

Interés de los germinados y su Seguridad Alimentaria

Interest of sprouts and their Food Security

Ponce de León De Lama, Carolina^{1,2}; Torija Isasa, Esperanza¹; Matallana González, M^a. Cruz¹; Pintado García, Concepción³

1 Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos (Nutrición, Bromatología, Higiene y Seguridad Alimentaria). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

2 Sección de Cs. Farmacéuticas. Departamento de Cs. Celulares y Moleculares. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

3 Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Recibido: 7/febrero/2020. Aceptado: 29/marzo/2020.

RESUMEN

Introducción: Los germinados son alimentos listos para el consumo cuyo uso está bastante extendido y de los que es necesario garantizar su inocuidad.

Objetivos: Nuestros objetivos fueron conocer la Normativa Europea que regula la Seguridad Alimentaria de los mismos y evaluar la calidad microbiológica de algunos tipos de germinados.

Metodología: La Normativa Europea estudiada recoge la evolución relativa a la Seguridad Alimentaria de hortalizas, incluyendo las semillas germinadas. En 2005 se establece únicamente la investigación de *Salmonella* y a partir de 2013 plantea criterios de calidad microbiológica para los germinados; dicha Normativa esta transpuesta a la Reglamentación Española. Para el estudio microbiológico se utilizaron 5 tipos diferentes de germinados adquiridos en el comercio, que se analizaron directamente (control), después de su lavado con agua destilada y tras su tratamiento con un desinfectante. Se realizaron recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* y se investigó la presencia de *Salmonella* spp.

Resultados: Los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales en los controles estuvieron comprendidos entre 1,0

x 10⁸ a 2,0 x 10⁹ ufc/g; en los lavados, fueron de 6,0 x 10⁷ a 1,1 x 10⁹ ufc/g y en los tratados de 1,0 x 10⁷ a 6,8 x 10⁸ ufc/g. La reducción de la carga bacteriana por el lavado fue de 24 % (ajo) a 50 % (brócoli) y en el caso del tratamiento con el desinfectante de 59 % (ajo) a 90 % (alfalfa). Los recuentos de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* fueron inferiores a 10 ufc/g en todas las muestras y en el caso de *Salmonella* spp. hubo ausencia en 25 g en todas las muestras analizadas.

Conclusiones: Los recuentos de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* son inferiores a lo indicado en la normativa y no se encontró presencia de *Salmonella* spp. En conclusión los germinados analizados se consideran alimentos seguros e inocuos.

PALABRAS CLAVE

Germinados, calidad microbiológica, normativa, seguridad alimentaria.

ABSTRACT

Introduction: Sprouts are ready-to-eat foods, and their use is quite widespread, consequently it is necessary to guarantee their safety.

Objective: The aims of this study were to know the European Regulations about Food Safety of sprouts and to evaluate the microbiological quality of some types of sprouts.

Methods: The European Regulation reflects the evolution related to Food Safety of vegetables, including sprouted

Correspondencia:
Carolina Ponce de León De Lama
carolponcedeleon@gmail.com

seeds. In 2005, only *Salmonella* was established to be investigated in sprouts, and in 2013, the European Union proposed microbiological quality criteria for sprouts and that Regulation was transposed to the Spanish Regulations. For the microbiological study, five different types of commercial sprouts were chosen; they were directly analyzed (control), after distilled water washing and after treatment with a disinfectant. Total mesophilic aerobic bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* were counted and presence of *Salmonella* spp. was determined.

Results: Counts of total mesophilic aerobic bacteria were between 1.0×10^8 to 2.0×10^9 cfu/g in control samples; in the washed ones, from 6.0×10^7 to 1.1×10^9 cfu/g, and, in the treated ones, from 1.0×10^7 to 6.8×10^8 cfu/g. The reduction of bacterial load by washing was from 24 % (garlic) to 50 % (broccoli) and in the case of treatment with the disinfectant from 59 % (garlic) to 90 % (alfalfa). *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* counts were lower than 10 cfu/g in all samples, and there was absence of *Salmonella* spp. in 25 g of all the samples analyzed.

Conclusions: *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* counts were lower than those indicated in the Regulations, and no presence of *Salmonella* spp was found. In conclusion, the analyzed sprouts are considered safe and innocuous foods.

KEYWORDS

Sprouts, microbiological quality, normative, food safety.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

ANOVA: Análisis de Varianza.

BPA: Buenas Prácticas de Almacenamiento.

BPH: Buenas Prácticas de Higiene.

CE: Comunidad Europea.

ESSA: European Sprouted Seeds Association (Asociación Europea de Semillas Germinadas).

EE.UU: Estados Unidos.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

HSD: Honestly significant - difference.

INFOSAN: International Food Safety Authorities Network.

ISO: International Organization for Standardization.

log: Logaritmo.

mL: Mililitro.

NACMCF: National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCA: Plate Count Agar.

ppm: Partes por millón.

RAE: Real Academia Española.

RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed.

RD: Real Decreto.

SCIRI: Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información.

ser: Serotipo.

spp: Especies.

STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico.

UE: Unión Europea.

ufc/g: Unidades formadoras de colonias por gramo.

var: Variedad.

INTRODUCCIÓN

Los germinados, también llamados brotes, son alimentos que han ido conquistando a los consumidores por su agradable frescura y su interés nutricional y se usan acompañando a diversos platos, tanto a nivel doméstico como en un gran número de restaurantes de todo el mundo. Aunque su uso está muy extendido surgen dudas sobre su denominación. La palabra germinado no se define como tal en el Diccionario de la Lengua Española¹, donde sí aparece la palabra germinar, para la que se indica que es: *Dicho de un vegetal: Comenzar a desarrollarse desde la semilla*. Por su parte la Asociación Europea de Semillas Germinadas (ESSA), define brotes como: *Producto obtenido a partir de la germinación de semillas y su desarrollo en agua o en otro medio, recolectado antes de que aparezcan hojas verdaderas y destinado a ser consumido entero, incluida la semilla*².

Generalmente el término más difundido entre los consumidores es el de germinados, si bien, también se utiliza la denominación de brotes para los mismos; no obstante, el término brotes, se utiliza para pequeñas hojas de distintas hortalizas, a las que se considera «brotes tiernos», que se suelen utilizar en ensaladas. Según la Real Academia Española (RAE), brote es: *Pimpollo o renuevo que empieza a desarrollarse*. La doble denominación de brotes para las semillas que empiezan a germinar o para las pequeñas hojas se observa en la propia Normativa comunitaria, por lo que, en nuestro estudio, al hacer referencia a dicha Normativa utilizaremos el término que se indica en la misma.

