



# Métodos de sanitización de semillas para consumo directo y de semillas para germinados

---

A.E. García-Santiesteban\*, E. Palou y M.T. Jiménez-Munguía.

\*Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos  
Correo electrónico: [abril.garciasn@udlap.mx](mailto:abril.garciasn@udlap.mx) • [mariat.jimenez@udlap.mx](mailto:mariat.jimenez@udlap.mx)

## RESUMEN

Las semillas y germinados son productos naturales cuya popularidad ha cobrado importancia entre consumidores debido a sus múltiples beneficios, tanto nutricionales como para la salud. Debido a su origen y cultivo en el campo, son alimentos con baja calidad microbiológica y alta probabilidad de contener microorganismos patógenos. Por ello, para prevenir afecciones a la salud de los consumidores, se han emitido recomendaciones para evitar su contaminación y asegurar el uso de desinfectantes en los casos aplicables. Sin embargo, este esfuerzo ha sido insuficiente. De acuerdo con cifras oficiales, los brotes de enfermedades producidos por el consumo de este tipo de alimentos prevalecen.

El objetivo de este artículo es presentar la información disponible sobre los métodos de sanitización probados, así como su eficacia, en semillas y germinados, con la finalidad de analizar su efectividad, ventajas y desventajas, y mostrar soluciones alternativas a los problemas de inocuidad en este tipo de productos de interés a nivel mundial.

**Palabras clave:** semillas, germinados, sanitización, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*.

## ABSTRACT

Seeds and seed sprouts are natural products whose popularity has grown among consumers due to their many nutritional and health benefits. Given their origin and cultivation in the field, these are products with low microbiological quality and high probability of containing pathogens. In order to prevent health risks to consumers, recommendations have been issued to avoid their contamination. However, this effort has been insufficient. According to official information, disease outbreaks caused by the consumption of these types of foods still prevail.

This article aims to present available information on proven sanitation methods and their effectiveness, for seeds and seed sprouts, in order to analyze their effectiveness, advantages and disadvantages, and to display alternative solutions to this worldwide problem.

**Keywords:** seeds, sprouts, food safety, sanitization, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*.

## INTRODUCCIÓN

Tanto las semillas de consumo directo como los germinados de semillas son alimentos con valor nutricional comprobado. Contienen abundantes vitaminas y minerales, además de altos niveles de proteínas (Ding *et al.*, 2013). Diversos estudios han confirmado sus importantes beneficios a la salud por sus propiedades anticolesterolémicas, antiartríticas y anticancerígenas (Kim *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2006). Esto ha llevado a un incremento en la demanda y el consumo de semillas y sus germinados; sin embargo, a pesar de sus beneficios, las semillas son alimentos cuyo origen en el campo implica un alto riesgo de contaminación microbiológica con patógenos, por lo que han causado importantes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Yang *et al.*, 2013).

Para asegurar su inocuidad, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y la Administración de Alimentos y Medicamentos (USDA y FDA, respectivamente, por sus siglas en inglés) han emitido manuales de buenas prácticas agrícolas (BPA) para prevenir, en la medida de lo posible, la contaminación de estos alimentos con patógenos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* (Kim *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2013). Para el caso específico de los germinados, la FDA recomienda la desinfección de las semillas —principal fuente de contaminación— con una solución de hipoclorito de calcio que contenga 20,000 ppm de cloro libre. Sin embargo, este método de sanitización no suele ser utilizado para el grupo de semillas de consumo directo, como semillas de girasol, calabaza o sésamo, entre otras. Esto se debe a que la solución acuosa afecta el contenido de humedad de las semillas, reduciendo su periodo de almacenamiento y ocasionando cambios en detrimento de la calidad sensorial de las mismas. En lugar de ello, para este grupo de semillas se emplean comúnmente métodos térmicos, cuyo principal objetivo es disminuir el contenido de humedad de la semilla para alargar su vida útil y controlar la población microbiana (Himathongkham *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013).

A pesar de estas recomendaciones, de acuerdo con información proporcionada por los Centros para el Control y

Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), cada vez es mayor el número de brotes de ETA por consumo de semillas. Se trata de un área de oportunidad importante en el aseguramiento de la inocuidad de estos alimentos, por lo que algunos investigadores se han interesado por el estudio y aplicación de nuevas tecnologías que aseguren una sanitización efectiva, mientras conserva las características nutricionales y sensoriales de las semillas (Himathongkham *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2013).

La presente revisión busca presentar la información disponible sobre los métodos de sanitización, así como su eficacia, en semillas y germinados, con la finalidad de analizar su efectividad, ventajas y desventajas, y mostrar soluciones alternativas a los problemas de inocuidad en este tipo de productos de interés a nivel mundial.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Riesgos microbiológicos asociados con el consumo de semillas

Las principales fuentes de contaminación de las semillas se presentan durante la pre-cosecha y son todas aquellas a las que la semilla se encuentra expuesta durante su cultivo; como el agua de irrigación, heces de animales salvajes, excretas de aves, estiércol de ganado en abonos orgánicos y la propia calidad microbiológica del suelo de cultivo. Todo ello expone a la semilla a un amplio rango de contaminación por microorganismos patógenos (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008; Tamber *et al.*, 2016; Willis *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013).

Durante la producción, los microorganismos patógenos se introducen en la microbiota de las semillas de diferentes maneras. La práctica frecuente del uso de estiércol como fertilizante representa una opción barata y fácil para mejorar la calidad del suelo. Sin embargo, el estiércol puede contener bacterias patógenas, como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., las cuales se introducen al suelo y después —por diversos factores— pueden migrar al producto (Yang *et al.*, 2013). Cuando animales domés-

ticos y salvajes tienen acceso al cultivo, la probabilidad de contaminación por patógenos aumenta por la presencia de heces de estos animales. Bacterias patógenas, como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7, pueden sobrevivir en restos de heces y en el suelo de cultivo por períodos de varios días, incluso meses. Se ha demostrado que *Salmonella* spp. puede sobrevivir hasta 60 días en heces durante el invierno; mientras que *E. coli* O157:H7 sobrevive por períodos de hasta 97 días en estiércol y suelo, y hasta 109 días en agua de riego (O'Neill et al., 2011; Yang et al., 2013).

Por otro lado, las características propias de la planta cobran relevancia. Por ejemplo, las semillas de girasol suelen tener mejor calidad microbiológica debido a que la mata puede medir hasta 2 metros de altura. Esta distancia que guarda del suelo le da una ventaja en comparación con semillas cuya planta tiene menor altura y cuya semilla se encuentra más cercana al suelo, como la semilla de chía o de alfalfa (Tamber et al., 2016; Willis et al., 2009).

La etapa de cosecha es otro punto crítico, puesto que durante este proceso las semillas suelen ser extendidas sobre el suelo, quedando expuestas a diversos factores de contaminación, como heces de roedores, aves, animales salvajes, entre otros, aumentando el riesgo de contaminación. Asimismo, tanto el equipo utilizado durante la cosecha como el sitio de almacenamiento y los contenedores en los que las semillas se almacenan o transportan, juegan un papel importante como factor de contaminación. Si estos no han sido adecuadamente lavados o sanitizados, pueden contribuir a la contaminación cruzada de patógenos en las semillas, tanto por presencia de microorganismos provenientes de lotes anteriores como por presencia de heces de roedores y otros animales que suelen introducirse en los mismos en búsqueda de comida (Yang et al., 2013).

### 1.1. Riesgos microbiológicos presentes en la producción de semillas para consumo directo

Debido a que el contenido de humedad de este tipo de semillas, como la de girasol, calabaza, sésamo, chía, lino, entre otras, suele alcanzar niveles superiores al 20 % después de su cosecha, es común someterlas a un proceso térmico de secado con el objetivo

de disminuir su contenido de humedad a menos de 10 %. Este proceso suele involucrar la extensión de las semillas sobre el suelo para secarlas al sol directo, o deshidratarlas en horno con aire forzado, incrementando el riesgo de contaminación y disminuyendo su calidad microbiológica (Tamber et al., 2016; Willis et al., 2009).

En otros casos, la reducción de humedad se realiza junto con el proceso de tostado, el cual involucra un tratamiento térmico que puede no ser efectivo para la eliminación de bacterias, ya que el calor utilizado no siempre se encuentra en un rango de temperatura suficiente para asegurar la inactivación de todas las bacterias patógenas. Esto se debe a que muchas de las propiedades nutricionales, y algunas propiedades sensoriales, de las semillas pueden verse afectadas al utilizar las temperaturas efectivas para la inactivación de microorganismos patógenos (Willis et al., 2009).

Aunque el riesgo microbiológico relacionado con el consumo de este tipo de semillas se encuentra ligado al origen de las mismas, existen pocos datos publicados sobre la calidad microbiológica de semillas secas comestibles. Un estudio realizado en 2009 en Gran Bretaña demostró que el consumo de semillas deshidratadas se asocia con un alto riesgo de salud pública debido a la alta probabilidad de contaminación con *Salmonella* spp. y *E. coli* a través de todas sus etapas, desde la producción hasta su consumo (Harvey et al., 2016; Willis et al., 2009).

