

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



**Uso de probióticos en la reducción de la carga de *Salmonella*
abaetetuba en retoños de soya y alfalfa.**

Trabajo de graduación presentado por Ana Isabel Montenegro para optar por el grado académico de Licenciada en Ingeniería en Ciencias de los Alimentos.

Guatemala

2021

Uso de probióticos en la reducción de la carga de *Salmonella abaeetuba*
en retoños de soya y alfalfa.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Uso de probióticos en la reducción de la carga de *Salmonella abaeetuba*
en retoños de soya y alfalfa.

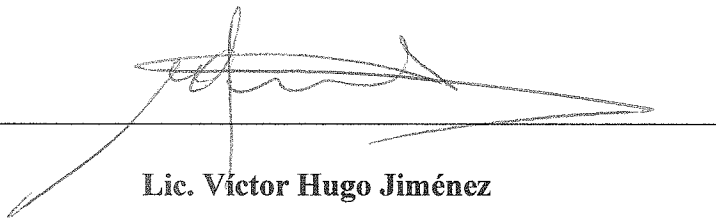
Trabajo de graduación presentado por Ana Isabel Montenegro para optar por el
grado académico de Licenciada en Ingeniería en Ciencias de los Alimentos.

Guatemala

2021

Vo. Bo.:

f)



Lic. Víctor Hugo Jiménez

Asesor

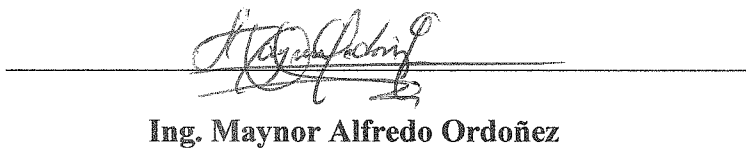
Tribunal Examinador:

(f)



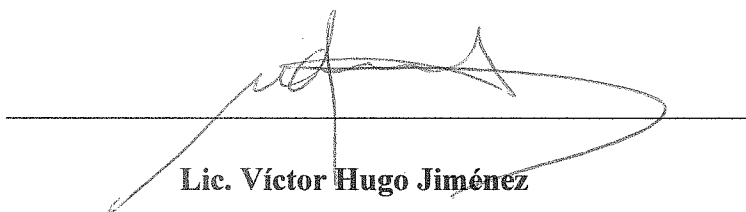
Lic. Ana Silvia Colmenares

(f)



Ing. Maynor Alfredo Ordoñez

(f)



Lic. Víctor Hugo Jiménez

Fecha de aprobación: Guatemala, 11 de febrero del 2021.

ÍNDICE

Lista de tablas	v
Lista de figuras	viii
Resumen	xi
I. Introducción	1
II. Objetivos	3
A. Generales	3
B. Específicos	3
III. Justificación	5
IV. Marco teórico	7
A. Soya y alfalfa	7
B. Proceso de germinación de los retoños	7
1. Imbibición	8
2. Activación del metabolismo	8
3. Emergencia de la radícula	8
C. Perfiles nutricionales	9
1. Proteínas	9
2. Carbohidratos	9
3. Lípidos	9
4. Vitaminas y minerales	10
D. Propiedades farmacológicas	10
E. Fuentes de contaminación de los retoños	11
F. Microorganismos comúnmente aislados	12
G. Probióticos	13
H. Pre-enriquecimiento y enriquecimiento	14
1. Pre-enriquecimiento	14
2. Enriquecimiento	14
I. Método de dilución decimal seriada	14
J. Método de aislamiento por medio de cultivo sólido	15

K. Antagonismo microbiano	16
1. Bacteriocinas	17
L. Pruebas de antagonismo	19
1. Prueba de difusión	19
2. Prueba spot test	19
V. Antecedentes	27
A. Métodos químicos	21
B. Métodos físicos	22
C. Métodos por inhibición biológica	23
D. Métodos combinados	25
VI. Metodología	27
A. Métodos	27
1. Obtención de microorganismos	27
2. Obtención de semillas	27
3. Preparación de <i>S. abaetetuba</i> a inocular	27
4. Contaminación de semillas con <i>S. abaetetuba</i>	28
5. Preparación de cultivos de probióticos	28
6. Actividad bacteriogénica	29
a. Por medio de agar spot- test	29
b. Por medio de una prueba de difusión	29
7. Tratamiento con cloro a semillas inoculadas con <i>S. abaetetuba</i>	29
8. Tratamiento con probióticos a semillas inoculadas con patógenos previamente tratadas con cloro	30
9. Análisis microbiológico	30
10. Efecto del tratamiento	31
B. Plan de análisis de datos	32
1. Número de repeticiones	32
a. Para la prueba de antagonismo	32
b. Para la prueba de eficacia de método	32
c. Para el porcentaje de germinación.	32
VII. Cronograma de actividades	33

VIII.	Resultados	35
A.	Pruebas de antagonismo y selección de cepas	35
B.	Porcentaje de germinación	36
C.	Resultados del método en cuanto a resultados de <i>Salmonella abaetetuba</i>	37
IX.	Discusión de resultados	41
A.	Pruebas de antagonismo y selección de cepas	41
B.	Porcentaje de germinación	43
1.	Ph	44
2.	Presencia de hongo	44
3.	Temperatura	45
4.	Salinidad	46
C.	Resultados del método en cuanto a reducción de <i>Salmonella abaetetuba</i>	47
X.	Conclusiones	51
XI.	Recomendaciones	53
XII.	Referencias bibliográficas	55
XIII.	Anexos	65
A.	Datos originales	65
1.	Resultados de pruebas de antagonismo	65
2.	Selección de cepas para su utilización en tratamientos	66
3.	Porcentaje de germinación	67
4.	Reducción de carga microbiana	69
5.	Análisis estadístico	71
B.	Cuadro de organización de la metodología	72
C.	Diagramas de flujo de las metodologías	74
D.	Protocolo de bioseguridad	76
1.	Especificaciones de la accesibilidad al laboratorio	76
2.	Especificaciones de protección personal	76
3.	Procedimientos dentro del laboratorio	76
4.	Procedimientos en el área de trabajo	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados promedio obtenidos para las pruebas de antagonismo	45
Tabla 2. Antagonismo microbiano por medio de prueba spot-test	70
Tabla 3. Antagonismo microbiano por medio de prueba de difusión	70
Tabla 4. Selección de cepas para tratamientos	71
Tabla 5. Recuento final obtenido para semilla de alfalfa con un tiempo de sumersión en probióticos de 20 minutos.	72
Tabla 6. Recuento final obtenido para semilla de soya con un tiempo de sumersión en probióticos de 1, 3 y 6 horas.	73
Tabla 7. Porcentaje de germinación y rendimiento para resultados obtenidos de semilla de alfalfa en un tiempo de 20 minutos sumergidas en probióticos.	73
Tabla 8. Porcentaje de germinación y rendimiento para resultados obtenidos de semilla de soya en un tiempo de 1, 3 y 6 horas sumergidas en probióticos.	74
Tabla 9. Resultados del análisis estadístico	75
Tabla 10. Resumen de metodologías y plan de análisis de resultados con respecto a etapas del estudio.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados promedio de germinación de alfalfa sumergida en probióticos durante 20 minutos	47
Figura 2. Promedio de germinación de soya sumergida durante 1, 3 y 6 horas en probióticos	48
Figura 3. Promedio de carga de salmonella en alfalfa sumergida durante 20 minutos en probióticos	48
Figura 4. Promedio de la carga de salmonella en soya sumergida durante 1, 3 y 6 horas en probióticos	49
Figura 5. Diagrama de flujo de metodología	79
Figura 6. Diagrama de flujo para la realización de pruebas de antagonismo.	80

RESUMEN

Los retoños de soya y alfalfa crudos, tradicionalmente utilizados en la cocina oriental, reportan un aumento en su consumo en las últimas décadas, como resultado de presentar altos valores nutricionales. Se ha determinado que las condiciones ideales para el crecimiento microbiano de los retoños son las mismas para los patógenos pudiendo llegar a concentraciones de hasta 5-6 log UFC/g. Los retoños de alfalfa y soya son reconocidos como los causantes de una gran cantidad de brotes registrados de enfermedades transmitidas por alimentos.

Hasta la fecha, no se conoce ningún tratamiento físico, químico o biológico considerado efectivo en la disminución de estos microorganismos patógenos o que haya reducido a niveles inocuos la carga microbiana sin haber afectado las características sensoriales y fisicoquímicas del producto. La contaminación con estos microorganismos se da desde la semilla, esto se ha relacionado con el uso de aguas contaminadas, malos manejos de compostaje, cercanía de las granjas al área de cultivo, cosechas en condiciones insalubres y mala higiene tanto de la maquinaria como del personal de trabajo, entre otros.

Por ello, el presente estudio busca determinar el efecto del tratamiento de la semilla con cepas de probióticos para determinar si estos logran llevar a concentraciones inocuas la carga microbiana del alimento sin afectar su rendimiento de germinación. Para lograr llevar a cabo lo antes mencionado, se obtuvieron semillas de alfalfa y soya, las cuales fueron inoculadas con *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 para su posterior tratamiento químico y luego con las cepas seleccionadas de probióticos.

Se determinó que las cepas de probióticos a utilizar fueron la *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y una combinación de ellas las cuales presentaron los más elevados en cuanto a inhibición in vitro según los resultados obtenidos en las pruebas de spot-test y difusión. Por otro lado, se determinó que el método no fue efectivo en cuanto a la reducción de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 ya que no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo control y las semillas tratadas con alguno de los probióticos en diferentes tiempos.

Por último, en cuanto a porcentaje de germinación, se observó que se presentó una reducción moderada en la tasa de germinación la cual pudo estar relacionada a diversos factores tales como la salinidad, temperatura, pH y presencia de hongos. Pudiendo concluir que el método estudiado no fue efectivo en cuanto a la reducción se *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de la alfalfa y la soya se encuentra en aumento debido a su popularidad por ser utilizados como un componente de las ensaladas. Generalmente, los retoños de alfalfa y soya, son muy utilizados en la cocina oriental, pero con el paso de los años, la compra y consumo de estos se ha expandido alrededor del mundo. El aumento en el consumo de los retoños se debe a sus altos valores nutricionales, ya que estos durante su germinación incrementan la biodisponibilidad biológica de las proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, carbohidratos y minerales.

El problema causado por el consumo de estos retoños ha prevalecido durante el paso de los años, esta situación ha sido relacionada a las altas cargas microbianas presentes en los retoños utilizados para el consumo y se presenta en países alrededor de todo el mundo. Según el CDC, en un lapso de 18 años se han relacionado más de 20 brotes de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157:H7 relacionados al consumo de retoños de alfalfa y soya únicamente en los Estados Unidos, esto se debe al alto nivel de patógenos presentes en los retoños el cual está relacionado al proceso de germinación ya que presenta condiciones favorables para su crecimiento.

Para el control de estos patógenos en este tipo de productos, se ha llevado a cabo una serie de investigaciones en las cuales las semillas son tratadas por medio de métodos físicos, químicos, biológicos y sus respectivas combinaciones. El uso de compuestos químicos tales como el cloro, ha sido el tratamiento recomendado por el FDA, debido a que es el método más efectivo y reproducible en cuanto a la aplicación, no obstante, debe de ser combinado con otros métodos, ya que no es del todo efectivo.

Hasta la fecha, se han identificado un reducido número de tratamientos los cuales han logrado disminuir la carga microbiana hasta 6 log UFC/g, desafortunadamente, los métodos que obtienen mejores resultados también reducen en gran manera el rendimiento alcanzado en los retoños en cuanto a una aplicación comercial. Hasta la fecha, no se ha determinado un tratamiento efectivo para la reducción de microorganismos patógenos a niveles inocuos en los retoños, por lo que se ha dado la necesidad del desarrollo de nuevos métodos de desinfección, principalmente utilizando fuentes de origen natural. La alternativa más popular hoy en día es la utilización de un método por medio del uso de antagonistas microbianos o de sus metabolitos secundarios.

II. OBJETIVOS

A. GENERALES

- Determinar la efectividad de disminución en la carga de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 en retoños de soya y alfalfa por medio de la utilización de cuatro cepas de probióticos.

B. ESPECÍFICOS

- Determinar el impacto del tratamiento con probióticos en el porcentaje de germinación en las semillas de soya y alfalfa.
- Elaborar un procedimiento de preparación de una solución de probióticos para su uso como protector de semillas en la producción de retoños.
- Evaluar la eficiencia de probióticos como método secundario luego de una desinfección química para reducir la cantidad de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 a niveles inocuos.
- Determinar qué cepa de probióticos posee una mayor tasa de disminución de carga microbiana de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 en los retoños de soya y alfalfa.

III. JUSTIFICACIÓN

El consumo de retoños de soya y alfalfa crudos es conocido a nivel mundial, tradicionalmente utilizado para la comida oriental, con el paso de los años el consumo ha ido aumentando, llegando en su mayoría hasta los países europeos y Estados Unidos. Una de las razones que explica el aumento en el consumo es resultado de que estos presentan altos valores en sus propiedades nutricionales. Baker, (2016) menciona que entre las características principales de la soya y la alfalfa se encuentra que proveen proteína cruda y son una excelente fuente de vitaminas y minerales.

Según el estudio realizado por Huda, H. (2010) los retoños son considerados por los consumidores como un alimento saludable con diversas propiedades medicinales. En este estudio también se destaca las propiedades antioxidantes y anticancerígenas, entre otras. Debido a esto, este tipo de alimento con el paso de los años se ha vuelto un producto de fácil acceso.

Entre las condiciones óptimas de su cultivo para ambos tipos de retoño se manejan temperaturas, humedades y propiedades nutricionales óptimas por un tiempo de aproximadamente 4 a 7 días. Estas condiciones son ideales para el crecimiento microbiano de estos patógeno pudiendo llegar a concentraciones de hasta 5-6 log UFC/g iniciando desde concentraciones menores a 1 log UFC/g durante el proceso de germinación (Chang, *et al*, 2010).

Entre la familia de las Fabaceae, los retoños de alfalfa y soya son reconocidos como los causantes de la mayor cantidad de brotes registrados de enfermedades transmitidas por alimentos. Estudios realizados por Chang, *et al*, (2010) han abordado el tema de la disminución de carga microbiana específicamente de *Salmonella*. debido a que es de los microorganismos más frecuentes en los casos de ETA's a nivel mundial.

Hasta la fecha, no se conoce ningún tratamiento químico o biológico considerado efectivo en la disminución de estos microorganismos patógenos o que haya reducido a niveles inocuos la carga microbiana sin haber afectado las características sensoriales y fisicoquímicas del producto. Según el FDA el tratamiento más efectivo para la disminución del riesgo de contraer una ETA es la sanitización de las semillas utilizando una solución de 20,000 ppm de cloro libre proveniente de hipoclorito de calcio por un tiempo de 15 minutos, pero en la mayoría de los casos, no asegura llegar a concentraciones inocuas. (Chang, *et al*, 2010).

La contaminación con estos microorganismos se da desde la semilla según diversos estudios, esto se ha relacionado a el uso de aguas contaminadas, malos manejos de compostaje, cercanía de las granjas al área de cultivo, cosechas en condiciones insalubres y mala higiene tanto de la maquinaria como del personal de trabajo, entre otros. Esta razón ha llamado la atención del FDA la cual optó por lanzar en el 2011 un manual para estandarizar el crecimiento, cosecha y empaque para todo tipo de retoños designados para el consumo humano. (Mohammad, *et al*, 2019)

Debido a lo anteriormente mencionado, se busca determinar el efecto del tratamiento de la semilla por medio de varias cepas de probióticos para determinar si estos logran llevar a concentraciones inocuas la carga microbiana del alimento. Este tipo de tratamiento podría ser una alternativa a los métodos tradicionales ya conocidos de los cuales no se han obtenido resultados efectivos para la reducción de la carga microbiana.

IV. MARCO TEÓRICO

A. SOYA Y ALFALFA

La alfalfa (*Medicago sativa*) y la soya (*Phaseolus aureus*), son considerados como los forrajes más importantes alrededor del mundo. Son de los cuatro cultivos más producidos en los Estados Unidos por detrás del maíz y el trigo, siendo de mayor predominancia el cultivo de la soya ante el cultivo de la alfalfa (Fu, *et al.*, 2014). En general los retoños se han caracterizado por poseer un tallo o hipocótilo de color blanco con pequeñas hoja o cotiledones de color verde oscuro inmaduros los cuales podrían emerger en pares o impares con respecto al tipo de retoño (DeEll, 2014).