El germinado más conocido en todo el mundo es el de soja verde, ya que aparece como ingrediente en los rollitos primavera. Ya en los años 2000 se empiezan a ver distintos germinados como adorno en diferentes platos servidos en restaurantes y a partir de aquí se fueron incorporando al uso doméstico. Se utilizan generalmente frescos, sobre todo para aportar sabor a alimentos más elaborados, acompañando ensaladas servidas con carnes o pescados; también pueden saltearse, pero el tiempo de cocción debe ser muy corto debido a que son alimentos de los que rápidamente cambian sus características sensoriales. Otras formas de uso más novedosas son galletas y snacks elaborados a base de distintos tipos de germinados³⁻⁴.

Diferentes autores investigan sobre el valor nutritivo de estos alimentos. Algunos hacen mención a que el proceso de germinación mejora el valor nutritivo de las semillas, a que aumentan los compuestos bioactivos, tales como la vitamina C y polifenoles y/o a que el proceso genere una disminución de factores antinutricionales dando origen a alimentos de mayor interés⁵⁻⁶. La utilización de los germinados se ha ido afianzando y ha impulsado el desarrollo de industrias dedicadas a su producción, aunque también ha aumentado su elaboración de forma casera. En España existen varias industrias registradas, muchas de ellas dedicadas concretamente a la producción de germinados y establecidas en las diferentes regiones españolas, destacando La Rioja, Madrid, Murcia y Barcelona; en Madrid hay una empresa que comercializa, aproximadamente 100 tipos distintos de germinados. A nivel doméstico se pueden preparar de forma muy sencilla, existiendo publicaciones en las que se indican las condiciones para cada tipo de semilla.

En el año 2003, el *Codex Alimentarius* publicó el Código de Prácticas de Higiene para las Frutas y Hortalizas Frescas, en cuyo Anexo II se plantean las recomendaciones para la producción de semillas germinadas destinadas al consumo humano; entre ellas, indica realizar controles microbiológicos de patógenos: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patógeno, *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp. en semillas, germinados y en el agua utilizada para la germinación. Sugiere la aplicación de las Buenas Prácticas de Almacenamiento (BPA) de las semillas durante la producción, acondicionamiento y almacenamiento y las Buenas Prácticas de Higiene (BPH). Sin embargo en la Normativa Europea aun no aparecía ninguna norma específica para los germinados⁷. Dado que en ambos casos, producción industrial y doméstica, existe el riesgo de desarrollo de microorganismos indeseables debido a la humedad y temperatura característicos del proceso de germinación, lo más importante es cuidar la higiene de las semillas y del agua que se utilizará para dicho proceso.

En la actualidad existe una amplia información para la correcta producción de los germinados destinados al consumo humano, sobre todo para evitar que se origine la contaminación durante el proceso de obtención. De gran interés es la Guía de Buenas Prácticas de Higiene en la Producción

Primaria de Brotes Vegetales, la cual presenta un Árbol de Decisiones para el Control Microbiológico de Brotes o de Agua de Riego utilizada, con pautas necesarias para la elaboración de los mismos⁸. Por su parte la ESSA, establece las Directrices de Higiene para la producción de brotes y semillas para germinación. Ambas sirven de apoyo informativo para los productores de brotes; aunque no tienen carácter jurídico².

En relación a las características sanitarias de estos alimentos, a mediados del 2011, se produjo en Alemania un brote de infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) con una incidencia importante de síndrome urémico hemolítico (SUH), que afectó a cientos de personas y que se extendió a varios países europeos, causando una alerta alimentaria en toda la Unión Europea (UE). Las investigaciones relacionaron la crisis alimentaria con el consumo de germinados contaminados elaborados con semillas de alholva (*Trigonella foenum-graecum* L.) provenientes de Egipto. Debido a esto se planteó la Decisión de Ejecución de la Comisión del 6 julio de 2011 sobre medidas de emergencia aplicables a las semillas de alholva y determinadas semillas y habas importadas de Egipto (2011/402/UE); esta Decisión fue modificada posteriormente, el 6 de octubre de 2011, por la Decisión de Ejecución de la Comisión (2011/662/UE). A partir del problema suscitado y de la Decisión Comunitaria que acabamos de comentar, han ido surgiendo nuevos controles y normas a nivel europeo⁹⁻¹⁰.

OBJETIVOS

Todas estas circunstancias son motivo suficiente para intentar profundizar en el conocimiento de este tipo de alimentos, lo que se plantea en los objetivos: a) conocer la Normativa Europea que regula la Seguridad Alimentaria de los germinados y b) estudiar desde el punto de vista microbiológico varios germinados comerciales con el fin de determinar si se trata de alimentos seguros.

Seguridad Alimentaria de los Germinados: Normativa

La Seguridad Alimentaria ha suscitado interés, desde hace muchos años, a nivel internacional, y a partir de la existencia de una Europa unida se ha procurado establecer normas comunes que la regulen. A ello se incorporó el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed) creado en 1979; ésta es una herramienta que permite mantener comunicados y actualizados a todos los miembros de la comunidad sobre las Notificaciones y Alertas provocadas por problemas relacionados con los alimentos que puedan afectar a la salud pública¹¹.

En España, a partir de 1987, el sistema que gestiona el intercambio de la información sobre las alertas alimentarias es el Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), una Red de Alerta Alimentaria establecida por la de-

nominada actualmente Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). La Red SCIRI establece comunicación constante con el RASFF (Red Europea) sobre los posibles riesgos alimentarios. Dada una alerta, el RASFF, además de comunicarla a sus miembros, la comunica a otros sistemas internacionales como el «International Food Safety Authorities Network» (INFOSAN), miembro de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el fin de preservar la Seguridad Alimentaria a nivel mundial¹².

La primera crisis internacional, no solo a nivel europeo, que involucró a los germinados fue en 1995, estuvo causada por *Salmonella* y afectó a 17 Estados de los Estados Unidos (EE. UU) y a Finlandia; esta crisis se relacionó con germinados de alfalfa contaminados con *Salmonella enterica* ser. Stanley, y se comprobó que los germinados se obtuvieron a partir de semillas contaminadas procedentes de un mismo distribuidor de los Países Bajos. Sin embargo este caso no fue notificado en el RASFF; el primer problema ya recogido en RASFF tuvo lugar a mediados de 1995 y en este caso la causa fue *Salmonella enterica* ser. Newport que afectó a siete Estados de EE.UU, Canadá y en Europa, a Dinamarca¹³. Llama la atención que en 2011 se comunicaron en el RASFF tres alertas debidas a distintos germinados, pero no se mencionan los de alfalfa o fenogreco responsables de la crisis citada.

