Analytical Manual*. 8ª ed. Cap. 5. Food and Drug Administration. Gaithersburg, MD, EEUU. www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm (Cons. 20/01/2009)
- APHA (1998) *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. Pouch F, Ito K (Eds.) 3ª ed. The American Public Health Association. Washington, DC, EEUU. 600 pp.
- Beuchat L (1996) Pathogenic microorganisms associated with fresh products. *J. Food Prot.* 59: 204-216.
- Brackett RE (1992) *Fruit, vegetables and grains food microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington, D.C., USA. pp. 117-126.
- Brown KL, Oscroft CA (1989) *Guidelines for the Hygienic Manufactures, Distribution and Retail Sales of Sprouted Seeds with Particular Reference to Mung Beans*. Technical Manual N° 25. Campden and Choreleywood Food Research Association. Campden, RU.
- Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR (2003) *Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables*. www.apsnet.org/online/feature/safety/ (Cons. 22/06/2006).
- Charkowski AO, Sarreal CZ, Mandrell RE (2001) Wrinkled alfalfa seeds harbor more aerobic bacteria and are more difficult to sanitize than smooth seeds. *J. Food Prot.* 64: 1292-1298.
- Charkowski AO, Barak JD, Sarreal CZ, Mandrell RE (2002) Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 3114-3120.
- Feng P, Weagant SD, Grant MA (1998) Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. En *Bacteriological Analytical Manual*. 8ª ed. Cap. 4. Food and Drug Administration. Gaithersburg, MD, EEUU. www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm (Cons. 20/01/2009)
- FDA (1999) *Reducing Microbial Food Safety Hazards for Sprouted Seeds and Guidance for Industry: Sampling and Microbial Testing of Spent Irrigation Water During Sprout Production*. [Federal Register Oct. 27, 1999 (Vol. 64, N° 207)] [Notices][Page 57893-57902] Federal Register Online via GPO Access [wais.access.gpo.gov] [DOCID:fr27oc99-98]. Center for Food Safety and Applied Nutrition Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Gaithersburg, MD, EEUU.
- Fu T, Stewart D, Reineke K, Ulaszek J, Schlessler J, Tortorello M (2001) Use of irrigation water for microbiological analysis of alfalfa sprouts. *J. Food Prot.* 60: 802-806.
- Gabriel AA, Berja MC, Estrada AM, Lopez MGA, Nery JGB, Villalflor EJ (2007) Microbiology of retail mung bean sprouts vended in public markets of national capital region, Philippines. *Food Control* 18: 1307-1313.
- Gandhi M, Matthews KR (2003) Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 301-306.
- Hara-Kudo Y, Konuma H, Iwaki M, Kasuga F, Sugita-Konishi Y, Ito YY, Kumagai S (1997) Potential hazard of radish sprouts as a vehicle of *Escherichia coli* O157. *J. Food Prot.* 60: 1125-1127.
- Harmon S, Kautter D, Solomon H (1987) *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetable sprouts grown in a home sprouting kit. *J. Food Prot.* 50: 62-65.
- Heiser M (1995) Trade and consumption of legumes seeds. *Grain Legum.* 11: 14-15.
- Hitchins AD (1998) *Listeria monocytogenes*. En *Bacteriological Analytical Manual*. 8ª ed. Cap. 10. Food and Drug Administration. Gaithersburg, MD, EEUU. www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm (Cons. 20/01/2009)
- Honish L, Nguyen Q (2001) *Outbreak of Salmonella enteritidis Phage type 913 gastroenteritis associated with mung bean sprouts*. Edmonton Canada Communicable Disease Report 27. www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc/publicat/ccdr/98vol24/index.htm (Cons. 22/06/2006).
- Jay J (1998) High temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. En *Modern Food Microbiology*. 5ª ed. pp. 33-35.
- Jin HH, Lee SY (2007) Combined effect of aqueous chlorine dioxide and modified atmosphere packaging on inhibiting *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in mungbean sprouts. *J. Food Sci.* 72: M441-M445.
- Lee H, Han K, Kim H, Bae D, Kim K, Kang H (2007) Effective heat treatment techniques for control of mung bean sprout rot incorporable into commercial mass production. *Plant Pathol.* 23: 174-179
- Martinez-Villaluenga C, Frias J, Gulewicz P, Gulewicz K, Vidal-Valverde C (2008) Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food Chem. Toxicol.* 46: 1635-1644.
- Moline H, Kulik M (1997) Contamination and deterioration of alfalfa sprouts caused by a seedborne isolate of *Erwinia herbicola*. *J. Food Qual.* 20: 53-60.
- NACMCF (1999). National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 123-153.
- Palmai M, Buchanan L (2002) Growth of *Listeria monocytogenes* during germination of alfalfa sprouts. *Food Microbiol.* 19: 195-200.
- Patterson J, Woodburn M (1980) Klebsiella and other bacteria on alfalfa and bean sprouts at the retail level. *J. Food Sci.* 45: 492-495.
- Peñas E, Gómez R, Frías J, Vidal-Valverde C (2008) Application of high-pressure treatment on alfalfa (*Medicago sativa*) and mung bean (*Vigna radiata*) seeds to enhance the microbiological safety of their sprouts. *Food Control* 19: 698-705.
- Piernas V, Giraud J (1997) Microbial hazards related to rice sprouting. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32: 33-39.
- Powel D (2005) *Sprout associated outbreaks in North America 1990-2005*. FSN Documents. Food Safety Network. www.foodsafetynetwork.ca/en/articleDetails.php?a=3&c=14&sc=119&id=867 (Cons. 25/11/2005).
- Prokopowich D, Blank G (1991) Microbiological evaluation of vegetable sprouts and seeds. *J. Food Prot.* 54: 560-562.
- Quintana E (2001) Las leguminosas en la alimentación venezolana durante cinco décadas (1945-1997). *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria* 7: 70-77.
- Rhodehamel EJ, Harmon SM (1998) *Bacillus cereus*. En *Bacteriological Analytical Manual*. 8ª ed. Cap.14. Food and Drug Administration. Gaithersburg, MD, EEUU. (Cons. 20/01/2009)
- Sangronis E, Machado C, Cava R (2004) Propiedades funcionales de las harinas de las leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan*) germinadas. *Interciencia* 29: 80-85.
- Sangronis E, Machado C (2007) Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *Lebensm-wis. Technol.* 40: 116-120.
- Soylemez G, Brashears MM, Smith DA, Cuppett SL (2001) Microbial quality of alfalfa seeds and sprouts after a chlorine treatment and packaging modifications. *J. Food Sci.* 66: 153-157.
- Stewart DS, Reineke KF, Ulaszek JM, Tortorello ML (2001) Growth of *Salmonella* during sprouting of alfalfa seeds associated with salmonellosis outbreaks. *J. Food Prot.* 64: 618-622.
- Taormina PJ, Beuchat LR (1999) Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals. *J. Food Prot.* 62: 850-856.