En los últimos años, se han reportado diversos incidentes con *Salmonella* relacionados con semillas comestibles y sus productos. Uno de los más grandes –con implicaciones internacionales– se dio en el año 2001 y asociaba el consumo de semillas con *Salmonella* Typhimurium en Suecia, Noruega, Alemania y Australia (Harvey et al., 2016; Willis et al., 2009). Sin embargo, aunque ese brote encendió las alertas alimentarias a nivel mundial sobre el riesgo que representa este tipo de productos, la incidencia de este tipo de enfermedades por su consumo no ha disminuido. En la tabla I se incluyen los brotes más relevantes de ETA relacionados con la ingesta de semillas durante la última década. Como se observa, es importante establecer controles en la producción, métodos de inactivación microbiana y explorar nuevas alternativas para mejorar la inocuidad de las semillas de consumo directo.

Tabla I.

Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) durante la última década generados por bacterias tras el consumo de semillas y sus germinados

Año	Factor etiológico	Casos	Hospitalizados	Decesos	Semilla	País	Referencia
2009	<i>Salmonella</i> Bovismorbificans	1	42	-	Alfalfa	Finlandia	Yang <i>et al.</i> , 2013
	<i>Salmonella</i> Cubana	1	14	-	Alfalfa	Canada	Yang <i>et al.</i> , 2013
	<i>Salmonella</i> Saintpaul	235	7	-	Alfalfa	EE. UU.	CDC, 2020
2010	<i>Salmonella</i> Bareilly	1	190	-	Alfalfa	G. B.	Yang <i>et al.</i> , 2013
	<i>Salmonella</i> Newport	1	28	-	Soya	EE. UU.	Yang <i>et al.</i> , 2013
	<i>Salmonella</i> Newport	44	34	-	Alfalfa	EE. UU.	CDC, 2020
2011	<i>Escherichia coli</i> (STEC O145)	1	3842	53	Fenogreco	Alemania y Francia	CDC, 2020; ECDC, 2010
	<i>Salmonella</i> serotipo I 4,[5],12:i:	140	33	-	Alfalfa	EE. UU.	CDC, 2020
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	25	3	-	Mix (alfalfa, rábano, fenogreco y trébol)	EE. UU.	CDC, 2020
2012	<i>Escherichia coli</i> O26 (STEC O126)	29	7	-	Trébol	EE. UU.	CDC, 2020
	<i>Escherichia coli</i> (STEC O145)	18	4	1	Trébol	EE. UU.	CDC, 2020
2013	<i>Salmonella</i> Montevideo	16	1	1	Sésamo utilizado para Tahini	EE. UU.	CDC, 2020
2014	<i>Salmonella</i> Enteritidis	115	5	-	Soya	EE. UU.	CDC, 2020
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	5	2	Soya	EE. UU.	CDC, 2020
	<i>Escherichia coli</i> O12 (STEC O121)	19	9	-	Trébol	EE. UU.	CDC, 2020
	<i>Salmonella</i> spp.	31	5	-	Chía orgánica	EE. UU.	CDC, 2020
		63	12	-	Chía orgánica	Canadá	Public Health Agency of Canada
2016	<i>Salmonella</i> Muenchen	26	8	-	Alfalfa	EE. UU.	CDC, 2020
	<i>Salmonella</i> Reading	36	7	-	Alfalfa	EE. UU.	CDC, 2020
2017	<i>Salmonella</i> Enteritidis	47	12	-	Pasta de sésamo	Rep. Checa, Alemania, Grecia, G. B.	ECDC, 2010
2017	<i>Salmonella</i> Agona	122	11	1	Mix semillas secas «ready to eat»	EE. UU., G. B., Finlandia, Dinamarca y Alemania	ECDC, 2010
2018	<i>Salmonella</i> Montevideo	10	0	-	Trébol	EE. UU.	CDC, 2020
2020	<i>Escherichia coli</i>	10	5	-	Semilla de girasol en ensaladas preparadas	EE. UU., Canadá	CDC, 2020

## 1.2. Riesgos microbiológicos presentes en la producción de semillas para germinados

El germinado de algunas semillas como la alfalfa, el trigo y la soya, entre otras, es de consumo común en diferentes países. Las principales fuentes de contaminación de los germinados se relacionan con los distintos factores a los cuales están expuestas las semillas durante su etapa de producción en el campo (Lorenzo-Leal *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2013).

Durante el proceso de producción de los germinados, las semillas se remojan en agua, posteriormente, se mantienen en condiciones de humedad y temperatura de incubación (20-40 °C) por períodos de 2 a 7 días. Estas condiciones son ideales, no solo para la germinación, sino también para la proliferación bacteriana (Weiss *et al.*, 2007). La etapa de germinación es crítica en el desarrollo de contaminación bacteriana, ya que algunas bacterias presentes en la semilla pueden internalizarse en los tejidos durante su germinación (Thomas *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2013). Diversos estudios han demostrado que la carga microbiana en las semillas suele estar entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/g, cuenta que puede incrementar entre  $10^2$  y  $10^3$  UFC/g durante el primer día de germinación, alcanzando poblaciones de hasta  $10^9$  UFC/g durante todo el período de germinación (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013).

Para prevenir riesgos, la FDA recomienda a los consumidores cocinar los germinados para inhibir o eliminar la presencia de bacterias (Weiss *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, se sigue prefiriendo su consumo crudo debido a que se preservan los nutrientes y glucosinolatos que contienen, los cuales son potentes antioxidantes y pueden inducir la apoptosis o muerte celular de células cancerígenas (Bellotas *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013).

El número de brotes de E. coli causados por germinados de semillas ha ido en aumento durante la última década, siendo la alfalfa la fuente más común –como se puede observar en la tabla I–. En general, las bacterias patógenas o agentes etiológicos comúnmente asociados con los brotes son *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, y *E. coli* O104:H4. Sin embargo, también se reporta la presencia de otros patógenos en semillas para germinados, como *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus*, aunque en menor cantidad (Rosenquist *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2013).

Un estudio detallado sobre la flora bacteriana en germinados de alfalfa a la venta en California determinó que, dentro de

la flora nativa, se encuentran bacterias de los grupos *Proteobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Moraxellaceae*. El mismo estudio demostró, además, que las condiciones de crecimiento y germinación de la alfalfa son ideales para el desarrollo de especies patogénicas como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* (Loui *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2007).

## 2. Métodos térmicos de sanitización de semillas

La temperatura desempeña un papel vital en la afección de los mecanismos de supervivencia de los microorganismos patógenos, por lo que los tratamientos térmicos son efectivos para incrementar la seguridad microbiana de las semillas. En la última década, se han realizado diversos estudios sobre la eficacia de dos tipos de tratamiento térmico para la inactivación de patógenos: calor seco y calor húmedo (Yang *et al.*, 2013). El primer tipo es más propicio para las semillas de consumo directo, mientras que el segundo ha sido estudiado principalmente en semillas para germinado.

### 2.1. Tipos de tratamientos térmicos

Las principales variables de control en este tipo de tratamientos son la temperatura y el tiempo, las cuales dependen de factores como el tipo de semilla, su composición y el microorganismo patógeno que se busca inactivar (Yang *et al.*, 2013). Estos tratamientos se pueden clasificar en tratamientos de calor seco y húmedo de acuerdo con el medio y fuente de calor. En la tabla II se comparan los métodos de todos aquellos ensayos donde se obtuvo una reducción mayor a  $10^4$  UFC/g del patógeno estudiado en semillas.

#### 2.1.1. Calor seco

Se han observado variables en la eficacia desinfectante del tratamiento de semillas a temperaturas alrededor de 50 °C por períodos prolongados de tiempo –desde varias horas hasta días– (Ding *et al.*, 2013). Una temperatura de 50 °C resultó adecuada para reducir la presencia de *E. coli* O157:H7 a niveles debajo de los detectables en semillas de rábano, brócoli y alfalfa. Sin embargo, los tiempos de tratamiento necesarios fueron prolongados, variando entre las 17 y 24 horas. Con estas mismas condiciones, no se lograron resultados significativos en la reducción de *E. coli* O157:H7 en semillas de frijol mungo (Bari *et al.*, 2010). Asimismo, otro estudio realizado por Hu *et al.* (2004), reportó una reducción de  $10^5$  UFC/g de *E. coli* y de  $10^3$  UFC/g de *Salmonella* en el mismo tipo de frijol, utilizando una temperatura de 55 °C. De manera similar, Feng *et al.*

Tabla II.