Los retoños son seleccionados dependiendo de sus características de calidad, ya sea por tamaño (raíz corta y brotes largos) o características sensoriales. Su cosecha es realizada aproximadamente a los 6 o 7 días luego de la germinación de las semillas al alcanzar una longitud máxima entre 3.8 y 5 centímetros. Siendo el rendimiento obtenido de aproximadamente 5 veces el peso de la semilla previo a su germinación (Baker, 2016). Generalmente los retoños germinados aportan textura en algunos alimentos dependiendo con qué son combinados, por lo que generalmente son ingeridos de manera cruda.

B. PROCESO DE GERMINACIÓN DE LOS RETOÑOS

La germinación mejora la calidad nutricional de las semillas de alfalfa y soya debido a que permite que los lípidos, hidratos de carbono y proteínas de almacenamiento se descompongan en nutrientes más simples mejorando su digestibilidad. Según Salazar (2017) la germinación es el proceso en el cual la semilla seca comienza por la absorción de agua y termina presentando una elongación del eje embrionario, concluyendo así cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean al embrión dando como resultado una “germinación visible”.

Para que todo el proceso de germinación pueda llevarse a cabo son necesarios factores externos tales como la humedad, el oxígeno y una temperatura adecuada para los procesos metabólicos que se llevan a cabo en el interior de la semilla. Entre los factores mencionados con

anterioridad, se ha observado que la temperatura de germinación influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que suceden en la semilla luego de la fase de imbibición. Generalmente, la mayoría de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de oxígeno (Nieto, 2005).

Salazar (2017) divide el proceso de germinación en tres fases:

1. Imbibición

La fase de imbibición es aquella en la cual se da la absorción de la cantidad de agua necesaria para la rehidratación de los tejidos que forman parte de la semilla, proteínas y organelos celulares. Es necesaria para que comiencen las reacciones hidrolíticas y así la semilla pueda recuperar la actividad metabólica. Esta absorción de agua se debe a un diferencial de potencial hídrico entre la semilla y el medio al cual está expuesto, la permeabilidad se va regulando a medida que las semillas se hinchan.

2. Activación del metabolismo

Durante la activación del metabolismo, el ácido gliberélico activa el ADN de las células de la aleurona, las cuales son las encargadas de producir amilasa. Durante la activación del metabolismo ocurre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Por otro lado, también se incrementa la actividad enzimática y la degradación inicial de las reservas de ácidos grasos y el almidón, siendo éstos transformados en carbohidratos. Los carbohidratos transformados son trasladados hacia el embrión en donde serán utilizados para la última fase en la germinación del almidón.

3. Emergencia de la radícula

Esta fase da como concluido el proceso de germinación, dando como resultado la emergencia de la radícula. La madurez del retoño es determinada por medio de la longitud alcanzada, luego de la aparición de la raíz, estudios han establecido un valor entre 26 y 38 mm de longitud. (Flores, 2013)

La calidad nutricional de las semillas de alfalfa y soya luego de llevarse a cabo el proceso de germinación aumenta debido a que los lípidos, carbohidratos y proteínas de almacenamiento en el interior de la semilla se descomponen en nutrientes más simples y fácilmente digeribles. Por otro lado, los factores anti nutricionales disminuyen o pueden llegar a desaparecer durante este proceso.

C. PERFILES NUTRICIONALES

La alfalfa, al igual que la soya contiene altos perfiles nutricionales los cuales van desde un alto rendimiento de materia seca, alto contenido proteico, posee una muy buena palatabilidad y presenta también un alto contenido de vitaminas y minerales. Esto está relacionado por Martón, *et al.* (2010) a que los retoños son cosechados y consumidos a los pocos días de su germinación, por ello, muchos de los factores nutricionales aún no han sido utilizados en la maduración de la planta misma. Debido a esto, la alfalfa y la soya no solo son de los alimentos más utilizados en la alimentación de los rumiantes sino también son muy utilizados en la gastronomía humana alrededor del mundo. (Baker, 2016)

1. *Proteínas*

Los retoños de soya y alfalfa han sido reconocidos debido a su contenido y calidad de proteína, esto se debe a que, durante el proceso de germinación, las largas cadenas que conforman proteínas se descomponen, dando lugar a grandes cantidades de distintos aminoácidos esenciales (Cervantes, 2013). Entre los aminoácidos esenciales que estos retoños poseen se pueden enumerar la histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano y valina. A pesar de que los niveles de lisina presentes son relativamente elevados, es recomendable combinar la proteína de estos retoños con algún grano para complementar la falta de metionina y cisteína (Solano, 2012). Por lo tanto, la alfalfa y la soya poseen uno de los mayores valores en cuanto a la digestibilidad de proteínas más elevadas comparadas con cualquier otro tipo de retoño, haciéndolas atractivas para el consumidor (Pospíšil, 2012).

2. *Carbohidratos*

Según Maxwell (2011) la mayor parte de los carbohidratos presentes en los retoños son polisacáridos insolubles, este tipo de carbohidratos abarca la pectina, la celulosa, la hemicelulosa y el almidón. Por otro lado, también posee una fracción la cual está abarcada por los carbohidratos solubles, estos incluyen la sucosa, la rafinosa y la estaquiosa.

3. *Lípidos*

Los lípidos al igual que las proteínas son degradados durante el proceso de germinación, dando lugar a la presencia de ácidos grasos libres. Se ha establecido que la mayor proporción de

lípidos en los retoños la ocupan los ácidos grasos saturados, teniendo la presencia de ácido palmítico y ácido esteárico, mientras que los ácidos grasos insaturados se presentan en menores proporciones y los componen el ácido oleico, el linoleico y el linolénico, siendo preferible una mayor concentración de ácido oleico que de ácido linolénico (Maxwell, 2011).

4. Vitaminas y minerales

Entre las vitaminas identificadas como parte de la composición de los retoños de alfalfa se encuentran las vitaminas del complejo B (B1, B2, B6, B12, Niacina, ácido pantoténico, Inositol, Biotina y ácido fólico). Según Milagros, *et al.* (2019) el contenido presente de este complejo ha presentado beneficios para el buen mantenimiento del sistema circulatorio y nervioso, para la reducción del colesterol y triglicéridos, son fundamentales para el crecimiento y desarrollo del sistema nervioso, ayuda a la formación de glóbulos rojos en la sangre, entre otros. (Pospíšil, 2012). También se ha demostrado que durante el proceso de germinación hay un incremento del contenido de vitamina C la cual se ha relacionado con el mejoramiento del sistema inmune, y mejoramiento de la absorción de nutrientes esenciales en el cuerpo. Las vitaminas que se encuentran en menores cantidades son la vitamina D, E y K las cuales presentan beneficios como ayudar en la coagulación de la sangre, y el mantenimiento de los huesos durante el paso de los años. (Milagros, 2019).

Se ha determinado que el mineral característico de los retoños de alfalfa y soya es el hierro, seguido por fósforo, calcio, potasio, sodio, cloro, sulfuro, magnesio, cobre, manganeso, cobalto, boro y molibdeno los cuales se presentan en menores concentraciones. Gracias a la presencia de estos minerales, se ha demostrado que los retoños juegan un papel muy importante en el funcionamiento de las terminaciones nerviosas. Por otro lado, debido a que los retoños representan una buena fuente de hierro, estos se han comenzado a utilizar para tratamientos en personas anémicas. (Mejía, 2019) (Milagros, 2019)

D. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

El consumo de los retoños de alfalfa y soya no solo ha aumentado por sus propiedades nutricionales, sino que también ha aumentado por sus propiedades farmacológicas (Karimi, *et al.*, 2013). Diversos estudios han demostrado la capacidad de los retoños de alfalfa y soya de actuar principalmente como un antiinflamatorio, antimicrobiano, anticancerígeno y principalmente

antioxidantes (Rathee *et al.*, 2009). Estos efectos nutracéuticos determinados se han relacionado a la presencia de tanto compuestos fenólicos como flavonoides los cuales actúan como atrapadores de radicales libres o como compuestos quelantes con los metales. (Oskoueian *et al.*, 2011b).

Por otro lado, entre otros de los componentes presentes en los retoños, se determinó que estos poseen alcaloides, fitoestrógenos, cumarinas, enzimas digestivas, terpenos, saponinas y fitoesteroles (Karim, *et al.*, 2013). Presentando propiedades para la disminución de absorción de colesterol, disminución de placas arterioescleróticas en las arterias, ayuda a pacientes con diabetes, tiene propiedades antitumorales contra ciertos tipos de leucemia (Oskoueian *et al.*, 2011b). Debido a la presencia de fitoestrógenos, también es muy utilizado en Asia para el tratamiento de mujeres menopáusicas (Fletcher, 2016).

E. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LOS RETOÑOS

Los retoños de alfalfa y soya se caracterizan por contener altas concentraciones de microorganismos patógenos al momento de ser consumidos, Y los estudios realizados recientemente se han enfocado en su mayoría, en el tratamiento de las semillas previo a su germinación, esto se debe a que, durante el proceso de germinación, las condiciones son óptimas para el crecimiento de los patógenos los cuales se multiplican hasta llegar a concentraciones muy elevadas difíciles de controlar (Bari, 2009). Barri, *et al.*, (2011) ha establecido posibles tres puntos en el proceso durante la manipulación de las semillas hasta su consumo en donde estas pueden ser contaminadas. Estas se identificaron como la producción de la semilla, durante el proceso de germinación y durante la distribución.

Durante la producción de las semillas y durante el proceso de germinación algunas de las fuentes de contaminación identificadas incluyen el agua de riego utilizada, la presencia de animales cerca del área en donde las semillas se encuentran, contaminación causada por animales salvajes y la falta de higiene por parte de los trabajadores los cuales tienen contacto directo con las semillas (Bari, *et al.*, 2011). Por otro lado, la contaminación durante el transporte y almacenamiento puede ser causada por la presencia de roedores u otros animales.

Otro de los casos más comunes es la contaminación durante el procesamiento de los retoños son procedimientos operacionales estándares de sanitización mal implementados en cuanto al

tratamiento de la maquinaria (Mueller, 2008). Existe un método ampliamente utilizado por los agricultores denominado escarificación el cual fue identificado como clara evidencia de contaminación por medio de equipo, este método consiste en raspar la capa externa de las semillas lo suficiente para crear una superficie rugosa la cual aumenta la velocidad de la germinación (Kimura, *et al*, 2012).

F. MICROORGANISMOS COMÚNMENTE AISLADOS

Múltiples brotes de enfermedades transmitidas por alimentos han sido asociados alrededor del mundo, al consumo de retoños de alfalfa y soya crudos o ligeramente cocidos. A diferencia del resto de vegetales, los retoños poseen un proceso único de germinación el cual es ideal para el desarrollo y crecimiento microbiano, por ello, se considera un reto para la industria determinar un método efectivo para disminuir la carga microbiana de estos a niveles inocuos. (Ding, *et al*, 2013)

Según Ding, *et al* (2013) se ha determinado que los dos microorganismos comúnmente identificados como los causantes de brotes de enfermedades en los Estados Unidos son la *Salmonella* s.p. y *Escherichia coli* O157:H7. A pesar de ello, también se han asociado menor número de casos relacionados a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* (Cava, *et al*, 2009). Estos microorganismos generalmente se encuentran ubicados en las superficies de las semillas y pueden llegar a introducirse en el interior de las capas de pared celular del retoño durante el proceso de germinación (Salazar, 2017).

A pesar de los esfuerzos realizados por la disminución de la carga microbiana, el CDC (2016) ha reportado en un lapso de 16 años un total de 49 brotes de ETAs relacionados con germinados únicamente en los Estados Unidos, por otro lado, uno de los casos más severos reportados se ha dado en Canadá registrando un total de más de 600 personas enfermas debido al consumo de retoños (Canadian Food Inspection Agency, 2005). Este y muchos más casos de ETAs relacionadas a consumo de alfalfa y soya han ido disminuyendo desde la publicación de el manual de la FDA para el manejo y tratamiento de este tipo de alimento, pero aun así se debe seguir investigando sobre la mejora en los métodos desarrollados o el desarrollo de un nuevo método.

G. PROBIÓTICOS

Los probióticos son organismos vivos los cuales han demostrado ser beneficiosos para la salud en estudios controlados en humanos al ser administrados en cantidades establecidas. Se ha observado que una de las especies de probióticos más utilizadas son los lactobacillus y se encuentran seguidos por los Bifidobacterium (Jones, *et al*, 2012). Castro, *et al*. (2006) establece que la comunidad científica tiene un acuerdo en cuanto a la nomenclatura de los microorganismos, y cada uno de los fabricantes de probióticos tiene la obligación de registrar sus cepas en un depositario internacional. El acuerdo de nomenclatura de los microorganismos establece que a cada una de las cepas de probióticos se le debe identificar según su género, especie, y designación alfanumérica. En caso de poseer una subespecie, también debe de ser identificado (Guarner, *et al.*, 2011).

Los probióticos han sido utilizados a lo largo de los años debido a que por ser de carácter biológico y formar parte de la microbiota intestinal no presentan riesgo al ser consumidos, por ello, poseen un largo historial en la industria alimenticia siendo utilizados para llevar a cabo fermentaciones o como agentes antimicrobianos con el objetivo de prolongar la vida útil de los alimentos. (Gonzales, *et al*, 2003). La actividad antimicrobiana de estos probióticos se ha caracterizado por la producción de sustancias tales como ácido láctico y ácido acético, entre otros metabolitos (Ruiz, *et al*, 2017). Bacterias del género *Lactobacillus* s.p. no solo son ampliamente utilizados por la contribución al desarrollo de propiedades organolépticas en los alimentos fermentados, sino que también se caracterizan por una destacada capacidad antagonista la cual contribuye a proveer de condiciones poco favorables para el desarrollo y multiplicación de microorganismos patógenos (Rondón, 2008).

Estudios han determinado una eficacia en biopreservación de productos alimenticios por medio de la utilización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* s.p., se observó que estos probióticos fueron efectivos en el control de patógenos, entre ellos, *Salmonella* s.p. y *Escherichia coli* (Ruiz, *et al.*, 2017). Por ello, para este estudio se trabajará con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Estas cepas se han identificado por ser probióticos catalogados como bacterias ácido-lácticas en el género de los *Lactobacillus* sp.

H. PRE-ENRIQUECIMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO

Previo al inicio de un análisis microbiológico es necesaria la realización de un pre-enriquecimiento y un enriquecimiento. El objetivo de la utilización de estos medios se encuentra en ayudar a los microorganismos a multiplicarse con mayor facilidad, esto es necesario ya que al presentarse en el alimento pueden estar en estado de estrés o en muy bajas concentraciones relacionado a daños químicos o físicos durante el procesamiento. (Perkins, 2016)

1. Pre-enriquecimiento

El pre-enriquecimiento es realizado utilizando medios no selectivos los cuales tienen como objetivo la reparación de las células dañadas (Célula dañada: Es aquella que ha perdido o disminuido la capacidad de reproducción o capacidad metabólica al ser expuestas a un tratamiento el cual no tiene como propósito la esterilización.). Este tipo de medio ofrece a los microorganismos condiciones óptimas para la recuperación, rehidratación y la dilución de sustancias inhibitorias para su crecimiento. Cabe destacar que es de interés la utilización de un medio no selectivo debido a que las células dañadas en estos microorganismos no suelen crecer en condiciones selectivas. Uno de los ejemplos de un medio de pre-enriquecimiento es el agua peptonada bufferada. (Perkins, 2016)

2. Enriquecimiento

Posterior al pre-enriquecimiento se lleva a cabo el proceso de enriquecimiento el cual tiene como propósito inhibir la competencia de la microflora presente en la muestra y al mismo tiempo crear condiciones óptimas para el microorganismo objetivo. Algunos factores que actúan como un medio de enriquecimiento son el pH, la temperatura, la atmósfera de exposición, antibióticos y químicos. Un ejemplo para un medio de enriquecimiento es el caldo tripticosa soya. (Perkins, 2016)

I. MÉTODO DE DILUCIÓN DECIMAL SERIADA

El método de dilución decimal seriada consiste en obtener una concentración deseada baja de microorganismos. Este objetivo se logra a través de la extracción de una pequeña fracción de solución madre y diluyéndola en una relación 1:10 con respecto al medio de cultivo enriquecido.

Posteriormente, se selecciona la concentración adecuada y estimada para la inoculación en el medio de cultivo sólido utilizando como referencia la concentración de microorganismos inoculada y la prevista al finalizar el análisis. (Rodríguez, 2019)

J. MÉTODO DE AISLADO POR MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Durante el paso de los años, en el área de la microbiología se han desarrollado numerosos métodos los cuales han optimizado el tiempo de análisis. A pesar de ello, organizaciones alrededor del mundo tales como la International Organization of Standardization (ISO), American Association for Analytical Chemist (AOAC), US Food and Drug Administration (FDA), British Standards (BSI), French Standards Assosiation (AFNOR), entre otros, establecen que los métodos estándar de análisis confiables siguen siendo aquellos por medio de aislamiento y selección en medios sólidos. (Perkins, 2016)

Da Silva, *et al.* (2013) establece que el objetivo general al momento de utilizar un medio de cultivo sólido, en este caso el agar, es el diferenciar y separar a los microorganismos de interés por medio de la competencia en el mismo medio. Esto puede ser llevado a cabo por medio de la inoculación del cultivo en el medio sólido el cual posee propiedades que permitirán actuar como medio de selección para el microorganismo de interés. Entre las propiedades a tener en cuenta para la utilización de un medio selectivo son los nutrientes, agentes selectivos, indicadores y detectores.

