

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**
FACULTAD DE QUÍMICA



“Evaluación de la actividad antibacteriana de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. frente a *Escherichia coli* en espinaca (*Spinacia oleracea*)”

TESIS

QUE COMO PARTE PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

Lic. en Mic. María José Ibarra Bonilla

DIRIGIDO POR

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Querétaro, Qro., diciembre, 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultada de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología en Alimentos

Tesis
Que como parte para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología en Alimentos

Presenta
Lic. en Mic. María José Ibarra Bonilla

Dirigida por
Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Presidente

Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Secretario

Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández

Vocal

Firma

Dr. Juan Campos Guillén

Suplente

Firma

Dra. Rocío Velázquez Robledo

Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (diciembre, 2025)
México.

DEDICATORIA

A mi madre Ma. Del Rocio Bonilla Suárez, por todo su apoyo, gracias por ser un ejemplo de resiliencia.

A mí, María José Ibarra Bonilla, por aprender a dejar ir. Espero que en el futuro vuelvas a leer esto y seas libre, te sientas sana, vivas con tranquilidad y en plenitud. Recuerda que “la vida plena se desliza en cuanto la dejes correr, no me olvides de ti”.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis por todas las valiosas aportaciones a mi desarrollo académico y profesional, así como durante la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis, Dra. Sofía María Arvizu Medrano, Dr. Andrés Cruz Hernández, Dr. Juan Campos Guillén y Dra. Rocío Velázquez Robledo, por todas las valiosas aportaciones realizadas durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio y maestría, los cuales apoyaron no solo de manera profesional durante la realización de este trabajo, también enriquecieron mi estancia en la universidad con su calidez y amabilidad; de manera especial a mi compañera Fátima Medina, muchas gracias por compartir tus conocimientos y experiencias.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro y empresas asociadas por su apoyo en la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS Y SIGLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Cultivo de espinaca.....	4
2.2 Contaminación y brotes de enfermedad asociados al consumo de hortalizas y espinaca.....	7
2.3 Desinfección y biopelículas bacterianas	9
2.4 Estructuras de resistencia en verduras de hoja verde: biopelículas bacterianas.	11
2.5 Microorganismos de biocontrol para el manejo de patógenos humanos.	15
2.6 Producción de biomoléculas antimicrobianas.	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos.	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 Material biológico.	21
5.2 Cuantificación de poblaciones de <i>Bacillus</i> en hortalizas de hoja verde.	21

5.4 Ensayos de actividad antagonista de cepas de <i>Bacillus</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	22
5.5 Extracción de biosurfactantes	23
5.6 Ensayos de antagonismo con lipopéptidos y determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	24
5.7 Ensayos de reto microbiano.....	25
5.8 Identificación genética de cepas de <i>Bacillus</i> aisladas de hortalizas.....	25
5.9 Análisis del extracto crudo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	27
5.10 Efecto del biosurfactante en la capacidad de formación de biopelículas bacterianas <i>in vitro</i>	27
5.11 Efecto del surfactante en la capacidad de formación de biopelículas en hojas de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>).	28
5.12 Análisis estadístico.....	28
6.1 Cuantificación de poblaciones de <i>Bacillus</i> en hortalizas de hoja verde.	29
6.2 Actividad antagonista de cepas de <i>Bacillus</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	35
5.3 Ensayos de antagonismo con lipopéptidos y determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	38
6.4 Actividad antibacteriana los lipopéptidos sobre <i>E.coli</i> en suspensión.....	45
5.5 Identificación genética de aislados de <i>Bacillus</i> aisladas de hortalizas.	48
5.6 Análisis del extracto crudo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	49
6.7 Efecto del biosurfactante en la capacidad de formación de biopelículas de cepas de <i>E.coli in vitro</i>	51
5.8 Efecto del biosurfactante en la capacidad de formación de biopelículas de <i>E.coli</i> bacterianas sobre hojas de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>).	54
7. CONCLUSIONES	60

8. REFERENCIAS.....	61
----------------------------	-----------

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Principales entidades productoras de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>) en México	5
Cuadro 2.	Fuentes de contaminación microbiana durante las etapas de pre y pos cosecha en hortalizas crudas	6
Cuadro 3.	Técnicas de desinfección convencionales y no convencionales empleadas en hortalizas de hoja verde	9
Cuadro 4.	Concentración de bacterias esporuladas recuperadas de hortalizas de hoja	26
Cuadro 5.	Caracterización de aislados de hortalizas de hoja	27
Cuadro 6.	Criterios de selección de la actividad antagónica de los aislado de hortalizas de hoja frente a <i>Escherichia coli</i>	31
Cuadro 7.	Clasificación de la actividad antagónica de los aislado de hortalizas de hoja frente a <i>Escherichia coli</i>	31
Cuadro 8.	Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	34
Cuadro 9.	Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	36
Cuadro 10.	Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de producción de la espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	4
Figura 2.	Fenología del cultivo de la espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	5
Figura 3.	Número de brotes alimentarios asociados al consumo de hortalizas y espinaca	6
Figura 4.	Formación de biopelículas en alimentos mínimamente procesados	8
Figura 5.	Representación de las etapas de formación de biopelículas	11
Figura 6.	Formación de biopelículas en planta e <i>in vitro</i>	13
Figura 7.	Actividad de los lipopéptidos (LP) sobre la membrana de hongos fitopatógenos	15
Figura 8.	Estructuras químicas de familias de lipopéptidos	16
Figura 9.	Colecta de hortalizas de hoja verde	19
Figura 10.	Técnica de la estría cruzada para ensayos de antagonismo	20
Figura 11.	Condiciones de amplificación mediante la técnica de PCR	23
Figura 12.	Clasificación en morfotipos de <i>Bacillus</i>	27
Figura 13.	Interacciones antagonistas, ensayos de confrontación en placa	31
Figura 14.	Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	34
Figura 15.	Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	36
Figura 16.	Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	37
Figura 17.	Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por <i>Bacillus methylotrophicus</i> Fr4B12 sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	39
Figura 18.	Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por <i>Bacillus subtilis</i> Q11 sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	40

Figura 19.	Árbol filogenético para las secuencias obtenidas, construcción por medio del método vecinos cercanos	42
Figura 20.	Análisis del extracto crudo producido por <i>Bacillus</i> spp. AR03 por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	43
Figura 21.	Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre la formación de biopelículas producidas por <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>in vitro</i>	45
Figura 22.	Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre la formación de biopelículas producidas por <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) <i>in vitro</i>	46
Figura 23.	Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre la formación de biopelículas producidas por <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) <i>in vitro</i>	47
Figura 24.	Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre la formación de biopelículas producidas por <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) en hojas de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	49
Figura 25.	Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre la formación de biopelículas producidas por <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) en hojas de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	50
Figura 26.	Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> spp. sobre la formación de biopelículas producidas por <i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) en hojas de espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	51

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Siglas Abreviatura

AN Agar nutritivo

AST Agar soya tripticaseína

C° Grados Celsius

CST Caldo soya tripticaseína

CMI Concentración mínima inhibitoria

cm Centímetro

nm Nanómetros

mm Milímetros

μL Microlitros

UFC Unidades formadoras de colonias

' Minutos

'' Segundos

LOG Logaritmo

EPS Sustancias poliméricas extracelulares

HCl Ácido clorhídrico

LP lipopéptidos

PBS Amortiguador salino de fosfatos

RESUMEN

La inocuidad de las hortalizas frescas representa un reto debido a que no se aplica un proceso terminal que inactive eficientemente a los microorganismos patógenos que pueden haber ingresado desde el cultivo y hasta su comercialización. Los microorganismos que se desarrollan sobre los tejidos vegetales, producen biopelículas y/o moléculas antimicrobianas (tipo lipopéptidos) que favorecen la competencia, colonización y sobrevivencia, lo cual es de interés para establecer sistemas de biocontrol. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antagonista de *Bacillus subtilis* Q11, *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12 y aislados bacterianos provenientes de hortalizas producidas en un huerto agroecológico contra tres cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922, 11229, 35218) mediante ensayos de confrontación en placas, empleando tanto los microorganismos antagonistas como sus lipopéptidos extraídos. En los ensayos de confrontación Q11, Fr4B12 y un aislado de hojas de arúgula (AR03), inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. coli*, mientras que en un antibiograma empleando los lipopéptidos, se encontró la mayor inhibición a 2100 µg. En un ensayo de reto microbiano en suspensión donde ensayo la concentración de 2100 µg mostro un efecto bacteriostático. Se evaluó el efecto inhibitorio de los biosurfactantes (2100µg) sobre la formación de biopelículas bacterianas *in vitro* y sobre hojas de espinaca a las 24, 48 y 72 h, mostrando diferencias significativas entre los lipopéptidos ensayados ($\alpha=0.05$), con porcentajes de inhibición del 50 hasta el 95 % para ensayos *in vitro* y del 24 hasta el 72 % para ensayos en hojas de espinaca, también, observa diferencias significativas en la producción de biopelículas (método de cristal violeta) en presencia de los biosurfactantes con respecto al control ($\alpha=0.05$) y se identificó actividad bactericida, cuando se expone *E. coli* a los biosurfactantes por 24 a 72 horas. Adicionalmente, el biosurfactante de *Bacillus* spp. AR03 se analizó por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), encontrando bandas de grupos orgánicos asociados a lipopéptidos bacterianos. En conclusión, los biosurfactantes producidos por cepas de *Bacillus*, muestran actividad antimicrobiana sobre la formación de biopelículas y viabilidad de *Escherichia coli*, remarcando la importancia de estas moléculas y sus posibles aplicaciones en sectores como la industria alimentaria.

Palabras clave: Biocontrol, Biopelículas, FTIR, Lipopéptidos, Reto microbiano.

ABSTRACT

The safety of fresh vegetables poses a challenge due to the absence of a terminal process that efficiently inactivates pathogenic microorganisms, which may be introduced from cultivation through to commercialization. Microorganisms that develop on plant tissues produce biofilms and/or antimicrobial molecules (such as lipopeptides) that promote competition, colonization, and survival—an aspect of interest for establishing biocontrol systems. In this study, the antagonistic capacity of *Bacillus subtilis* Q11, *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12, and bacterial isolates from vegetables grown in an agroecological garden was evaluated against three strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922, 11229, 35218) through confrontation assays on plates, using both the antagonistic microorganisms and their extracted lipopeptides. In the confrontation assays, Q11, Fr4B12, and an isolate from arugula leaves (AR03) inhibited the growth of *E. coli* strains. In an antibiogram using the lipopeptides, the highest inhibition was observed at 2100 µg. In a microbial challenge assay in suspension, the 2100 µg concentration showed a bacteriostatic effect. The inhibitory effect of biosurfactants (2100 µg) on bacterial biofilm formation was evaluated both in vitro and on spinach leaves at 24, 48, and 72 hours, showing significant differences among the tested lipopeptides ($\alpha = 0.05$), with inhibition percentages ranging from 50 to 95% in vitro and from 24 to 72% on spinach leaves. Significant differences were also observed in biofilm production (crystal violet method) in the presence of biosurfactants compared to the control ($\alpha = 0.05$), and bactericidal activity was identified when *E. coli* was exposed to biosurfactants for 24 to 72 hours. Additionally, the biosurfactant from *Bacillus* spp. AR03 was analyzed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), revealing bands of organic groups associated with bacterial lipopeptides. In conclusion, biosurfactants produced by *Bacillus* strains exhibit antimicrobial activity against biofilm formation and *Escherichia coli* viability, highlighting the importance of these molecules and their potential applications in sectors such as the food industry.

Keywords: Biocontrol, Biofilms, Lipopeptides, FTIR, Microbial challenge.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Lic. María José Ibarra Bonilla

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos mínimamente procesados o aquellos que mantienen la misma calidad nutricional y organoléptica de los vegetales frescos, tienen como características que son listos para consumo (Finger *et al.* 2023), cuyo metabolismo pos-cosecha acelerado propician su deterioro y que sean más susceptibles al desarrollo microbiano (Gomes *et al.*, 2023).

Para inactivar los microorganismos patógenos que puedan haber contaminado a los productos frescos, se han desarrollado diversas estrategias químicas como la aplicación de desinfectantes, entre los que destaca el hipoclorito de sodio, el cual presenta una marcada eficiencia sobre superficies y agua, sin embargo, su aplicación directa tiene una eficacia limitada, así como la formación de subproductos dañinos (Niemira y Fan, 2014). Como respuesta a condiciones adversas, los microorganismos generan estructuras de resistencia, como las biopelículas bacterianas, estas estructuras las protegen ante la desecación, radiación U.V, así como de productos químicos usados durante el procesamiento (Yaron y Römling, 2014).

La formación de las biopelículas, es una estrategia constante en los ambientes naturales de las comunidades microbianas que habitan la filosfera de las plantas (Yadav *et al.*, 2008), sitios donde existe una alta interacción microbiana, las cuales pueden ser de tipo neutral, negativas y/o positivas o beneficiosas para las plantas, ya que pueden prevenir la colonización de los patógenos o ser un promotor de crecimiento (Dees *et al.*, 2015). En algunas ocasiones se ha observado que el mecanismo que utilizan los microorganismos para la inhibición de otros es la producción de antibióticos, algunas bacterias como las pertenecientes al género de *Bacillus*, producen compuestos como los lipopéptidos, los cuales se han demostrado tienen fuertes propiedades anti fúngicas frente a diversos patógenos de plantas (Malviya *et al.*, 2020).

En el presente trabajo se ensayaron aislados bacterianos procedentes de hortalizas de hoja de verde y cepas de *Bacillus* (*B. subtilis* Q11, *B. methylotrophicus* Fr4B12), así como compuestos de tipo lipopéptidos producidos por estos, frente a *Escherichia coli* (ATCC 11229, 25922 y 35218), en suspensión, sobre la formación de biopelículas *in vitro* y sobre hojas de espinaca; buscando generar una alternativa viable para el biocontrol de patógenos en hortalizas de hoja verde, lo cual contribuye a mejorar la inocuidad microbiana de los alimentos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de espinaca

Las verduras de hoja verde son aquellas como la lechuga (*Lactuca sativa*), la arúgula (*Eruca vesicaria*), la espinaca (*Spinacia oleracea*), entre otras (CDC, 2023), que, a pesar de ser un grupo pequeño, son de gran relevancia en la dieta, ya que de acuerdo con la organización mundial de la salud se recomienda un consumo diario de al menos 400 gramos para adultos y en niños pequeños de 250-350 gramos al día (WHO, 2019). Los cinco principales países exportadores son Estados Unidos, España, México, Países Bajos e Italia (FAOSTAT, 2022). Para el 2023, la producción nacional de espinaca en México se calculó en 2,789 hectáreas cosechadas, con un valor de \$230,546; (**Cuadro 1**); (SIAP, 2024).

Cuadro 1. Principales entidades productoras de espinaca (*Spinacia oleracea*) en México.

Entidad	Producción (toneladas)	Valor de producción (miles de pesos)
Aguascalientes	1,467.70	7,333.22
Baja California	7,240.88	95,183.04
Ciudad de México	1,493.70	9,960.62
Guanajuato	5,670.50	36,051.63
Hidalgo	4,200.00	3,52.80
Michoacán	5,460.00	4,73.05
Puebla	3,444.99	35,597.57
Querétaro	9,240.00	92,47.39
Total	40, 924.29	230, 546.12

Tomado y modificado de (SIAP, 2023).