Métodos y condiciones de sanitización que cumplen el criterio del Comité Consultivo Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos (NACMCF) sobre una reducción logarítmica mínima de  $10^4$  CFU/g

Método de Sanitización	Semilla	Condiciones de tratamiento	Patógenos	Reducción logarítmica (CFU/g)	Referencia
<i>Métodos térmicos</i>					
Calor seco	Alfalfa y brócoli	50 °C/17 o 24 h	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	5	Bari, Sugiyama et al., 2009
	Frijol mungo	55 °C/4 d	<i>E. coli</i> O157:H7	5	Hu et al., 2004
	Frijol mungo	55 °C/4 d	<i>Salmonella</i> Typhimurium	3	Hu et al., 2004
	Alfalfa y brócoli	55 °C/6 d	<i>E. coli</i> O157:H7	8	Feng et al., 2007
	Alfalfa y brócoli	55 °C/6 d	<i>Salmonella</i> Typhimurium	8	Feng et al., 2007
Calor húmedo	Frijol mungo	85 °C, 40 s/30 s agua fría 2 h agua con 2,000 ppm de cloro	<i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> spp	>6	Bari et al., 2008
<i>Métodos térmicos (calor húmedo) + otro</i>					
+ Choque térmico	Frijol mungo	90 °C, 90 s/30 s agua fría	<i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> spp	>6	Bari, Nei et al., 2010
<i>Métodos térmicos (calor seco) + otro</i>					
+ Agentes químicos	Alfalfa	50 °C/17 h y 1 % ácido oxálico, 0.03 % ácido fítico, 50 % etanol	<i>E. coli</i> O157:H7	>5	Bari, Nei et al., 2009
+ Irradiación	Rábano y frijol mungo	50 °C/17 h y 1 kGy	<i>E. coli</i> O157:H7	>6	Bari Nei et al., 2009
	Brócoli y alfalfa	50 °C/17 h y 0.25 kGy	<i>E. coli</i> O157:H7	>6	Bari Nei et al., 2009
<i>Métodos químicos</i>					
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$	Alfalfa	10 min	<i>Salmonella</i> Stanley	5	Gandhi y Mathews, 2003
	Alfalfa	15 min	<i>E. coli</i> O157:H7	5	Lang et al., 2000
$\text{ClO}_2$	Rábano	500 µg/ml, 5 min + 70 °C, 48 h.	<i>E. coli</i>	6*	Bang et al., 2011
$\text{CO}_2$	Alfalfa	60 °C, 30 min, ozono rebombeado	<i>E. coli</i> O157:H7	4.8*	Sharma et al., 2002
<i>EO carvacrol</i> acidificado	Frijol mungo	Aplicado en nanoemulsión	<i>Salmonella</i> enterica	4	Landry et al., 2006
Ácido acético gaseoso	Rábano y alfalfa	8.7 % (v/v), 55 °C, 3 h	<i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> spp	>5	Nei et al., 2011
Ácido málico	Alfalfa	10 % ácido málico, 1 % TDS	<i>E. coli</i> O157:H7	4*	Fransisca et al., 2011

**Tabla II.** Métodos y condiciones de sanitización que cumplen el criterio del Comité Consultivo Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos (NACMCF) sobre una reducción logarítmica mínima de  $10^4$  CFU/g (continuación)

Método de Sanitización	Semilla	Condiciones de tratamiento	Patógenos	Reducción logarítmica (CFU/g)	Referencia
<i>Tecnologías emergentes</i>					
PLAI	Alfalfa	8 cm, 90 s	<i>E. coli</i> O157:H7	>4	Sharma y Demirci, 2003
	Chía	15 s, fluencia 19.35 J/cm <sup>2</sup>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	Reyes-Jurado et al., 2019
APH	Berro	300 MPa, 15 min, 4 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>E. coli</i> MG1655 y <i>Listeria innocua</i>	6	Wuytack et al., 2003
	Alfalfa	650 MPa, 15 min, 20 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	>5	Neetoo et al., 2008
	Alfalfa	550 MPa, 2 min, 40 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	>5	Neetoo et al., 2009
		-	<i>Shigella flexneri</i> y <i>E. coli</i> LMM1010	4	Wuytack et al., 2003
SC-CO <sub>2</sub>	Alfalfa	4000 psi, 50 °C, 60 min	<i>E. coli</i> K12	>4	Jung et al., 2009
Radiaciones ionizantes	Germinados de alfalfa	3.3 kGy	<i>L. monocytogenes</i>	6	Schoeller et al., 2002
	Germinados de alfalfa	0.5 kGy	<i>Salmonella enterica</i>	>4	Rajkowski et al., 2003
	Germinado de brócoli	1 kGy	<i>L. monocytogenes</i>	4.88	Bari et al. 2005
	Frijol mungo	1 kGy	<i>L. monocytogenes</i>	4.57	Bari et al. 2005

Abreviaciones utilizadas: hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ), dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), aceites esenciales (EO, por sus siglas en inglés), pulsos de luz de alta intensidad (PLAI), altas presiones hidrostáticas (APH), dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>).

\*En estos estudios se comprobó que, a pesar de las altas reducciones logarítmicas en las poblaciones bacterianas, estas alcanzaron niveles superiores a los  $10^6$  CFU/g durante la etapa de germinación de las semillas.

(2007) lograron reducciones de  $10^2$  y  $10^8$  UFC/g, respectivamente, para *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, pero utilizando semillas de alfalfa, y tiempos de hasta 6 días (Feng et al., 2007; Hu et al., 2004). Esto indica que es difícil estandarizar las variables de control, ya que la respuesta dependerá, en gran medida, de la composición y estructura de la semilla utilizada, así como del mecanismo de supervivencia aplicado por el patógeno objetivo.

Por otro lado, un tratamiento rápido a temperaturas superiores a los 90 °C durante 90 segundos, seguido de un choque térmico, a 0 °C por 30 segundos, mejoró la desinfección, logrando reducciones de 6.08 UFC/g y 5.3 UFC/g en las poblaciones iniciales de *E. coli* y *Salmonella* spp., respectivamente. Este método reportó incluso la inactivación total de dichos patógenos, mientras que los tratamientos a menores temperaturas y tiempos más

prolongados, alcanzaron reducciones máximas de 4 UFC/g, sin lograr la total inactivación de los patógenos (Bari *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a la disminución en las tasas de germinación en temperaturas mayores a 75 °C, este método no es aplicable para su uso en semillas para germinados (Bari, Nei *et al.*, 2009), pero podría utilizarse para semillas de consumo directo.

En el caso particular de semillas para consumo directo, su tostado implica una serie de reacciones de oscurecimiento que, aunque en muchos casos mejoran sus características sensoriales, también afectan la composición química de las semillas. En un estudio realizado en chía sobre el efecto del tostado a diferentes temperaturas (160-200 °C) por 5 a 15 minutos, se demostró que la capacidad de retención de agua de la semilla cambió rápidamente a los 180 °C, indicando que a dicha temperatura se producen cambios químicos en la estructura del mucílago. Estos cambios pueden impactar en las características sensoriales, nutricionales y tecnológicas buscadas en esta semilla para su aplicación en diversas áreas (Song *et al.*, 2018).

En muchos casos, la combinación de diferentes tipos de tratamiento puede llevar no solo a mejores resultados en cuanto a la inactivación microbiológica, sino también respecto a la preservación de las características sensoriales y nutricionales propias del producto. Por ejemplo, la combinación de tratamientos prolongados (17 horas) de calor seco a 50 °C con tratamientos químicos (1 % ácido oxálico, 0.03 % ácido fítico, 50 % etanol) dio como resultado la reducción a niveles no detectables de *E. coli* O157:H7 inoculada en semillas de alfalfa (mayor a 10<sup>5</sup> UFC/g), rábano y brócoli, sin comprometer la calidad sensorial de sus germinados. Sin embargo, estas mismas condiciones no fueron suficientes para eliminar completamente el patógeno en semillas de alfalfa y rábano, en cuyos germinados se alcanzó una población de 10<sup>7</sup> UFC/g de *E. coli* O157:H7 posterior a su germinación. La aplicación de calor seco bajo estas condiciones, más una dosis de irradiación de 1.0 kGy, eliminó por completo la población de *E. coli* O157:H7 en semillas de rábano y frijol mungo, mientras que una radiación mínima de 0.25 kGy fue suficiente para eliminar el patógeno en las semillas de brócoli y alfalfa. La combinación de calor seco con radiación a dichas dosis, no afectó significativamente la tasa de germinación de las semillas de alfalfa, brócoli o rábano, pero sí disminuyó el tamaño de los brotes de frijol mungo (Bari, Nei, *et al.*, 2009).

### 2.1.2. Calor húmedo

Los tratamientos con calor húmedo pueden emplear agua caliente o vapor de agua. La desinfección con agua caliente fue uno de los primeros tratamientos estudiados y aplicados para la sanitización de semillas para germinados. Sin embargo, este tipo de tratamientos muestra una pérdida de viabilidad de la semilla cuando se utilizan tiempos prolongados y temperaturas elevadas (Yang *et al.*, 2013).