Para el estudio realizado, el cultivo sólido a utilizar para el aislamiento y recuento de *Salmonella abagetuba* será el agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). El agar XLD es utilizado para la detección de salmonella en los alimentos debido a que posee una combinación diferenciada de azúcares. El agar XLD está compuesto por tres azúcares (xilosa, lactosa y sucrosa), un aminoácido (lisina) y el indicador es el ácido sulfhídrico. En su mayoría, la Salmonella es capaz de fermentar la xilosa, pero es incapaz de fermentar la lactosa y la sucrosa, por otro lado, la salmonella es capaz de descarboxilar la lisina produciendo ácido sulfhídrico. Al concluir con el muestreo, en los resultados se esperan colonias negras con centro rojo. (Perkins, 2016)

A medida que pasa el tiempo, se ha recomendado la utilización de dos distintos medios de cultivo para la realización de análisis microbiológicos, esto se debe a que algunas cepas similares al microorganismo objetivo pueden ser sensibles al mismo enriquecimiento del medio. Debido a lo antes mencionado, también se hará uso del agar Rambach. Este agar es un medio de diferenciación para los distintos tipos de salmonella, este agar fue desarrollado en 1990 por Rambach. Este tipo de agar utiliza el fenotipo característico de la Salmonella el cual es la formación de ácido a partir de propilenglicol. Por otro lado, también utiliza como indicador la 13-galactosidasa para la diferenciación de la salmonella del resto de los *Enterobacteriaceae*. Otro de los componentes incluidos en el medio es la desoxicolato el cual actúa como un inhibidor de organismos gram-positivo. El resultado final esperado en este tipo de medio de cultivo es una colonia rojo brillante. (Perkins, 2016)

K. ANTAGONISMO MICROBIANO

El antagonismo microbiano puede manifestarse de diversas maneras para el control de los diversos patógenos. Entre las maneras que este puede actuar se encuentra la competencia por espacio o por nutrientes, parasitismo o lisis enzimática como una interacción directa con el patógeno y la secreción de bacteriocinas. (Mateluna, 2006)

Durante la competencia microbiana se presenta un comportamiento desigual entre dos o más microorganismos. Este comportamiento es presentado al haber un requerimiento limitado de algún elemento necesario por ambos microorganismos. Cabe destacar que el requerimiento del elemento presentado por uno de los dos microorganismos debe de ser mayor al de la competencia para que esta se presente. (Mateluna, 2006)

Por otro lado, anteriormente se mencionaba que otro de los mecanismos utilizados por los microorganismos relacionados al antagonismo es el parasitismo o la lisis enzimática como una interacción directa con el patógeno. Esto se da debido al momento en la que el microorganismo antagonista utiliza al patógeno como alimento y es comúnmente denominado como una simbiosis antagónica entre los microorganismos. (Mateluna, 2006)

Para tener una mayor eficacia en la utilización de los antagonistas microbianos, estos deben presentar las siguientes características:

- I. Deben de ser genéticamente estables
- II. Tener una alta efectividad en bajas concentraciones
- III. Deben de ser económicamente reproducibles
- IV. Contener un amplio rango de control de patógenos
- V. De fácil distribución
- VI. No tóxicos
- VII. Resistentes a pesticidas
- VIII. Compatibles con distintos tipos de tratamientos físicos y químicos

(Mateluna, 2006)

1. *Bacteriocinas*

Las bacteriocinas son grupos heterogéneos peptídicos o proteicos los cuales han demostrado poseer actividad antimicrobiana, inicialmente fueron observadas en *Escherichia coli*. Este tipo de mecanismo en su mayoría consiste en la producción de sustancias tóxicas por parte del microorganismo antagonista hacia el patógeno. Las sustancias bacteriocinas actúan de manera muy efectiva en concentraciones relativamente bajas, generalmente menores a 10 ppm y son clasificadas dependiendo de la genética, la estructura y las características bioquímicas que estas posean. (Padilla, 2016; Mateluna, 2006)

Según menciona Beristain y López (2012) la producción de bacteriocinas suele ocurrir de manera natural durante o al final de la fase logarítmica del crecimiento microbiano. Se ha determinado que debido a la naturaleza de las bacteriocinas las cuales son de estructura proteica, estas son inactivadas al contacto con proteasas presentando un gran beneficio. Debido a la presencia de proteasas en el páncreas se evita la absorción de las bacteriocinas como un componente activo siendo inocuas para el consumo humano.

Las bacteriocinas de mayor interés durante el tiempo han sido predominantemente las de origen de bacterias ácido lácticas. Estas bacteriocinas originadas de las BAL han sido catalogadas según su estructura, propiedades fisicoquímicas y moleculares en cuatro grandes grupos, desafortunadamente, con el tiempo no se ha logrado justificar uno de los grupos por lo que actualmente solo se conocen los siguientes tres:

- Clase 1 – Lantibióticos (5kDa): Péptidos pequeños policíclicos con poca estabilidad al calor. Este tipo de bacteriocina es producida en el ribosoma como un pre-péptido modificado post-traduccionalmente para formar un péptido activo.
 - Clase 1a (< 4kDa): Péptido elongado en forma de tornillo con moléculas anfipáticas con carga neta positiva. Son considerados como parte de la categoría bacteriocina ya que causan la destrucción de la célula por medio de la despolarización de la membrana citoplásmica. El ejemplo que más representa a esta clase es la nisina.
 - Clase 1b (1.8-2.1 kDa): Péptido globular hidrófobo con carga neta negativa o sin carga. Este tipo de bacteriocina produce inhibición enzimática como método de acción. Algunos ejemplos característicos de esta clase es la cinamisina.
- Clase 2 - No Lantibióticos (< 10kDa): Es considerado como el grupo de bacteriocinas más amplio producido por BAL. Este tipo de bacteriocinas se destaca por no poseer aminoácidos modificados y por ser estables al calor y al pH.
 - Clase 2a: Conformada por una secuencia amino terminal y contiene entre uno y dos puentes disulfuro. Se ha diferenciado por su alta capacidad contra la actividad de la listeria y han sido caracterizadas tres tipos dentro de esta clase, la pediocina PA-1, la enterocina A y la divercina V41.
 - Clase 2b: Conformadas por dos péptidos los cuales deben de estar presentes en las mismas concentraciones para desarrollar la actividad antimicrobiana. Su mecanismo de acción es por medio de la formación de poros en la membrana celular. La bacteriocina destacada dentro del grupo es la sakacina.
 - Clase 2c: Estructura cíclica termoestable y no modificada. Es diferenciada de los demás grupos debido a que no posee terminación amino. La más destacada dentro de la clase es la enterocina AS-40.
- Clase 3 – Termolábiles o bacteriolisinas (> 30kDa): Actúa mediante la catálisis e hidrólisis de la pared celular de las células sensibles. Las más destacada es la helveticina J.

L. PRUEBAS DE ANTAGONISMO

1. Prueba de difusión

El método de difusión fue originalmente desarrollado por Kirby-Bauer y posteriormente fue estandarizado por la aplicación de discos o pozos. Este método busca como objetivo establecer cuantitativamente por medio de ensayos individuales el efecto de sustancias bacterianas. Este método posee dos alternativas las cuales se diferencian en la utilización de discos de papel filtro o pozos el cual permitirá el sembrado homogéneo de la sustancia a evaluar. (Ramirez, 2009)

Este método busca relacionar la concentración de la sustancia inhibidora de crecimiento en la superficie del agar con respecto al patógeno. Todo esto es posible debido a la presencia de un halo de inhibición como resultado del antagonismo. Los resultados obtenidos por este método son altamente reproducibles media vez sea realizado utilizando el procedimiento estandarizado de la prueba. (Ramirez, 2009)

2. Prueba spot test

La prueba de spot test o bien conocida como método de mota en césped es una prueba antimicrobiana in-vitro al igual que la prueba de difusión. Esta prueba tiene como base la difusión de la solución con el microorganismo en el medio de cultivo para mostrar la actividad inhibitoria del microorganismo indicador. Esta prueba al igual que la de difusión presenta como resultado en caso de haber inhibición un halo alrededor del patógeno de interés. La diferencia entre la prueba de difusión y la de spot es que, en la prueba de difusión, es necesario inocular la muestra en pozos mientras que en la de spot es suficiente con picar. (Macaluso, *et al*, 2016).

V. ANTECEDENTES

Debido al número elevado de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos relacionados al consumo de retoños de alfalfa y soya, la industria se ha enfocado en el desarrollo de un método efectivo para reducir la carga microbiana previo a la germinación (Ding, *et al.*, 2013). Desafortunadamente, hasta la fecha el FDA sólo ha acuñado un solo método como método sugerido para el tratamiento de las semillas, método el cual ha sido publicado en el manual titulado “Compliance with and Recommendations for Implementation of the Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption for Sprout Operations: Guidance for Industry” el cual fue publicado en enero del 2017. Ayala (2014) establecido que el desarrollo de un método efectivo para el tratamiento de las semillas de alfalfa y soya debe reducir la carga de patógenos microbianos sin comprometer la preservación de la viabilidad, germinación y el vigor de las semillas. Este método debe ser definido para una semilla en específico ya que la sensibilidad de estas hacia los agentes antimicrobianos y otros tratamientos puede variar, pudiendo ser aplicable para algunas semillas y no para otras.

Entre la infinidad de métodos utilizados para la desinfección de semillas de alfalfa y soya se pueden clasificar en cuatro grandes grupos los cuales son catalogados como desinfección química, física, biológica y combinada (Ding, *et al.*, 2013).

A. MÉTODOS QUÍMICOS

El método, sugerido por el FDA consiste en el uso de 20,000ppm de cloro residual proveniente de hipoclorito de calcio a una temperatura ambiente por un total de 10-15 minutos, reduciendo aproximadamente un promedio 3.8 log CFU/g(FDA,1999). Por otro lado, también se han probado otras opciones de compuestos químicos para la desinfección tales como el peróxido de hidrógeno, etanol, ácido láctico, ácido peroxiacético y ácidos grasos.

A pesar de que la mayoría de los métodos evaluados obtuvieron una reducción muy similar a la del cloro antes mencionada, muy pocos de estos han sido sometidos a para determinar la repetibilidad y precisión de los resultados para determinar el nivel de eficacia que los mismos tienen. Por ello, se determinó que los tratamientos que se han seguido estudiando han presentado dificultades para la replicación de las metodologías debido a la variación de las condiciones del

tratamiento, estableciendo que no se puede realizar una validación eficaz para poder ser tomados como un método sugerido tal como la desinfección utilizando cloro residual. (Ding, *et al.*, 2013)

B. MÉTODOS FÍSICOS

Otra de las categorías establecidas es la desinfección física. Este tipo de desinfección es catalogada entre las más efectivas, amigables con el ambiente y más económicas entre los tratamientos mencionados. El método físico de desinfección se basa en la destrucción de las formas vegetativas durante los períodos de exposición al método físico utilizado (Negroni, 2009).

Vignoli (2006). Establece que el proceso comienza cuando se produce una serie de rupturas de cadena única en el ADN, esto provoca la muerte celular por activación o liberación de enzimas con actividad de endonucleasas. Al aumentar la energía comienza la pérdida de la integridad funcional de la membrana citoplásmica, produciendo interferencias en el intercambio con el medio externo, los procesos respiratorios y la síntesis proteica. Concluyendo la desinfección con la activación de ribonucleasas las cuales degradan el ARNr produciendo la pérdida de viabilidad de las células expuestas.

A diferencia de la desinfección por medio de la utilización de sustancias químicas, los métodos físicos no están limitadas por la accesibilidad a los patógenos los cuales pueden almacenarse en superficies no lisas, presentando una mejor penetración en cuanto el alcance de los microorganismos (Ding, *et al.*, 2013). Entre los tratamientos físicos analizados en el estudio se encuentran tratamiento por calor, altas presiones y radiación.

Para los tratamientos por medio de la utilización de calor, se ha determinado que, debido a la disminución en la tasa de germinación de los retoños, como resultado de un tratamiento térmico, se ha determinado que el método no es aplicable para el tratamiento de las semillas, a pesar de que se presentó una disminución de aproximadamente de 3log UFC/g sin comprometer la tasa de germinación basándose en el método más exitoso. (Bari, *et al.*, 2008).

En cuanto a los estudios realizados con respecto a la utilización de altas presiones, se ha determinado que en promedio la desinfección realizada por este método puede llegar a una reducción más alta que 5.09 UFC/g siendo hasta el momento una de las metodologías más exitosas,

teniendo un éxito mayor de desinfección que el método sugerido por el FDA. Desafortunadamente, se han conducido muy pocos estudios los cuales confirmen la eficacia del método los cuales deben de llevarse a cabo previo a definir que es un método comercialmente viable.

Por último, se encuentran los tratamientos por medio de irradiación. El método consiste en la exposición del producto a la acción de las radiaciones ionizantes durante un cierto lapso. Existen 3 fuentes de irradiación aprobadas para el uso en alimentos, los rayos gamma, los rayos x y el haz de electrones (FDA, 2016). El FDA a aprobado como tratamiento seguro en el 2000 el uso de irradiación a 8 kGy. A pesar de ello, (Thayer, *et al.*, 2002) ha determinado que la eficacia del tratamiento por medio de irradiación depende de la densidad de bulto.

La densidad de bulto es una variable crítica en la desinfección por irradiación ya que esta dificulta la exposición de manera uniforme a todas las semillas sin sobrepasar los límites de seguridad previamente establecidos, disminuyendo la posibilidad de ser utilizado sin el apoyo de mesas vibratorias que esparzan el producto en capas con menor densidad. En general, el método por irradiación ha presentado problemas en la conservación de las propiedades de longitud, rendimiento, apariencia y pérdida de nutrientes, factores los cuales han evitado que es método sea aceptado como método oficial de desinfección. (Thayer, *et al.*, 2002)

C. MÉTODOS POR INHIBICIÓN BIOLÓGICA

Un método de desinfección por medio de la inhibición biológica es considerado como un método también amigable con el ambiente, así como los métodos físicos. Está descrito como una estrategia no peligrosa para controlar y reducir la presencia de patógenos específicamente en frutas y verduras por medio de la utilización de microorganismos. (Salazar, 2017) Este método consiste en que las poblaciones microbianas puedan ser controladas principalmente por medio de los productos que las bacterias agregadas producen y excretan al ambiente. Estos compuestos incluyen una variedad de antibióticos de amplio espectro sintetizados no ribosomalmente, enzimas líticas, subproductos metabólicos tales como ácidos orgánicos, exotoxinas proteicas, y péptidos antimicrobianos producidos cromosomalmente y/o ribosomalmente, y bacteriocinas que son de particular importancia en la defensa de las bacterias. (Salazar, 2017)

Sharma, (2009) Ha expuesto dos maneras del uso de antagonistas microbianos en el control de patógenos en las frutas y verduras. El primero se realiza por medio del aprovechamiento de microorganismos ya existentes en el producto, mientras que el segundo método es por introducción artificial de microorganismos ajenos. Actualmente el método más utilizado y efectivo en cuanto a tratamientos por medio de inhibición biológica especialmente en productos vegetales es la introducción artificial de microorganismos patógenos.

Se ha establecido que el control proporcionado por los antagonistas microbianos depende de la concentración inicial del cultivo de microorganismos antagonistas aplicados para el tratamiento. Por otro lado, también es de suma importancia la selección de los antagonistas a utilizar. (Salazar, 2017), Según un estudio realizado por Bautista, (2016) se pueden establecer cuatro parámetros los cuales se puede realizar la selección de estos microorganismos.

- Habilidad de los antagonistas para colonizar rápidamente las superficies de las frutas y verduras y persistir en ellas en niveles efectivos presentando un antagonismo eficaz a diversos patógenos.
- La capacidad de los microorganismos agregados de superar al patógeno en la adquisición de nutrientes disponibles en el medio.
- La capacidad de desarrollo y sobrevivencia del microorganismo a las condiciones ambientales a las cuales el producto está expuesto.
- Sus características propias deben ser favorables en cuanto su estabilidad genética, no deben poseer altos requerimientos con respecto a factores nutricionales, no debe producir metabolitos dañinos para la salud humana o que cause efectos negativos en la salud, su preparación y uso debe ser fácil y accesible.