Estas hortalizas han cobrado gran relevancia debido a su valor nutritivo, ya que contienen vitaminas, minerales y fibra dietética, generando un aporte muy importante en la dieta (WHO, 2019). Cambios en el estilo de vida de las poblaciones ha promovido el consumo de vegetales, lo que ha incrementado la producción de espinaca para satisfacer la demanda actual (Finger *et al.*, 2023). Para su producción (**Figura 1**) de manera importante se busca retrasar lo más que se pueda su floración, debido a que la hoja es el órgano que se consume (Jiménez *et al.*, 2010).

Invernadero



Campo



Figura 1. Proceso de producción de la espinaca (*Spinacia oleracea*), Esquema realizado con información de (Jiménez *et al.*, 2010) y (Cedillo *et al.*, 2021).

En el caso particular de la espinaca, para su producción se requiere de temperaturas que oscilan entre los 14-18°C, aunque tiene una gran adaptabilidad a temperaturas bajas (0°C), ya que en esta temperatura permite mantener su estado de “roseta” o fase vegetativa, pero a temperaturas altas (15°C-26°C) favorece el inicio del periodo de floración (Jiménez *et al.*, 2010).

Para su producción en campo, se requiere de un suelo bien drenado, fértil, profundo, suelto, rico en materia orgánica, nitrógeno y un pH de 6,0 a 6,5 ya que en suelos con pH ligeramente alcalino o ácido puede generar un mal desarrollo, siendo los suelos franco-arcillo-arenosos los más óptimos para su desarrollo. Finalmente, el fotoperiodo es muy importante ya que la exposición alta puede afectar el desarrollo y acelerar el proceso de floración, obteniendo el mejor desarrollo entre 1,500 a 1,700 horas-luz/año (Jiménez *et al.*, 2010).

Para su cultivo, la producción de plántulas en charolas garantiza un mayor porcentaje de germinación, dicho proceso sucede en un lapso de 5 días, para posteriormente mantenerlas en invernadero durante 10 días, y así obtener en 15 días, las plántulas con un desarrollo radicular grande, en este punto se pueden trasplantar al campo. Este cultivo presenta un ciclo vegetativo de 7 a 9 semanas desde la siembra hasta la cosecha (**Figura 2**), aunque en algunas variedades la floración se presenta a las 13 semanas (Jiménez *et al.*, 2010).

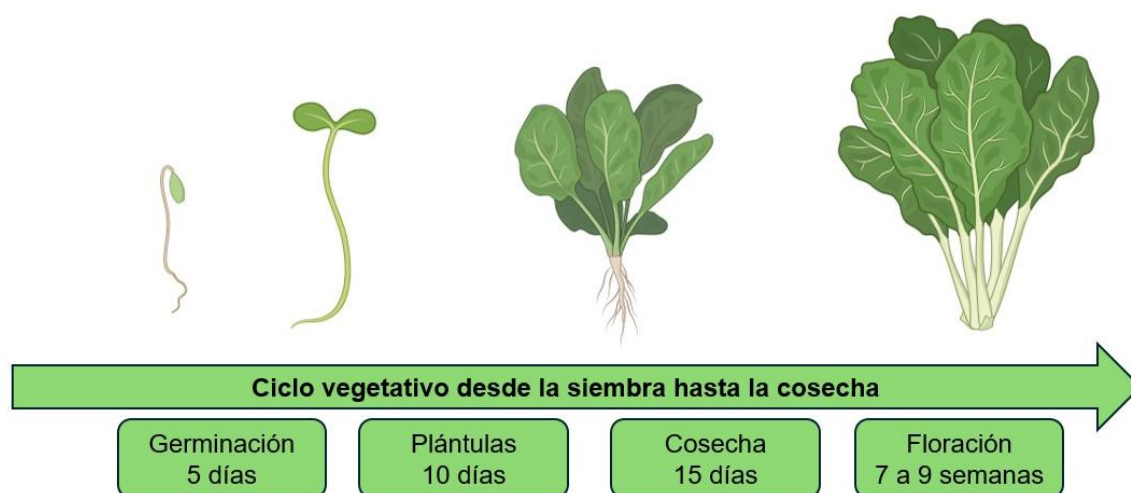


Figura 2. Fenología del cultivo de la espinaca (*Spinacia oleracea*), Esquema realizado con información de: (Jiménez *et al.*, 2010).

2.2 Contaminación y brotes de enfermedad asociados al consumo de hortalizas y espinaca.

Entre las diversas matrices alimentarias los alimentos mínimamente procesados o en fresco presentan una complejidad muy alta en torno a la inocuidad, ya que la contaminación puede ingresar en cualquier punto de su procesamiento, (Luna-Guevara *et al.*, 2019). Además de un creciente aumento en el consumo, de acuerdo a datos reportados en 2019, en países como Estados Unidos el consumo tuvo un incremento de hasta un 25%, este aumento en gran medida se atribuye a la difusión sobre sus diversas propiedades funcionales y el fácil acceso a nuevos productos listos para consumo como las ensaladas empaquetadas (Luna-Guevara *et al.*, 2019; Mieke *et al.*, 2016).

Se han identificado tres momentos donde este tipo de alimentos se pueden contaminar: en el campo, el procesamiento inicial (recolección y empaque) y en la cocina (Luna-Guevara *et al.*, 2019). En los últimos puntos un factor muy importante es su forma de consumo fresco, los tratamientos que pueden ayudar a disminuir considerablemente la carga microbiana como la aplicación de calor, sin embargo, este último no es posible (Yaron y Römling, 2014).

Adicionalmente, las fuentes por las cuales las hortalizas se pueden contaminar son variadas (**Cuadro 2**), tal es el caso del agua que se utilizan en procesos como el lavado y remojo o superficies durante el cortado, así como el empaque y la manipulación durante la preparación del alimento, es decir la contaminación de los agentes patógenos a los alimentos puede ocurrir de manera directa, cuando la fuente de contaminación contacta al alimento o por contaminación cruzada, cuando la transferencia de los agentes patógenos se da a través de un vehículo (**Figura 3**); (Luna-Guevara *et al.*, 2019; Finger *et al.*, 2023).

Cuadro 2. Fuentes de contaminación microbiana durante las etapas de pre y pos cosecha en hortalizas crudas.

Etapa	Fuentes de contaminación
Pre cosecha	Suelo, agua de riego, estiércol con compostado inadecuado, humano que manipula el alimento, fungicidas reconstituidos e insecticidas.
Post cosecha	Equipos de cosecha, contenedores de transporte, agua contaminada utilizada para lavar, vehículos de transporte y equipos de procesamiento, herramientas sucias, manos mal higienizadas.

Tomado y modificado de: (Luna-Guevara *et al.*, 2019).

En los últimos años, se ha reportado un incremento de brotes alimentarios asociados a productos en fresco de manera particular a las verduras de hoja verde, (CDC, 2023). En el periodo de 2014 a 2021 se reportaron 78 brotes alimentarios, cobrando gran relevancia ya que sugirió que la contaminación de estos productos ocurrió más frecuentemente de lo que se esperaba (CDC, 2023; Yaron y Römling, 2014).

Durante estos brotes se han visto involucrados una amplia variedad de microorganismos responsables, como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* y *Clostridium spp.*, virus tales como norovirus y hepatitis A y parásitos tales como *Cyclospora cayetanensis* y *Cryptosporidium parvum* (Yaron y Römling, 2014). Sin embargo, los principales agentes patógenos a los que se les atribuyó este tipo de brotes fueron: *Escherichia coli* (62.2%) y *Listeria monocytogenes* (21.5%), entre otros (**Figura 3**); (IFSAC, 2023; FDA, 2024; Yaron y Römling, 2014; Kroupitski *et al.*, 2013).

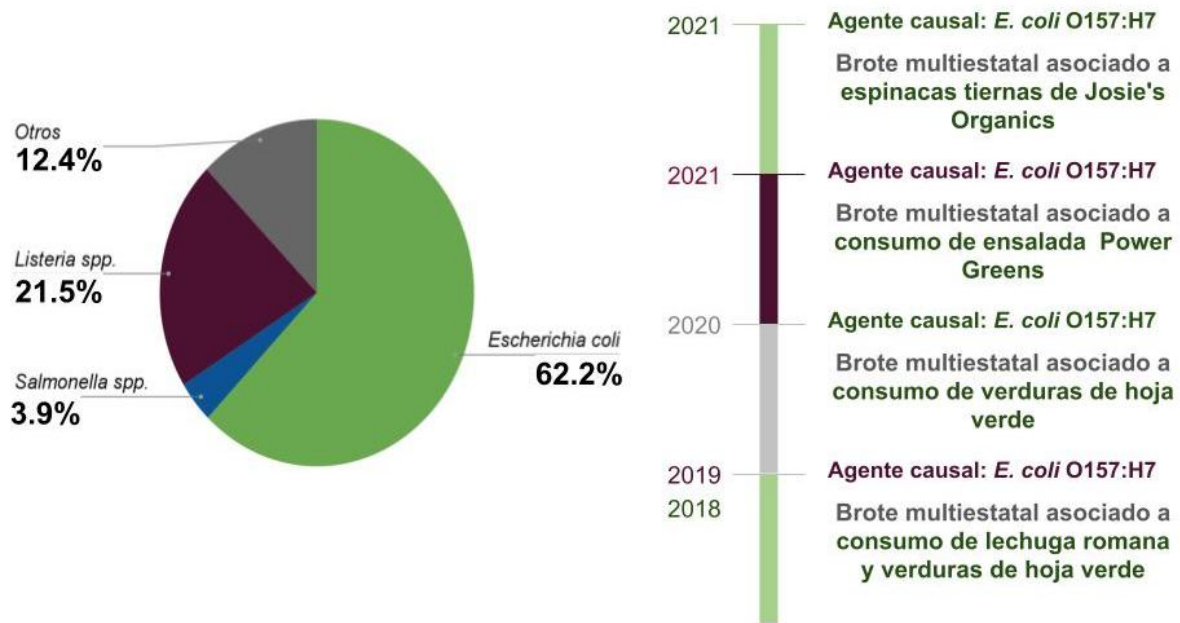


Figura 3. Porcentaje de brotes alimentarios asociados al consumo de hortalizas y espinaca, periodo de 2018-2021 en Estados Unidos, Imagen tomada y modificada de (IFSAC, 2023).

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa en forma de bastones cortos, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, estrechamente relacionado con patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia pestis*, es comensal inofensivo del tracto gastrointestinal en animales de sangre caliente. Suele constituir del 0,1-5% de la microbiota intestinal, se encuentra en la capa delgada de moco y crece en una biopelícula compleja y multiespecie, si bien hay muchos agentes etiológicos responsables de la diarrea, la *Escherichia coli* patógena es un contribuyente importante (Croxen *et al.*, 2013; Blount, 2015).

2.3 Desinfección y biopelículas bacterianas

Las enterobacterias, se ha observado que poseen diversos mecanismos para persistir en dichas matrices alimentarias, se ha demostrado que géneros como *Escherichia* y *Salmonella* son capaces de formar biopelículas, mecanismo crucial para la virulencia de las cepas patógenas (Niemira y Fan, 2014; Yaron y Römling, 2014; Mendoza *et al.*, 2022).

Otros mecanismos de sobrevivencia se han reportado para *Salmonella Typhimurium*, como la penetración de la epidermis de la lechuga, a través de un proceso que involucra motilidad flagelar y quimiotaxis (Kroupitski *et al.*, 2013). Debido a que los patógenos entéricos persisten en el ambiente hasta que llegan a su huésped final, las biopelículas son una estrategia primordial (**Figura 4**); ya que son estructuras versátiles pueden desarrollarse tanto en las superficies de las raíces, dentro de los espacios intercelulares de los tejidos vegetales y en las hojas (Yaron y Römling, 2014).

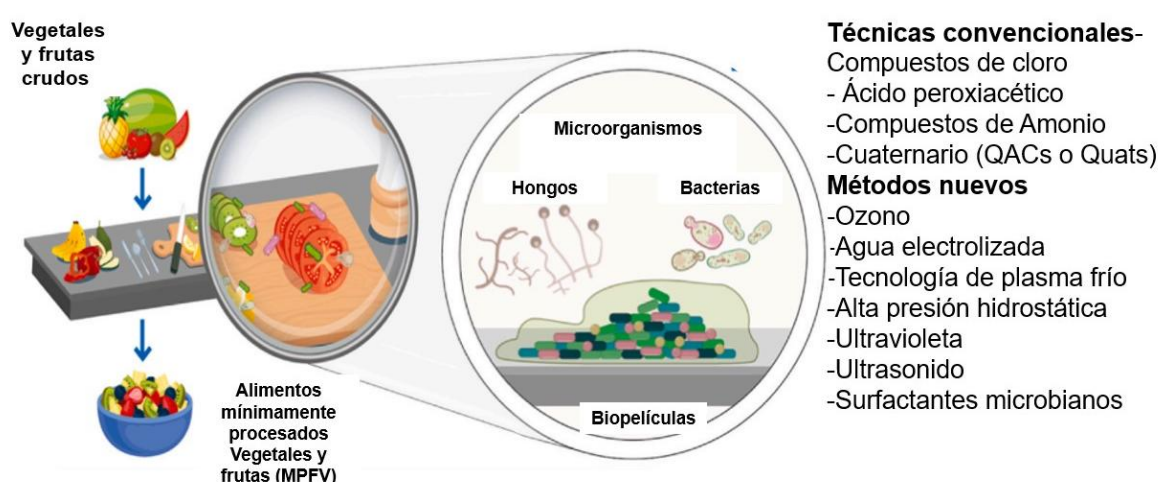


Figura 4. Formación de biopelículas en alimentos mínimamente procesados. Imagen tomada y modificada de (Mendoza *et al.*, 2022).

Dichas estructuras son cruciales para sobrevivir en un ambiente tan complejo como las hojas, donde se tiene una baja disponibilidad de nutrientes, la exposición a altas temperaturas, radiaciones UV, vientos y baja humedad, lo cual limitan el crecimiento de los microorganismos; tal como se ha observado en el género *Escherichia*, donde se ha demostrado que la rugosidad de la hoja es importante para la adherencia y supervivencia en el tejido vegetal en espinaca (Macarisin *et al.*, 2013).

Para reducir la sobrevivencia de bacterias patógenas en hojas verdes, se aplican tratamientos desinfectantes (**Cuadro 3**), entre los que destaca el uso de

hipoclorito de sodio, el cual presenta una eficiencia marcada sobre superficies y agua, sin embargo, su aplicación en hojas verdes tiene una eficiencia limitada, así como la formación de subproductos dañinos (Niemira y Fan, 2014).

Cuadro 3. Tratamientos de desinfección convencionales y no convencionales empleadas en hortalizas de hoja verde.