Algunos tratamientos con calor húmedo suelen implicar un choque térmico, mientras que otros añaden el uso de algún químico para reforzar el efecto inhibitorio. Un estudio en frijol mungo con un tratamiento con agua caliente a 85 °C por 40 segundos, seguido de la inmersión de la semilla en agua fría por 30 segundos y por 2 horas en agua con 2,000 ppm de cloro, logró una reducción hasta límites no detectables de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. Se obtuvo el mismo resultado cuando este frijol fue tratado en agua a 90 °C durante 90 segundos, seguido por la inmersión del mismo en agua fría por 30 segundos. Ambos tratamientos lograron la desinfección de la semilla, sin una reducción significativa en el porcentaje de germinación del frijol mungo (Bari *et al.*, 2010; Bari *et al.*, 2008).

Los tratamientos con calor húmedo pueden ser aplicables, de igual manera, en el germinado, tal como han demostrado algunos estudios (Pao *et al.*, 2008). Sin embargo, el alcance de esta revisión se limita a los métodos de desinfección de las semillas.

## 3. Métodos químicos

Se han observado un gran número de métodos químicos para la desinfección de semillas, utilizando diversos agentes químicos como cloro, agua electrolizada, ozono y otros compuestos ácidos (Yang *et al.*, 2013). Los agentes químicos más utilizados para la desinfección de semillas suelen tener resultados altamente variables (Ding *et al.*, 2013).

### 3.1. Cloro, dióxido de cloro e hipoclorito de sodio y de calcio

El cloro es el agente químico más ampliamente utilizado para sanitizar productos frescos. Para el caso específico de las semillas para germinados, la FDA recomienda el uso de soluciones de 20,000 ppm de cloro activo, como hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}[\text{OCl}]_2$ ), durante 15 minutos. Además, recomienda monitorear la calidad microbiológica del agua de irrigación para mitigar los riesgos de ETE con relación al consumo de germinados (Yang *et al.*, 2013).

Las semillas de alfalfa inoculadas con *Salmonella Stanley* y tratadas con 20,000 ppm de Ca(OCl)<sub>2</sub> durante 10 minutos a temperatura ambiente, tuvieron una reducción de más de 10<sup>5</sup> UFC/g de la población inoculada, hasta alcanzar niveles no detectables. Sin embargo, durante la etapa de germinación, la población de este microorganismo alcanzó rápidamente cuentas superiores a 10<sup>7</sup> UFC/g en germinados de 2 días (Gandhi y Matthews, 2003). Estos resultados se encuentran en concordancia con los reportados por Lang *et al.* (2000). En ese estudio, las semillas de alfalfa inoculadas con *E. coli* O157:H7 fueron tratadas por 15 minutos a temperatura ambiente, alcanzando una reducción hasta niveles no detectables; pero estos mismos niveles incrementaron hasta 10<sup>8</sup> UFC/g durante el germinado, por lo que concluyeron que el tratamiento no logró garantizar la muerte total de los patógenos presentes en la semilla.

Se ha observado también que la inmersión de semillas de trigo y de sus germinados en una solución con una concentración de hipoclorito de sodio con 400 ppm durante 30 minutos, seguida de un enjuague con agua corriente durante 3 minutos, logró una reducción de 1.03 ciclos logarítmicos de *E. coli*, sin impacto en la capacidad de germinación de las semillas (Tornuk *et al.*, 2011).

En años recientes, se han investigado los efectos de la aplicación de cloro en forma de dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>), con resultados prometedores en la eliminación de patógenos en semillas para germinados. El ClO<sub>2</sub> se diferencia del hipoclorito, no solo en su formulación química, sino también porque se encuentra en estado gaseoso a temperatura ambiente. Bang *et al.* (2011) utilizaron ClO<sub>2</sub> en combinación con un tratamiento térmico, reportando una reducción de 5.9 ciclos logarítmicos de *E. coli* en semillas de rábano tratadas con 500 µg/ml de ClO<sub>2</sub> por 5 minutos, secadas a 45 °C durante 24 horas y, por último, sometidas a un tratamiento térmico con calor seco a 70 °C por 48 horas.

Se ha demostrado que, cuando la carga microbiana inicial es alta, el cloro es ineffectivo en la sanitización de alimentos. Semillas de alfalfa, inoculadas con cargas iniciales de 10<sup>6</sup> UFC/g de *E. coli* O157:H7, fueron sometidas a tratamientos de lavado con 10 mg/l de ClO<sub>2</sub> entre 3 y 10 minutos a 21 °C. La máxima reducción microbiana obtenida bajo estas condiciones fue de 1.24 ciclos logarítmicos. También se observó que la población de *E. coli* incrementó rápidamente a niveles similares a los del control durante la etapa de germinación de semillas tratadas, por lo que estos resultados se consideran insuficientes para lograr la inocuidad de estas semillas con este método y bajo

estas condiciones (Singh *et al.*, 2003). El tratamiento con una concentración de entre 200 y 20,000 ppm de hipoclorito de sodio (NaOCl), durante 20 minutos, logró una reducción máxima de 1.64 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 en semillas de rábano. Sin embargo, el conteo incrementó rápidamente a niveles incluso mayores que los del control durante el germinado (Fransisca *et al.*, 2011).

Estos resultados son desalentadores, pues reflejan que una reducción de patógenos en la semilla no garantiza la inocuidad del producto final. Esto se debe a la proliferación de los mismos microorganismos durante el germinado, etapa en la cual la disponibilidad de nutrientes y condiciones físicas del medio favorecen su desarrollo. La superficie propia de cada semilla puede facilitar que algunas células bacterianas se protejan en grietas, poros y escamas; lo cual ocasiona que las soluciones tengan limitaciones para alcanzar todos los sitios de desinfección. Es posible que ahí radique la falta de consistencia y efectividad en los resultados obtenidos de estos métodos, puesto que se observan mayores reducciones en semillas de superficie lisa. Sin embargo, la ventaja de este método radica en que este tipo de tratamientos no tiene ningún efecto en la tasa de germinación de las semillas (Ding *et al.*, 2013).

Considerando estas limitaciones, se están realizando estudios explorando otros posibles tratamientos, como el uso de ozono, aceites esenciales en fase de vapor, agua electrolizada y otros agentes químicos, con el objetivo de mejorar las técnicas convencionales de descontaminación.

### 3.2 Ozono

El tratamiento con ozono ofrece diversas ventajas, en comparación con los tratamientos químicos convencionales, como su eficacia antimicrobiana a concentraciones relativamente bajas y con cortos períodos de exposición. Además de su descomposición espontánea en O<sub>2</sub>, la cual permite que al final del proceso no queden residuos químicos que puedan representar un riesgo adicional para la salud o el medio ambiente (Yang *et al.*, 2013).

Un estudio realizado en germinados de alfalfa y de rábano inoculados con *Shigella* demostró que la inmersión de los germinados en agua con una concentración de ozono de 2 ppm durante 5 minutos logra reducciones <10<sup>2</sup> UFC/g. Sin embargo, utilizando la misma concentración de ozono en combinación con un 2 % de ácido málico, se maximiza la inhibición de *Shigella*, por lo que los autores del estudio lo sugieren como

una potencial opción comercial para el control de *Shigella* en germinados crudos (Singla *et al.*, 2011). A pesar de ello, otro estudio realizado en alfalfa inoculada con *E. coli* O157:H7 y tratada con ozono en una concentración de 21 ppm no logró una reducción significativa en comparación con el control, a pesar del tiempo de tratamiento (2-64 minutos). Es probable que esto se deba a la rápida disminución de la concentración de ozono tras el contacto con la superficie del germinado. Sin embargo, otro estudio con recirculación de ozono a 60 °C por 3 horas tuvo éxito, al lograr una reducción de 4.8 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 en semillas de alfalfa (Sharma *et al.*, 2002).

### 3.3. Agua electrolizada

El agua electrolizada se genera por electrólisis de una solución de NaCl, se puede dividir en alcalina y ácida, dependiendo del pH de la solución, y puede tener diferentes propiedades, como el potencial de óxido-reducción y la concentración del ion Cl en ella (Liu y Yu, 2017). El agua electrolizada ácida (AEW, por sus siglas en inglés) es la más investigada como una alternativa novedosa a otros métodos químicos de desinfección. Se caracteriza por un pH menor a 2.7, un alto potencial de óxido-reducción (>1000 mV), concentraciones de Cl de entre 40-90 ppm y un amplio espectro antibacteriano comparado con otros tratamientos antimicrobianos (Yang *et al.*, 2013; Zhang, Lu, Li, Shang, Zhang y Cao, 2011). A pesar de sus ventajas, se ha demostrado que su efecto es limitado sobre *E. coli* O157:H7 en semillas de alfalfa, cuya reducción alcanzada fue de 2.72 ciclos logarítmicos en tratamientos con constante agitación por 2, 4, 8, 16, 32 y 64 minutos totales (Sharma y Demirci, 2003). Dichos niveles son comparables con el tratamiento clásico con 2000 ppm de hipoclorito de sodio, pero con la desventaja de que el agua electrolizada puede afectar la viabilidad de las semillas debido al pH fuertemente ácido (Fransisca *et al.*, 2011; Len *et al.*, 2002; Liu y Yu, 2017; Yang *et al.*, 2013).