Muchos de los microorganismos tienen la capacidad de producir bacteriocinas, estas bacteriocinas son sustancias extracelulares producidas por bacterias las cuales inhiben o inactivan otros microorganismos (Bizandi, 2002). Estudios realizados han determinado que el espectro de inhibición de las bacteriocinas es reducido y que se limitan a microorganismos los cuales son relacionados taxonómicamente, esto conlleva a que su actividad bactericida solamente se presenta frente a cepas sensibles (Vázquez, 2009).

Ding, *et al.*, (2013). Ha recopilado información obtenida en diversos estudios realizados con diversas bacterias, bacteriocinas y hasta bacteriófagos. Y se ha determinado que hasta el momento el tratamiento que ha logrado conseguir una reducción tanto de *Salmonella* s.p. y *E.coli* a una concentración de más de 6 log UFC/g atribuyéndose a las bacterias ácido-lácticas. De igual manera, debido a la complejidad de la aplicación de los métodos, la incertidumbre de la eficacia en la aplicación del método a escala industrial y la falta de información sobre las repercusiones en la salud del consumidor, se sugiere continuar con los estudios para obtener diversas alternativas de aplicación.

D. MÉTODOS COMBINADOS

Se ha establecido que los métodos combinados pueden llegar a ser más efectivos en cuanto a la reducción de la carga microbiana en las semillas de alfalfa y soya. A pesar de ello, utilizar dos tratamientos, ya sea uno después que otro o simultáneamente, no necesariamente alcanza altos valores, a pesar de ello, los valores de reducción son mayores a los obtenidos utilizando un solo método. Algunos de los métodos combinados estudiados son la combinación de temperatura (físico) con tratamiento de cloro (químico), temperatura (físico) con irradiación (físico), Temperatura (físico) con altas presiones (físico), entre otras.

Entre los métodos antes descritos, Huda, (2010) ha determinado que la combinación de temperatura de 60 grados Celsius durante 24 horas combinado con un tratamiento presión de 600MPa a 35 grados Celsius durante 2 minutos ha logrado desinfectar por completo las semillas de los retoños. Desafortunadamente, el método descrito anteriormente ha causado una reducción de más de un 20% de rendimiento de los retoños.

En general, la eficacia de una desinfección combinada es mejor que el método establecido por el FDA. A pesar de ello, Identificar la combinación óptima puede ser más complicado debido a los problemas de practicidad la complejidad que aplicación de diversos tratamientos conlleva. (Ding, *et al.*, 2013)

Actualmente hay un sin número de alternativas para métodos los cuales tienen como objetivo reducir la contaminación microbiana de los retoños y las semillas en general, observándose también un aumento en la investigación de nuevos métodos a lo largo de los años.

A pesar de haber obtenido resultados más satisfactorios para algunos métodos con respecto al método recomendado por la FDA, aún no se ha encontrado un método el cual posea la capacidad de eliminar completamente los patógenos de las semillas de retoños en escala de producción comercial (Sikin, *et al.*, 2013). Por lo que Yang, *et al.* (2013) sugiere profundizar más en los temas relacionados a las fuentes de contaminación de las semillas y entender mejor el mecanismo de sobrevivencia de estos patógenos en ellas. También sugiere tomar en cuenta al momento de desarrollar una nueva metodología, que el método sea práctico a nivel industrial, que no posea efectos en la calidad del producto final, el tiempo de tratamiento sea reducido, el equipo requerido sea de fácil acceso y que siga con las normas regulatorias establecidas.

VI. METODOLOGÍA

a. MÉTODOS

1. Obtención de microorganismos

El microorganismo utilizado será preparado en cultivos, siendo este de *Salmonella abaetetuba* ATCC 35640. Por otro lado, se prepararán 4 cultivos de probióticos: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

2. Obtención de semillas

Las semillas utilizadas para el estudio serán de alfalfa y soya. Las semillas de alfalfa serán adquiridas de Superb agrícola de denominación “Alfalfa peruana” empacadas en envase de hojalata de 1 libra cada uno, los envases se encuentran debidamente identificados con su número de lote (170307AP9 y 171030VC2). Las semillas de soya serán compradas en mercados populares por lo cual serán locales sin número de lote.

3. Preparación de *S. abaetetuba* a inocular

- a. Cultivar la cepa a trabajar de *S. abaetetuba* en distintos recipientes estériles que contengan caldo tripticasa soya.
- b. Incubar a una temperatura de 35°C por un tiempo de 24 horas.
- c. Diluir el cultivo en tubos de ensayo hasta que la *S. abaetetuba* esté presente en una concentración de 1×10^8 UFC/ml.
- d. Realizar un recuento de *S. abaetetuba* por mililitro de solución de 1×10^8 UFC/ml utilizando agar XLD y agar Rambach a 37°C por un tiempo de 24-48 horas.

(Jiménez, 2008) (Adzitey, *et al.*, 2011)

4. Contaminación de semillas con *S. abaetetuba*

- a. Se pesará un total de 400 gramos de semillas de alfalfa y soya individualmente y se agregaran en cada uno de los cultivos de *S. abaetetuba* a una concentración de 1×10^8 UFC/ml preparados como se indica en el apartado de preparación de patógenos a inocular.
- b. Sumergir las semillas (aproximadamente 25ml) en caldo tripticasa soya con la *S. abaetetuba* por un tiempo total de 20 minutos con agitación para una contaminación homogénea.
- c. Decantar el inóculo, lavar las semillas agregando agua destilada 3 veces y colocar las semillas en una bandeja estéril con papel toalla para el secado de las mismas bajo flujo laminar a 35 °C por un tiempo de 24 horas.
- d. Evaluar las semillas inoculadas para determinar el recuento de *S. abaetetuba* el cual debería de oscilar alrededor de 1×10^6 UFC/ gramo de semilla.

(Mohammad, 2019)

5. Preparación de cultivos de probióticos

- a. Preparar 4 tubos de ensayo con capacidad de 50 ml. 25ml de caldo MRS y los probióticos *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Lactobacillus casei* ATCC 334 y *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.
- b. Incubar los cultivos de probióticos 24 horas a una temperatura de 32°C
- c. Centrifugar cada cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos y decantar los sobrenadantes.
- d. Lavar con solución salina estéril, centrifugar de nuevo a 10000 rpm durante 10 minutos y decantar los sobrenadantes nuevamente. Realizar este procedimiento 3 veces.
- e. Para tratar las semillas con los probióticos inocular 100ml de caldo MRS (pH 6.8) e incubar a 30°C por 18-24 horas.

(Sáenz, 2016)

6. Actividad bacteriológica

a. Por medio de agar spot- test

- 1) Picar cada una de las cepas de probióticos a utilizar sobre una placa de agar MRS.
- 2) Incubar por un tiempo de 20-24 horas a una temperatura de 25°C bajo condiciones anaeróbicas.
- 3) Inocular 5×10^7 células de *S. abaetetuba* a 7 ml de agar tripticasa soya a 45°C.
- 4) Agregar una capa de agar tripticasa soya con la *S. abaetetuba* al agar MRS con probióticos.
- 5) Incubar por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 30°C.
- 6) Analizar si hay halos de inhibición presentes y si estos tienen un tamaño mayor a 0.5mm.

(Settani, *et al.*, 2008), (Kang, 2000), (Sáenz, 2016)

b. Por medio de una prueba de difusión

- 1) Solidificar 15 ml de agar tripticasa soya en una caja Petri
- 2) Agregar 7 ml más de agar con 0.3 ml de cultivo de *S. abaetetuba* incubado por un tiempo de 24 horas.
- 3) Agregar 10 microlitros de cada uno de los probióticos por separado sobre los 7 ml de agar con cultivo de patógeno previamente inoculado e incubado por 24 horas.
- 4) Incubar a 30°C durante un tiempo de 24 horas en un medio anaerobio.
- 5) Analizar si hay halos de inhibición presentes y si estos tienen un tamaño mayor a 0.5mm.

(Settani, *et al.*, 2008), (Kang, 2000), (Sáenz, 2016)

7. Tratamiento con cloro a semillas inoculadas con *S. abaetetuba*

- a. 100 semillas de cada tipo inoculadas con *S. abaetetuba* serán sumergidos por 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 20,000 ppm de cloro residual. Las 100 semillas serán sumergidas de manera individual según su tipo.
- b. Se realizarán 3 lavados consecutivos decantando la solución para eliminar cualquier traza de cloro que pudiese haber quedado.
- c. Se realizará el recuento microbiológico respectivo para determinar la concentración de *S. abaetetuba* sobreviviente de interés en los 10 gramos de semillas.

- d. Se realizará un control utilizando 10 gramos de semillas inoculadas con la *S. abaetetuba* de manera individual sin cloro.

(Beuchat, 2001)

8. *Tratamiento con probióticos a semillas inoculadas con patógenos previamente tratadas con cloro*

- a. Por un tiempo de 20 minutos, 1, 3,6, 24 y 72 horas sumergir individualmente 100 semillas de cada tipo previamente contaminadas con *S. abaetetuba* y luego tratadas con cloro en 50ml de cultivos de probióticos elaboradas como se indica en el inciso preparación de cultivos de probióticos.
- b. Establecer un control de 100 semillas tratadas con cloro y contaminadas con *S. abaetetuba* de manera individual.
- c. Regar cada 12 horas las semillas con probióticos aislados con solución salina al 0.85% hasta que estos germinen en su totalidad.

(Ye, 2010)

9. *Análisis microbiológico*

- a. En una bolsa para stomacher, pesar la totalidad de retoños y agregar caldo tripticasa soya de manera que la muestra represente el 1% de la solución
- b. Homogeneizar los retoños utilizando un stomacher por un tiempo de 2 minutos.
- c. Diluir la solución para en agua peptonada al 0.1% hasta obtener diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .
- d. Sembrar 0.1ml de cada una de las diluciones en una placa de agar tripticasa de soya por duplicado y distribuir sobre la superficie del mismo.
- e. Incubar durante 3 horas a una temperatura de 37°C.
- f. Agregar 7 ml de agar XLD sobre la superficie de la caja Petri.
- g. Incubar durante un tiempo de 21-24 horas a una temperatura de 37°C
- h. Llevar a cabo el recuento respectivo de *S. abaetetuba* por cada muestra de semillas.

(Salazar, 2017) (Kang, 2000) (Mohammad, 2019) (Kang, 2000)

10. Efecto del tratamiento

- a. Colocar 100 semillas tratadas por los distintos probióticos y una muestra control sin tratamiento en una caja Petri estéril con papel filtro humedecido con agua destilada estéril.
- b. Mantener cajas Petri a una temperatura de 25°C durante 48 horas manteniendo el papel filtro húmedo.
- c. Calcular el porcentaje de germinación correspondiente a cada tratamiento y para la muestra control.

(Gonzales, 2006)

b. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

1. Número de repeticiones

a) Para la prueba de antagonismo

Se llevará a cabo utilizando el tamaño del halo de inhibición por medio de la estimación de las medias de cada tratamiento, desviación y varianza.

b) Para la prueba de eficacia de método

Se llevará a cabo una prueba de ANOVA de dos factores la cual determinará si existe una relación de significancia entre la reducción de microorganismos y el conjunto de todos los tratamientos por medio de la utilización de la diferencia del conteo microbiológico inicial y el conteo microbiológico final.

Las hipótesis serán planteadas de la siguiente manera:

$$H_0: B_1=B_2=B_3=B_4$$

Ha: Hay diferencia significativa en al menos uno de los métodos.

En caso se rechace la hipótesis nula, se procederá a hacer una prueba t para determinar el nivel de significancia de los métodos.

En donde las hipótesis quedarían de la siguiente manera:

$$H_0: B_i=0$$

$$H_a: B_i \neq 0$$

En donde el criterio de rechazo será por medio del valor -p

$$\text{Se rechaza } H_0 \text{ si el valor } -p \leq \alpha$$

Demostrando así que el tratamiento presenta diferencia significativa en el nivel de desinfección.

c) Para el porcentaje de germinación.

El porcentaje de germinación será evaluado mediante gráfico de barras y serán asociados con su respectivo probiótico y eficacia de desinfección.

(Anderson, 2016)

VIII. RESULTADOS

A. PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DE CEPAS

En el Tabla 1, se puede observar los halos de inhibición obtenidos los cuales oscilan entre (2.83 ± 0.31) cm para la prueba de spot-test y un valor de (0.50 ± 0.10) cm para la prueba de difusión para los valores más elevados (1.90 ± 0.26) cm para la prueba de spot-test y un valor de (0.23 ± 0.15) cm para la prueba de difusión para los valores más bajos.

En cuanto al resultado promedio entre ambas pruebas, se pudo determinar que las dos cepas cuyos halos de inhibición promedio fueron mayores a 0.5 cm y presentaron el valor más elevado fueron la cepa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Esta cepa obtuvo un valor promedio de (2.43 ± 0.15) cm para la prueba de spot-test y un valor de (1.00 ± 0.40) cm para la prueba de difusión. Por otro lado, la cepa de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 con un valor promedio de (2.83 ± 0.31) cm para la prueba de spot-test y un valor de (0.50 ± 0.10) cm para la prueba de difusión. Tomando en cuenta los resultados mencionados con anterioridad, se delimitaron las pruebas in vivo únicamente a tres tratamientos, los cuales corresponden a cada uno de los probióticos antes mencionados y una combinación de ellos.

	Spot-test (cm)	Difusión (cm)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	2.83 ± 0.31	0.50 ± 0.10
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	2.43 ± 0.15	1.00 ± 0.40
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.	1.90 ± 0.26	0.23 ± 0.15
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338.	2.03 ± 0.25	0.53 ± 0.06

Tabla 1. Resultados promedio obtenidos para las pruebas de antagonismo entre las bacterias ácido lácticas y la *Salmonella abaeetuba*.

**Nota: Los valores presentados en rojo son aquellos que no cumplen con el mínimo requerido de 0.5cm para considerarse una inhibición exitosa.

B. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

El porcentaje de germinación promedio para la semilla de alfalfa (Figura 1) fue de 79.33% para *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, 82.67% para *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, 79.67% para la combinación de ambos probióticos y 86.33% para la muestra control. Cada uno de los valores mencionados anteriormente fueron comparados con el valor teórico proporcionado por los distribuidores (80%) y se pudo observar que hubo un aumento en el porcentaje de germinación promedio entre los tratamientos de aproximadamente el 2.5%. Cabe destacar que el porcentaje de germinación fue mayor exceptuando las semillas tratadas con *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y la combinación de los dos probióticos, las cuales, obtuvieron un valor aproximado de 79% con respecto al valor reportado por los proveedores de las semillas. (Tabla 7)

Se pudo evidenciar un aumento del 6.33% en el porcentaje de rendimiento de las semillas colocadas como control con respecto al dato teórico (80%), y al comparar el porcentaje de rendimiento de cada uno de los tratamientos tomando de referencia el grupo control, se obtuvo un valor de 91.89%, 95.75% y 92.28% para los tratamientos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y la combinación de ambos respectivamente. En cuanto a la semilla de soya, no es posible comparar datos debido a una ausencia en la germinación.

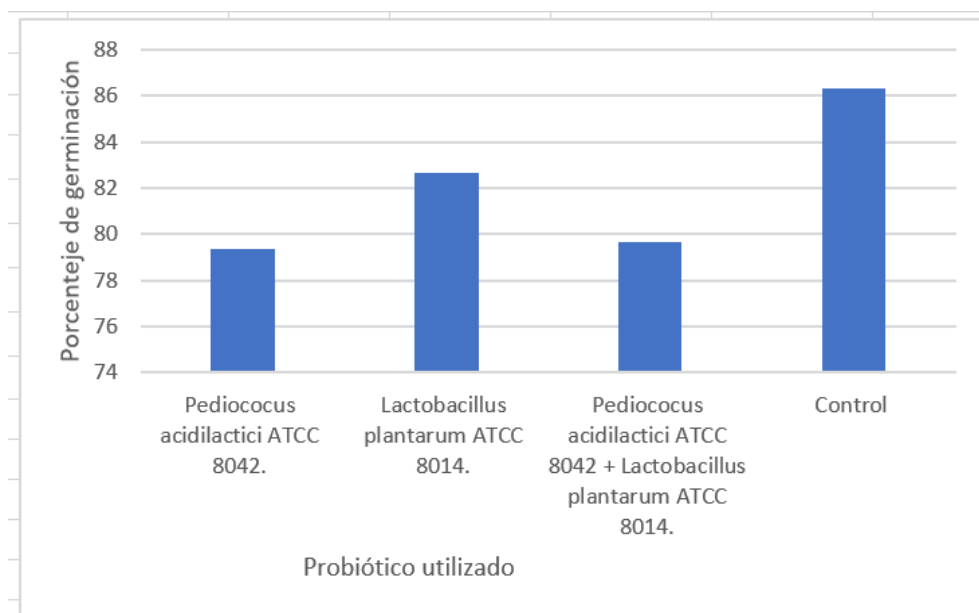


Figura 1. Resultados promedio de germinación de alfalfa sumergida en probióticos durante 20 minutos

Para la Figura 2, se obtuvieron resultados promedio para el porcentaje de germinación de la semilla de soya los cuales oscilaron entre 70% y 98%, siendo los porcentajes más bajos obtenidos para el tratamiento con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 los cuales, para los tiempos de exposición de 1, 3 y 6 horas dieron resultados de 71%, 70% y 86% respectivamente. El tratamiento con ambos probióticos obtuvo valores de 86% para 1 hora, 91% para 3 horas y 97% para 6 horas. Luego el tratamiento con *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 obtuvo valores de 86% para 1 hora, 88% para 3 horas y 96% para 6 horas. Y por último, los valores más elevados correspondientes a la muestra control de 97% para 1 hora, 98% para 3 horas y 98% para 6 horas. Para las semillas de alfalfa no se obtuvieron resultados debido a una ausencia en la germinación.