Tratamientos convencionales		
Tratamiento	Producto	Microorganismo y reducción logarítmica (UFC/g)
Compuestos de cloro	Espinaca	<i>E. coli</i> O157:H7 1,7 log
	Lechuga	<i>E. coli</i> O157:H7 0,7 log
Ácido peroxiacético	Lechuga	<i>E. coli</i> O157:H7 0.97–1,74 log
Compuestos de amonio cuaternario	Espinaca	<i>E. coli</i> O157:H7 3,33 log
Tratamientos no convencionales		
Tecnología de plasma frío	Lechuga	<i>E. coli</i> 1,5 log
Tensoactivos microbianos	Hojas de espinaca	<i>E. coli</i> O157:H7, de 7,1 log a nivel indetectable

Tabla tomada y modificada de: (Mendoza *et al.*, 2022).

2.4 Estructuras de resistencia en verduras de hoja verde: biopelículas bacterianas.

Las biopelículas bacterianas las podemos definir como aquellas comunidades adherentes de microorganismos a superficies bióticas o abióticas rodeadas de Sustancias Poliméricas Extracelulares autoproducidas (SPE) (Solanki *et al.*, 2020; Rafique *et al.*, 2015). Las biopelículas son estructuras heterogéneas conformadas por células que se promueven debido a diversos factores ambientales

como la disponibilidad de nutrientes, salinidad, entre otros; en esta conformación se producen cambios a nivel metabólico y en la comunicación célula a célula, así como en las células adyacentes (Solanki *et al.*, 2020).

Para lograr dicha estructura se reconocen cuatro etapas para que la célula pase de un estado planctónico solitario a formar parte de un consorcio o comunidad de células (**Figura 5**). Específicamente se requiere de cuatro etapas, en primera instancia la unión inicial de los microorganismos a una superficie o entre sí, durante el proceso tanto el sustrato, como los nutrientes disponibles favorecen la unión y se produce una capa bidimensional (Solanki *et al.*, 2020), para ello, se requiere de factores moleculares, como el c-di-GMP, el cual induce señales específicas para la producción de adhesinas y productos de la matriz extracelular (Tolker-Nielsen, 2015).

Posteriormente se genera la formación de micro colonias, las diferentes células conectan entre sí rodeadas por fibras de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos o SPE. La siguiente fase es de maduración de la biopelícula, durante la cual se genera tanto la transferencia de material genético como de fuentes de energía como los carbohidratos y otros compuestos como los metales (Solanki *et al.*, 2020). Finalmente se genera la dispersión de la biopelícula, esta etapa se presenta debido a que las interacciones agotan los nutrientes y oxígeno disponible, lo cual propicia que los microorganismos regresen a un estado planctónico (Solanki *et al.*, 2020; Tolker-Nielsen, 2015).

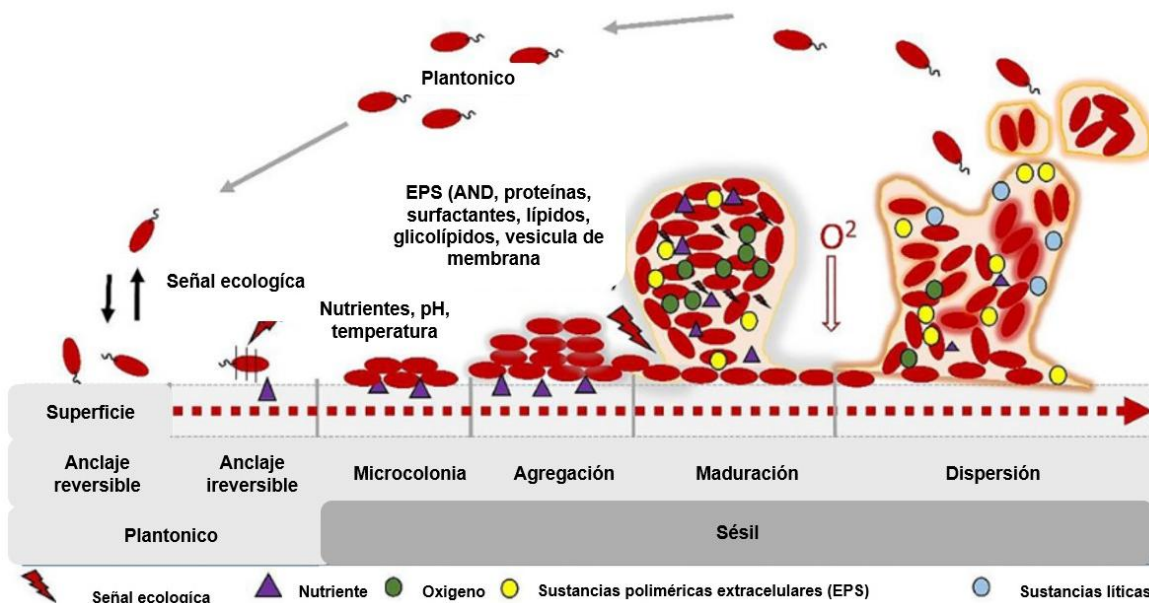


Figura 5. Representación de las etapas de formación de biopelículas Imagen tomada y modificada de: (Solanki *et al.*, 2020).

Algunos de los beneficios que trae esta conformación son la protección de los microorganismos ante factores ambientales, radiación de tipo UV, la desecación, entre otros, así como de factores propios del hospedero, es decir la respuesta inmunitaria, compuestos antimicrobianos y la microbiota autóctona (Yaron y Römling, 2014).

A pesar de ser una conformación altamente beneficiosa para los microorganismos, la biopelícula en los vegetales está fuertemente limitada por factores asociados a la superficie de adhesión, es decir, su topografía y la arquitectura resulta un factor crucial para la adhesión, debido a que la rugosidad en las hojas puede afectar en la afinidad de los patógenos por la superficie, ya que la rugosidad se modifica con el tipo y edad de la planta (**Figura 6**); (Yaron y Römling, 2014).

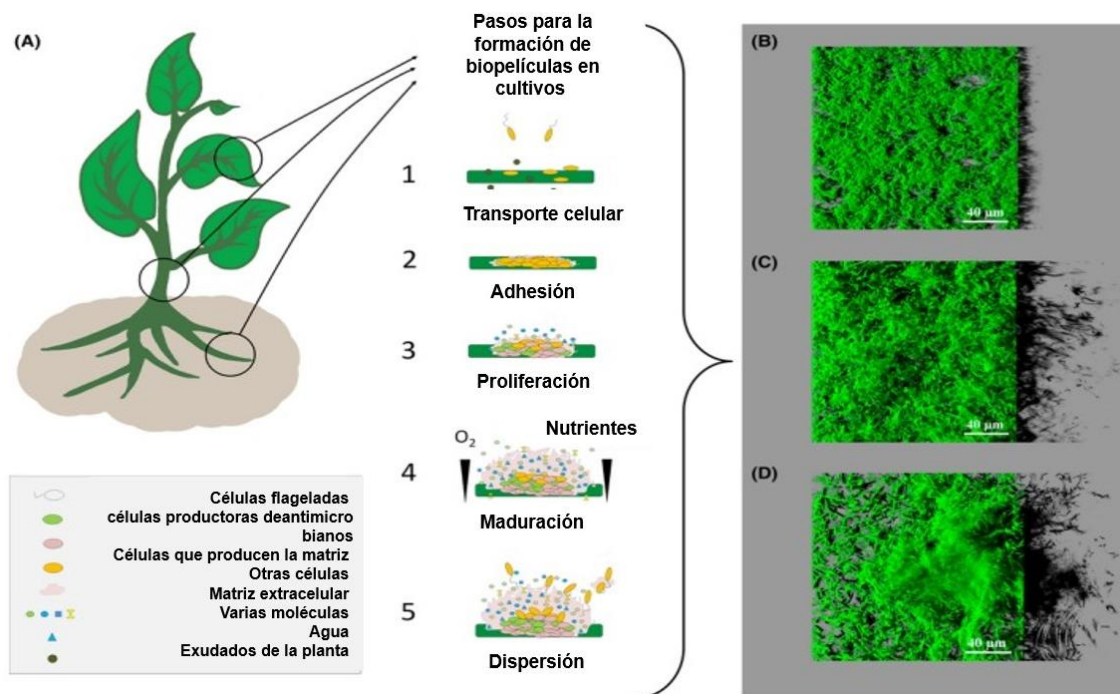


Figura 6. Formación de biopelículas en plantas e *in vitro* Imagen tomada y modificada de: (Pandín *et al.*, 2017).

De acuerdo a lo observado por Pandín *et al.*, en 2017; el primer paso para la formación de biopelículas en cultivos consiste en la deposición en el sustrato, seguido de la adhesión al soporte, a través de la pared celular y apéndices extracelulares. Una vez adheridas, se da una fase de proliferación y la diversificación de los tipos celulares, estos inician la organización espacial de la bioestructura, dando lugar a la maduración de la biopelícula (Figura 6; Pandín *et al.*, 2017).

Posteriormente se da el envejecimiento de la biopelícula ante las condiciones ambientales desfavorables, para el mantenimiento de la biopelícula se da una dispersión regulada de esta, diseminando células libres y los grupos celulares que iniciarán un nuevo ciclo de biopelícula en una nueva superficie. Esto fue observado mediante microscopía de láser confocal en biopelículas de tres agentes de control biológico, cultivados durante 24 h a 25°C en microplacas, *Bacillus*

amyloliquefaciens FZB42 formo una arquitectura plana indiferenciada, mientras que *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 y *Bacillus subtilis* QST formaron bioestructuras 3D diferenciadas, (**Figura 6**); (Pandín *et al.*, 2017).

2.5 Microorganismos de biocontrol para el manejo de patógenos humanos.

El manejo ecológico de los cultivos resulta complejo debido a que en su mayoría están expuestos a diversos fitopatógenos que pueden afectar su rendimiento, algunos ejemplos son los hongos fitopatógenos del género *Penicillium* los cuales generan afectaciones en los frutos (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2018). En los tejidos de las plantas, existen interacciones microbianas de antagonismo, las cuales en diversos estudios han mostrado un amplio potencial como microorganismos de biocontrol (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2018; Milišašević-Marčić *et al.*, 2018).

Tal como se ha reportado para hongos fitopatógenos, las interacciones antagonistas no se limitan solo a este campo de estudio, en el caso de patógenos humanos como *Escherichia coli*, se han probado distintas estrategias para su control utilizando interacciones microbianas, entre las que destacan el uso de microorganismos probióticos pertenecientes al grupo *Lactobacilli* (*L. plantarum* y *L. salivarius*) y el género *Bifidobacterium*, así como bacterias ácido lácticas (Puligundla y Lim, 2022).

Durante estos procesos de interacción, algunos de los mecanismos que se producen para el antagonismo es la competencia por nutrientes y espacio o la secreción de sustancias antimicrobianas; en el primer escenario algunos microorganismos ambientales como los pertenecientes al género de *Pseudomonas* (*P. syringae* y *P. graminis*) han demostrado un potencial en la reducción de patógenos humanos del género *Escherichia*, mientras que en el segundo caso las bacterias ácido lácticas utilizan estrategias como la producción de ácido láctico, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno para retrasar el desarrollo de estos microorganismos (Puligundla y Lim, 2022).

2.6 Producción de biomoléculas antimicrobianas.

La producción de metabolitos secundarios por los microorganismos ha generado un creciente interés, ya que se ha demostrado que algunas de estas sustancias tienen funciones de tipo antimicrobianas, tal es el caso de los lipopéptidos bacterianos (Oni *et al.*, 2022). Los cuales son compuestos que han demostrado poseer funciones de tipo ecológicas como detener el quorum sensing o la formación de biopelículas, así como funciones de tipo antifúngicas, antibacterianas, herbicidas, entre otras (**Figura 7**); (Oni *et al.*, 2022; Rodríguez-Chávez *et al.* 2019). De manera general se componen de una estructura peptídica unida a una cola de ácido graso (**Figura 8**) y los podemos clasificar como un biosurfactantes (Oni *et al.*, 2022; Desai y Banat, 1997).

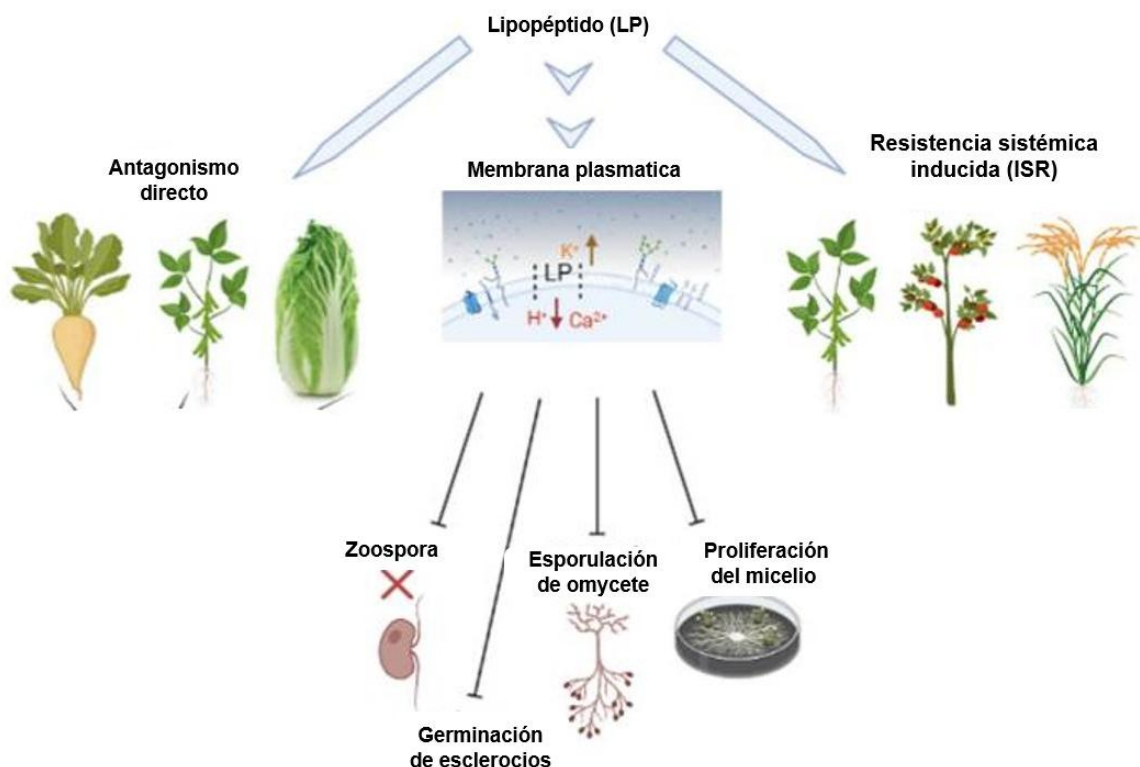


Figura 7. Actividad de los lipopéptidos (LP) sobre la membrana de hongos fitopatógenos, antagonismo directo e inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas. Imagen tomada y modificada de (Oni *et. al.*, 2022).