### 3.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (EO, por sus siglas en inglés) son compuestos aromáticos derivados de diversas partes de plantas, como flores, brotes, semillas, hojas, ramas, hierbas, madera, frutas y raíces. Su actividad antimicrobiana contra patógenos presen-

tes en alimentos ha sido ampliamente estudiada (Burt, 2004; Lee *et al.*, 2018). Se ha observado que los EO de pimienta, tomillo, romero y orégano han tenido comprobada efectividad contra diferentes cepas, como *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio alginolyticus*, *Salmonella Typhimurium*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomia phaseolina*, *Salmonella Senftenberg*, *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus*, y *A. niger* (Burt, 2004; Kotan, *et al.*, 2013; Lorenzo-Leal *et al.*, 2019).

Los EO de orégano, tomillo y corteza de canela aplicados en fase vapor demostraron tener una fuerte actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* en medio de cultivo (MIC y MLC 78.1 µl/l). Estos mismos aceites aplicados en la superficie de germinados de rábano en concentraciones de 156 µl/l durante 24 horas a 30 °C y 43 % HRE, lograron reducciones de *L. monocytogenes* de hasta 2.1 ciclos logarítmicos. Bajo las mismas condiciones y con una concentración de 625 µl/l se lograron reducciones entre 2.7 y 3 ciclos logarítmicos. Sin embargo, estos resultados no aseguran la inactivación total del patógeno, por lo que su aplicación bajo estas condiciones no asegura la inocuidad de los germinados (Lee *et al.*, 2018). Un estudio realizado con EO de pimienta, tomillo y romero en fase de vapor aplicados en semillas de alfalfa inoculadas con *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* concluyó que el aceite de tomillo es el más efectivo del grupo para inhibir el crecimiento de ambos patógenos. Con una dosis de 4.0 ml/l se inhibió significativamente el crecimiento de ambas bacterias en las semillas durante su germinación, sin tener ningún efecto negativo en la tasa de germinación o en las propiedades sensoriales de los germinados (Lorenzo-Leal *et al.*, 2019). Estos resultados concuerdan con estudios que demuestran que la aplicación en fase de vapor ejerce actividad antimicrobiana en áreas mayores que en fase líquida. Asimismo, se ha observado que algunos EO son más efectivos contra bacterias y organismos deteriorativos cuando se aplican en fase gaseosa que en fase líquida (Lee *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2015).

Los EO también pueden ser aplicados por medio de nanoemulsiones. Landry *et al.* (2016) aplicaron carvacrol acidificado (50 mM ácido levulínico) por medio de nanoemulsiones en

semillas de brócoli y de frijol mungo con el objetivo de inactivar *Salmonella enterica* Enteriditis, previamente inoculada en las semillas. Los resultados mostraron una reducción de  $10^4$  UFC/g de *Salmonella* en frijol mungo y de  $10^2$  UFC/g en semilla de brócoli. En el primer caso, no se detectó presencia del patógeno en el germinado de las semillas tratadas por 30 minutos con la nanoemulsión (Landry *et al.*, 2016).

Una de las principales ventajas que ofrecen estos compuestos en su aplicación es que muchos de los aceites estudiados han sido reconocidos como compuestos naturales y seguros, por lo que podrían ser una alternativa que reemplace los conservadores químicos (Lee *et al.*, 2018). Sin embargo, la presencia de olores y sabores fuertes podría ser un obstáculo para su aplicación por sus efectos en las propiedades organolépticas (Lee *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2015; Tyagi *et al.*, 2012).

### 3.5. Compuestos ácidos

Los compuestos ácidos tienen un alto efecto antimicrobiano atribuido principalmente a la forma disociada de este tipo de moléculas, las cuales se mueven a través de la membrana celular y liberan protones estando ya en el citoplasma, reduciendo así el pH celular, inactivando enzimas intracelulares, inhibiendo mecanismos de transporte de nutrientes y disminuyendo las reservas energéticas de la célula. Este es uno de los mecanismos por los cuales ciertas frutas con altos contenidos de ácidos orgánicos son más resistentes a la contaminación bacteriana (Yang *et al.*, 2013).

El tratamiento de semillas de rábano y de alfalfa con 8.7 % (v/v) de ácido acético en estado gaseoso a 55 °C por un periodo de entre 2 y 3 horas demostró efectividad para reducir poblaciones mayores a  $10^5$  UFC/g de *E. coli* y *Salmonella* spp. en ambos tipos de semillas. Por otra parte, con 48 horas de tratamiento se obtuvo la inhibición total de *E. coli*, aun después de la etapa del enriquecimiento. Sin embargo, ninguna de las condiciones estudiadas tuvo éxito en eliminar por completo la población de *Salmonella* (Nei *et al.*, 2011). A pesar de ello, este tratamiento es más eficiente que el recomendado con 20,000 ppm de hipoclorito de calcio, que como ya se describió previamente, puesto que obtiene reducciones menores a  $10^2$  UFC/g para ambas especies.

No obstante, el punto débil de la desinfección con compuestos ácidos sigue siendo la etapa de germinación. Otros estu-

dios han comprobado que, a pesar del éxito obtenido, la cuenta microbiana se eleva considerablemente durante la germinación de la semilla (Singh *et al.*, 2005). El uso de ácido peroxiacético (PAA) tiene una efectividad similar a la del uso de 20,000 ppm de cloro, con una reducción de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 apenas un poco mayor que 1 ciclo logarítmico en semillas de alfalfa tratadas con concentraciones de entre 1-3 % de PAA por tiempos variables entre 10 a 20 minutos, sin que se observaran reducciones mayores con el incremento en el tiempo de tratamiento o en la concentración de PAA (Rajkowski y Ashurst, 2009). La utilización de ácido láctico al 5 % durante 10 minutos a 42 °C redujo hasta límites no detectables la población de *Salmonella* spp., sin embargo, esta alcanzó niveles superiores a  $10^7$  UFC/g durante la germinación, indicando que la inactivación total de dicho patógeno no se alcanzó (Lang *et al.*, 2000).

Por su parte, Chang *et al.* (2010) investigaron la eficiencia del ácido caprílico (AC) y monocaprílico (MC) a concentraciones entre 25 y 75 mM, a 4 °C y tiempos entre 30 y 90 minutos, para la desinfección de semillas de alfalfa previamente inoculadas con *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Aunque los resultados demostraron que concentraciones mayores y tiempos más prolongados mejoraban la reducción bacteriana, tanto el AC como el MC tenían un efecto bacteriano limitado con una máxima reducción de 1.56 ciclos logarítmicos para *E. coli* O157:H7 y de 2.56 ciclos logarítmicos para *Salmonella* spp (Chang *et al.*, 2010). Con la aplicación de 10 % de ácido málico (AM) con 1 % de TDS (sulfato de dilauril tiamina), se obtuvo una reducción de *E. coli* O157:H7 de una población inicial de  $10^4$  UFC/g a niveles por debajo de los detectables. Sin embargo, esta misma población aumentó a  $10^7$ - $10^8$  UFC/g tras la etapa de germinación de la semilla (Fransisca *et al.*, 2011).

## 4. Tecnologías emergentes

Muchos estudios realizados recientemente emplean tratamientos físicos, como altas presiones, irradiación, tratamientos con dióxido de carbono supercrítico (sc-CO<sub>2</sub>), pulsos de luz de alta intensidad, entre otras tecnologías, con el objetivo de reducir o eliminar los patógenos presentes en semillas para germinados y consumo directo.

#### 4.1. Pulsos de luz de alta intensidad

Los pulsos de luz de alta intensidad (PLAI), utilizan pulsos de luz de amplio espectro ricos en luz ultravioleta de onda corta (uv-c) para la desinfección de superficies. Se ha probado que resultan más eficientes para la sanitización de alimentos que los tratamientos convencionales con luz uv-c debido a su mecanismo de acción, que actúa sobre la estructura de ADN de las bacterias, impidiendo su replicación (Demirci y Keklik, 2012; Gómez-López et al., 2007). Los PLAI se producen utilizando tecnología que multiplica la potencia de emisión de luz por el almacenamiento de electricidad en un capacitor por períodos de tiempo relativamente largos para, posteriormente, liberarlos en millonésimas de segundo (Fernández Molina et al., 2001; Gómez-López et al., 2007; Rowan, 2019). Los PLAI fueron aprobados por la FDA para la producción, procesamiento y manejo de alimentos, en 1999. La dosis acumulada permitida de uv es de hasta 12 J/cm<sup>2</sup> con el espectro de emisión entre 200 y 1100 nm (Demirci y Keklik, 2012; Fernández Molina et al., 2001).