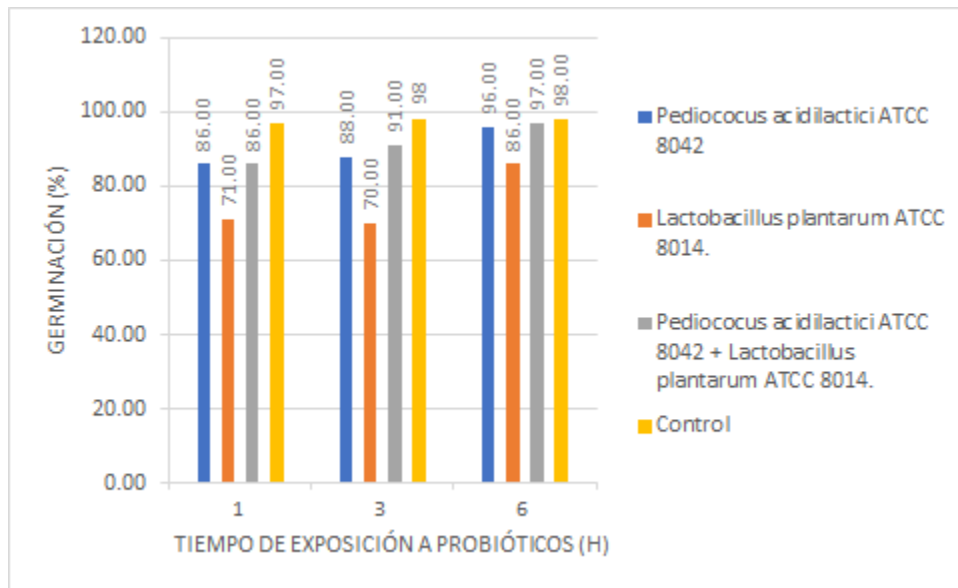


Figura 2. Promedio de germinación de soya sumergida durante 1, 3 y 6 horas en probióticos

C. RESULTADOS DEL MÉTODO EN CUANTO A REDUCCIÓN DE *Salmonella abaeetetuba*

El método no fue efectivo en la reducción y eliminación de la salmonella en las semillas de alfalfa ya que no existe diferencia alguna en la carga microbiana presentada en el grupo control en comparación con los grupos tratados con diversos probióticos. En la Figura 3 se puede observar que la carga representada en logaritmo del recuento en placa de *Salmonella abaeetetuba* ATCC 35640 según la dilución realizada de 10^3 , todos los resultados obtenidos fueron iguales a 12.6. Por otro lado, la prueba no pudo llevarse a cabo en semillas de soya debido a que no hubo germinación.

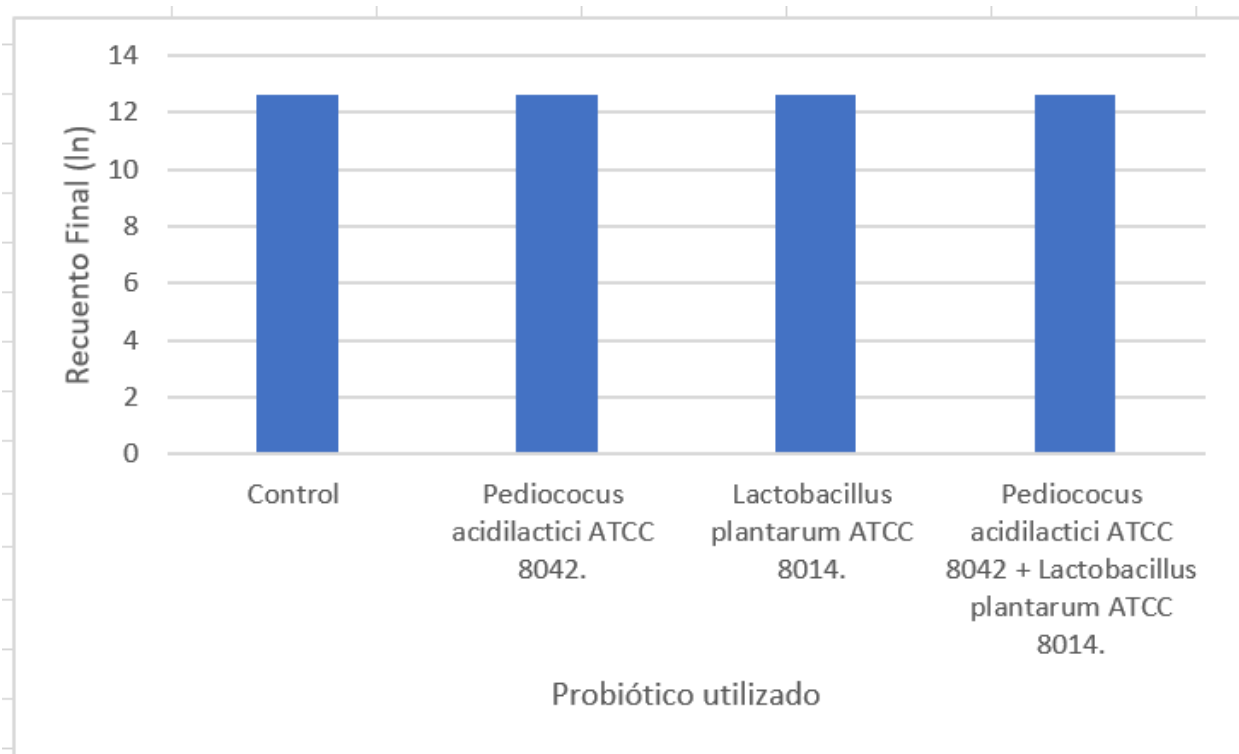


Figura 3. Promedio de carga de salmonella en alfalfa sumergida durante 20 minutos en probióticos

En la Figura 4 se puede observar que los resultados obtenidos se encuentran en un rango de 14.91 y 18.64 unidades logarítmicas, a pesar de ello, se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados para el cual se realizó un ANOVA de dos factores para determinar si había diferencia significativa no solo entre el tratamiento con distintos probióticos, sino que también para determinar si había diferencia significativa entre los tiempos de exposición de las semillas a los probióticos.

Como resultado de los análisis estadísticos presentados en la Tabla 9 llevados a cabo, se determinó que no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la carga microbiana entre los tiempos de exposición de las semillas a los probióticos ni entre el tratamiento con diversos probióticos. El análisis no pudo llevarse a cabo en las semillas de alfalfa debido a una ausencia en la germinación.

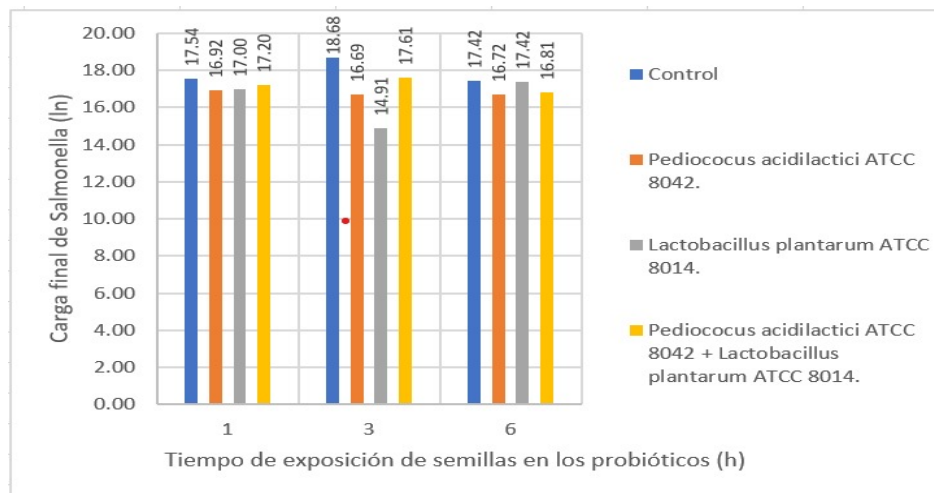


Figura 4. Promedio de la carga de salmonella en soya sumergida durante 1, 3 y 6 horas en probióticos

**Nota: Debido a la exposición de semillas a diversas variables, no hubo germinación de éstas en distintas ocasiones por ello es que, para las semillas expuestas a 20 minutos a los probióticos, hay ausencia en la germinación de soya y para las expuestas durante 1,3y 6 horas, no hay germinación para las semillas de alfalfa.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DE CEPAS

Los resultados obtenidos por medio del uso de la cepa *Pediococcus acidilactici* pueden estar relacionados a la producción de Pediocina JB clasificada como clase IIa denominada no lantibiótica y posee la característica de ser una bacteriocina de peso molecular variable la cual contienen aminoácidos regulares y péptido activo con una secuencia consenso en la región N-terminal. (González-Martínez, 2003)

A diferencia de los *Pediococcus*, el *Lactobacillus plantarum*, produce una biocina denominada plantaricina E/F clasificada en la clase IIb. La clase IIb a diferencia de la IIa previamente mencionada, caracteriza a aquellas biocinas las cuales poseen la capacidad de ser formadoras de complejos de poración. Cuando una biocina posee estos complejos tienden a poseer dos péptidos distintos los cuales son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. Esto pudo verse reflejado en los resultados al presentar un mejor antagonismo frente a salmonella que las otras dos cepas del género *Lactobacillus* estudiadas. (González-Martínez, 2003)

Por otro lado, el resultado de los halos de inhibición más altos obtenidos para ambas pruebas fue el de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 por lo que ambos fueron utilizados en combinación por medio de una inoculación simultánea en el medio de enriquecimiento con una relación 1:1. González-Martínez (2003) ha realizado un estudio en el cual se han combinado dos cepas, una del género *Pediococcus*, y una del género *Lactobacillus* con el objetivo de aumentar las propiedades probióticas de interés entre ambos. En el estudio, se presenta como resultado, que la combinación entre ambas cepas de probióticos da como resultado la producción de una biocina denominada Pediocina PA-1. Esta pediocina, al igual que la pediocina JD producida por *Pediococcus acidilactici*, se encuentra clasificada en la clase IIa. (González-Martínez, 2003)

El mecanismo de acción de los tres tratamientos según la clasificación de las bacteriocinas que estos producen puede ser descrito de manera generalizada ya que comparten mecanismos de acción muy similares. Generalmente las bacteriocinas de clase II actúan formando poros en la membrana citoplásmica de la célula destruyendo la integridad de esta, esto es posible ya que logran

adherirse a ella por medio de uniones electroestáticas con los fosfolípidos. Al perder la integridad de la célula, ocurre un fenómeno el cual da como resultado salida de compuestos o la alteración de la fuerza motriz de protones. En caso de una alteración de la fuerza motriz en los protones, existiría una deficiencia en la forma en la que se produce energía y en la que se sintetizan ácidos nucleicos o proteínas. (González-Martínez, 2003)

Por otro lado, si se da una salida de compuestos, se presenta una salida generalmente de iones en su mayoría de potasio y magnesio, ATP y ácidos nucleicos. Todo este proceso podría ser uno de los principales factores causantes de los halos de inhibición presentes como resultado de las pruebas in vitro de difusión y de spot-test. (González-Martínez, 2003)

Por último, cabe destacar que, a pesar de poseer un mecanismo generalizado, cada clase de bacteriocina puede diferenciarse al momento de llevarse a cabo el proceso antes mencionado. Por un lado, la clase IIa como lo es las Pediocinas JB y las Pediocinas PA-1, se ha observado que esta región consenso amino terminal juega el papel del reconocimiento de la membrana celular blanco, esta membrana celular blanco es la cual da el acceso para el ingreso o enlace de esta biocina con la estructura del patógeno estudiado. En cuanto a la clase IIb, estas van a depender de la actividad de la combinación de dos péptidos los cuales son los encargados de la formación de los poros para su disipación del potencial en la membrana. (González-Martínez, 2003)

B. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

Se buscó monitorear el porcentaje de germinación para cada uno de los tiempos de exposición de los dos tipos de semillas para así poder determinar si la exposición de estas a los distintos probióticos causaría un impacto negativo en el crecimiento de los retoños.

Según lo anteriormente mencionado con respecto a los valores obtenidos en la Figura 1, se ha tomado de referencia lo que Ochoa (2019) ha establecido. Al obtener un promedio menor a 80% en el porcentaje de germinación se considera que deberían de hacerse estudios para una corrección del valor teórico en el lugar en el que se está llevando a cabo la siembra ya que, para cumplir los estándares especificados, se debe ajustar a cada país las necesidades de contenido de humedad, variabilidad de temperaturas, entre otras. A pesar de ello, la diferencia de porcentaje de germinación fue menor al 0.7% el cual podría haber sido corregido al realizar mayor número de pruebas para determinar si hay una repetitividad en el resultado y una mejora en el resultado promedio la cual se encuentre por encima del 80%. (Ochoa, 2019)

Por otro lado, se llevó a cabo la determinación del porcentaje de germinación en las semillas sumergidas por un tiempo de 1, 3 y 6 horas, Figura 2. Cabe destacar que este resultado fue obtenido por medio de la incubación de las semillas a una temperatura de 30°C. Esto se llevó a cabo de esta manera ya que la siembra fue llevada a cabo durante el mes de diciembre y la temperatura ambiental se redujo drásticamente. Varela, *et al* (2011) menciona que las semillas de leguminosas bajo una temperatura constante de 30-45°C provoca una aceleración en la germinación por medio del rompimiento de la impermeabilidad del hilo, esto se da simulando el golpe de la semilla contra una superficie sólida como lo es la escarificación, como se puede observar en la Figura 2.

El porcentaje de germinación obtenido en la semilla de soya fue calculado únicamente en aquellas semillas las cuales presentaron algún indicio de crecimiento ya que, a pesar de incubar las semillas, no se logró que las mismas concluyesen el proceso germinativo. A pesar de ello, se obtuvieron diversos porcentajes de germinación, la ausencia de crecimiento en el germinado es un factor el cual pudo verse afectado por diversos factores al igual que las semillas de alfalfa.

1. *Ph*

Estudios han comprobado que la presencia de ácido láctico o ácidos orgánicos por un tiempo prolongado causan la reducción de más del 20% de germinación en las semillas de alfalfa y soya. Lang, *et al*, (2000) ha estudiado el impacto de la variación en tiempo de exposición de semillas a diversos ácidos orgánicos tales como el ácido láctico y el ácido acético. Estos estudios llevados a cabo no solo varían el tiempo de exposición de las semillas sino también la concentración de ácido en los medios.