Los lipopéptidos perturban la barrera de la membrana, lo que resulta en una afluencia de iones de hidrógeno, calcio y potasio. En pruebas *in vitro*, los lipopéptidos lisan con éxito las zoosporas y bloquean la germinación de los esclerocios, así como la germinación de los oomicetos y la proliferación del micelio. Mientras que, en antagonismo directo, diversos lipopéptidos median la supresión de *Rhizoctonia solani* en frijol, col china y en pruebas *in vitro*. En el caso de la inducción de la Respuesta Sistémica Inducida (del inglés, ISR), los lipopéptidos inducen resistencia contra *R. solani* en el frijol; *Phytophthora infestans* en el tomate; *Pyricularia oryzae* en el arroz y *Cochliobolus miyabeanus* en el arroz (Oni *et. al.*, 2022).

De manera general un surfactante es una molécula anfipática que posee características tensoactivas, si bien en un inicio este tipo de moléculas procedían principalmente de petróleo a lo largo de los años se ha identificado biomoléculas

producidas por diferentes microorganismos que desempeñan la misma función (Desai y Banat, 1997).

Estos compuestos han cobrado relevancia en gran medida porque ofrecen una alternativa más amigable con el medio ambiente, ya que poseen una baja toxicidad, degradación a largo plazo, así como su eficiencia ante condiciones ambientales extremas; entre los principales microorganismos que producen este tipo de compuestos bioactivos se encuentran el género *Bacillus* (Malviya *et al.*, 2020).

Entre las principales familias de lipopéptidos reportadas para el género *Bacillus* se encuentran las surfactinas, iturinas y fengicinas (**Figura 8**). Tanto las surfactinas como las iturinas se componen de siete aminoácidos unidos a un ácido hidroxigraso, mientras que las fengicinas constan de 10 aminoácidos unidos a un ácido hidroxigraso. Estos compuestos nos presentan un panorama más amplio del biocontrol, ya que no solo actúan sobre las poblaciones microbianas, algunas veces lo hacen mediante el fortalecimiento del sistema de defensa de la planta, ya que puede inducir la ISR (**Figura 7**); (Malviya *et al.*, 2020).

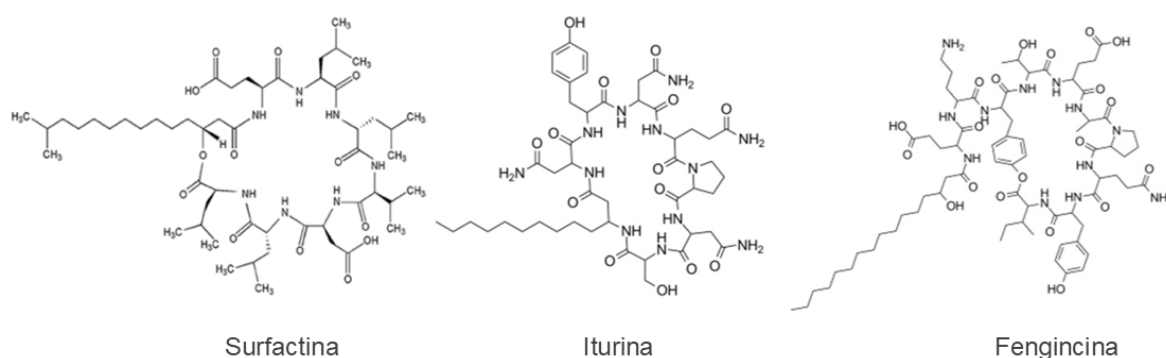


Figura 8. Estructuras químicas de familias de lipopéptidos producidos por inoculantes microbianos en ecosistemas naturales. (Imagen tomada y modificada de: Malviya *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

Para inactivar los microorganismos patógenos que puedan haber contaminado a los productos frescos, se han desarrollado diversas estrategias químicas como la aplicación de desinfectantes, entre los que destaca el hipoclorito de sodio, el cual presenta una marcada eficiencia sobre superficies y agua, sin embargo, su aplicación directa tiene una eficacia limitada, así como la presencia de diversos compuestos que son potencialmente dañinos para la salud.

Tomando como referencia el potencial antimicrobiano reportado para el género *Bacillus*, en el presente trabajo se evaluó el papel de los lipopéptidos sobre *Escherichia coli*, con la finalidad de desarrollar estrategias de biocontrol alternativas que contribuyan a la mejora de la inocuidad microbiana de los alimentos. Así como la posibilidad de utilizar un sub producto, usando una técnica de extracción que permite reducir su costo de producción, evitando la purificación del extracto sin afectar su eficiencia.

Adicionalmente estas estrategias de biocontrol se pueden adaptar al ambiente, ya que estas provienen de ambientes agroecológicos nacionales, que se alinean con la microbiota nativa y tienen adaptaciones a las condiciones climáticas de la región. Lo que genera un producto nacional que brinda la posibilidad de adquirir estos compuestos a un bajo costo, favoreciendo así las prácticas agrícolas sostenibles, favoreciendo así a los productores nacionales y apoyando el desarrollo agroecológico nacional.

4. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Aislar y caracterizar cepas de *Bacillus* procedentes de hortalizas de hoja verde con capacidad de biocontrol sobre poblaciones de *Escherichia coli* en espinaca (*Spinacia oleracea*).

3.2 Objetivos específicos.

1. Aislar y caracterizar bacterias esporuladas de hortalizas de hoja, provenientes de un huerto de producción agroecológica.
2. Evaluar las interacciones antagonistas de los aislados frente a *Escherichia coli*, mediante ensayos de confrontación por estría en placa.
3. Determinar la producción bacteriana de lipopéptidos y evaluar su actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli*.
4. Identificar los aislados bacterianos con mayor actividad antagonista mediante la secuenciación y análisis del gen 16S ARN ribosomal.
5. Evaluar el efecto inhibitorio de los biosurfactantes sobre *Escherichia coli* en espinaca (*Spinacia oleracea*) y su efecto sobre la producción de biopelículas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material biológico.

Se emplearon cepas de *Escherichia coli* (ATCC 11229, 25922, 35218), las cuales fueron donadas por la empresa SIASA S.A de C.V (Servicio Integral a la Agroindustria) y dos cepas pertenecientes al género de *Bacillus*, *Bacillus subtilis* Q11 (un producto comercializado por la empresa Quimia), así como *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12, un aislado de manzana de una huerta experimental del municipio de Amealco, Santiago de Querétaro (20°09'LN, 100°07'LO y 2279 msnm), (López-González *et al.* 2019). Para su activación se inocularon en caldo soya tripticaseína (CST), para posteriormente conservarlas CST con en glicerol (20%) a -20°C.

5.2 Cuantificación de poblaciones de *Bacillus* en hortalizas de hoja verde.

Esta determinación se realizó sobre hojas de hortalizas de hoja verde procedentes de un huerto urbano agroecológico llamado Xata, ubicado en el municipio de Corregidora, Santiago de Querétaro. Se colectaron cinco grupos de hortalizas, las plantas fueron cultivadas a cielo abierto y se recolectó una muestra por cada grupo (**Figura 9**). Posteriormente conforme a lo descrito por (López-González *et al.*, 2021) con modificaciones, se pesaron 10 gramos de cada muestra de hojas de hortaliza y se colocaron en un matraz con 90 mL de PBS (pH 7,2) y se sonicaron (135 W, 42 kHz; Branson 5510, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, EE. UU.) durante 10 min.



Figura 9. Colecta de hortalizas de hoja verde, a) Arúgula (*Eruca vesicaria*) y Mizuna (*Brassica rapa subsp. nipposinica*), b) Lechuga (*Lactuca sativa*), c) Kale (*Brassica oleracea var. sabellica*), d) Acelgas Rainbow (*Beta vulgaris var. Cicla*) y hojas comestibles, e) Alfalfa San miguel (*Medicago sativa*) y f) Mastuerzo (*Tropaeolum majus L.*), en el huerto agroecológico Xata, Corregidora, Qro. México.

En condiciones de esterilidad se tomaron hojas de cada hortaliza, en total se tomaron 10 g de cada muestra, éstas se sometieron a un procedimiento de pasteurización 80°C durante 10 min., (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016); Posteriormente se sembró por triplicado en AN, se incubó a 35°C durante 48 horas; Posteriormente se realizó la cuenta viable de microorganismos esporulados y la purificación de las colonias típicas del género *Bacillus*. Se clasificaron en morfotipos, para ello se observó la morfología celular y del cultivo, así como pruebas auxiliares como el hidróxido de potasio al 3%, para la diferenciación entre Gram, positivos y/o negativos. Para la purificación se utilizó AST y se sembró por estría cruzada e incubó a 35°C durante 24 horas. Los aislados obtenidos se conservaron en glicerol al 50% a -80°C.

5.4 Ensayos de actividad antagonista de cepas de *Bacillus* sobre *Escherichia coli*.

Para evaluar la actividad antagonista se utilizó la metodología de estría cruzada descrito por (Shomura *et al.*, 1980; Lertcanawanichakul & Sawangnop, 2008; Sharma *et al.*, 2013), con modificaciones; para el ensayo se prepararon placas de AST, donde se inocularon de manera independiente las especies de *Bacillus subtilis* Q11, *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12 y los aislados procedentes

de hortalizas de hoja, una raya en centro de la placa, se incubaron a 30°C durante 8 horas.

Posterior a la incubación en la misma placa se sembraron las cepas de *E. coli* (ATCC 11229, 25922 y 35218) mediante una estría en un ángulo de 90° con respecto a la primera estría de los aislados y especies de *Bacillus*, (**Figura 10**); se volvieron a incubar durante 16 horas más a 30°C. Las interacciones microbianas se analizaron mediante la observación de zona de inhibición, tomando como inhibición de *E. coli*, la ausencia de crecimiento cerca de *Bacillus* sp.

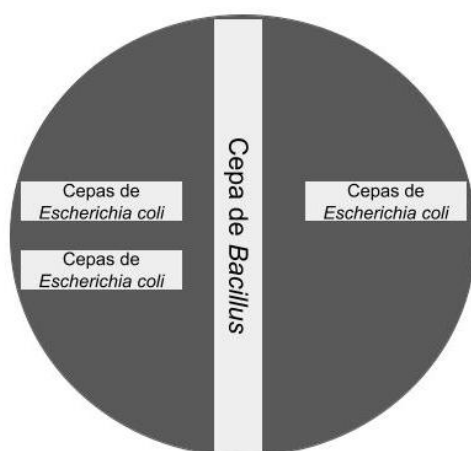


Figura 10. Técnica de la estría cruzada para ensayos de antagonismo.

5.5 Extracción de biosurfactantes

Se utilizó la metodología descrita por Cao *et al.*, (2009); Rodríguez-Chávez *et al.*, (2018) con modificaciones; en primera instancia se inocularon de manera independiente las especies de *Bacillus subtilis* Q11, *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12 y los aislados procedentes de hortalizas de hoja en 5 mL de CST, se incubaron a 35°C y 140 rpm durante 18 horas, (inóculo primario); posteriormente cada cultivo se transfirió a 0.5 L de medio de cultivo en frascos de 1 L, se incubó a 30°C y 140 rpm por 72 horas para los aislados de hoja y 120 horas para las especies de *Bacillus subtilis* Q11, *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12.

Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron removidas mediante centrifugación 2706 xg a 10 °C por 35 minutos en una microcentrifuga Rotofix 32 ATM (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Germany).

El sobrenadante recolectado se llevó a pH 2, usando ácido clorhídrico (HCl) 6 N y se refrigeró a 4°C durante toda la noche. El precipitado se recuperó por centrifugación 2706 x g a 10° C por 30 minutos, la pastilla que se obtuvo fue lavada dos veces con agua acidificada con HCl (pH 2) y secada a temperatura ambiente durante 24 horas. El extracto crudo de surfactante fue extraído utilizando 60 mL de metanol anhidro y concentrado mediante un evaporador al vacío, el residuo seco resultante se utilizó para ensayos de antagonismo.

5.6 Ensayos de antagonismo con lipopéptidos y determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Para realizar el siguiente ensayo se utilizó la metodología descrita por Pinchuk *et al.*, (2001); (Ministerio de salud de Perú; 2002; Reisner *et al.* 2006; Moore *et al.*, 2013; Nair *et al.*, 2018; Kim & Kang, 2020). La actividad inhibitoria del biosurfactante se evaluó mediante discos de papel filtro estériles, se añadieron diversas concentraciones del lipopéptidos (140-2100 µg) en cada disco, una vez seco el disco se colocaron sobre un estriado de cada una de la cepas de *E. coli* (ATCC 11229, 25922 y 35218); utilizando suspensiones de 10⁶ UFC/ mL. Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C y se incluyó un control de reactivo del solvente utilizado (metanol). Posteriormente se midieron las zonas de inhibición y se identificó a la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano, como la concentración mínima inhibitoria; como control positivo se utilizó el antibiótico ceftriaxona (30 µg).

5.7 Ensayos de reto microbiano

Para realizar el ensayo de reto microbiano se utilizó la metodología descrita en la NMX-BB-040-SCFI-1999, con modificaciones (Tomičić *et al.*, 2023; Banach *et al.*, 2020). Para ello en tubos Eppendorf (1,5 mL) se depositó una suspensión 1 de mL que contenía una concentración de 10^8 UFC/ mL, para cada una de las cepas de *E. coli*. Después, se añadieron los lipopéptidos desde 140 hasta 2100 μ g a cada suspensión, posteriormente se llevó a vórtex durante 60 segundos, para después dejar reposar durante 10 minutos. Pasado el tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener un título de 10^4 UFC/mL, sembrando alícuotas (100 μ L) en placas de AST mediante extensión por superficie. Las placas se incubaron durante 24 horas a 36°C y transcurrido este tiempo se contaron las colonias. Como control positivo se utilizó plata coloidal (0,35 μ l).

5.8 Identificación genética de cepas de *Bacillus* aisladas de hortalizas.

Se utilizó la metodología descrita por Weisburg *et al.*, (1991) el morfotipo AR03, se identificó mediante el gen ARNr 16s, El aislado AR03 purificado, fue sembrado en AST e incubado a 35°C durante una noche, posteriormente se tomó una colonia para realizar la extracción de ADN genómico mediante el kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Zymo Research, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En primera instancia 1 μ L el ADN fue incorporado en 90 μ L de agua ultrapura Milli-Q en tubos Eppendorf estériles. Esta solución se utilizó para realizar la amplificación mediante PCR, para ello se realizó una mezcla que contenía, un 1 μ L de ADN diluido, 1 μ L de cebador fD1(ccgaattcgtagacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1 μ L de cebador rP2(cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTACGACTT), 10 μ L de solución 2x Phusion Flash PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA), 10 μ L de agua ultrapura y 10 μ L de aceite mineral estéril. La amplificación se realizó en un termociclador ARKTIK (Thermo Scientific, USA) con las siguientes condiciones desnaturalización inicial por

2 minutos a 94°C y 35 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 1 min 94°C, alineamiento por 30 segundos a 50 °C, extensión por 30 segundos a 72°C con 35 ciclos) y extensión final por 1 minuto a 72 °C (**Figura 11**).