En la Tabla 1 se recogen cronológicamente las Notificaciones de Alertas sobre germinados reportadas por el RASFF;

entre ellas los que causaron más problemas fueron los de alfalfa con el 23,1 % de los casos, los de remolacha, soja y mungo con 15,4 % cada uno. Se trata de germinados y países muy diversos, siendo Alemania y Finlandia los que más casos presentaron, cuatro en el primer país y tres en el segundo; en cuanto a los microorganismos, con excepción de un caso de *Bacillus cereus*, los responsables fueron *Salmonella* en 61,5 % y *Escherichia coli* en 30,8 %.

En la Tabla 2 se incluyen aquellas Notificaciones de Información publicadas por el RASFF, en las que el riesgo no demanda tomar una acción inmediata entre los países miembros. Es preciso destacar que al revisar estas Notificaciones, antes del año 2004 no se registraban Notificaciones de Información de los alimentos que nos ocupan cuando representaran un riesgo para la salud causado por un agente bacteriano. En 2011 entra en vigor el Reglamento (UE) N° 16/2011 y desde entonces, las Notificaciones de Información se clasifican en: «Notificación de Información para Seguimiento», cuando el alimento está en el mercado o puede ser comercializado entre los Estados miembros y «Notificación de Información para Atención», cuando el alimento no ha sido comercializado, ya que no se encuentra en el mercado o se encuentra únicamente en el país notificante². Por esta razón en la Tabla 2, las Notificaciones correspondientes a los años 2004 a 2010 son «Notificaciones de Información» y las recogidas a partir del

Tabla 1. Notificaciones de Alertas publicadas en RASFF (RASFF, 2019).

Año	Germinado	Bacteria	País Notificación	Nº Alertas	Nº total de Alertas de frutas y vegetales
1995	Alfalfa	<i>Salmonella enterica</i> ser. Newport	Dinamarca	1	1
1999	Alfalfa	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	Finlandia	1	7
2007	Alfalfa	<i>Salmonella enterica</i> ser. Weltevreden	Dinamarca	1	108
2011	Mungo	<i>Salmonella enterica</i> ser. Newport	Holanda	3	60
	Remolacha	<i>Escherichia coli</i> (O74:H28) (toxina Shiga)	Alemania		
	Mezcla orgánicos	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Alemania		
2012	Soja	<i>Salmonella enterica</i> ser. Münster <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	Bélgica	2	41
	Rábano orgánico	<i>Bacillus cereus</i>	Alemania	1	
2015	Lenteja	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Finlandia	1	79
2016	Mungo orgánico	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	Finlandia	1	98
2018	No específica	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Alemania	1	120
2019	Remolacha	<i>Salmonella</i> spp.	Suecia	1	142

Tabla 2. Notificaciones de Información publicadas en RASFF (RASFF, 2019).

Año	Germinado	Bacteria	País Notificación	Nº Notificaciones	Nº total de Notificaciones de frutas y vegetales
2004	Alfalfa, brócoli y rábano	<i>Salmonella</i>	Reino Unido	1	177
2010	Remolacha	<i>Salmonella enterica</i> ser. Newport	Dinamarca	1	198
2012	Soja	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bélgica	5	145
	Soja	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Austria		
	Mungo	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Alemania		
	Rábano	<i>Listeria monocytogenes</i>	Alemania		
	Alfalfa	<i>Listeria welshimeri</i> y <i>Salmonella enterica</i> grupo B	Alemania		
2014	Rábano	<i>Bacillus cereus</i>	Alemania	1	148
2015	Soja	<i>Salmonella enterica</i>	Holanda	1	105
2016	Soja	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Holanda	2	98
	Remolacha roja	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	Holanda		
2017	Remolacha	<i>Escherichia coli</i> (toxina Shiga)	Alemania	1	102
2018	Soja	Enterotoxina estafilocócica	Eslovenia	2	98
	Soja	<i>Salmonella</i>	Holanda		

2012 están clasificadas como: «Notificaciones de Información para Atención»¹⁴.

En el caso de las Notificaciones de Alertas, los germinados responsables de las Notificaciones de Información fueron los germinados de soja con el 42,9 %, los de remolacha con 21,4 %, los de alfalfa y rábano con 14,3 % cada uno, y los de mungo con el 7,1 % de los casos (Tabla 2). Destaca el año 2012 en el que hubo cinco Notificaciones de Información para Atención relativas a estos alimentos; en cuanto a los países, se presentaron más casos en Alemania (5) y Holanda (4). Entre los microorganismos responsables destaca nuevamente *Salmonella* en un 42,9 %, seguida de *Escherichia coli* en un 28,6 % de los casos y *Listeria* en un 21,4 % (un caso en Bélgica y dos en Alemania).

En la Tabla 3 se recoge la Normativa Europea y la Española. En cuanto a la denominación de estos productos, la propia Normativa utiliza los dos términos, germinado y brote, en diferentes Reglamentos. Podemos observar que se utiliza más el término «brote» tal como se define por primera vez en el Reglamento (UE) 208/2013: *El producto obtenido a partir de la germinación de semillas y su desarrollo en el agua o en otro medio, recolectado antes de que*

*aparezcan hojas verdaderas y destinado a ser consumido entero, incluida la semilla*¹⁵. El Reglamento de la Comunidad (CE) 852/2004 y el Reglamento (CE) N° 882/2004, incluyen normas generales de higiene para la producción de los alimentos que servirán de base para las siguientes normativas¹⁶⁻¹⁷. La reglamentación que por primera vez incluye a los germinados es el Reglamento (CE) 2073/2005, modificado posteriormente por el Reglamento (CE) N° 1441/2007, Reglamento (UE) N° 209/2013 y recientemente por el Reglamento (UE) N° 2019/229; en este último se cita a las semillas germinadas y se establecen los criterios microbiológicos necesarios para la producción de las mismas. Los otros Reglamentos mencionados en la Tabla 3, Reglamento de Ejecución (UE) N° 208/2013, Reglamento (UE) N° 210/2013, Reglamento (UE) N° 211/2013 y Reglamento (UE) N° 704/2014 son específicos para la producción de los germinados y permiten un mejor control en toda la cadena alimentaria, desde la obtención de las semillas destinadas a su producción hasta la comercialización del producto germinado¹⁸⁻²⁴. En España, desde mayo de 2014, utilizando como base la Normativa Europea (Tabla 3), se establecen los respectivos Reales Decretos (RD) aplicados a la producción de los germinados²⁶⁻²⁷. Durante los últimos años la normativa

Tabla 3. Germinados: Normativa Europea y Española.