A pesar de que se trata de una tecnología que está siendo ampliamente investigada, no existen suficientes estudios sobre su aplicación en semillas para la inactivación de patógenos (Gómez-López et al., 2007). Uno de los primeros estudios, realizado por Sharma y Demirci (2003), demostró que un tratamiento por 90 segundos a una distancia de 8 centímetros de la fuente logra una reducción mayor a 10<sup>4</sup> UFC/g en semillas de alfalfa inoculadas con *E. coli* O157:H7. El modelo matemático desarrollado en este estudio permitió optimizar el proceso para lograr obtener una reducción de hasta 8 ciclos logarítmicos del patógeno estudiado; sin embargo, estas condiciones optimizadas no se comprobaron experimentalmente. Este estudio también demostró que el grosor de la muestra es un factor relevante, dado que una de las variables de estudio fue el grosor de la capa de semillas de alfalfa. Los resultados mostraron que este factor afecta significativamente, reduciendo la efectividad del tratamiento a mayor grosor de la capa distribuida de la muestra.

Kim et al. (2019) estudiaron la aplicación de PLAI en semillas de rábano y *pak choi* para la reducción de la cuenta bacteriana de estas semillas. Las condiciones del tratamiento incluyeron

una distancia fija de 20 centímetros de la fuente lumínica y tiempos entre 0-180 segundos (fluencia de 0 a 37.80 J/cm<sup>2</sup>). El tiempo, 180 segundos, brindó la mejor inhibición bacteriana, con una reducción de 1.41 ciclos log UFC/g de mesófilos aerobios en las semillas de rábano, y 1.78 ciclos log UFC/g en las semillas de *pak choi*. Ninguna de las condiciones mostró un efecto significativo en la tasa de germinación de las semillas. Sin embargo, el mayor efecto inhibitorio de bacterias se dio en una fluencia mayor al límite máximo permitido por la FDA (12 J/cm<sup>2</sup>) (Kim et al., 2019). Por su parte, Hwang et al. (2017) estudiaron la aplicación de esta tecnología para la descontaminación de semillas de sésamo, obteniendo una reducción máxima de 1.46 ciclos log UFC/g en semillas cuya carga inicial de mesófilos aerobios se encontraba entre 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> UFC/g, con 120 segundos de tratamiento.

Una de las complicaciones que presenta este método es el tipo de equipo disponible para su aplicación, puesto que resulta complicado asegurar la distribución uniforme de los pulsos de luz por todas las caras del alimento. El estudio realizado por Hwang et al. (2017) resulta valioso en este sentido también, puesto que propone un diseño de equipo de flujo continuo para la aplicación de los PLAI. Sin embargo, se requieren más estudios en equipos con este diseño para comprobar si existe una diferencia significativa en su efecto descontaminante para el caso específico de semillas (Hwang et al., 2017).

Reyes-Jurado et al. (2019) aplicaron la tecnología de PLAI en semillas de chía inoculadas con *Salmonella Typhimurium*, obteniendo una reducción de 10<sup>4</sup> UFC/g con un tratamiento de 15 segundos (19.35 J/cm<sup>2</sup>). La relevancia de este estudio se debe a que la chía es una semilla cuya desinfección por otros métodos es complicada, ya que una elevada humedad produce la absorción de agua por parte del mucílago contenido en la semilla, lo que lleva a una alteración en las características fisicoquímicas y sensoriales en la semilla. Este es un claro ejemplo de que los PLAI pueden ser una novedosa alternativa para la desinfección de semillas sin producir cambios en sus propiedades.

Una de las principales desventajas del uso de esta tecnología es el «efecto de sombra» que se da en algunas superficies

rugosas o porosas de los alimentos. Debido a esto, las bacterias encuentran refugio en la topografía característica del alimento, volviendo a este método menos efectivo. Por otro lado, tratamientos prolongados pueden producir un calentamiento en el producto, lo que podría afectar la composición y características de textura del producto (Gómez-López *et al.*, 2007; Sharma y Demirci, 2003).

#### 4.3. Altas presiones hidrostáticas

El uso de altas presiones hidrostáticas (APH) es un método no térmico novedoso, cuya eficacia para inactivar patógenos sin alterar sus propiedades sensoriales y nutricionales en diversos alimentos ha sido comprobada (Rendueles *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

Los primeros estudios para la aplicación de esta tecnología en la descontaminación de semillas fueron realizados por Wuytack *et al.* (2003) y Ariefdjohan *et al.* (2006). Una de las principales conclusiones alcanzadas en sus investigaciones fue que la efectividad de los tratamientos con APH se encuentra también en función de la temperatura, presión, tiempo de exposición, pre-tratamiento y tipo de semilla.

De igual manera, la efectividad del tratamiento de las APH depende de la resistencia que tienen diferentes tipos de bacterias. Esto se ha observado en algunos estudios, como el realizado por Wuytack *et al.* (2003), donde se obtuvo una reducción de  $10^6$  CFU/g de *S. Typhiurium*, *E. coli* MG1655 y *Listeria innocua* con un tratamiento de 300 MPa por 15 minutos, a 4 °C, en semillas de berro. Por su parte, para *Shigella flexneri* y *E. coli* LMM1010—cepas resistentes a las presiones— se logró una reducción de  $10^4$  CFU/g. La menor reducción lograda con estas condiciones se obtuvo en *Staphylococcus aureus* con tan solo  $10^2$  UFC/g (Wuytack *et al.*, 2003).

La aplicación de PLAI en semillas de alfalfa demostró que *Listeria monocytogenes* es más resistente que *E. coli* O157:H7 a las altas presiones (Ariefdjohan *et al.*, 2006). Mientras que otros estudios comprobaron que un tratamiento en semillas de alfalfa de 650 MPa y 20 °C por 15 minutos, tiene el mismo efecto que uno con 550 MPa, a 40 °C por 2 minutos, para inactivar *E. coli* O157:H7 (Neetoo *et al.*, 2008; Neetoo *et al.*, 2009). Igual-

mente, en alfalfa se demostró que remojar previamente las semillas mejora la inactivación de *E. coli* O157:H7 y de *Salmonella* spp., pero disminuye la viabilidad para germinar en las semillas de alfalfa (Neetoo y Chen, 2010).

#### 4.4. Dióxido de carbono supercrítico (sc-co<sub>2</sub>)

El efecto bactericida del dióxido de carbono supercrítico (sc-co<sub>2</sub>) se debe probablemente a la reducción del pH intracelular, provocando la inactivación de enzimas claves para el metabolismo de la célula, disruptión bacteriana y un incremento en la presión interna de la célula, modificaciones en la membrana celular, y la extracción de sustancias intracelulares (Spilimbergo y Bertucco, 2003).

Los estudios que han observado la aplicación de esta tecnología a semillas para germinados reportan mejores resultados con mayores presiones de sc-co<sub>2</sub>, temperatura o tiempo de tratamiento. Mazzoni *et al.* (2001) lograron reducciones del 92.8 % ( $>104$  UFC/g) de *E. coli* K12 inoculada en semillas de alfalfa, utilizando SC-CO<sub>2</sub> a 4000 psi y 50 °C por 60 minutos, sin afectar las características de germinación de las semillas. El mismo estudio confirmó que un tratamiento con dicha presión y temperatura, por solo 15 minutos, la inhibición fue mayor al 50 %, por lo que la duración es un factor importante a considerar. De igual manera, se obtiene una reducción de 3.51 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 con un tratamiento a 15 MPa y 35 °C por 10 minutos, mientras que para lograr reducciones cercanas a  $10^3$  UFC/g en colonias de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* fue necesario un tratamiento a 10 MPa a 45 °C por 5 minutos. Por su parte, se logró una reducción de más de  $10^7$  UFC/g de estos tres patógenos con un tratamiento a 20 MPa y 45 °C por 15 minutos; sin embargo, bajo estas condiciones la capacidad de germinación disminuyó (Jung *et al.*, 2009).

Los estudios disponibles muestran que el tratamiento con sc-co<sub>2</sub> por sí solo no es capaz de alcanzar una reducción igual o mayor a  $10^5$  UFC/g de patógenos en las semillas utilizadas, por lo que no cumple los estándares recomendados por el Comité Consultivo Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos (NACMCF, por sus siglas en inglés) (Yang *et al.*, 2013).

#### 4.5. Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes son tecnologías no térmicas con efectividad comprobada para mejorar la inocuidad de los alimentos, extendiendo su vida de anaquel (Song *et al.*, 2009). Estas incluyen a los rayos gamma producidos por fuentes de cobalto 60 o cesio 137, electrones generados por máquinas como el «e-beam» (haz de electrones) y los rayos X (Komolprasert, 2007). A pesar de diversas controversias, la FDA ha aprobado su uso para el tratamiento de semillas con una dosis máxima de 8 kGy (Yang *et al.*, 2013).

Rajkowski *et al.* (2003) reportaron la inactivación total de *Salmonella* en germinados de alfalfa procedentes de semillas tratadas con radiación gama y dosis iguales o mayores a 0.5 kGy. Pero esta tecnología ha sido investigada en su aplicación no solo a semillas, sino también al producto ya germinado. Schoeller *et al.* (2002) realizaron un estudio en germinado de alfalfa, donde obtuvieron reducciones superiores a  $10^6$  CFU/g de *Listeria monocytogenes* con dosis de 3.3 kGy de radiación beta. Los resultados mostraron que dichos tratamientos no generaron cambios en apariencia u olor del alimento. Por su parte, Bari *et al.* (2005) observaron reducciones de 4.88 y 4.57 ciclos logarítmicos en germinados de brócoli y frijol, respectivamente, tras un tratamiento con 1 kGy.