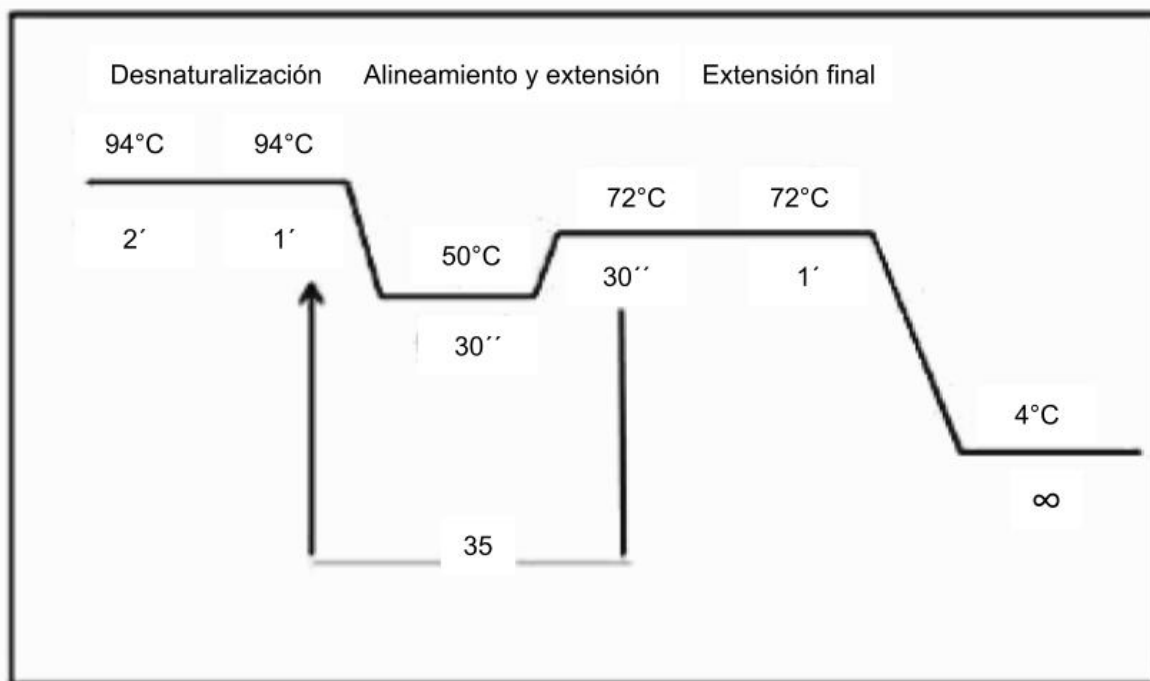


Figura 11. Condiciones de amplificación mediante la técnica de PCR.

La integridad del producto de la PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% v/v), el gel se visualizó en foto documentador (MacroVue, UVis-20; Hoefer) y los amplicones resultantes fueron enviados para su secuenciación a Macrogen Inc. (Seúl, República de Corea). Las secuencias resultantes se compararon con las secuencias para el género *Bacillus* contenidas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés: NCBI) mediante la herramienta BLAST. Finalmente fueron analizadas mediante el software MEGA X para la construcción de un árbol filogenético.

5.9 Análisis del extracto crudo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Se realizó una espectroscopia infrarroja para identificar los enlaces químicos o grupos funcionales presentes en el lipopéptido crudo obtenido (4.5), mediante un espectrofotómetro FTIR (Shimadzu modelo IRTracer-100, Japón) equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) Pike Miracle, en el rango entre 400 y 4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} , con 32 escaneos por espectro, se usó la función de apodización de Happ-Genzel y una resolución de 4 cm^{-1} .

5.10 Efecto del biosurfactante en la capacidad de formación de biopelículas bacterianas *in vitro*

Para la determinación de la capacidad de las cepas de *Escherichia coli* para formar biopelículas se empleó la metodología descrita por (O'Toole y Kolter, 1998) con modificaciones. En microplacas de 96 pozos, a cada pocillo se le adicionó medio mínimo M63+ (160 μL) y se inoculó por triplicado 20 μL de una suspensión bacteriana de 10^6 UFC/mL, se le añadió 15 μL el respectivo surfactante (2100 μg) y se incubó a 30°C, se midió la densidad óptica a 600 nm a las 24, 48 y 72 horas, de incubación.

Posterior a la incubación se realizó una tinción con cristal violeta, en primera instancia se descartaron las células planctónicas al realizar dos lavados solución salina isotónica (SSI), para después añadir metanol (99%) y dejar actuar por 15 min; se removió el metanol y se adiciono el cristal violeta al 0.1% por 5 minutos. Se descartó el colorante y se realizaron dos lavados más con SSI, para después dejar secar la placa a temperatura ambiente, finalmente el cristal violeta se solubilizó con ácido acético glacial (30%) y se midió la DO a 595 nm en el lector de placas Varioskan (Thermo Scientific, USA).

5.11 Efecto del surfactante en la capacidad de formación de biopelículas en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*).

Para el ensayo de la formación de biopelículas bacterianas en hojas de espinaca se empleó la metodología descrita por Balbuena-Alonso *et al.*, (2024), se realizaron cortes circulares de hojas de espinaca de 15-16 mm de diámetro y se colocaron en placas de 24 pozos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2,5% por 2,5 minutos en agitación suave y este se retiró haciendo un segundo lavado con agua destilada estéril. Posteriormente se inocularon 20 μL de una suspensión de *E. coli* en una concentración de 10^6 UFC/mL, se adicionaron 15 μL del surfactante que contenía 2100 μg , medio mínimo M63+ (160 μL) y se incubó a 36°C por 24 h.

Posteriormente se descartó el sobrenadante del cultivo y se lavaron las porciones de hoja con PBS (200 μL), para después añadir cristal violeta (0,1%) y se se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente (25°C). Al término, se descartó el colorante y se lavó con agua destilada estéril (200 μL por pozo). Después del lavado, el colorante se recuperó de la hoja utilizando ácido acético (30%; 100 μL por pozo), primero con la hoja inclinada colectando el colorante en una microplaca de 96 pozos, se añadió más ácido acético (100 μL) y se dejó actuar por 15 minutos a temperatura ambiente (25°C). Se recuperó el ácido, para colocarla en la misma placa de 96 pozos, para tener un total de 200 μL por pozo, se midió DO a 620 nm, utilizando un lector de placas Varioskan (Thermo Scientific, USA).

5.12 Análisis estadístico.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de tipo Tukey ($\alpha=0.05$). Estos se expresaron como la media más menos la desviación estándar. Para ambos análisis se utilizó el software estadístico Infostat versión 2013, Universidad Nacional de Córdoba.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cuantificación de poblaciones de *Bacillus* en hortalizas de hoja verde.

Por medio de la cuenta viable a las 48 h, observamos que los microorganismos esporulados en todas las muestras se encuentran dentro de 2 Log UFC (**Cuadro 4**). Es importante mencionar la ecología de este microorganismo, ya que *Bacillus* es un género que está presente en mayor medida en el suelo, en rangos de conteo de 3 a 6 logaritmos por gramo de suelo (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018), mostrando así la relevancia de la cuenta realizada, ya que su distribución no solo se limita a este nicho ecológico, también puede formar parte de otros sitios en los cultivos, tales como las hojas de las hortalizas.

Lo reportado para hortalizas de hoja, los filos más prevalentes en la filosfera de las hortalizas de hoja verde son Proteobacterias, Bacteroidetes, Actinobacterias y Firmicutes (5,1%), particularmente lo reportado para lechuga, el género *Bacillus* se encuentra en un porcentaje del 7% (Dees *et al.*, 2015; Rastogi *et al.*, 2012; Tatsika *et al.*, 2019).

Cuadro 4. Cuenta viable de bacterias esporuladas recuperadas de hortalizas de hoja.

Hortalizas	Recuento viable de bacterias esporuladas (UFC/g)
Alfalfa san miguel	$2,9 \times 10^2 \pm 0.2$
Mastuerzo	$3,1 \times 10^2 \pm 0.2$
Kale	$3,1 \times 10^2 \pm 0.3$
Lechuga	$3,1 \times 10^2 \pm 0.3$
Acelgas Rainbow	$3,6 \times 10^2 \pm 0.1$
Arúgula y Mizuna	$3,8 \times 10^2 \pm 0.1$

Se aislaron y caracterizaron un total de 30 colonias, 5 por cada tipo de hortalizas, (**Figura 12**). Para ello se realizó la selección de colonias, con base en lo reportado para el cultivo de *B. subtilis*; morfología cultivo con aspecto liso, mucoso o rugoso, colonias con los bordes ondulados o extendidos en el medio, ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos (Realpe *et al.*, 2002). Así como tinción de Gram para observar la morfología celular y pruebas de hidróxido de potasio al 3% y hemólisis.

a) Morfología colonial



b) Morfología celular

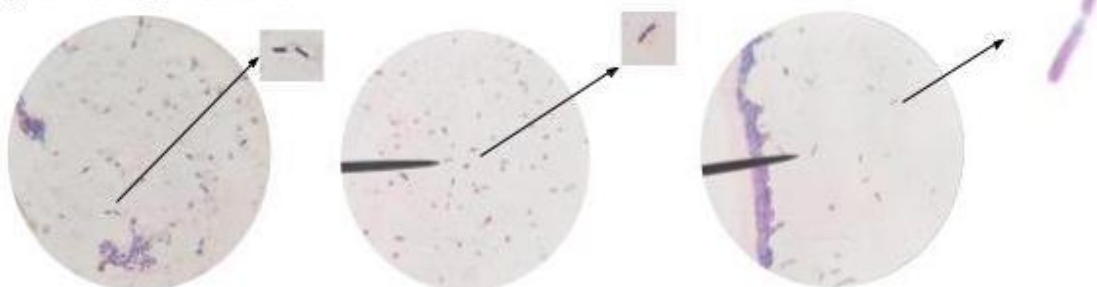


Figura 12. Clasificación en morfotipos de *Bacillus* a) morfología colonial y b) morfología celular.

Cuadro 5. Caracterización de aislados de hortalizas de hoja.

Hortaliza	Clave	Morfología colonial	Tinción Gram	Prueba KOH 3%	Morfología celular	Hemólisis
Arúgula	AR01	Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide	+	+	Bacilos cortos con esporas	+
	AR02	Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide	+	+	Bacilos largos	-
	AR03	Blancas, cerosas,	+	+	Bacilos cortos	+

Kale	AR04	irregulares y con aspecto mucoide	+	+	Bacilos cortos	-
		Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide				
	AR05	Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide	+	+	Bacilos cortos	-
		Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide				
	KA01	Blancas cerosas, circulares, con aspecto liso	+	+	Bacilos cortos	-
		Blancas cerosas, circulares, con aspecto liso				
	KA02	Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide	+	+	Bacilos cortos	-
		Blancas, cerosas, irregulares y con aspecto mucoide				
	KA03	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	KA04	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	+

Lechuga	KA05	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	+
	LE01	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	+
	LE02	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	+
	LE03	Blancas, cerosas, circulares y de aspecto liso	+	+	Bacilos cortos	-
	LE04	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos largos en cadena	-
Alfalfa	LE05	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos largos	-
	AL01	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	AL02	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos largos	-
	AL03	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	AL04	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos largos en cadena	-
	AL05	Blancas, cerosas e	+	+	Bacilos largos	-

Acelga		irregulares				
	AC01	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	AC02	Blancas, cerosas, circulares y con aspecto liso	+	+	Bacilos cortos	-
	AC03	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	AC04	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos largos	-
Mastuerzo	AC05	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos con esporas	-
	MZ01	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	MZ02	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos largos	-
	MZ03	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	MZ04	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-
	MZ05	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	-

<i>E.coli</i>	ATCC 25922	Blancas, circulares, brillosa y con elevación convexa	-	-	Bacilos cortos	-
<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	Fr4B12	Blancas, cerosas e irregulares	+	+	Bacilos cortos	+

6.2 Actividad antagonista de cepas de *Bacillus* sobre *Escherichia coli*.

El ensayo de antagonismo directo mostró que de los 30 aislados ensayados frente a las cepas de *E. coli* (ATCC 11229, 25922 y 35218), solo tres mostraron actividad antagonista; se observó una respuesta singular para cada aislado, ya que las muestras procedentes de hojas de kale KA05 y KA04, mostró un efecto inhibitorio frente a las cepas de *Escherichia coli* 11229 y 25922, respectivamente (**Figura 13**), mientras que la cepa procedente de hojas de lechuga (LE01) mostró un efecto inhibitorio sólo sobre la cepa 35218, a diferencia de la cepa procedente de arúgula (AR03), la cual mostró un efecto inhibitorio sobre las tres cepas de *E. coli*.

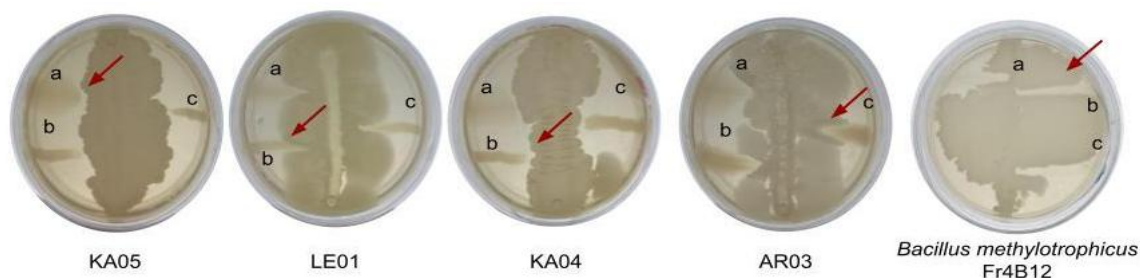


Figura 13. Ensayos de confrontación en placa de los morfotipos procedentes de hortalizas (kale, lechuga y arúgula) frente a las distintas cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229 (a), 25922 (b), 35218 (c), el control empleado fue *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12.,

Cuadro 6. Criterios de selección de la actividad antagónica de los aislado de hortalizas de hoja frente a *Escherichia coli*.

Criterio	Área de inhibición
Inhibición alta	++ (5-10 mm)
Inhibición parcial	+(1-5 mm)
Inhibición nula	-(0 mm)

Es importante considerar que este ensayo no muestra resultados concluyentes, debido al área de inhibición, es muy pequeña y al no poder cuantificarse, la prueba solo muestra resultados de tipo cualitativo, debemos considerar que este estudio se consideró el tiempo de replicación para *E.coli*, el cual es más corto que el de *Bacillus*, esta diferencia en los tiempos de replicación con respecto a *Bacillus* genera que no se produzcan los metabolitos (lipopéptidos) para generar la inhibición (Lertcanawanichakul & Sawangnop, 2008).