Reglamento	Aplicación	Observaciones
Reglamento (CE) Nº 852/2004	Higiene de los productos alimenticios	Paquete de higiene
Reglamento (CE) Nº 882/2004	Verificación del cumplimiento de la legislación	Paquete de higiene
Reglamento (CE) Nº 2073/2005	Criterios microbiológicos	Incluye semillas germinadas
Reglamento (CE) Nº 1441/2007	Criterios microbiológicos	Modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005
Reglamento de Ejecución (UE) Nº 208/2013	Trazabilidad de los brotes	
Reglamento (UE) Nº 209/2013	Criterios microbiológicos	Modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005
Reglamento (UE) Nº 210/2013	Autorización de los establecimientos que producen brotes	En virtud al Reglamento (CE) Nº 852/2004
Reglamento (UE) Nº 211/2013	Importaciones en la Unión de brotes y semillas destinadas a la producción de brotes	Requisitos de certificación
Reglamento (UE) Nº 704/2014	Importaciones en la Unión de brotes y semillas destinadas a la producción de brotes	Modifica el Reglamento (UE) Nº 211/2013
Reglamento (UE) Nº 2019/229	Criterios microbiológicos	Modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005
RD 379/2014 (ESPAÑA)	Autorización de establecimientos, higiene y trazabilidad, en el sector de los brotes y de las semillas destinadas a la producción de brotes	Reglamento (CE) Nº 178/2002 Reglamento (CE) Nº 852/2004 Reglamento de Ejecución (UE) Nº 208/2013 Reglamento (UE) Nº 209/2013, que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 Reglamento (UE) Nº 210/2013. Reglamento (UE) Nº 211/2013
RD 9/2015 (ESPAÑA)	Higiene en la producción primaria agrícola	Reglamento (CE) Nº 178/2002 Reglamento (CE) Nº 852/2004 Reglamento (CE) Nº 183/2005 Reglamento (CE) Nº 396/2005
RD 578/2017 (ESPAÑA)	Higiene en la producción primaria agrícola Modifica: RD 9/2015: Laboratorios Nacionales de Referencia. RD 379/2014: Deroga artículo 7.1 (Laboratorios Nacionales de Referencia). RD 280/1994: Deroga artículo 6 (Límites máximos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal).	Ley 17/2011

referente a los germinados ha evolucionado y los organismos encargados de la misma han demostrado la necesidad de establecer una legislación que abarque todos los puntos críticos en toda la cadena de producción de los germinados, logrando instaurar las pautas necesarias con el fin de consolidar la Seguridad Alimentaria de los germinados en toda la Comunidad Europea.

Estudio microbiológico de germinados

Se ha llevado a cabo el estudio de varios tipos de germinados comercializados en Madrid con el fin de determinar su calidad microbiológica. Para ello es preciso comprobar si cumplen los criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento (CE) 2073/2005. Aunque en este Reglamento no se fijan límites de bacterias aerobias mesófilas en semillas

germinadas, es interesante conocer la carga bacteriana inicial para evaluar cómo puede influir el lavado y/o el tratamiento con un desinfectante de uso alimentario en la disminución del número de bacterias presentes en el mismo. Se incluye también un recuento de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal, aplicando los límites recogidos en el mismo Reglamento (CE) 2073/2005 y utilizando como referencia la categoría de alimentos «frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)», debido a que los germinados son hortalizas. Así mismo, según el Reglamento (UE) 2019/229, las semillas germinadas favorecen el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y, por tanto, deberían estar incluidas en el criterio relativo a los alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de este organismo. En consideración a este criterio y según el Reglamento (CE) 2073/2005, en el análisis de este tipo de alimentos el recuento de este microorganismo durante la vida útil del producto no debe superar 100 ufc/g (unidades formadoras de colonias por gramo). Para el caso de *Salmonella* se especifica que debe haber ausencia en 25 g de producto.

Muestras

Los germinados analizados fueron ajo (*Allium sativum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), cebolla (*Allium cepa* L.) y col roja (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*). Se adquirieron envases comerciales listos para el consumo que contenían 95 g cada uno. En las etiquetas de los diferentes germinados se indica: *Brotos naturales, sin aditivos. Para todo tipo de platos, como aderezos, sopas, arroces, guisos, etc. Imprescindible en sus platos y guisos orientales. Útil para sus dietas.* Además se especifica el tratamiento previo a su uso proponiendo dos formas: escaldado o lavado con un desinfectante apto para alimentos. El análisis de las muestras se llevó a cabo inmediatamente después de abrir el envase, ya que se trataba de un alimento listo para su consumo.

De cada tipo de germinado se analizaron dos lotes y de cada uno de ellos cinco envases. Para obtener una muestra homogénea se mezclaron, en una bandeja estéril, 65 g procedentes de cada uno de los cinco envases y posteriormente se transfirieron a bolsas estériles hasta su análisis. Se llevaron a cabo distintos recuentos bacterianos en el alimento, antes y después de su lavado con agua destilada estéril, para comprobar en qué proporción se reduciría el contenido microbiano con este proceso; la porción sin lavar se utilizó como control. Se analizó una tercera porción tratada con un desinfectante comercial de uso alimentario.

La porción de muestra que denominamos "lavada", se sumergió en 300 mL de agua destilada estéril durante 15 minutos y posteriormente se aclaró dos veces con 200 mL de la misma, eliminándose totalmente, a través de un colador.

La porción "tratada" se sumergió en el desinfectante de uso alimentario preparado según las instrucciones que figuraban

en el envase (6 mL del producto en 300 mL de agua destilada estéril, lo que da lugar a una concentración de 230 partes por millón (ppm) de hipoclorito de sodio) y se dejó actuar durante 15 minutos. Posteriormente se aclaró dos veces con 200 mL del agua destilada estéril con el fin de eliminar los restos del desinfectante, como se hizo con la porción "lavada".

MÉTODOS

Para evaluar la calidad microbiológica de todas las muestras se realizaron los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e investigación de *Salmonella* spp. para las porciones control, lavada y tratada. En todos los casos los recuentos se hicieron por duplicado y se utilizó material estéril.

Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas Totales

Se llevó a cabo según la Norma ISO 4833 depositándose asepticamente 10 g de la muestra en una bolsa estéril y añadiendo 90 mL del diluyente triptono sal, homogeneizando durante dos minutos en un homogeneizador Stomacher®. Se prepararon diluciones decimales hasta la 10^{-8} , inoculándose 1 mL en agar de recuento Plate Count Agar (PCA) (Pronadisa, Madrid) por el método de dilución en masa. Las placas se incubaron durante 72 horas a 30 °C. Los resultados se expresan en ufc/g.

Recuento de *Escherichia coli*

Este recuento se hizo siguiendo la Norma ISO 16649. Se inoculó 1 mL de la dilución 10^{-1} en el medio cromogénico Coli ID agar (bioMérieux, Incorporation Hazelwood) por el método de dilución en masa incubando de 24 a 48 horas a 37 °C y haciendo dos lecturas, una a las 24 horas y otra al terminar la incubación. Los resultados se expresan en ufc/g.

Recuento de *Listeria monocytogenes*

El recuento se llevó a cabo según la Norma ISO 11290, a partir de 10 g de la muestra en 90 mL de agua de peptona tamponada (Pronadisa, Madrid). Tras su homogeneización se dejó en reposo durante 1 hora a 20 °C. Se utilizó el medio ALOA (Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti) inoculando 1 mL de la dilución 10^{-1} repartido sobre la superficie de tres placas e incubando 24 horas a 37 °C. Los resultados se expresan en ufc/g.

Investigación de *Salmonella*

Se realizó según la Norma ISO 6579. A partir del preenriquecimiento en medio no selectivo incubado durante 24 horas a 37 °C, se tomaron alícuotas de 1 mL y se inocularon por duplicado en tubos de enriquecimiento selectivo con caldo selenito con verde brillante y Rappaport-Vassiliadis (Pronadisa), incubando 24 horas a 37 °C y 45 °C, respectivamente. El ais-

lamiento se realizó en agar *Salmonella-Shigella* y agar cromogénico ASAP (AES Chemunex) cuando la muestra procedía del caldo selenito y en agar verde brillante y agar xilosa-lisina-desoxicolato (Pronadisa), cuando procedía del caldo Rappaport-Vassiliadis. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y los resultados se expresan como presencia o ausencia en 25 gramos de muestra.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo con el programa *StatGraphics Plus*. Los recuentos de las bacterias aerobias mesófilas totales se compararon por análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas, a un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$). Para discernir entre las medias de los recuentos se utilizó el Test de Tukey Honestly Significant - Difference (HSD).

RESULTADOS

Bacterias aerobias mesófilas totales

Los resultados del recuento de estas bacterias en los diferentes germinados estudiados, tanto del control como después de los tratamientos, se muestran en la Tabla 4. En las muestras control, los recuentos estuvieron comprendidos entre $1,0 \times 10^8$ y $2,0 \times 10^9$ ufc/g, siendo los germinados de alfalfa los que presentaron los valores más bajos y los de cebolla, los más altos.

En las muestras lavadas, el recuento de bacterias aerobias mesófilas totales fue menor que en los controles en todos los casos, siendo de $6,0 \times 10^7$ (alfalfa) a $1,1 \times 10^9$ ufc/g (cebolla). Estos recuentos continúan siendo elevados en los germinados de cebolla, ya que fueron también los más altos en las muestras control, mientras que los más bajos son los de alfalfa, como era previsible tras los resultados iniciales.

En la porción "tratada" con el desinfectante los recuentos fueron inferiores a los de las porciones lavadas y a los de los respectivos controles, oscilando entre $1,0 \times 10^7$ y $6,8 \times 10^8$ ufc/g, y correspondiendo, nuevamente, los mayores recuentos a los germinados de cebolla y los menores a los de alfalfa.

En la Figura 1, se recogen los porcentajes de reducción con ambos tratamientos, lavado y desinfectante, en comparación con las muestras control. Los porcentajes oscilan entre 24 % (ajo) y 90 % (brócoli) tras el lavado en comparación con los controles, mientras que los porcentajes de reducción en las muestras tratadas con el desinfectante fueron del 59 – 90 %, siendo los germinados de ajo los que presentaron el valor menor de reducción y los de alfalfa, el mayor.

Escherichia coli

En nuestro estudio, los recuentos de *Escherichia coli* fueron inferiores a 10 ufc/g en todas las muestras control, lavadas y tratadas. Estos resultados se encuentran dentro de lo que establece el Reglamento (CE) 2073/2005, siendo el valor máximo permitido de 1000 ufc/g para frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo) y aunque en este Reglamento no se precisa su determinación para germinados, se ha utilizado dado que se trata de hortalizas.

Listeria monocytogenes

Los recuentos de *Listeria monocytogenes*, fueron inferiores a 10 ufc/g en todas las muestras control, lavadas y tratadas. El Reglamento (CE) 2073/2005, establece como valor máximo permitido 100 ufc/g para la categoría de alimentos listos para el consumo, tal como se explicó anteriormente.

Salmonella spp.

En relación a la investigación de *Salmonella spp.*, el Reglamento (CE) 2073/2005 exige ausencia de este microorganismo en 25 gramos de muestra. Todas las muestras analizadas, control, lavadas y tratadas, cumplen con lo especificado en dicho Reglamento.