Se ha determinado que la exposición de semillas a ácidos orgánicos o a ácido láctico por un tiempo prolongado de aproximadamente 30 minutos en adelante causa una reducción de hasta más del 30% del porcentaje de germinación en las semillas de alfalfa y soya. En el estudio se puede observar por otro lado, que el aumento en la concentración del ácido láctico, tiempo de exposición al mismo y una desinfección con hipoclorito de sodio a 20,000 ppm dio un resultado indeterminado en cuanto al porcentaje de germinación en las semillas. (Lang, *et al*, 2000)

Desafortunadamente, los alcances del estudio no han permitido la determinación y control exhaustivo constante de los valores de pH del medio al cual estaban expuestas las semillas durante su germinación por lo que se puede inferir que la presencia de probióticos tuvo como resultado la producción de ácido láctico y por ende el pH del medio presentó una disminución, exponiendo las semillas a una constante exposición a ácido presentando una ausencia o reducción en la germinación. (Lang, *et al*, 2000)

2. *Presencia de hongo*

En el cultivo de las semillas se pudo observar el crecimiento de hongo en la superficie de las mismas y en el papel toalla utilizado como base para la germinación, con una apariencia algodonosa proporcionada por los micelios. La presencia de hongos en las semillas causa enfermedades fisiológicas en las plantas, esto afecta su funcionamiento y reduce o elimina el potencial germinativo en la semilla. Estos hongos pueden estar presentes en la mayoría de las etapas de los ciclos agrícolas adoptando diversas formas para su supervivencia. Entre las formas a adoptar, el hongo puede estar presente en forma de micelio, esclerocios, clamidosporas y esporas. (Lastres, *et al*, 2009)

Por otro lado, el hongo en cualquiera de las formas antes descritas puede ubicarse no solo en el ambiente, sino que también puede estar presente en la superficie o en el interior de semillas contaminadas. (Lastres, *et al*, 2009) Para evitar el crecimiento de hongos en las semillas, podría reforzarse el efecto del probiótico sobre este por medio de una suplementación del medio utilizando diversos adyuvantes. Matsubara, *et al*, (2016) sugiere que el uso de micro-minerales tales como el selenio, regula el metabolismo y refuerza el poder inmunitario de los probióticos presentes aportando a los probióticos una actividad antifúngica más elevada.

3. *Temperatura*

Por último, se llevó a cabo una prueba con un tiempo de 24 y 72 horas para sumergir las semillas en las distintas soluciones de probióticos y su consecuente riego bajo una temperatura ambiental promedio de 25°C para su almacenamiento. En cuanto al porcentaje de germinación en estas semillas, no se obtuvo resultados satisfactorios ya que no se evidenció indicios de germinación en ninguno de los dos tipos de semilla. Este resultado puede atribuirse a los diversos factores mencionados con anterioridad y también por la temperatura de germinación de las semillas.

La temperatura de almacenamiento de las semillas durante la germinación es de suma importancia, esto se debe a que las semillas al ser adquiridas se encuentran en el denominado estado de latencia. Este estado de latencia, dormición o letargo es aquella incapacidad de la semilla sana y viable de germinar. Generalmente está presente al momento de la formación de la semilla y cumple la función de no permitir una germinación previa a la dispersión de la misma en el campo. La latencia en las semillas también cumple la función de supervivencia ya que esta restringe el crecimiento y germinación de la planta en caso los factores ambientales a los cuales se encuentra expuesta no son favorables almacenando la energía de esta para el momento ideal de la germinación. Las semillas expuestas a probióticos y a distinto número de horas fueron colocadas en envases expuestos a temperatura ambiente, temperatura la cual oscilaba entre los 13°C y 15°C, esta temperatura es característica durante la época de invierno en un área boscosa. (Ochoa, 2019). La experimentación tuvo que darse por concluida debido a que ninguno de los dos tipos de semilla presentó crecimiento alguno.

4. Salinidad

Para la purificación de cada una de las cepas a utilizar, se llevó a cabo una solución salina a una concentración del 0.85%, esta solución en conjunto con los probióticos fue utilizada para el riego de las semillas. Se hace mención del uso de la solución salina debido a que la salinidad en el medio de cultivo y desarrollo de los probióticos pudo haber sido una causa para impactos negativos no solo en su desarrollo sino en este caso, como pudo observarse durante la experimentación, en su germinación. La presencia de sales en el agua de riego de los retoños fisiológicamente causa un estrés osmótico e iónico, este estrés iónico se da como producto en una alteración de la relación potasio/ sodio el cual impacta directamente en el citosol ocasionando incrementos en las concentraciones de sodio y cloro las cuales dan como resultado daños en la planta o la incapacidad de germinación. (Hernández, *et al*, 2014)

Estudios llevados a cabo por Hernández, *et al*, (2014) han demostrado que la capacidad de crecimiento se ha visto imposibilitado con una concentración de 0.61% de sodio en el tejido por lo que la solución salina utilizada para la purificación de los probióticos pudo haber causado el mismo fenómeno observado en la experimentación. Por otro lado, al utilizar el medio de cultivo de los probióticos, se crea la misma respuesta esto se debe a que el caldo MRS está compuesto acetato de sodio en un 0.5% y está compuesto de elementos los cuales al estar en disolución se separan en iones de amonio, magnesio, manganeso y potasio en menores concentraciones.

Se debe mencionar que el efecto de la sal no es exclusivamente osmótico, la presencia de sal causa un control inadecuado de iones en este tipo de plantas. Este tipo de daño causa un problema en los mecanismos internos de compartimentalización de iones. Al referirse a este tipo de efecto, no se hace referencia a un estrés osmótico, sino a un estrés causado por una toxicidad de iones presentándose en la membrana celular y el citoplasma. Este estrés antes mencionado puede llegar a dañar la actividad enzimática y organelos necesarios para el desarrollo del retoño. (Hernandez, *et al*, 2014) (Obledo, 1991)

Como solución a esta problemática se sugiere utilizar semillas halófitas, estas semillas se cree son tolerantes a la salinidad en concentraciones no mayores a 10,000 mg/l y son caracterizadas por el mecanismo de secuestro y acumulación de sal en las vacuolas celulares, esto le permite controlar la concentración de sal presente en el citosol para ser capaz de mantener la relación potasio/sodio en las células. Se ha intentado definir si las semillas de alfalfa y soya pertenecen a

alguno de estos grupos, desafortunadamente, la variabilidad de los cultivos en cuanto a la respuesta a el estrés antes mencionado imposibilita la clasificación de estas por lo que se debe llevar a cabo una evaluación del genotipo a utilizado. (Hernandez, *et al*, 2014)

C. RESULTADOS DEL MÉTODO EN CUANTO A REDUCCIÓN DE *Salmonella abaeetuba*

Debido a que el objetivo principal del estudio era determinar la capacidad de reducción de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 en retoños de alfalfa y soya, se llevó a cabo un análisis microbiológico al concluir cada uno de los métodos estudiados durante la experimentación.

Este resultado reflejado en la Figura 3 fue interpretado de la siguiente manera debido a que, según la FDA, BAM capítulo 3 recuento en placa de microorganismos aeróbicos, el método correcto de reportar recuentos en placas con crecimiento excesivo e incapacidad de diferenciación entre unidades formadoras de colonias es el reporte de estas como TMTC lo cual se traduce por sus siglas a muchas colonias como para ser contadas y su posterior interpretación como una presencia de >300 UFC por placa. Por otro lado, el análisis microbiológico en las semillas de soya no se pudo llevar a cabo debido a la ausencia de germinación en las semillas y la aparición de mohos en las mismas, por lo que la muestra fue desechada.

Debido a los resultados antes mencionados para la Figura 4 se prosiguió a aumentar el tiempo de exposición directa de las semillas con los probióticos. Estos resultados se encuentran registrados en la Figura 4 como valores promedio del logaritmo del recuento total en placa de la dilución inoculada la cual fue aumentada a 10^4 . Durante esta experimentación no pudo llevarse a cabo la determinación de salmonella en retoños de alfalfa ya que la semilla de esta presentó una ausencia en la germinación. Se determinó por medio de una prueba ANOVA de dos factores Tabla 9 que no existe diferencia significativa entre el tiempo de exposición y el tipo de probiótico con respecto a la reducción en la carga microbiana y que ambos valores de F presentaron valor menor con respecto al F crítico.

Se llevó a cabo el método de sumersión de semillas a 24 y 72 horas en probióticos con exposición a temperatura ambiente. La determinación de salmonella para esta experimentación tampoco pudo llevarse a cabo debido a la ausencia de germinación de los retoños. Para el estudio

es de suma importancia mencionar la razón por la cual no se lleva a cabo la determinación de carga microbiana en semillas, sino que solo en los retoños, esta importancia radica en las condiciones de germinación a las cuales son expuestas los retoños. Según Stewart, *et al*, (2001) debido a que los retoños poseen altos valores nutricionales, los cuales para llevar a cabo el proceso de germinación deben liberarse para estar biodisponibles y ser utilizados por los mecanismos propios de las plantas, son uno de los factores los cuales benefician el crecimiento de los microorganismos patógenos, el cual, en este caso, fue la Salmonella.

Cabe mencionar, que entre las condiciones ampliamente estudiadas para la conservación de alimentos y la prolongación de la vida útil es el pH. Se ha determinado que un pH neutro el cual se encuentre más apegado al 7 es una condición ideal para el crecimiento y el desarrollo del retoño. Al observar los resultados, el pH interno de la semilla presenta un indicio de ser de aproximadamente 7-7.5, ya que este pH es el pH óptimo para el crecimiento y multiplicación de la Salmonella. A pesar de ello, los alcances del estudio no permiten la determinación específica del pH en el interior de la semilla por lo que se sugiere que para futuros estudios se lleve a cabo la determinación de pH en el retoño de la semilla posterior a su lavado para la eliminación de residuos de probióticos. (Stewart, *et al*, 2001)

Por último, otra de las variables que son cruciales para el desarrollo y crecimiento de cualquier patógeno en los alimentos es la temperatura. Los patógenos al igual que cualquier organismo vivo poseen una temperatura óptima de crecimiento la cual les permite la multiplicación exponencial en un menor tiempo. Durante la experimentación se mantuvieron las semillas a temperatura ambiente y a temperatura de incubación de 30°C. Según la literatura, el rango de temperatura para el crecimiento de la salmonella es de un rango muy amplio el cual puede encontrarse desde 10°C hasta 45°C presentando tasas de crecimiento variables, por lo que la incubación de las semillas a 30°C también fue un factor que propició el crecimiento y la permanencia de la salmonella en las semillas. (Stewart, *et al*, 2001)

La actividad de los probióticos, al igual que el cloro, necesitan un contacto directo con la Salmonella para lograr su inactivación. Un fenómeno comúnmente presentado durante el tratamiento y desinfección de semillas en general es el poco tiempo de contacto del agente desinfectante con el microorganismo patógeno, esto puede deberse a que la capa externa de la semilla no es del todo lisa, proporcionando un lugar a los patógenos de almacenarse y no

necesariamente entrar en contacto con ninguna de las soluciones utilizadas para este estudio. (Buchholz, *et al*, 2010)

Este escenario puede darse también por daños físicos ocasionados a la semilla creando un área para el almacenamiento de microorganismos. Generalmente en la industria se utiliza un aparato el cual burbujea la sustancia sanitizante para que esta provoque una turbulencia en el fluido y mueva las semillas de forma que esta pueda lograr un contacto completo con cada una de las semillas y la mayor parte de su superficie. (Buchholz, *et al*, 2010)

Otro fenómeno para considerar es la internalización de la salmonella en el tejido vegetal del retoño. Se ha demostrado en diversos estudios que el aumento de carga de *Salmonella* en los retoños se presenta durante las primeras 24 horas de la germinación, este aumento de carga puede partir de concentraciones muy pequeñas del microorganismo y llegar hasta concentraciones de aproximadamente 10^7 , fenómeno el cual pudo ser observado durante el estudio. Se ha estudiado el comportamiento en muchos patógenos presentes en diversas semillas y se ha observado que estos tienen la capacidad de ingresar a los tejidos internos de la planta al no encontrar condiciones favorables en la superficie. (Sánchez, *et al*, 2011)

Este mecanismo antes mencionado es posible ya que la *Salmonella* posee un llamado mecanismo de secreción tipo III y consiste en proporcionar a los bacilos gram negativo secretar e inyectar proteínas de carácter patógeno. Estas proteínas de patogenicidad son inyectadas específicamente en el citosol de la célula vegetal, posterior a ser inyectadas, estas proteínas reensamblan factores eucariotas de funcionamiento en las señales de transducción, estos son capaces de crear interferencia con vías de señalización de la célula y causar la redirección de señales celulares encargadas de la organización del citoesqueleto. Esta organización se ve modificada estableciendo nichos subcelulares los cuales proporcionan facilitación en la colonización bacteriana en el interior del tejido vegetal de los retoños. (Sánchez, *et al*, 2011)

Estudios han demostrado también, que la internalización de la *Salmonella* en el interior de los tejidos de los retoños se debe a un movimiento del patógeno por medio de las raíces. Diversos autores han reportado que el mecanismo de ingreso de los patógenos por las raíces se da preferentemente por medio de las uniones de estas. Estos sitios preferidos por los patógenos son sitios que se caracterizan por liberar exudados y presentar un mejor acceso a altas concentraciones

de nutrientes las cuales permiten una supervivencia, estadía prolongada y la capacidad de multiplicación. (Ramírez, 2006)

Se ha determinado que este tipo de microorganismo es capaz de ingresar al retoño por medio de aberturas naturales ubicadas en la epidermis de la plántula, entre estas se puede encontrar las cavidades sub-estomales las cuales se encuentran en las hojas. Por último, una vez los microorganismos se ubiquen en el interior de la planta, las células vegetales encargadas de proteger la planta se cierran en su estado original creando una capa protectora la cual protege a la *Salmonella* de sanitizantes que funcionan por contacto o cualquiera que trate únicamente la superficie del retoño. (Ramírez, 2006)

Calderón, *et al*, (2007) también ha mencionado que bacterias gram negativo, como lo es la *Salmonella*, son poco sensibles a uno de los mecanismos de defensa de los probióticos, específicamente el de la producción de bacteriocinas. La razón explicada en los diversos estudios que Calderón, *et al*, mencionan es que estos microorganismos son menos susceptibles debido a la configuración y constitución de la pared de la membrana externa. Esta membrana externa presente en la *Salmonella* constituye una barrera de permeabilidad selectiva que permite no solo un correcto intercambio de iones, nutrientes y desecho de sustancias nocivas para la célula, sino que también la restricción de entrada de sustancias nocivas, las cuales en este caso serían las biocinas secretadas por los probióticos. (Cortés, *et al*, 2009)

En conclusión, debido a todos los factores antes mencionados, por el momento la utilización de bacterias ácido-lácticas no es un método que se vea prometedor al corto plazo en cuanto al tratamiento de semillas con altas cargas iniciales de *Salmonella*. A pesar de ello, se debería de ampliar los alcances de la investigación tomando en cuenta los posibles factores los cuales pudieron haber influenciado en esta experimentación.

X. CONCLUSIONES

- La desinfección de las semillas de alfalfa y soya con 20000 ppm y su posterior riego con cepas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 y una combinación de ambas no fue efectivo para la reducción de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640
- Se observó que el método causó un impacto negativo en cuanto el desarrollo y germinación de las semillas de alfalfa y soya por lo que presentó no ser viable para su uso en la industria.
- Los retoños que presentaron una mayor reducción de *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 fueron aquellos tratados con *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 por un tiempo de 3 horas. A pesar de ello, el método no fue efectivo ya que no se presentó una diferencia significativa entre los resultados obtenidos posterior al tratamiento de las semillas con los probióticos y el grupo control.

XI. RECOMENDACIONES

- Tomar en cuenta las variables mencionadas en el estudio durante la selección, manejo y tratamiento de las semillas para que el método no cause un impacto negativo en cuanto el desarrollo y germinación de las semillas de alfalfa y soya. Para ello, se mencionan los puntos de mejora y las recomendaciones a tomar en cuenta para solucionar estos fenómenos presentados.
 - Para asegurar una producción de biocinas por parte de los probióticos, comprar y trabajar con cepas aisladas y caracterizadas a las cuales se les hayan realizado diversos estudios y se haya comprobado una producción de biocinas. Estas pueden adquirirse por medio del contacto con laboratorios microbiológicos y solicitar las cepas con suficiente tiempo de antelación.
 - En cuanto al pH, llevar a cabo un control exhaustivo en el monitoreo del pH en el medio en el que se encuentran las semillas, así como el pH en los caldos de cultivo a los que las semillas son expuestas durante la contaminación con *Salmonella* y el tratamiento con los probióticos.
 - Utilizar adyuvantes como micro-minerales tales como el selenio para la regulación del metabolismo y refuerzo de la actividad antifúngica en los probióticos. De igual manera, colocar las semillas en un ambiente más controlado en cuanto a contaminación ambiental y estudiar las semillas en búsqueda de contaminación con alguna forma de hongos para así reducir la probabilidad de contaminación con los mismos.
 - Para eliminar la prolongación de la fase de letargo en las semillas, continuar con el estudio utilizando un ambiente controlado con respecto a la temperatura, así como la utilización de incubadoras para determinar si este factor también contribuyó en la ausencia de germinación evidenciada.
 - Identificar e investigar distintos métodos de purificación de probióticos los cuales no involucran la utilización de cloruro de sodio para eliminar el daño ocasionado por estrés osmótico y la toxicidad de iones. Por otro lado, también se recomienda el estudio, caracterización y utilización de semillas

de alfalfa y soya de carácter halófito ya que estas presentan tolerancias mayores a la exposición de medios salinos.