Cuadro 7. Clasificación de la actividad antagónica de los aislado de hortalizas de hoja frente a *Escherichia coli*

Hortaliza	Morfotipo	<i>E.coli</i> ATCC 11229	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> ATCC 35218
Arúgula	AR01	-	-	-
	AR02	-	-	-
	AR03	+	+	+
	AR04	-	-	-
	AR05	-	-	-
Kale	KA01	-	-	-
	KA02	-	-	-
	KA03	-	-	-
	KA04	+	+	+
	KA05	+	+	+
Lechuga	LE01	+	+	+

	LE02	-	-	-
	LE03	-	-	-
	LE04	-	-	-
	LE05	-	-	-
Alfalfa	AL01	-	-	-
	AL02	-	-	-
	AL03	-	-	-
	AL04	-	-	-
	AL05	-	-	-
Acelga	AC01	-	-	-
	AC02	-	-	-
	AC03	-	-	-
	AC04	-	-	-
	AC05	-	-	-
Mastuerzo	MZ01	-	-	-
	MZ02	-	-	-
	MZ03	-	-	-
	MZ04	-	-	-
	MZ05	-	-	-
<i>Bacillus spp.</i>	Q11	+	+	+
<i>Bacillus spp.</i>	Fr4B12	++	++	++

Inhibición alta ++ (5-10 mm), inhibición parcial +(1-5 mm) e inhibición nula -(0 mm)

Las zonas inhibitorias en esta prueba se asocian a la producción de compuestos inhibitorios que se difunden en el medio. Así mismo es importante considerar otros mecanismos antagonistas, como la competencia por nutrientes y espacio, así como la presencia de otros metabolitos involucrados. La incubación en esta prueba fue realizada durante 24 horas, con la finalidad de observar de manera más clara el área de lisis, sin embargo, la producción de metabolitos para el género *Bacillus* se ha reportado durante la fase logarítmica. Lo cual resalta la importancia de re-evaluar los tiempos de incubación, ya que el extender el tiempo podría

contribuir a observar de manera más clara el efecto (Lertcanawanichakul & Sawangnop, 2008).

Este ensayo nos ayuda a reducir la población de estudio, ya que se ha reportado una mejor eficiencia en el uso de este método en comparación con métodos de difusión en placa, ya que los metabolitos pueden estar presentes durante el tiempo de experimentación (Lertcanawanichakul & Sawangnop, 2008); Lo cual contribuye a dilucidar la importancia de trabajar con extractos y no con el microorganismo de manera directa, particularmente frente a microorganismos con tiempos de replicación tan cortos como *Escherichia coli*.

5.3 Ensayos de antagonismo con lipopéptidos y determinación de la concentración mínima inhibitoria.

En el antibiograma, se observa la formación de halos inhibitorios, frente a *E. coli*, al comparar las medias de los tratamientos, en concentraciones altas (2100 µg), se observan diferencias entre los extractos procedentes del aislado AR03 con *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12, ($\alpha=0.05$; **Figura 14** y **Cuadro 8**). Durante esta evaluación se probaron distintas concentraciones que fueron desde 140 µg hasta 2100 µg; se han reportado para *E. coli*, donde se había reportado concentraciones de 312 µg/mL como concentración mínima inhibitoria con extractos procedentes del género *Bacillus* (Sharma *et al.*, 2013).

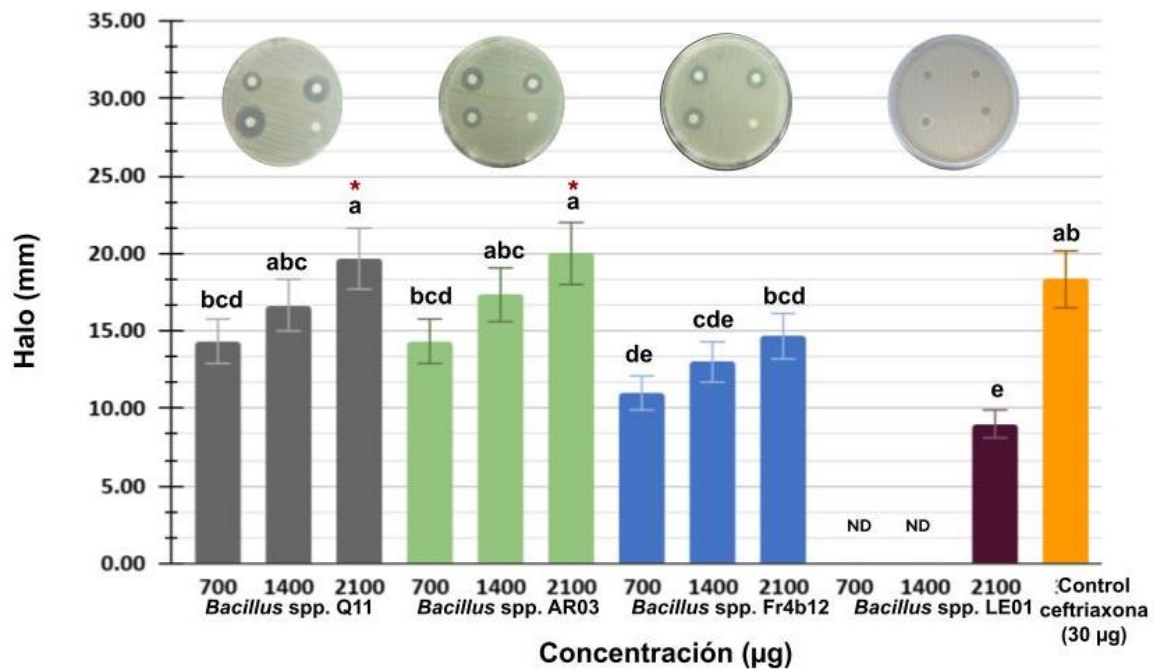


Figura 14. Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. sobre *Escherichia coli* (ATCC 11229), ND: No detectable.

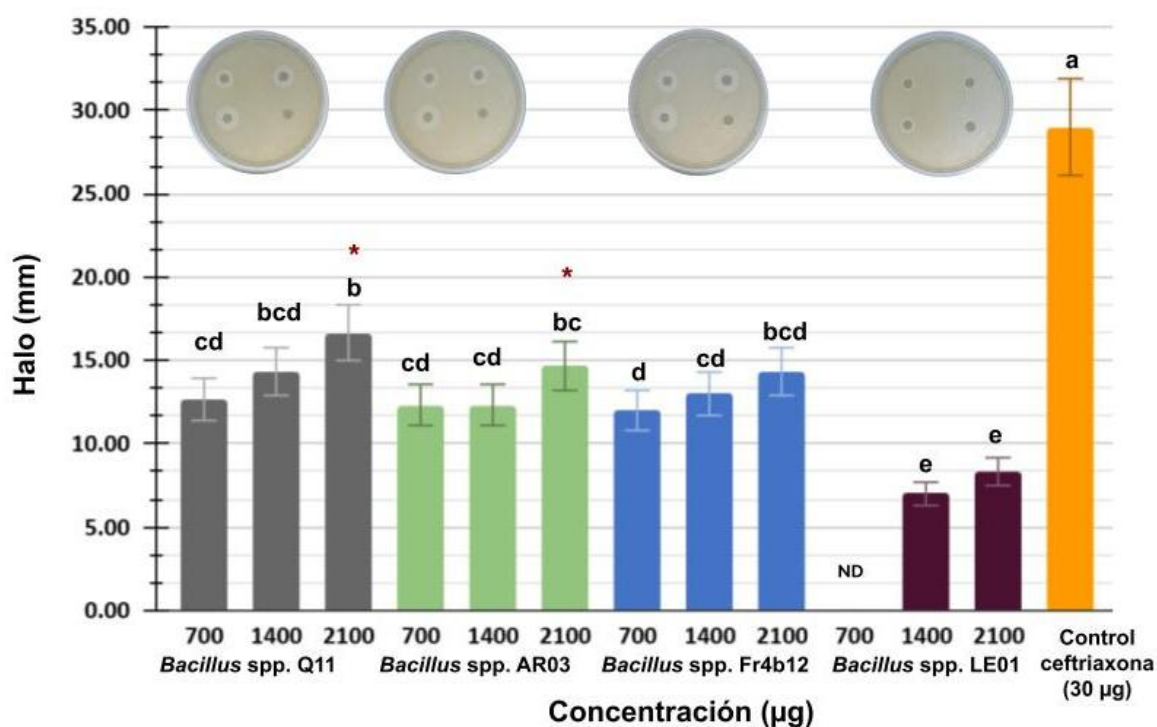
Cuadro 8. Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. sobre *Escherichia coli* (ATCC 11229).

Biosurfactante	Concentración (μg)	halo de inhibición	Análisis con respecto a ceftriaxona
<i>Bacillus</i> spp. Q11	700	14.33 ± 0.58	Intermedio
	1400	16.67 ± 2.08	Intermedio
	2100	19.67 ± 3.06	Intermedio
Aislado AR03	700	14.33 ± 1.53	Intermedio
	1400	17.33 ± 1.53	Intermedio
	2100	20.00 ± 1.00	Intermedio
<i>Bacillus</i> spp. Fr4B12	700	11.00 ± 2.65	Resistente
	1400	13.00 ± 1.00	Resistente
	2100	14.67 ± 1.15	Intermedio
Aislado LE01	700	ND	Resistente
	1400	ND	Resistente
	2100	9.00 ± 1.00	Resistente
Ceftriaxona	30	18.33 ± 0.58	NA
Metanol	30	ND	NA

ND: no detectable; NA: No aplica

Se observaron diferencias en la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* a los lipopéptidos, siendo la cepa 11229 (**Figura 14**) la más sensible, a diferencia de las cepas 35218 o 25922 (**Figura 15 y 16; Cuadros 9 y 10**), donde sus diferencias no son cercanas al control positivo empleado, el antibiótico comercial (ceftriaxona 30 μg), caso similar a lo reportado para otros géneros de la familia de enterobacterias, donde para *Escherichia coli* y *Shigella sonnei* se logra la inhibición utilizando 312 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de lipopéptidos de *Bacillus methylotrophicus* SCS2012, mientras que para *Shigella dysenteriae* se logra utilizando 625 $\mu\text{g/mL}$ (Sharma *et al.*, 2013).

Las cepas procedentes de hojas de kale (KA04 y KA05) y lechuga (LE01) fueron descartadas, debido que mostraba un efecto inhibitorio a concentraciones superiores de 2100 μg , por ello estos extractos no fueron considerados para posteriores análisis. Las cepas de *Bacillus* previamente identificadas y con el aislado de arúgula (AR03) se seleccionaron para continuar la caracterización de los lipopéptidos, ya que se observa la presencia de halos a concentraciones de 700 μg , la cual es superior a la reportada para *E. coli*, pero cercana a lo reportado para *Shigella dysenteriae*, (Sharma *et al.*, 2013).



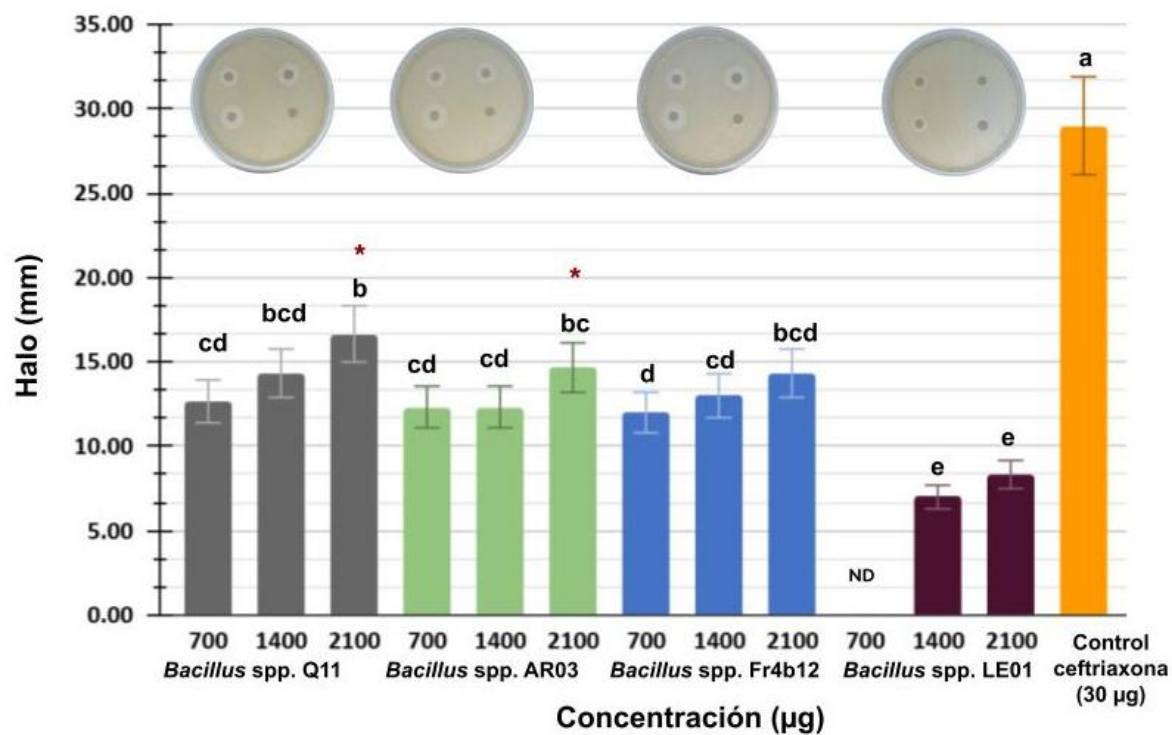


Figura 15. Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. sobre *Escherichia coli* (ATCC 35218), ND: No detectable.

Cuadro 9. Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. sobre *Escherichia coli* (ATCC 35218).

Biosurfactante	Concentración (µg)	halo de inhibición	Análisis de referencia con ceftriaxona
<i>Bacillus</i> spp. Q11	700	12.64 ± 0.6	Resistente
	1400	14.33 ± 0.6	Intermedio
	2100	16.67 ± 0.6	Intermedio
Aislado AR03	700	12.33 ± 1.5	Resistente
	1400	12.33 ± 1.5	Resistente
	2100	14.67 ± 0.6	Intermedio
<i>Bacillus</i> spp. Fr4B12	700	12.00 ± 0.0	Resistente
	1400	13.00 ± 0.0	Intermedio
	2100	14.33 ± 0.6	Intermedio
Aislado LE01	700	ND	Resistente
	1400	7.00 ± 0.0	Resistente
	2100	8.33 ± 0.6	Resistente
Ceftriaxona	30	29.00 ± 0.0	NA
Metanol	30	ND	NA

ND: no detectable; NA: No aplica

Ya que durante este ensayo podemos observar que el control con solvente (metanol) no interfiere con el antagonismo presentado, ya que no hay un efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli*, comparable con lo reportado por Sharma y colaboradores en 2013, donde emplean solventes como el acetato de etilo y al someterlos a un análisis por antibiograma no hay una respuesta inhibitoria frente a *Escherichia coli*, (Sharma *et al.*, 2013); Por tanto podemos separar el solvente de los extractos y observar una respuesta inhibitoria exclusiva del extracto crudo de lipopéptidos sobre *Escherichia coli*.