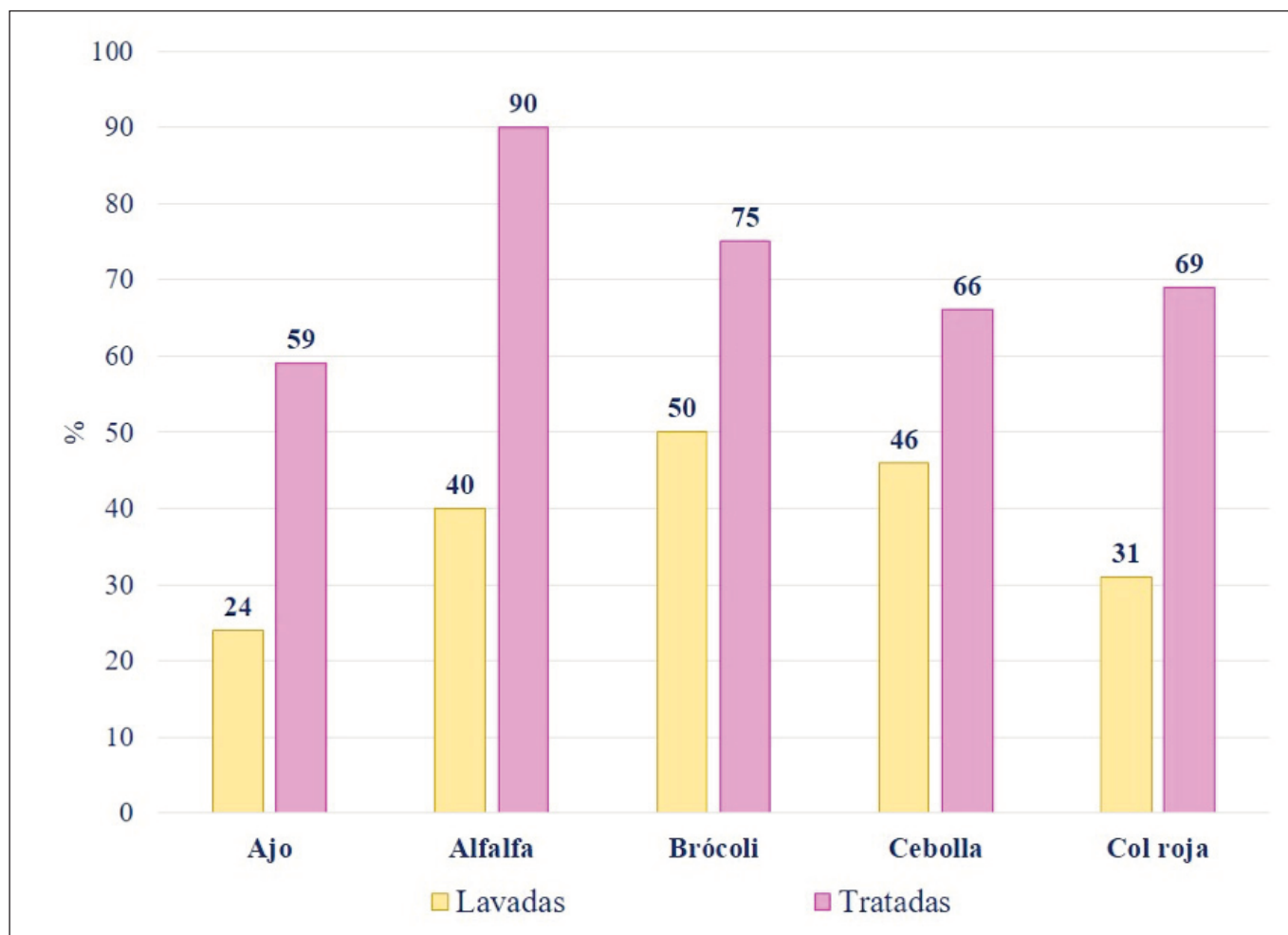
DISCUSIÓN

Existen pocos trabajos dedicados a estudiar la calidad microbiológica de todos los tipos de germinados que nos ocupan, si bien algunos autores analizan germinados de soja verde al ser este el más conocido y consumido en todo el

Tabla 4. Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas Totales (ufc/g).

Germinado	Control	Lavada	Tratada
Ajo	$3,4 \times 10^8$ ^b	$2,6 \times 10^8$ ^b	$1,4 \times 10^8$ ^c
Alfalfa	$1,0 \times 10^8$ ^a	$6,0 \times 10^7$ ^a	$1,0 \times 10^7$ ^a
Brócoli	$4,4 \times 10^8$ ^c	$2,2 \times 10^8$ ^b	$1,1 \times 10^8$ ^b
Cebolla	$2,0 \times 10^9$ ^d	$1,1 \times 10^9$ ^c	$6,8 \times 10^8$ ^d
Col roja	$1,3 \times 10^8$ ^a	$9,0 \times 10^7$ ^a	$4,0 \times 10^7$ ^a

a-d: La letra minúscula, significa que las medias son significativamente diferentes ($p < 0.05$) a un nivel de confianza del 95.0 %.

Figura 1. Porcentaje de reducción del contenido de bacterias aerobias mesófilas totales en muestras lavadas y tratadas.

mundo²⁸. La carga bacteriana en alimentos de origen vegetal, podría disminuir significativamente mediante la utilización de desinfectantes de uso alimentario. El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes más utilizados en la industria alimentaria, en restauración y de forma doméstica; se debe tener en cuenta que la disminución de la carga bacteriana del alimento tratado con este producto químico depende de la concentración utilizada y del tiempo de contacto. Diversos autores establecen que debe usarse el hipoclorito de sodio a una concentración de 50 a 200 ppm, añadido al alimento y dejándolo en reposo durante 2 - 5 minutos²⁹⁻³⁰ consiguiendo una reducción de la carga microbiana de entre 1 y 2 log ufc/g³⁰. En nuestro caso se siguieron las indicaciones del fabricante.

En relación a la calidad microbiológica de los germinados estudiados, el recuento de bacterias aerobias mesófilas totales en las muestras control, estuvo comprendido entre 8,0 y 9,3 log ufc/g. En el caso de los germinados de brócoli, el recuento fue de 8,7 log ufc/g, mientras que otros autores en el mismo tipo de germinado encontraron 8,4 log ufc/g³¹. En

cuanto a germinados de alfalfa, los recuentos en este trabajo fueron de 7,8 log ufc/g, inferiores a los hallados en otro estudio, en el que fueron de 9,0 log ufc/g³². Todas las variedades de germinados analizados en este estudio después del proceso de lavado con agua destilada estéril, contienen entre 7,8 y 9,0 log ufc/g, siendo los de alfalfa los que presentaron los recuentos más bajos. En este mismo tipo de germinados, lavados con agua corriente durante 1 minuto, otros investigadores encontraron valores de 7,9 log ufc/g observando una reducción de 1,1 log ufc/g³²; en nuestro caso, la reducción fue inferior a la de estos autores (0,2 log ufc/g).

Tras el tratamiento de los germinados con el desinfectante, los valores encontrados fueron de 7,1 - 8,8 log ufc/g, inferiores a los de las muestras control y lavadas. En un estudio similar en germinados de alfalfa tratados con una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm durante 1 minuto se obtuvo un recuento de 7,7 log ufc/g, lo que equivale a una reducción de 1,3 log ufc/g en relación al control³². En nuestro trabajo, el recuento de este germinado tratado fue de 7,1 log ufc/g, reduciendo 0,9 log ufc/g correspondiente al 90 % de reducción en

comparación con el control. Todos los recuentos (muestras control, lavada y tratadas) se muestran en la Figura 2.