- Para realizar la desinfección con la solución de cloro y probióticos, utilizar un aparato de burbujeo el cual permite crear turbulencia en las soluciones para una desinfección más homogénea.
- Mantener un control más exhaustivo en los metabolitos secundarios y los productos relacionados a los microorganismos que intervienen durante el proceso de desinfección.
 - Llevar a cabo estudios previos en las semillas para determinar sus características y su forma de reacción con respecto a factores tales como estrés osmótico, cambios de temperatura y factores relacionados los cuales puedan repercutir en la germinación de los retoños.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adzitey, F., Huda, N., Rusul, G. (2011). *Comparison of Media for the Isolation of Salmonella (XLD and Rambach) and Listeria species (ALOA and Palcam) in Naturally Contaminated Duck Samples*. Internet Journal of Food Safety. 13. 20-25.
- Alba, N. y Araujo, F. (2008). *Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapéuticos en laboratorios prenabell LTDA*. Pontificia Universidad Javeriana, facultad de microbiología industrial. Bogotá. Pp. 99.
- Anderson, D., Sweeney, D., Williams, T., Camm, J., Corchran, J. (2016). *Estadística para negocios y economía*. 12a edición. Cengage learning. México.
- Ayala, R. (2014). *Extracto de cáscara de granada como antimicrobiano y potenciador antioxidante en germinados de alfalfa*. Centro de investigación en alimentación y desarrollo A.C. México. Pp. 22.
- Baker, K. A. (2016). *Microbiological and quality characteristics of alfalfa (Medicago sativa) and mung bean (Vigna radiata) sprouts grown using different water sources and treated post-harvest (Doctoral dissertation)*. Clemson University, United States.
- Bari, M. L., Nei, D., Enomoto, K., Todoriki, S., & Kawamoto, S. (2009). *Combination treatments for killing Escherichia coli O157: H7 on alfalfa, radish, broccoli, and mung bean seeds*. Journal of food protection, 72(3), 631-636.
- Bari ML, Inatsu Y, Isobe S, Kawamoto S. (2008). *Hot water treatments to inactivate Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in mung bean seeds*. J Food Prot 71:830-4.
- Bari, L., Enomoto, K., Nei, D., Kawamoto, S., (2011). *Development of effective seed decontamination technology to inactivate pathogens on mung bean seeds and its practical application in Japan*. Jpn. Int. Res. Quart. 45, 153-161.
- Bautista, L. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos (Tesis de licenciatura)*. Pontificia Universidad Javerina, Bogotá, Colombia.
- Beristain-Bauza, S. C., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). *Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos*. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 6(2), 64-78.

- Beuchat, L., Ward, T., Pettigrew, C. (2001). *Comparison of chlorine and a prototype produce wash product for effectiveness in killing Salmonella and Escherichia coli O157: H7 on alfalfa seeds. Journal of Food Protection*, 64(2), 152-158.
- Bi zani, D., y Brandelli, A. (2002). *Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus sp. Strain 8 A. Journal of applied microbiology*, 93(3), 512-519.
- Buchholz, A., y Matthews, K. R. (2010). *Reduction of Salmonella on alfalfa seeds using peroxyacetic acid and a commercial seed washer is as effective as treatment with 20 000 ppm of Ca (OCl) 2. Letters in applied microbiology*, 51(4), 462-468. New Jersey, Estados Unidos.
- Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L., y Arias, M. L. (2007). *Evaluación del efecto del cultivo probiótico Lactobacillus rhamnosus adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157: H7, Listeria monocytogenes y Salmonella enteritidis. Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(1), 51. Costa Rica.
- Canadian Food Inspection Agency. (2005). *Health hazard alert. Mung bean sprouts manufactured by Toronto Sun Wah trading may contain Salmonella bacteria*. Extraído de http://www.inspection.gc.ca/english/corpaffr/reca_rapp/2005/20051124e.shtml. Accesado el 04/04/2020.
- Cava, R., Sangronis, E., Rodríguez, M., Colina, J. (2009). *Calidad microbiológica de semillas germinadas de phaseolus vulgaris. Interciencia*, 34(11), 796-800.
- CDC. (2016). *Multistate Outbreak of Salmonella Infections Linked to Alfalfa Sprouts from One Contaminated Seed Lot (Final Update)*. Accesado el 16 de mayo de 2016, Extraído de <http://www.cdc.gov/salmonella/muenchen-02-16/index.html>.
- Dalal, J., y Kulkarni, N. (2013). *Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (Glycine max (L) Merril). Current research in microbiology and biotechnology*, 1(2), 62-69.
- Cervantes, J. (2013). *Antagonismo microbiano como alternativa para controlar el desarrollo de salmonella entérica y Escherichia coli O157 en germinados de alfalfa. Universidad autónoma de Querétaro. Pp. 85.*
- Chang, S; Redondo-Solano, M; Thippareddi, H. (2010). *Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin.*

- Department of Food Science and Technology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, United States
- Combs, G. F. (2012). *The Vitamins*. Vol. 4th ed. Academic Press.
 - Cortés, A., León, J., Jiménez, F., Díaz, M., Villanueva, A. (2016). *Alimentos funcionales, alfalfa y fitoestrógenos*. Revista Mutis, 6(1), 28-40.
 - Cortés, G. (2009). *Caracterización electrofisiológica de la proteína OmpW de salmonella entérica serovar typhimurium en bicapas de fosfolípidos* (Doctoral dissertation, Universidad Andrés Bello). Chile.
 - Da Silva, N; Taniwaki, M; Amstalden, V; Ferraz, N; Da Silva, M. y Romeiro, R. (2013). *Basic Techniques for the detection of the presence/absence of microorganisms*. Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. 49-56, London, UK.
 - DeEll, J.R. 2014. *Sprouts. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks*. Agriculture Handbook Number 66 (HB-66). Beltsville, MD: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
 - Ding, H; Fu, T; Smith, M. (2013). *Microbial Contamination in Sprouts: How effective Is Seed Disinfection Treatment?* US Food and Drug Administration, Office of the Commissioner, Silver Spring, MD, USA.
 - Fletcher, B. (2016). *Soybeans: Cultivation, Nutritional Properties, and Effects on Health*. Nova Science Publishers, Inc.
 - Flores, P. (2013). *Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la tasa respiratoria y calidad de germinados de alfalfa mínimamente procesados en fresco*. Facultad de ciencias agrónomas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
 - Fu, C., Hernandez, T., Zhou, C., & Wang, Z.-Y. (2014). *Alfalfa (Medicago sativa L.)*. Agrobact
 - Gilmore, P. L. (2010). *Lipids: Categories, Biological Functions and Metabolism, Nutrition and Health*. Nova Science Publishers, Inc.
 - González, B., Gómez, M., Jiménez, Z. (2003). *Bacteriocinas de probióticos*. Revista Salud Pública y Nutrición, 4(2). erium Protocols, 213–221.
 - González, D. (2006). *Desinfección de semillas de alfalfa con luz ultravioleta de onda corta (UVC)*. Tesis Licenciatura. Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería

- Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas Puebla.
- Guarner, F., Khan, A., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., y Fedorak, R. (2011). *Probióticos y prebióticos*. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos, 1, 1-29.
 - Hernandez, Y. y Soto, N. (2014). *Reseña bibliográfica salinidad en la soya (Glycine max (L.) Merrill) y avances en el estudio de los mecanismos de tolerancia*. Ministerio de educación superior, Cuba. Pp. 12.
 - Hudaa, H. (2010). *Individual and combined application of dry heat with high hydrostatic pressure to inactivate Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on alfalfa seeds*. Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark. Pag. 9.
 - Jiménez, V. (2004). *Reducción de microorganismos causales de enfermedades transmitidas por alimentos en retoños de alfalfa (Medicago sativa) y soya (phaseolus aureus) por medio de la utilización de bacterias ácido-lácticas*. Departamento de ingeniería en ciencias de los alimentos, Universidad Del Valle de Guatemala, Guatemala. Pag. 58.
 - Jiménez, S. M., Tiburzi, M. C., Salsi, M. S., Moguevsky, M. A., & Pirovani, M. E. (2008). *Tratamientos con ácido acético de cultivos de e. coli y salmonella in-vitro y en líquidos escurridos del lavado de canales de pollo treatments of acetic acid for e. coli and salmonella in-vitro and in run-off fluids from poultry washes*. CYTA-Journal of Food, 6(2), 90-94.
 - Jones, M; Martoni, C; Tamber, S; Parent, M; Prakash, S. (2012). *Evaluación de la seguridad y tolerancia del Lactobacillus reuteri NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación en yogur: Estudio con distribución aleatoria, controlado con placebo, doble ciego*. Toxicol Quím Alimentos, 50, 2216-2223.
 - Kang, Dongyun. (2000). *Application of thin agar layer method for recovery of injured Salmonella typhimurium*. International journal of food microbiology. 54. 127-32.
 - Kang, D. H. (2002). *Development of membrane filter holder (MFH) method for recovery of heat-injured Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhimurium*. Letters in applied microbiology, 34(1), 62-66.

- Karimi, E., Oskoueian, E., Oskoueian, A., Omidvar, V., Hendra, R., & Nazeran, H. (2013). *Insight into the functional and medicinal properties of Medicago sativa (Alfalfa) leaves extract*. Journal of Medicinal Plants Research, 7(7), 290-297.
- Kimura, E., & Islam, M. A. (2012). *Seed scarification methods and their use in forage legumes*. Research Journal of Seed Science, 5(2), 38-50.
- Laita, E., Mateo González, E., Mazas, B., Bravo, B., & Lucha, P. (2018). *¿Cómo se abordan los minerales en la enseñanza obligatoria? Análisis del modelo de mineral implícito en el currículo y en los libros de texto en España* (No. ART-2018-108966).
- Lang M., Ingham B., Ingham S. (2000). *Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating Escherichia coli O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting*. Intl J Food Microbiol 58:73–82. Wisconsin, Estados Unidos. Pp. 10
- Lastres, L., Soza, F. (2009). *Manual de Sanidad Vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central*. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. Pp. 75
- Macaluso, G., Fiorenza, G., Gaglio, R., Mancuso, I., y Scatassa, M. (2016). *In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making*. Italian Journal of Food Safety, 5(1)
- Mateluna, R. (2006). *Estudio de actividad antibacteriana de potenciales biocontroles sobre bacterias acéticas involucradas en la pudrición ácida de la uva*. Universidad de Chile, Chile. Pp. 72
- Matsubara, V., Bandara, N., Mayer, P., y Samaranayake, P. (2016). *Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis*. Clinical Infectious Diseases, 62(9), 1143-1153.
- Maturin, L., y Peeler, J. (2001). *BAM: Aerobic plate count*. Bacteriological Analytical Manual US Food and Drug Administration, New Hampshire Avenue Silver Spring USA.
- Márton, M., Mándoki, Z., Csapó-Kiss, Z., Csapó, J. (2010). *The role of sprouts in human nutrition. a review*. Acta University Sapientiae, Alimentaria. Sapientia–Hungarian University of Transylvania.
- Mejía, C. (2019). *Formulación, evaluación y aporte nutricional de pastas alimenticias fortificados con proteína foliar de alfalfa (Medicago sativa)*. Universidad nacional José Faustino Sánchez Carrión. Perú.

- Milagros, C., Ramirez, E., Figueroa, F., Salsavilca, I. y Loarte, S. (2019) *Suplemento vitamínico en polvo a base de alfalfa y camu camu*. Universidad San Ignacio de Loyola, Perú. Pp. 279
- Mollinedo, A., Benavides, G. (2014). *Carbohidratos*. Revista de Actualización Clínica Investiga, 41, 2133.
- Maxwell, J. E. (2011). *Soybeans: Cultivation, Uses and Nutrition*. Nova Science Publishers, Inc.
- Mohammad, Z; Kalbasi-Ashtari, A; Riskowski, G; Castillo, A. (2019). *Reduction of Salmonella and Shiga toxin-producing Escherichia coli on alfalfa seeds and sprouts using an ozone generating system*. Department of Nutrition and Food Science, biological and agricultural engineering and animal sciences Texas A&M University, College Station, TX, USA. Pag. 7.
- González-Martínez, B., Gómez-Treviño, M., & Jiménez-Salas, Z. (2003). *Bacteriocinas de probióticos*. Revista Salud Pública y Nutrición, 4(2).
- Narvaiz, P. (2000). *Irradiación de los alimentos*. Ezeiza- Pcia. de Buenos Aires- Argentina. Pp. 4.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. Editorial médica panamericana, Buenos Aires, Argentina. Pp. 455
- Nieto, R. (2005). *Estructura y fisiología de las semillas*. Chapingo, México: ISBN.
- Obledo, N. (1991). *Efecto de poliaminas en la germinación de medicago sativa l.(alfalfa) bajo estrés de salinidad*. Universidad de Guadalajara, Mexico. Pp. 79
- Ochoa Antezana, J. L. (2019). *Efecto de escarificación física en la germinación de semilla de alfalfa (medicago sativa) variedad AGP 35*. Huancavélica, Perú. Pp. 101
- Organización mundial de la salud. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. Tercera edición. Ginebra. Pp. 223.
- Oskoueian E, Abdullah N, Hendra R, Karimi E (2011b). *Bioactive compounds, antioxidant, xanthine oxidase inhibitory, tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory activities of selected agro-industrial by-products*. Int. J. Mol. Sci. 12:8610-8625.
- Padilla, T. (2016). *Bacteriocins: Production, Applications and Safety*. Nova Science Publishers, Inc.

- Palma, F. (2009). *Respuestas inducidas por ácido absícico y ácido salicílico en la simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino*. Universidad de Granada, Granada. Pp. 421.
- Perkins, E. (2016). *Food Microbiology: Fundamentals, Challenges and Health Implications*. Nova Science Publishers, Inc.
- Pospíšil, D., Fiala, J. (2012). *Alfalfa and Clovers: Properties, Medicinal Uses, and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc.
- Ramírez, E. (2006). *Frecuencia de Microorganismos Indicadores de Higiene y Salmonella y el Comportamiento de Grupos Patógenos de Escherichia coli en Germinado de Soya*. Pachuca de Soto, Hidalgo. Pp. 110
- Ramírez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). *Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal*. Scientia et technica, 15(42), 263-268.
- Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K (2009). *Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review*. Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy 8(3):229-235.
- Rodríguez, M. (2019). *Enseñanza de la preparación y determinación de disoluciones al técnico superior de laboratorio*. Universidad de Jaén, España. Pp. 105
- Rondón, A; Samaniego, L; Bocourt, R; Rodríguez, Milián, G; Ranilla, M; Laurencio, M; Pérez, M. (2008). *Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de Lactobacillus sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba isolation*. Journal of Food, 6:1, 56-63
- Ruiz, M., Colello, R., Padola, N., & Etcheverría, A. (2017). *Efecto inhibitorio de Lactobacillus spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos*. Revista argentina de microbiología, 49(2), 174-177.
- Sáez, S. (2016). *Estudio genómico de Lactobacillus plantarum LL441 y caracterización del locus de la plantaricina C*. Máster universitario en biotecnología alimentaria. Universidad de Oviedo.
- Salazar, J. (2017). *Efecto de bacillus spp. en el control de salmonella y en el crecimiento de germinado de alfalfa*. Universidad autónoma de Querétaro, facultad de química. Querétaro. Pp. 105

- Sánchez, J. y Cardona, N. (2011) *Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal*. Infectio 7.1 Asociación colombiana de infectología, Colombia.
- Sánchez, L., & Tromps, J. (2014). *Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico*. Revista de Salud Animal, 36(2), 124-129.
- Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). *Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation*. International journal of food microbiology, 121(2), 123-138.
- Sikin, M; Zoellner, C; & Syed, R. (2013). *Current Intervention Strategies for the Microbial Safety of Sprouts*. Journal of food protection. Institute of Food Science, Cornell University, New York, USA. Pag. 2099-2123.
- Solano, G., Fonseca, R., Santiesteban, R. (2012). *Proteína, aminoácidos y grasa en el grano de variedades de soya (Glycine max (L.) Merry) cultivadas en el oriente de cuba*. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 19(4).
- Stein, H; Berger, L; Drackley, J; Fahey, G; Hernot, D; Parsons, C. (2008). *18 - Nutritional Properties and Feeding Values of Soybeans and Their Coproducts*. Department of animal sciences, University of Illinois. IL. Pag. 613-660.
- Stewart, D., Reineke, K., Ulaszek, J., y Tortorello, M. (2001). *Growth of Salmonella during sprouting of alfalfa seeds associated with salmonellosis outbreaks*. Journal of food protection, 64(5), 618-622. Illinois, Estados Unidos.
- Sujii, A., Mendonça, Aura, D., Shaw, A. (2014). *Foodborne Pathogens and Disease*. 900-906.
- Thayer, D; Rajkowski, K; Boyd, G; Cooke, P; Soroka, D. (2002). *Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella by Gamma Irradiation of Alfalfa Seed Intended for Production of Food Sprouts*. East Mermaid Lane, Wyndmoor, Pennsylvania 19038, USA. Pp. 175-181.
- U.S. Food and Drug Administration. (2000). *Irradiation in the production, processing and handling of food*.
- U.S. Food and Drug Administration. (2016). *La irradiación de alimentos: lo que usted debe saber*.
- U.S. Food and Drug Administration. (1999a). *Guidance for industry: reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds*.