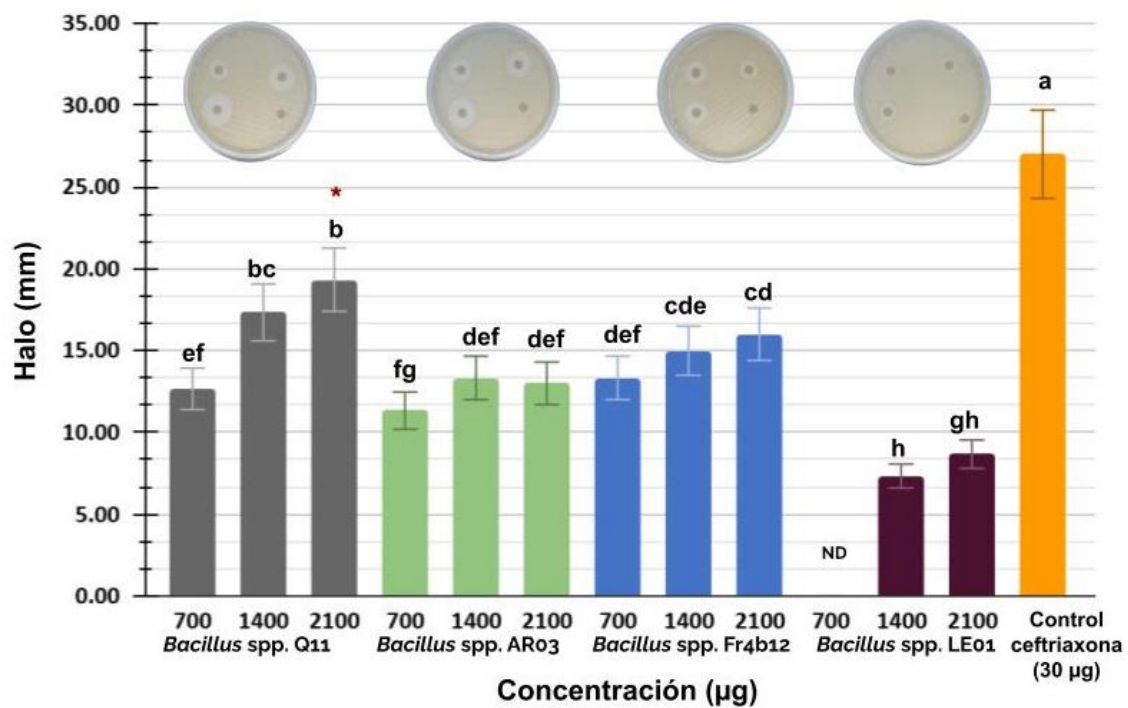


Figura 16. Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Cuadro 10. Efecto inhibitorio de la concentración de lipopéptidos producidos por *Bacillus* spp. sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Biosurfactante	Concentración (μg)	halo de inhibición	Análisis de referencia con ceftriaxona
<i>Bacillus</i> spp. Q11	700	12.67 ± 1.1	Resistente
	1400	17.33 ± 1.5	Intermedio
	2100	19.33 ± 1.5	Intermedio
Aislado AR03	700	11.33 ± 0.6	Resistente
	1400	13.33 ± 0.6	Resistente
	2100	13.00 ± 1.0	Resistente
<i>Bacillus</i> spp. Fr4B12	700	13.33 ± 0.6	Resistente
	1400	15.00 ± 1.7	Intermedio
	2100	16.00 ± 1.7	Intermedio
Aislado LE01	700	ND	Resistente
	1400	7.33 ± 0.0	Resistente
	2100	8.67 ± 0.6	Resistente
Ceftriaxona	30	27.00 ± 0.0	NA
Metanol	30	ND	NA

ND: no detectable; NA: No aplica

6.4 Actividad antibacteriana los lipopéptidos sobre *E.coli* en suspensión.

Para dilucidar el tipo de actividad antibacteriana de los extractos obtenidos se realizó un ensayo denominado reto microbiano, en el cual se determinó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad de las cepas de *E.coli* en suspensión. El efecto de los extractos muestra actividad diferenciada por cepa y extracto, el extracto generado por *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12 no muestra diferencias significativas ($\alpha=0.05$), ni entre las concentraciones empleadas, ni entre cepa de *Escherichia coli* (**Figura 17**). La reducción en la viabilidad observada para este extracto es limitada, no mayor a 0.35 Log UFC/mL.

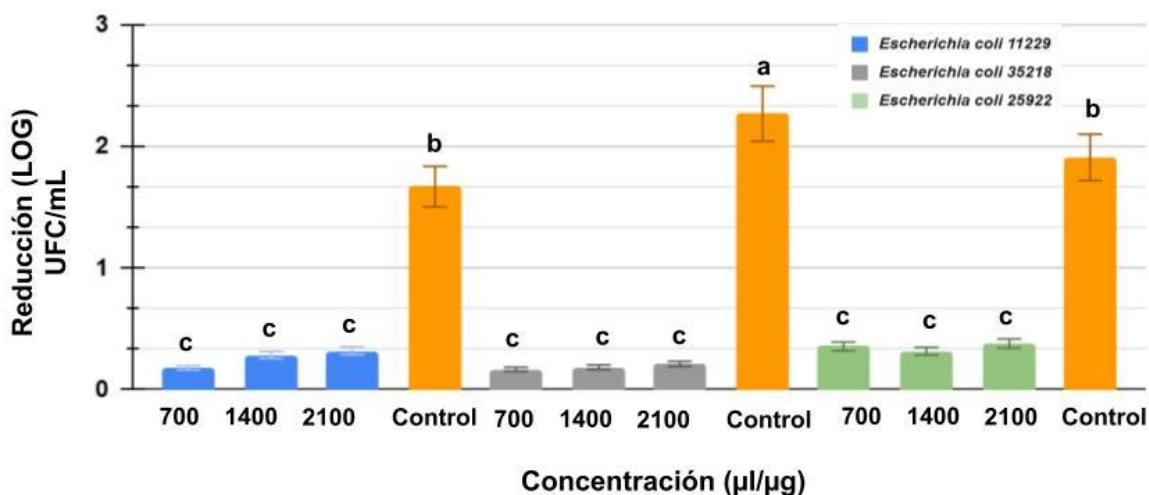


Figura 17. Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por *Bacillus methylophilus* Fr4B12 sobre cepas de *E. coli* 11229, 35218 y 25922, análisis realizado con respecto al control de plata coloidal (0.35 µl; barras anaranjadas) y con un tiempo de interacción de 10 minutos.

En el caso de los extractos de *Bacillus subtilis* Q11 y AR03, muestran diferentes efectos entre las distintas cepas de *E. coli*, siendo la cepa 25922 la que muestra una mayor sensibilidad para ambos extractos y solo la cepa 35218 sólo para el extracto de AR03, (**Figura 18**). En ambos casos, el extracto generado por AR03 y *Bacillus subtilis* Q11 generaron una reducción máxima de 1 logaritmo en las cepas más susceptibles y con mayor concentración del extracto, lo cual nos indica que la principal actividad antimicrobiana de estos compuestos es de tipo bacteriostática; El control positivo empleado fue plata coloidal, la cual generó una reducción de alrededor de 2 Log UFC/mL; eficacia de este compuesto ha sido ampliamente cuestionada, ya que 22 ppm no muestran un efecto bactericida frente a *E. coli* (Van Hasselt et al., 2004).

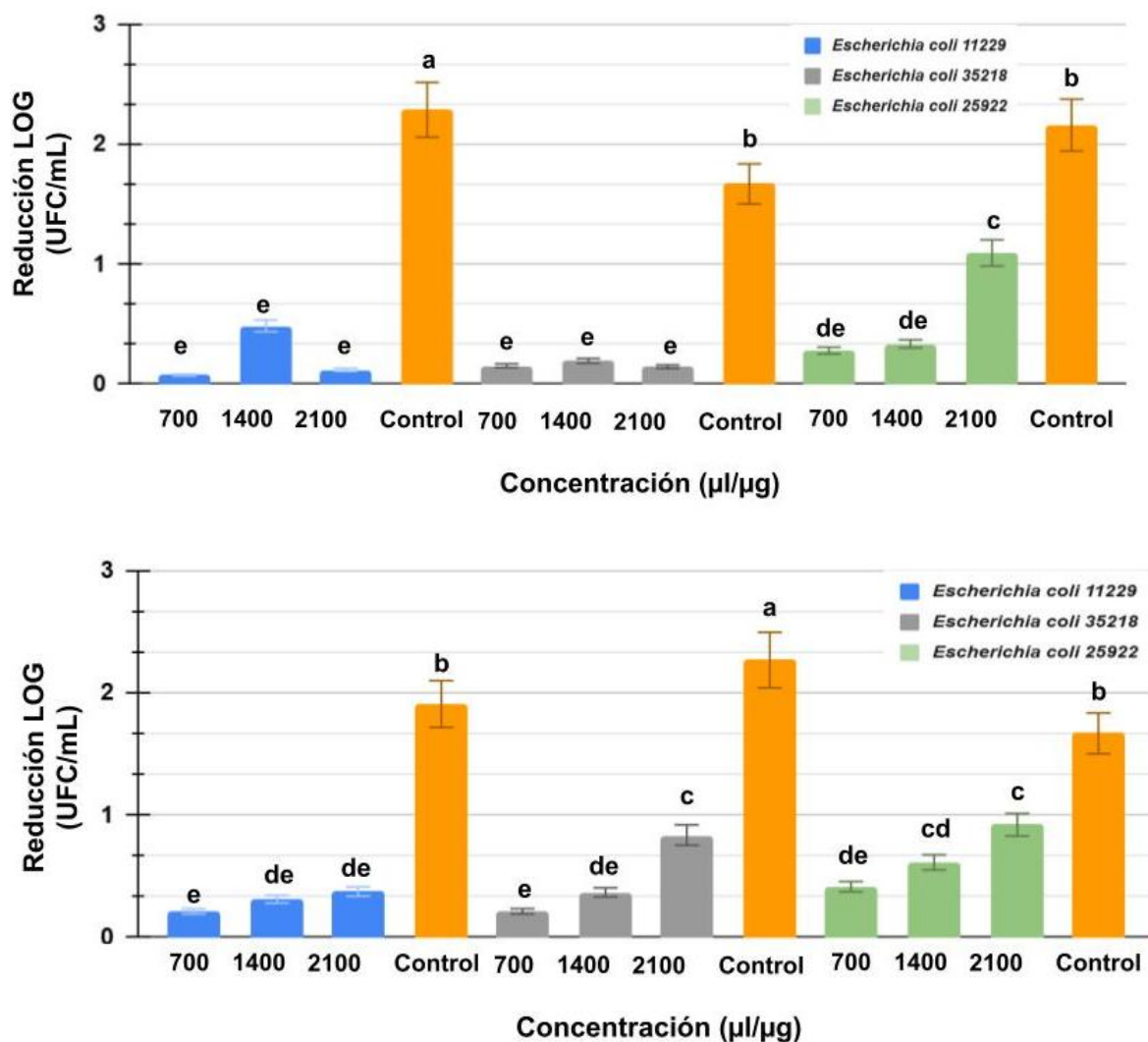


Figura 18. Efecto inhibitorio de los lipopéptidos producidos por A) *Bacillus subtilis* Q11 y B) *Bacillus* spp. AR03 sobre cepas de *Escherichia coli* 11229, 35218 y 25922, análisis realizado con respecto al control de plata coloidal (0.35 µL) y con un tiempo de interacción de 10 minutos.

En comparaciones recientes se ha observado que la plata coloidal mostró una eficiencia sobre la inactivación de los microorganismos deterioradores es del 95% utilizando como matriz alimentaria el cilantro (Salgado-Escobar *et al.*, 2020); a pesar de estos reportes es importante mencionar que en México desde 1993 se utiliza como un método de desinfección de frutas y verduras (Rodríguez & Del Rocío, 2015). Resaltado así la necesidad de evaluar los diversos desinfectantes

empleados durante la desinfección de hortalizas de hoja utilizando metodologías más apropiadas.

La desinfección de hortalizas de hojas sin duda es un reto para la inocuidad, dónde el tratamiento convencional con hipoclorito de cloro puede generar compuestos tóxicos, como los trihalometanos y ácidos haloacéticos con efectos dañinos potenciales para la salud (Banach *et al.*, 2020).

Si bien se han estudiado tratamientos alternativos como el ácido peroxiacético o el dióxido de cloro, se ha demostrado que las concentraciones comerciales de estos productos, 20 y 80 ppm respectivamente, no logran inhibir a *E. coli* O157:H7 en los tanques de lavado con matrices de espinaca (Chalen-Moreano *et al.*, 2024). Por lo anterior es importante destacar que el extracto crudo de los biosurfactantes al presentar un efecto de tipo bacteriostático, puede ser un posible candidato para generar estrategias de desinfección, como la tecnología de barreras que promueve la inocuidad de estos alimentos.

5.5 Identificación genética de aislados de *Bacillus* aisladas de hortalizas.

Se identificó el aislado que presentó la mayor actividad antagonista, en este caso el aislado procedente de hojas de arúgula, aislado AR03, Con base en la comparación de la secuencia por el gen ARNr 16s usando la herramienta de tipo BLAST, la secuencia se encuentra dentro del género *Bacillus*, mostrando 100% de similitud con *Bacillus halotolerans* y una relación cercana con especies como *B. malacitensis* y *B. subtilis* (**Figura 19**).

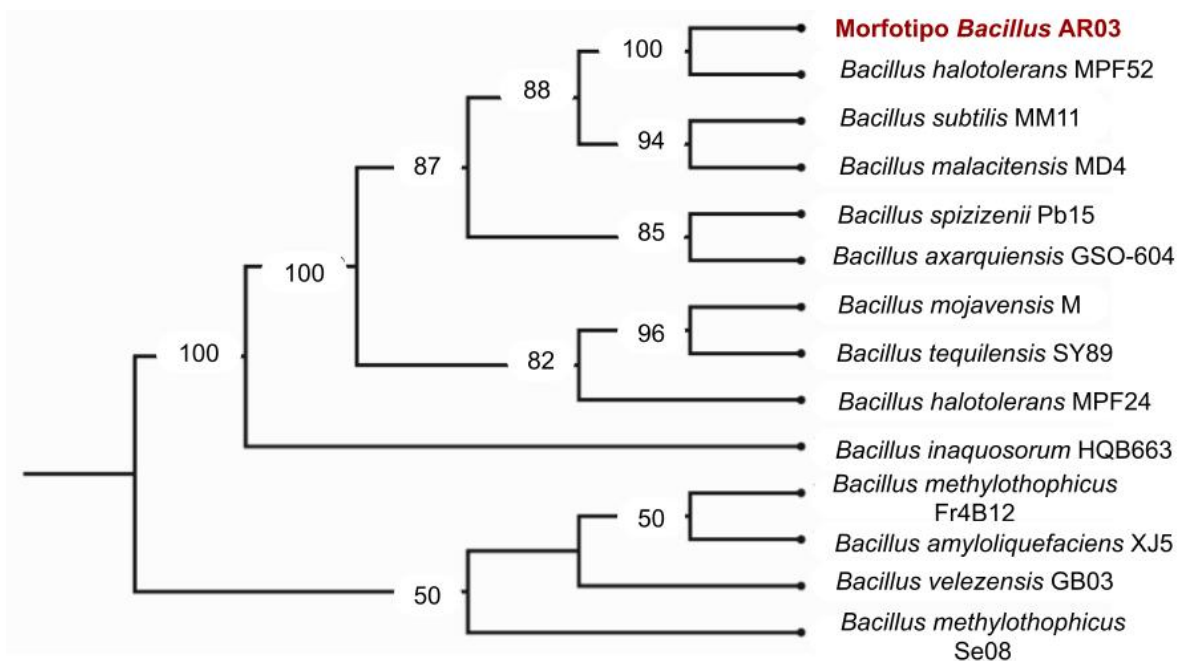


Figura 19. Árbol filogenético para las secuencias obtenidas, construcción por medio del método vecinos cercanos (BV-BRC versión 3.53.3).