Se ha comprobado la existencia de biofilms microbianos en la superficie de los germinados, indicando que su presencia podría facilitar la retención de bacterias patógenas para el hombre³³. Aunque los procesos del lavado reducen el contenido microbiano, la proporción de esta reducción es muy pequeña, posiblemente debido a la existencia de estas biopelículas³².

En el presente trabajo los recuentos de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* fueron inferiores a los límites de detección de los métodos empleados, es decir menores a 100 ufc/g y 10 ufc/g, respectivamente y hubo ausencia de *Salmonella*. Así mismo, otros autores investigaron *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en germinados de brócoli, si bien no hacen referencia a ninguna normativa y analizan únicamente 1 g de producto, no habiendo detectado ninguno de estos microorganismos en las muestras estudiadas³¹.

CONCLUSIONES

Las medidas tomadas por la Comunidad Europea han permitido una evolución de la Normativa Europea y Española, logrando cubrir los puntos críticos en la producción y comercia-

lización de los germinados; de esta manera si los productores de germinados cumplen con la Normativa vigente se podría garantizar la Seguridad Alimentaria de los mismos.

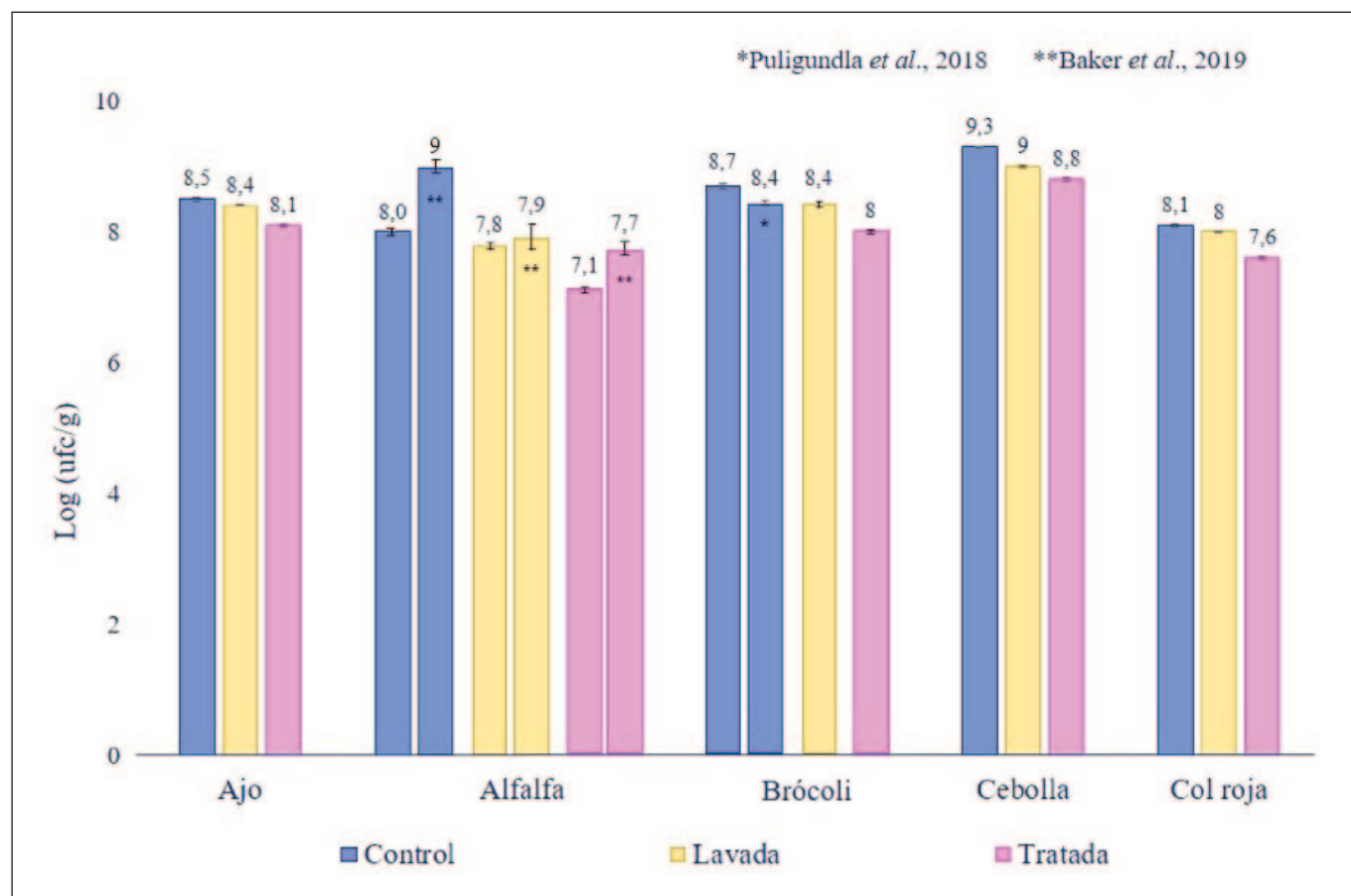
En todos los germinados analizados únicamente se encontraron bacterias aerobias mesófilas, recuento que se llevó a cabo con la finalidad de comprobar la eficacia de los dos procesos de higiene utilizados habitualmente con alimentos listos para su consumo: lavado con agua y tratamiento con un desinfectante, expresándolos en porcentajes de reducción.

Los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales en germinados control estuvieron comprendidos entre $1,0 \times 10^8$ a $2,0 \times 10^9$ ufc/g, valores similares a los hallados por otros autores.

Para los germinados lavados con agua destilada, los resultados del recuento de bacterias aerobias mesófilas totales, fueron de $6,0 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^9$ ufc/g. Con el lavado, se logró una reducción entre el 24 a 50 % respecto a los germinados control.

Por su parte los recuentos de bacterias aerobias mesófilas totales en los germinados tratados con el desinfectante fue-

Figura 2. Estudio microbiológico: Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales en distintos germinados.



ron de $1,0 \times 10^7$ a $6,8 \times 10^8$ ufc/g; en este caso, se obtuvo una reducción del 59 al 90 % respecto a los recuentos de los controles.

En las muestras analizadas no se encontraron bacterias indicadoras de contaminación fecal (*Escherichia coli*) ni patógenas (*Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*), por lo que los germinados analizados se consideran alimentos seguros e inocuos.