De igual manera, se ha estudiado la aplicación de esta tecnología en combinación con otras. Bari, Nei *et al.* (2009) utilizaron la radiación en combinación con un tratamiento térmico para suprimir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en frijol mungo (tabla II). Cabe mencionar que dicha reducción no fue alcanzada por el tratamiento térmico o por la irradiación por sí solas cuando se probaron por separado.

La principal ventaja de la aplicación de radiación en germinados, aparte de la efectividad en la inactivación de patógenos, es la extensión de la vida útil de estos alimentos debido a la disminución, en general, de microorganismos deteriorativos. Estudios de vida de anaquel en germinados de alfalfa y de brócoli han demostrado que esta extensión puede ser de hasta 10 días utilizando una dosis baja de 2 kGy. Sin embargo, es en su aplicación en la semilla donde se encuentra la principal des-

ventaja, ya que se ha observado que dosis altas de radiación tienen efectos adversos en el porcentaje de germinación, la tasa de rendimiento, así como en la morfología (largo y ancho) del germinado (Rajkowski *et al.*, 2003).

Por otro lado, la aplicación de dosis bajas de radiación (menores a 3 kGy) no altera las características del germinado, ni tiene algún efecto significativo en su germinación. Sin embargo, estas dosis no garantizan la inocuidad del producto germinado. Estudios realizados sobre el efecto de dosis bajas (1 kGy) en semilla de frijol mungo inoculado con *E. coli* y *Salmonella Typhimurium* mostraron una reducción de 2.6 ciclos log UFC/g en la semilla, pero esta población alcanzó un recuento de hasta  $10^8$  UFC/g tras 48 horas de germinación de las semillas previamente tratadas (Saroj *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

Las semillas y sus germinados son productos naturales con muchos beneficios nutricionales y asociados a la salud; sin embargo, su naturaleza los hace proclives a la contaminación con microorganismos patógenos. En atención al elevado riesgo que ello implica, se han emitido varias recomendaciones con el objetivo de mitigar las causas de posibles enfermedades transmitidas por alimentos. Estas recomendaciones se han orientado principalmente hacia la implementación de buenas prácticas de agricultura y manufactura durante su producción, en el caso de las semillas de consumo directo. Para las semillas para germinados, la FDA recomienda su sanitización con una solución con 20,000 ppm de hipoclorito de calcio; no obstante, esta práctica tiene una alta variabilidad y limitada eficacia. Así lo respalda el hecho de que, a pesar de su existencia, cada año se reportan enfermedades transmitidas por alimentos, y producidas por patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en estos productos.

Dado que los métodos químicos presentan limitaciones debido, por un lado, a su inhabilidad para alcanzar las bacterias escondidas en superficies rugosas de las semillas y, por otro, a que por sus características no pueden ser aplicados en el grupo de semillas de consumo directo, ya que alteran sus propiedades sensoriales, se han buscado otro tipo de tecnologías. Entre las investigadas, los mejores resultados aplicando un solo tipo de tecnología se han obtenido con métodos físicos, especialmente los tratamientos con altas presiones, irradiación y tratamientos térmicos con calor seco a temperaturas cercanas a los 50 °C y prolongados períodos de tiempo. Sin embargo, también hay que considerar que dichos tratamientos no afecten la calidad nutricional de las semillas, ni su capacidad para germinar cuando se trate de semillas para germinados. Tal es el caso de la irradiación de semillas; si bien se ha comprobado su alta efectividad de inactivación microbiana, afecta el crecimiento del brote del germinado en dosis elevadas.

Los mejores resultados obtenidos, considerando la reducción e inactivación total de los patógenos en semillas, ha sido la combinación de dos o más tecnologías, como el tratamiento térmico con posterior irradiación o tratamientos con ozono seguido de irradiación a dosis muy bajas que no afecten la tasa de germinación de las semillas. Estos resultados apuntan a que una posible alternativa a las 20,000 ppm de cloro recomendadas por la FDA se encuentre en el diseño y aplicación de alguna de estas combinaciones de tecnologías para lograr asegurar la inocuidad de estos productos.

## AGRADECIMIENTOS

La autora del presente artículo agradece a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) –hoy Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)–, por el financiamiento otorgado para sus estudios en el Doctorado en Ciencia de Alimentos de la UDLAP.

## REFERENCIAS

- Ariefdjohan, M. W., Nelson, P. E., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Balasubramanian, V. M., y Singh, N. (2006). Efficacy of high hydrostatic pressure treatment in reducing *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in alfalfa seeds. *Journal of Food Science*, 69(5), M117-M120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10718.x>
- Bang, J., Kim, H., Kim, H., Beuchat, L. R. y Ryu, J.-H. (2011). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on radish seeds by sequential treatments with chlorine dioxide, drying, and dry heat without loss of seed viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6680-6686. <https://doi.org/10.1128/AEM.05715-11>
- Bari, M. L., Enomoto, K., Nei, D., y Kawamoto, S. (2010). Scale-Up seed decontamination process to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* on mung bean seeds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(1), 51-56. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0389>
- Bari, M. L., Inatsu, Y., Isobe, S., y Kawamoto, S. (2008). Hot Water treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in mung bean seeds. *Journal of Food Protection*, 71(4), 830-834. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.4.830>
- Bari, M. L., Nakamura, M., Todoriki, S., Juneja, V. K., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Effectiveness of irradiation treatments in inactivating *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables at refrigeration temperature. *Journal of Food Protection*, 68(2), 318-323. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.2.318>
- Bari, M. L., Nei, D., Enomoto, K., Todoriki, S. y 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. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.3.631>
- Bari, M. L., Sugiyama, J., y Kawamoto, S. (2009). Repeated quick hot-and-chilling treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in mung bean and radish seeds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(1), 137-143. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0143>
- Bellostas, N., Kachlicki, P., Sørensen, J. C. y Sørensen, H. (2007). Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Scientia Horticulturae*, 114(4), 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.06.015>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention Foodborne Outbreak). Online Database. 2020. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>. Consultado en febrero 2020.
- Chang, S., Redondo-Solano, M. y Thippareddi, H. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. On alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.011>
- Demirci, A. y Keklik, N. M. (2012). Process design involving pulsed uv light. En J. Ahmed y M. S. Rahman (ed.), *Handbook of food process desing* (pp. 1166-1239). Wiley-Blackwell.
- Ding, H., Fu, T.-J. y Smith, M. A. (2013). Microbial contamination in sprouts: How effective is seed disinfection treatment?: seed disinfection for sprouts. *Journal of Food Science*, 78(4), R495-R501. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12064>
- ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). Online Database. 2020. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data?search=food+outbreaks>. Consultado en febrero 2020.
- Feng, G., Churey, J. J. y Worobo, R. W. (2007). Thermal inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1698-1703. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.7.1698>
- Fernández Molina, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. *Arbor*, 168(661), 155-170. <https://doi.org/10.3989/arbor.2001.i661.827>
- Fransisca, L., Zhou, B., Park, H. y Feng, H. (2011). The effect of calcinated calcium and chlorine treatments on *Escherichia coli* O157:H7 87-23 population reduction in radish sprouts. *Journal of Food Science*, 76(6), M404-M412. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02270.x>
- Gandhi, M. y Matthews, K. R. (2003). Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 301-306. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00108-9)
- Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. y Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(9), 464-473. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.010>
- Harvey, R. R., Zakhour, C. M. y Gould, L. H. (2016). Foodborne disease outbreaks associated with organic foods in the United States. *Journal of Food Protection*, 79(11), 1953-1958. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-204>
- Himathongkham, S., Nuanualsuwan, S., Riemann, H. y Cliver, D. O. (2001). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in artificially contaminated alfalfa seeds and mung beans by fumigation with ammonia. *Journal of Food Protection*, 64(11), 1817-1819. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1817>
- Hu, H., Churey, J. J. y Worobo, R. W. (2004). Heat treatments to enhance the safety of mung bean seeds. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1257-1260. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1257>
- Hwang, H.-J., Cheigh, C.-I. y Chung, M.-S. (2017). Construction of a pilot-scale continuous-flow intense pulsed light system and its efficacy in sterilizing sesame seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.017>
- Jung, W. Y., Choi, Y. M. y Rhee, M. S. (2009). Potential use of supercritical carbon dioxide to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Typhimurium* in alfalfa sprouted seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.014>
- Kim, S.-M., Hwang, H.-J., Cheigh, C.-I. y Chung, M.-S. (2019). Bactericidal effect of intense pulsed light on seeds without loss of viability. *Food Science and Biotechnology*, 28(1), 281-287. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0456-4>
- Komolprasert, V. (2007). Packaging for foods treated by ionizing radiation. En J. H. Han (ed.) *Packaging for nonthermal processing of food* (pp. 87-116). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470277720.ch6>
- Kotan, R., Dadasoğlu, F., Karagoz, K., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R. y Dikbas, N. (2013). Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Scientia Horticulturae*, 153, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.027>
- Kumar, M., Hora, R., Kostrzynska, M., Waites, W. M. y Warriner, K. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on mung beans, alfalfa,