- Varela, S., y Arana, V. (2011). *Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos*. *Sistemas Forestales Integrados*, 3, 1-10.
- Vignoli, R. (2006). *Esterilización y desinfección. Temas de Bacteriología y Virología para CEFA*. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Instituto de Higiene. Disponible en: [http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap, 27](http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap,27).
- Villarreal, C., Gelabert, R., Gaxiola, G., Cuzon, G., Amador, L. E., Guevara, E., & Brito, R. (2011). *Crecimiento de alevines de Cichlasoma urophthalmus con dietas basadas en diferentes niveles de inclusión de proteína de soya y gluten de trigo*. *Universidad y ciencia*, 27(1), 53-62.
- Yang, Y., Meier, J., Lo, W., Yuan, V., Sze, H., Chung, y H. Yuk. (2013) *Overview of recent events in themicrobiological safety of sprouts and new intervention technologies*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12:265–280
- Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K., y Warriner, K. (2010). *Control of Salmonella on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages*. *Journal of food protection*, 73(1), 9-17.

XIII. ANEXOS

A. DATOS ORIGINALES

1. Resultados de pruebas de antagonismo

	Halo 1 (cm)	Halo 2 (cm)	Halo 3 (cm)	Media
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	2.90	2.50	3.10	2.83 ± 0.31
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	2.30	2.60	2.40	2.43 ± 0.15
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.	1.60	2.00	2.10	1.90 ± 0.26
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338.	2.30	2.00	1.80	2.03 ± 0.25

Tabla 2. Antagonismo microbiano por medio de prueba spot-test

	Halo 1 (cm)	Halo 2 (cm)	Halo 3 (cm)	Media
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	0.50	0.40	0.60	0.50 ± 0.10
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	0.60	1.40	1.00	1.00 ± 0.40
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.	0.40	0.20	0.10	0.23 ± 0.15
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338.	0.50	0.50	0.60	0.53 ± 0.06

Tabla 3. Antagonismo microbiano por medio de prueba de difusión

**Nota: todos los valores en rojo son aquellos que no presentaron un valor satisfactorio para la prueba de antagonismo (mayor a 0.5cm)

2. Selección de cepas para su utilización en tratamientos

	Promedio de resultados obtenidos en ambos métodos
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1,67 ± 0.15
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	1,72 ± 0.17
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.	1,06 ± 0.08
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338.	1,28 ± 0.14

Tabla 4. Selección de cepas para tratamientos

**Nota: Los valores presentados en rojo son aquellos que se determinaron no ser favorables para el estudio, los valores presentados en verde fueron aquellos que presentaron ser favorables para el estudio y por ello fueron seleccionados.

3. Porcentaje de germinación

Probiótico	Número de repetición	Porcentaje de germinación	Media	Porcentaje de rendimiento según dato teórico (80%)	Porcentaje de rendimiento según control
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	1	82.00%	79.33%	99.17%	91.89%
	2	84.00%			
	3	72.00%			
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1	86.00%	82.67%	103.33%	95.75%
	2	75.00%			
	3	87.00%			
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 + <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1	85.00%	79.67%	99.58%	92.28%
	2	80.00%			
	3	74.00%			
Control	1	88.00%	86.33%	107.92%	100.00%
	2	86.00%			
	3	85.00%			

Tabla 7. Porcentaje de germinación y rendimiento para resultados obtenidos de semilla de alfalfa en un tiempo de 20 minutos sumergidas en probióticos.

**Nota: Todos aquellos valores presentados en color rojo fueron aquellos que presentaron un valor promedio menor al dato teórico proporcionado en el envase.

	Número de repetición	Porcentaje de germinación	Porcentaje de rendimiento según control
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	1	86.00%	89.00%
	3	88.00%	90.00%
	6	96.00%	99.00%
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1	71.00%	73.00%
	3	70.00%	71.00%
	6	86.00%	89.00%
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 + <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1	86.00%	89.00%
	3	91.00%	93.00%
	6	97.00%	100%
Control	1	97.00%	---
	3	98.00%	
	6	98.00%	

Tabla 8. Porcentaje de germinación y rendimiento para resultados obtenidos de semilla de soya en un tiempo de 1, 3 y 6 horas sumergidas en probióticos.

4. Reducción de carga microbiana

Probiótico	Número de repetición	Conteo en placa (UFC)	Media	Unidades exponenciales	Unidades logarítmicas
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	1.1	> 300 UFC	> 300 UFC	3.00x10 ⁵	12.61
	2.1	> 300 UFC			
	1.2	> 300 UFC	> 300 UFC		
	2.2	> 300 UFC			
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1.1	> 300 UFC	> 300 UFC	3.00x10 ⁵	12.61
	2.1	> 300 UFC			
	1.2	> 300 UFC	> 300 UFC		
	2.2	> 300 UFC			
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 + <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1.1	> 300 UFC	> 300 UFC	3.00x10 ⁵	12.61
	2.1	> 300 UFC			
	1.2	> 300 UFC	> 300 UFC		
	2.2	> 300 UFC			
Control	1.1	> 300 UFC	> 300 UFC	3.00x10 ⁵	12.61
	2.1	> 300 UFC			
	1.2	> 300 UFC	> 300 UFC		
	2.2	> 300 UFC			

Tabla 5. Recuento final obtenido para semilla de alfalfa con un tiempo de sumersión en probióticos de 20 minutos.

Probiótico	Número de repetición	Recuento en placa (UFC)	Media	Unidades exponenciales	Unidades logarítmicas
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042.	1.1	2,438	2,244	2.24×10^7	16.92
	1.2	2,050			
	3.1	1,440	1,772	1.77×10^7	16.68
	3.2	2,105			
	6.1	1,551	1,828	1.83×10^7	16.72
	6.2	2,105			
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1.1	2,936	2,410	2.41×10^7	16.99
	1.2	1,884			
	3.1	300	300	3.00×10^6	14.91
	3.2	300			
	6.1	3,656	1,978	1.98×10^7	16.72
	6.2	300			
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 + <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014.	1.1	2,936	1,618	1.62×10^7	17.19
	1.2	300			
	3.1	4,432	2,366	2.37×10^7	17.61
	3.2	300			
	6.1	1,495	1,994	1.99×10^7	16.81
	6.2	2,493			
Control	1.1	316	416	4.16×10^7	17.54
	1.2	516			
	3.1	1,028	1,298	1.30×10^8	18.68
	3.2	1,568			
	6.1	300	368	3.68×10^7	17.42
	6.2	436			

Tabla 6. Recuento final obtenido para semilla de soya con un tiempo de sumersión en probióticos de 1, 3 y 6 horas.

5. Análisis estadístico

	F	F crítico	Conclusión
Variación de tiempo	1.43	4.75	No hay diferencia significativa entre las medias
Variación de probióticos	0.05	5.14	No hay diferencia significativa entre las medias

Tabla 9. Resultados del análisis estadístico

**Nota: Los datos presentados en rojo son todos aquellos que no presentaron una conclusión satisfactoria para el estudio

B. CUADRO DE ORGANIZACIÓN DE METODOLOGÍA

Etapa de evaluación	Metodología	Control positivo	Plan de análisis de datos
<p>Pruebas de antagonismo</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prueba agar spot test. 2. Prueba de difusión. 	<ul style="list-style-type: none"> - Control de contaminación ambiental. 	<p>Evaluación de tamaño del halo de inhibición por medio de la estimación de las medias de cada tratamiento, desviación y varianza.</p>
<p>Para pruebas de efectividad de desinfección con cloro y probióticos.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtención de semillas 2. Obtención de <i>S. abaetetuba</i> 3. Preparación de <i>S. abaetetuba</i> a inocular. 4. Preparación de cultivos de probióticos. 5. Contaminación de semillas con <i>S. abaetetuba</i> 6. Tratamiento con cloro a semillas inoculadas con <i>S. abaetetuba</i>. 7. Tratamiento con probióticos a semillas inoculadas previamente tratadas con cloro. 	<ul style="list-style-type: none"> - Recuento microbiológico o de retoños sin inoculación de <i>S. abaetetuba</i> - Recuento microbiológico o de retoños inoculados con <i>S. abaetetuba</i> - Recuento microbiológico o de retoños inoculados con probióticos y tratados con cloro - Recuento microbiológico o de retoños inoculados con <i>S. abaetetuba</i>, tratados con 	<p>Resultados de los recuentos (Establecer un punto de comparación para resultados del método estudiado)</p> <p>ANOVA de dos factores</p>

	8. Análisis microbiológico.	cloro y con probióticos.	
Rendimiento de germinación.	1. Obtención de semillas	- Previo a la contaminación con <i>S. abaetetuba</i>	Gráfico de barras
	2. Obtención de <i>S. abaetetuba</i>		
	3. Preparación de <i>S. abaetetuba</i> a inocular.	- Luego de ser contaminados con <i>S. abaetetuba</i>	
	4. Preparación de cultivos de probióticos.	- Luego de ser desinfectados con cloro	
5. Contaminación de semillas con <i>S. abaetetuba</i>			
6. Tratamiento con cloro a semillas inoculadas.			
7. Tratamiento con probióticos a semillas inoculadas previamente tratadas con cloro.		- Luego de la desinfección con probióticos	
8. Efectividad del método.			

Tabla 10. Resumen de metodologías y plan de análisis de resultados con respecto a etapas del estudio.

C . DIAGRAMAS DE FLUJO DE METODOLOGÍAS

Prueba de efectividad de desinfección con cloro y probióticos

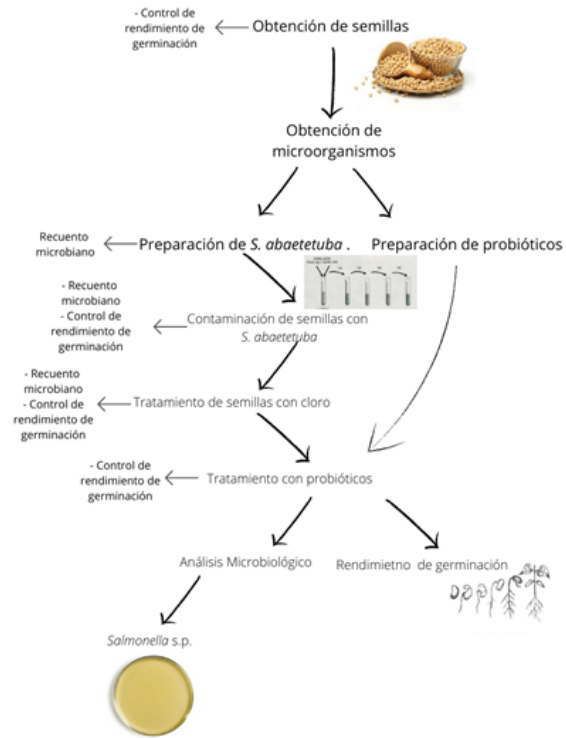


Ilustración 5. Diagrama de flujo de metodología

Pruebas de antagonismo

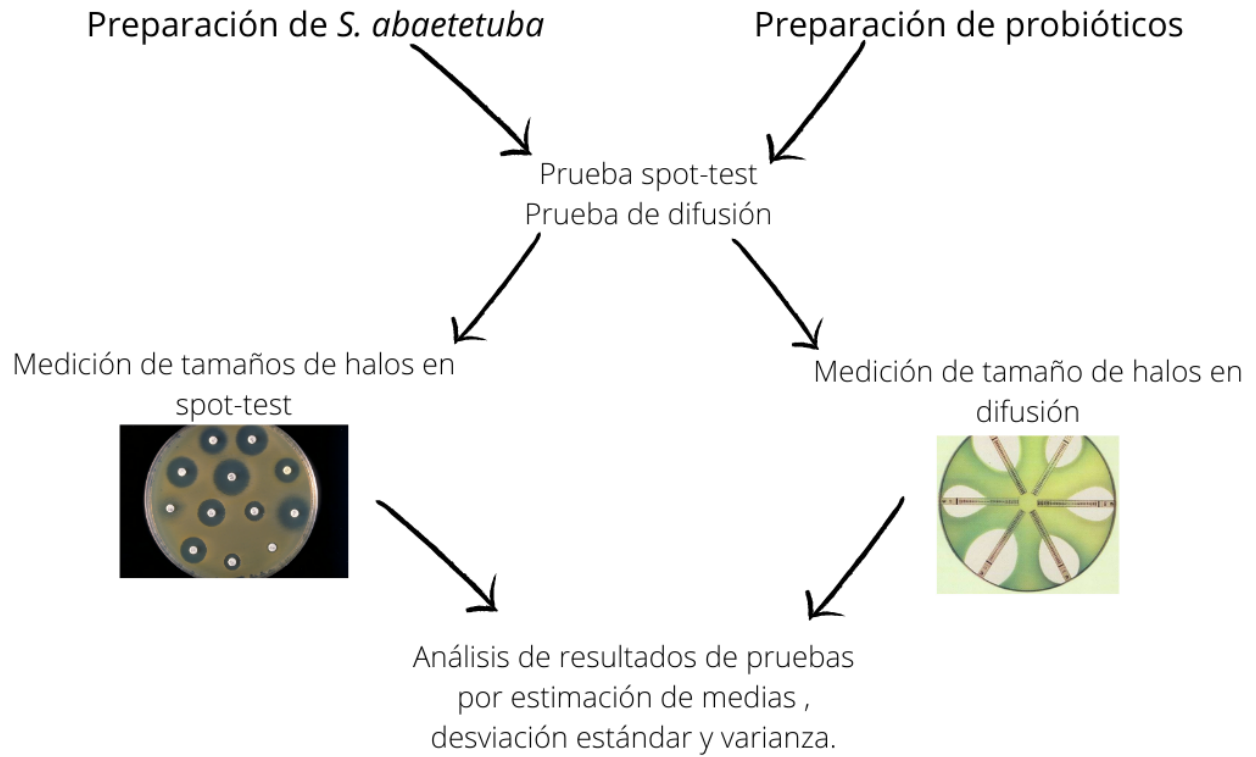


Ilustración 6. Diagrama de flujo para la realización de pruebas de antagonismo.

D . PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD

(Alba y Araujo, 2008)(OMS, 2005)

1. Especificaciones de la accesibilidad al laboratorio

- a. Se deberá colocar en las puertas de entrada el símbolo signo internacional de peligro biológico.
- b. Mantener las puertas del laboratorio cerradas en todo momento, especialmente al estar manipulando el microorganismo.
- c. No se permite el acceso a personas ajenas al estudio media vez se estén llevando a cabo pruebas con los microorganismos y no se haya llevado a cabo el procedimiento de limpieza y desinfección final.

2. Especificaciones de protección personal

- a. Previo al ingreso el individuo se debe lavar las manos adecuadamente y colocarse el equipo adecuado (bata, guantes y lentes de laboratorio).
- b. El individuo debe lavar sus manos o guantes cada vez que manipule alguno de los microorganismos y previo a retirarse del laboratorio.
- c. Queda terminantemente prohibido retirarse con cualquier prenda de protección personal fuera del laboratorio en donde se está manipulando el microorganismo.
- d. El calzado debe de ser zapato cerrado preferiblemente de cuero.
- e. No está permitido almacenar alimentos para el futuro consumo humano, comer, beber o fumar dentro del laboratorio.
- f. La bata de laboratorio deberá colocarse en el lugar adecuado para ser lavada, no en armarios en donde se encuentre ropa de calle.

3. Procedimientos dentro del laboratorio

- a. No está permitido por ningún motivo pipetear o colocar ningún material en la boca.

- b. Todo derrame o accidente será notificado al encargado del laboratorio y se mantendrá un registro escrito de cualquier incidente.
- c. Todo material de descarte que haya estado en contacto con los microorganismos deberá ser descontaminado, ya sea por medios físicos o químicos.
- d. En caso se necesite retirar cualquier documento del laboratorio, éste será introducido, manipulado y protegido de cualquier tipo de contaminación.

4. *Procedimientos en el área de trabajo*

- a. El área de laboratorio en donde se esté trabajando debe permanecer siempre limpia y ordenada, libre de materiales no relacionados al estudio.
- b. Las mesas y materiales de trabajo serán limpiadas y desinfectadas con alcohol al 70% previo y concluido su uso.
- c. Todo el material ubicado dentro del área de trabajo debe ser exclusivo de dicha área y no se debe retirar ni sustituir por otro.