BIBLIOGRAFÍA

1. RAE. Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española: RAE. [Internet]. [Consultado 5 febrero 2020]. Disponible en: <https://dle.rae.es/germinar?m=form&e=>
2. ESSA. European Sprouted Seed Association. Directrices de higiene para la producción de brotes y semillas para germinación de la ESSA. Diario Oficial de la Unión Europea. 2017; 29 – 52. Disponible en: <http://sproutedseeds.eu/wp-content/uploads/2016/10/SANTE-2017-10151-00-00-ES-TRA-00.pdf>.
3. Ponce de León C, Matalana M^ªC, Torija E. Germinados o brotes: su interés en la alimentación actual. Schironia. [Internet]. 2011; 10: 5 – 13. Disponible en: <http://farmadrid.cofm.es/es/index.asp?MP=55&MS=426&MN=1&TR=A&IDR=1&iddocumento=45&d=1>.
4. Gan RY, Lui WY, Wu K, Chan CL, Dai SH, Sui ZQ, et al. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2017; 59: 1 – 14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>.
5. Aparicio N, Martínez Villaluenga C, Frias J, Peñas E. Optimization of germination parameters for obtaining nutritive oat sprouts with high content of bioactive compounds and antioxidant activity. Nutr. clín. diet. hosp. 2018; 38(supl. 1): 81
6. Ponce De León C, Torija E, Cruz M. Utilidad en la alimentación de algunas semillas germinadas: brotes de soja y trigo. Bol R Soc Esp Hist Nat Sec Biol [Internet]. 2013; 107: 47–55. Disponible en: <http://www.rsehn.es/cont/publis/boletines/183.pdf>
7. Codex Alimentarius. Código de prácticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas. CAC/RCP 53-2003. [Internet]. 2003 [consultado 5 febrero 2020]. 2003: 1 – 26. Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/alinor_m03a.pdf.
8. MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente. Guía de Buenas Prácticas de Higiene en la Producción Primaria de Brotes Vegetales. MAPAMA. 2016; 1 - 40. España. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiebuenaspracticadehigienedebrotes_tcm30-376533.pdf.
9. Decisión de Ejecución de la Comisión de 6 de julio de 2011 sobre medidas de emergencia aplicables a las semillas de alholva y determinadas semillas y habas importadas de Egipto. (2011/402/UE).
10. Decisión de Ejecución de la Comisión de 6 de octubre de 2011 por la que se modifica la Decisión de Ejecución 2011/402/UE, sobre medidas de emergencia aplicables a las semillas de alholva y determinadas semillas y habas importadas de Egipto. (2011/662/UE).
11. RASFF: Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos [Internet]. Unión Europea: Portal RASFF. [Consultado 05 febrero 2020]. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>.
12. AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. [Internet]. Red de Alerta Alimentaria. [consultado 5 febrero 2020]. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/seccion/alertas_alimentarias.htm.
13. NACMCF. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. International Journal of Food Microbiology. 1999; 52(3): 123 – 153.
14. Reglamento (UE) N° 16/2011 DE LA COMISIÓN de 10 de enero de 2011 por el que se establecen medidas de ejecución del Sistema de Alerta Rápida para los Productos Alimenticios y los Alimentos para Animales.
15. Reglamento (UE) 208/2013 DE LA COMISIÓN de 11 de marzo de 2013 sobre requisitos en materia de trazabilidad de los brotes y de las semillas destinadas a la producción de brotes.
16. Reglamento (CE) 852/2004 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios
17. Reglamento (CE) N° 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.
18. Reglamento (CE) 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (DOL 338 de 22.12.2005, p.1).
19. Reglamento (CE) N° 1441/2007 DE LA COMISIÓN de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n.o 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
20. Reglamento (UE) N° 209/2013 DE LA COMISIÓN de 11 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CE) n.o 2073/2005 en lo que respecta a los criterios microbiológicos para los brotes y las normas de muestreo para las canales de aves de corral y la carne fresca de aves de corral.
21. Reglamento (UE) N° 2019/229 DE LA COMISIÓN de 7 de febrero de 2019 por el que se modifica el Reglamento (CE) n.o 2073/2005.
22. Reglamento (UE) N° 210/2013 DE LA COMISIÓN de 11 de marzo de 2013 sobre la autorización de los establecimientos que producen brotes en virtud del Reglamento (CE) n.o 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.
23. Reglamento (UE) N° 211/2013 DE LA COMISIÓN de 11 de marzo de 2013 relativo a los requisitos de certificación aplicables a las

- importaciones en la Unión de brotes y semillas destinadas a la producción de brotes.
24. Reglamento (UE) Nº 704/2014 DE LA COMISIÓN de 25 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (UE) n.o 211/2013, relativo a los requisitos de certificación aplicables a las importaciones en la Unión de brotes y semillas destinadas a la producción de brotes.
 25. Real Decreto. RD. 379/2014, de 30 de mayo, por el que se regulan las condiciones de aplicación de la normativa comunitaria en materia de autorización de establecimientos, higiene y trazabilidad, en el sector de los brotes y de las semillas destinadas a la producción de brotes.
 26. Real Decreto. RD. 9/2015, de 16 de enero, por el que se regulan las condiciones de aplicación de la normativa comunitaria en materia de higiene en la producción primaria agrícola.
 27. Real Decreto. RD. 578/2017, de 12 de junio, por el que se modifican el Real Decreto 9/2015, de 16 de enero, el Real Decreto 379/2014 y el Real Decreto 280/1994.
 28. Iacumin L, Ginaldi F, Andyanto D, Comi G. Microbial Quality of Raw to eat mung bean sprouts produced in Italy. *Nutri Food Sci Int. J.* 2017. 3 (1): 1-4.
 29. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas del campo al mercado. [Internet]. 2003 [Consultado 5 febrero 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/Y4893S/y4893s07.htm>.
 30. Sikin AMD, Zoellner C, Rizvi SSH. Current intervention strategies for the microbial safety of sprouts. *J Food Prot.* 2013; 76 (12): 2099 – 123.
 31. Puligundla P, Kim JW, Mok C. Broccoli sprout washing with electrolyzed water: Effects on microbiological and physicochemical characteristics. *Lwt* [Internet]. 2018; 92: 600 – 6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.044>
 32. Baker KA, Beecher L, Northcutt JK. Effect of irrigation water source and post-harvest washing treatment on the microflora of alfalfa and mung bean sprouts. *Food Control* [Internet]. 2019; 100 (November 2018): 151 – 7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.015>
 33. Fett WF. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J Food Prot.* 2000; 63 (5): 625 – 32.