- and other seed types destined for sprout production by using an oxychloro-based sanitizer. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1571-1578. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.7.1571>
- Landry, K. S., Komaiko, J., Wong, D. E., Xu, T., McClements, D. J. y McLandsborough, L. (2016). Inactivation of *Salmonella* on sprouting seeds using a spontaneous carvacrol nanoemulsion acidified with organic acids. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1115-1126. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-397>
- Lang, M. M., Ingham, B. H. y Ingham, S. C. (2000). Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2), 73-82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00297-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00297-X)
- Lee, G., Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L. R. y Ryu, J.H. (2018). Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 265, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.001>
- Len, S.V., Hung, Y.C., Chung, D., Anderson, J. L., Erickson, M. C. y Morita, K. (2002). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 209-212. <https://doi.org/10.1021/jf010822v>
- Liu, R. y Yu, Z.-L. (2017). Application of electrolyzed water on reducing the microbial populations on commercial mung bean sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 995-1001. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2445-z>
- Lorenzo-Leal, A. C., Palou, E. y López-Malo, A. (2019). Evaluation of the efficiency of allspice, thyme and rosemary essential oils on two foodborne pathogens in in-vitro and on alfalfa seeds, and their effect on sensory characteristics of the sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 295, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.008>
- Loui, C., Grigoryan, G., Huang, H., Riley, L. W. y Lu, S. (2008). Bacterial communities associated with retail alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*, 71(1), 200-204. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.1.200>
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Gulewicz, P., Gulewicz, K. y Vidal-Valverde, C. (2008). Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1635-1644. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.004>
- Mazzoni, A. M., Sharma, R. R., Demirci, A. y Ziegler, G. R. (2001). Supercritical carbon dioxide treatment to inactivate aerobic microorganisms on alfalfa seeds. *Journal of Food Safety*, 21(4), 215-223. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2001.tb00320.x>
- Neetoo, H. y Chen, H. (2010). Pre-soaking of seeds enhances pressure inactivation of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on crimson clover, red clover, radish and broccoli seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.026>
- Neetoo, H., Pizzolato, T. y Chen, H. (2009). Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds through a combination of high hydrostatic pressure and mild heat. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1901-1907. <https://doi.org/10.1128/AEM.02531-08>
- Neetoo, H., Ye, M. y Chen, H. (2008). Potential application of high hydrostatic pressure to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouted seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 348-353. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.011>
- Nei, D., Latiful, B. M., Enomoto, K., Inatsu, Y. y Kawamoto, S. (2011). Disinfection of radish and alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* by a gaseous acetic acid treatment. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(10), 1089-1094. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0901>
- O'Neill, C. J., Bolton, D. J. y Fanning, S. (2011). Comparative studies on the survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* in different farm environments. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology*, 1, 116-122.
- Pao, S., Kalantari, A. y Khalid, M. F. (2008). Eliminating salmonella enterica in alfalfa and mung bean sprouts by organic acid and hot water immersions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(2), 335-342. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00182.x>
- Rajkowski, K. T. y Ashurst, K. (2009). Use of 1% peroxyacetic acid sanitizer in an air-mixing wash basin to remove bacterial pathogens from seeds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(9), 1041-1046. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0267>
- Rajkowski, K. T., Boyd, G. y Thayer, D. W. (2003). Irradiation d-values for *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* sp. on inoculated broccoli seeds and effects of

- irradiation on broccoli sprout keeping quality and seed viability. *Journal of Food Protection*, 66(5), 760-766. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.5.760>
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., y Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1251-1260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>
- Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A. R., Méndez-Aguilar, J., Ochoa-Velasco, C. E., Maní-López, E., Jiménez-Munguía, M. T., Palou, E., López-Malo, A. y Ávila-Sosa, R. (2019). High-intensity light pulses to inactivate *Salmonella Typhimurium* on Mexican chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. *Journal of Food Protection*, 82(8), 1272-1277. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-577>
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S. R., Jensen, G. B. y Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters*, 250(1), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.054>
- Rowan, N. J. (2019). Pulsed light as an emerging technology to cause disruption for food and adjacent industries - Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 88, 316-332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.027>
- Saroj, S. D., Hajare, S., Shashidhar, R., Dhokane, V., Sharma, A. y Bandekar, J. R. (2007). Radiation processing for elimination of *Salmonella Typhimurium* from inoculated seeds used for sprout making in india and effect of irradiation on germination of seeds. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1961-1965. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1961>
- Schoeller, N. P., Ingham, S. C. y Ingham, B. H. (2002). Assessment of the potential for listeria monocytogenes survival and growth during alfalfa sprout production and use of ionizing radiation as a potential intervention treatment. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1259-1266. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1259>
- Seo, H.-S., Beuchat, L. R., Kim, H. y Ryu, J.H. (2015). Development of an experimental apparatus and protocol for determining antimicrobial activities of gaseous plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.021>
- Sharma, R.R., y Demirci, A. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of Food Science*, 68(4), 1448-1453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09665.x>
- Sharma, R. R., Demirci, A., Beuchat, L. R. y Fett, W. F. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat treatment. *Journal of Food Protection*, 65(3), 447-451. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.3.447>
- Singh, B. R., Chandra, M., Agarwal, R. y Babu, N. (2005). Curing of salmonella enterica, serovar typhimurium-contaminated cowpea seeds and sprouts with vinegar and chlorination. *Journal of Food Processing and Preservation*, 29(3-4), 268-277. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2005.00027.x>
- Singh, N., Singh, R. K. y Bhunia, A. K. (2003). Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 235-243. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00224-4)
- Singla, R., Ganguli, A. y Ghosh, M. (2011). An effective combined treatment using malic acid and ozone inhibits *Shigella spp.* On sprouts. *Food Control*, 22(7), 1032-1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.012>
- Song, H. P., Kim, B., Jung, S., Choe, J. H., Yun, H., Kim, Y. J. y Jo, C. (2009). Effect of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into salted, seasoned, and fermented oyster. *LWT - Food Science and Technology*, 42(8), 1320-1324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.018>
- Song, K. Y., Joung, K. Y., Shin, S. Y. y Kim, Y. S. (2018). Effects of chia (*salvia hispanica l.*) Seed roasting conditions on quality of cookies. *Italian Journal of Food Science*, 31(1). <https://doi.org/10.14674/IJFS-1198>
- Spilimbergo, S. y Bertucco, A. (2003). Non-thermal bacterial inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 627-638. <https://doi.org/10.1002/bit.10783>
- Tamber, S., Swist, E. y Oudit, D. (2016). Physicochemical and bacteriological characteristics of organic sprouted chia and flax seed powders implicated

- in a foodborne salmonellosis outbreak. *Journal of Food Protection*, 79(5), 703-709. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-529>
- Thomas, J. L., Palumbo, M. S., Farrar, J. A., Farver, T. B. y Cliver, D. O. (2003). Industry practices and compliance with U.S. Food and Drug Administration guidelines among California sprout firms. *Journal of Food Protection*, 66(7), 1253-1259. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.7.1253>
- Tornuk, F., Ozturk, I., Sagdic, O. y Yetim, H. (2011). Determination and improvement of microbial safety of wheat sprouts with chemical sanitizers. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 503-508. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0709>
- Tyagi, A. K., Malik, A., Gottardi, D. y Guerzoni, M. E. (2012). Essential oil vapour and negative air ions: A novel tool for food preservation. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.02.004>
- Weiss, A., Hertel, C., Grothe, S., Ha, D. y Hammes, W. P. (2007). Characterization of the cultivable microbiota of sprouts and their potential for application as protective cultures. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(6), 483-493. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.006>
- Willis, C., Little, C. L., Sagoo, S., de Pinna, E. y Threlfall, J. (2009). Assessment of the microbiological safety of edible dried seeds from retail premises in the United Kingdom with a focus on *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 26(8), 847-852. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.007>
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., Meersseman, K. y Michiels, C. W. (2003). Decontamination of seeds for seed sprout production by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 66(6), 918-923. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.6.918>
- Yang, Y., Meier, F., Ann Lo, J., Yuan, W., Lee Pei Sze, V., Chung, H. J. y Yuk, H.-G. (2013). Overview of recent events in the microbiological safety of sprouts and new intervention technologies: sprout safety and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 265-280. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12010>
- Zhang, C., Lu, Z., Li, Y., Shang, Y., Zhang, G. y Cao, W. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* on mung bean seeds and sprouts by slightly acidic electrolyzed water. *Food Control*, 22(5), 792-796. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.018>