5.6 Análisis del extracto crudo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El extracto procedente de *Bacillus* spp. AR03, presenta una banda en 3294 cm^{-1} la cual corresponde al grupo amida A, 2926 cm^{-1} atribuidas a la vibración de estiramiento en enlaces simples de C-H (**Figura 20**), es importante mencionar que esta región se ha asocia con la presencia de lípidos ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$), así mismo se pueden observar enlaces dobles de C=O por la presencia de la banda en 1643 cm^{-1} y la presencia de proteínas, esto debido a la presencia de dos bandas ($1715\text{ y }1530\text{ cm}^{-1}$) en el espectro asociado a la Amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) y II ($1565\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$); (Rodríguez-Chavéz *et al.*, 2018; Bureau *et al.*, 2018; Glassford *et al.*, 2013).

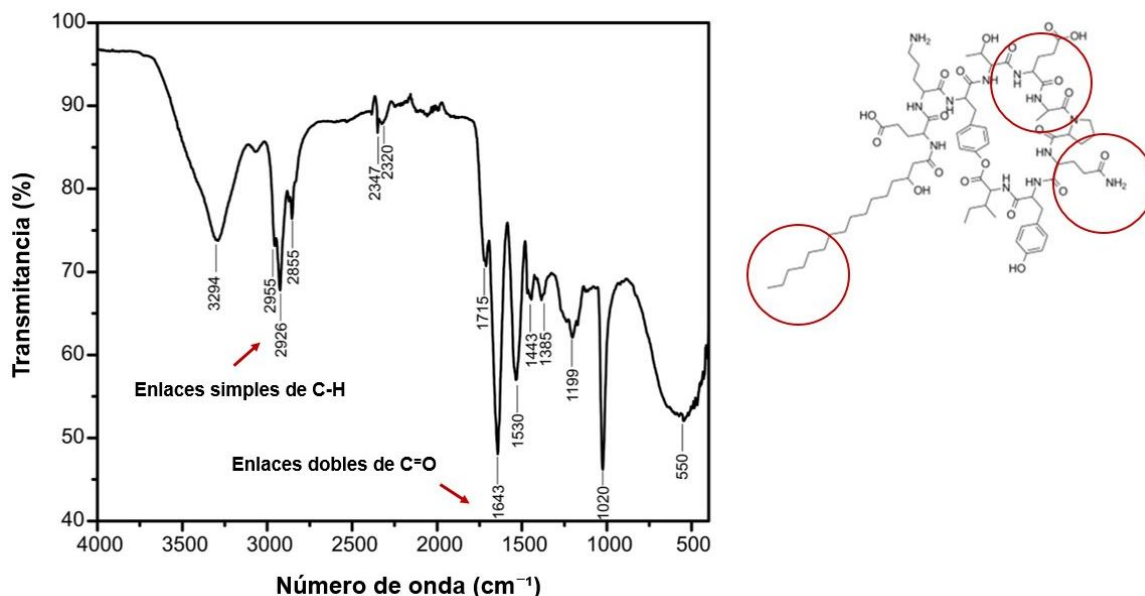


Figura 20. Análisis del extracto crudo producido por *Bacillus* spp. AR03 por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Para el caso de *Bacillus subtilis* Q11 su extracto crudo fue analizado previamente por Rodríguez-Chavéz *et al.*, 2018, dónde el análisis de FTIR reporta la misma banda para el grupo amida A (3294 cm^{-1}), así como bandas en 2923 a 2853 cm^{-1} atribuidas a la vibración de estiramiento en enlaces simples de C-H, así como enlaces dobles de $\text{C}=\text{O}$ en 1644 cm^{-1} .

Por otro lado, se observa la presencia de bandas en 1515 cm^{-1} asociadas a la región para amida II, así como a la presencia de enlaces peptídicos, debido a la vibración de flexión N-H y la vibración de estiramiento C-N en los rangos de 1241 y 1172 cm^{-1} (Rodríguez-Chavéz *et al.*, 2019; Glassford *et al.*, 2013).

Lo anterior nos muestra un panorama general sobre la composición del extracto crudo, lo cual coincide con un análisis más completo del extracto de surfactante de *Bacillus subtilis* Q11, dónde utilizando MALDI-TOF, se ha reportado la presencia de dos de las principales familias de lipopéptidos, iturina (A), fengicinas (A y B) (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2019). Mismo caso para el extracto de *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12 o M9, en el cual se ha reportado la presencia de grupos de lipopéptidos procedentes de dos familias la fengicinas e iturinas (López-

González *et al.*, 2021). Tomando como referencia lo previamente reportado, así como el análisis realizado mediante FTIR podemos ubicar a los tres extractos de biosurfactantes como lipopéptidos.

6.7 Efecto del biosurfactante en la capacidad de formación de biopelículas de cepas de *E.coli in vitro*.

La acción de los biosurfactantes sobre las biopelículas de *E. coli* a través del tiempo muestran una actividad diferente entre las cepas, a la concentración evaluada (2100 µg o 2.1 mg), todos los extractos muestran diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con respecto al control empleado, (**Figura 21, 22 y 23**). Sin embargo,

Sin embargo la cepa de *E.coli* 25922 mostró una susceptibilidad muy similar entre los diferentes extractos aplicados, los tres surfactantes extraídos muestran propiedades inhibitorias sobre la formación de exopolisacáridos a las 48 horas posteriores a su aplicación, donde se observan reducciones que van desde el 87% hasta el 96%, siendo el extracto procedente de *Bacillus* spp Q11 el que muestra una mayor actividad inhibitoria (**Figura 21**).

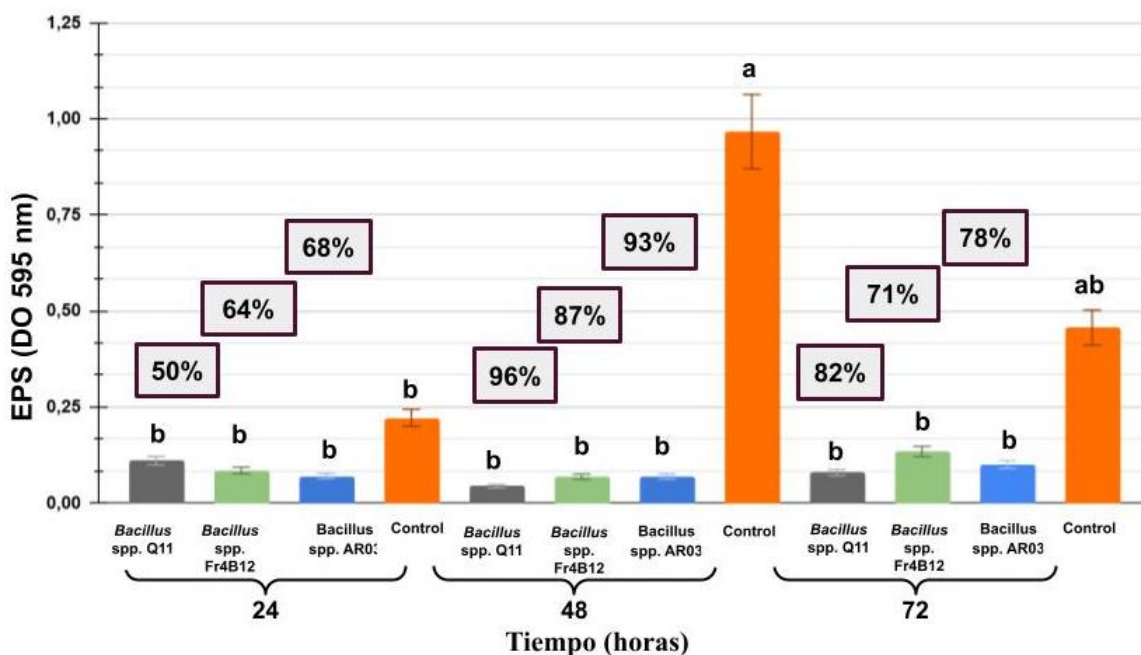


Figura 21. Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. sobre la formación de biopelículas producidas por *E. coli* (ATCC 25922) *in vitro*.

Por otro lado la cepa de *E.coli* 11229, muestra una mayor capacidad para la formación de biopelículas bacterianas, debido a que la producción de exopolisacáridos comienza desde las 24 horas posteriores a su inoculación, sin embargo a pesar de ello se logran porcentajes de reducción hasta de 88%, siendo el extracto procedente de *Bacillus* spp. AR03 es el que muestra una mayor actividad inhibitoria a las 24 horas. Sin embargo, el extracto procedente de *Bacillus* spp. Fr4B12 tiene una actividad más estable sobre esta cepa, debido a que mantiene porcentajes de reducción altos hasta 72 horas posteriores a su aplicación (**Figura 22**).

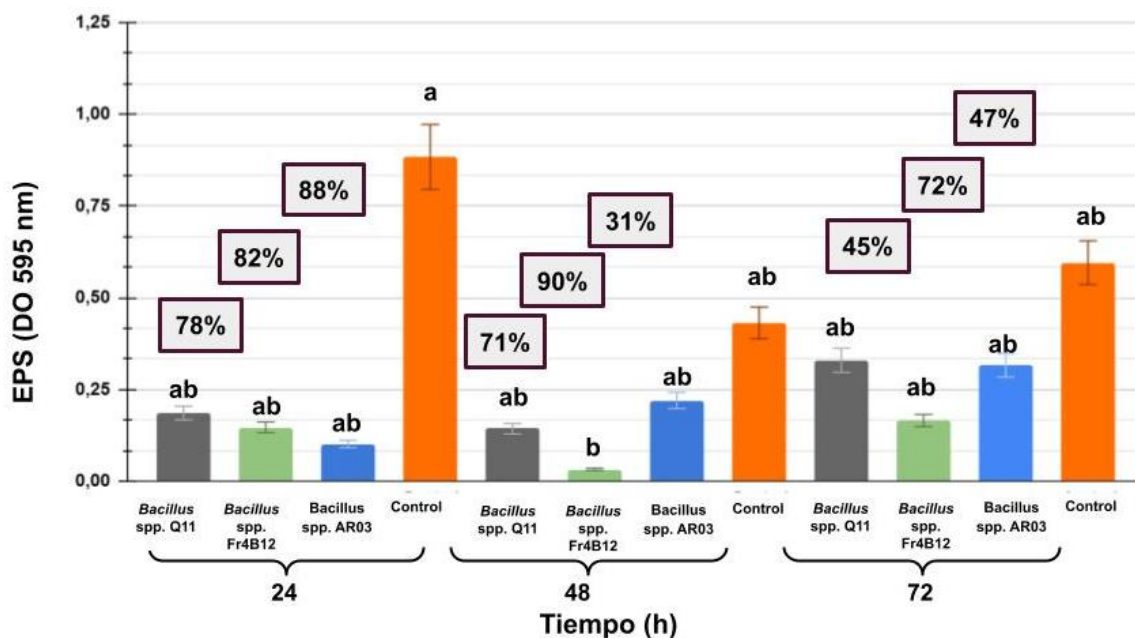


Figura 22. Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. sobre la formación de biopelículas producidas por *E. coli* (ATCC 11229) *in vitro*.

Es importante destacar la sensibilidad mostrada por parte de la cepa de *E. coli* 35218 ya que los tres extractos muestran porcentajes de reducción altos en los distintos tiempos de medición, siendo un efecto aún más pronunciado a las 72 horas posteriores a su aplicación, dónde el extracto procedente de *Bacillus* spp. AR03 mostró una mayor capacidad de inhibición a través del tiempo, con porcentajes del 95% a las 72 horas posterior a su aplicación (**Figura 23**).

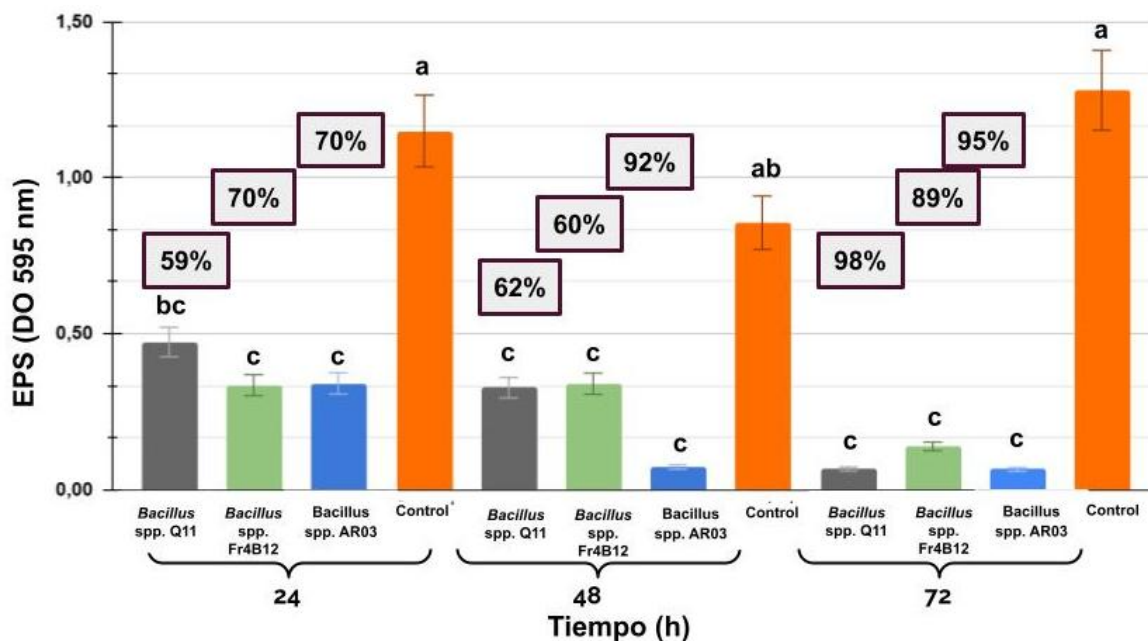


Figura 23. Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. sobre la formación de biopelículas producidas por *E. coli* (ATCC 35218) *in vitro*.

Esta capacidad de los biosurfactantes coincide con lo previamente reportado por Adnan (2021) dónde se observó que estos compuestos tienen una capacidad antiadherente, impidiendo la arquitectura de la matriz de la biopelícula, al afectar la viabilidad e integridad de las células bacterianas dentro de las biopelículas, lo que reduce el contenido total de exopolisacáridos. Así mismo se ha observado para los compuestos de tipo lipopéptidos bacterianos, reducen la tensión superficial y forman micelas, lo cual puede disminuir la formación de biopelículas bacterianas (Saiyam *et al.*, 2024).

5.8 Efecto del biosurfactante en la capacidad de formación de biopelículas de *E.coli* bacterianas sobre hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*).

Para dilucidar la acción de los biosurfactantes en una matriz alimentaria se realizó un ensayo sobre biopelículas de las cepas de *E.coli* en hojas de espinacas, en el cual los distintos extractos muestran diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con

respecto al control empleado, aunque con una actividad diferenciada entre las cepas de *E. coli*, a la concentración evaluada (2100 µg), (**Figuras 24, 25 y 26**).

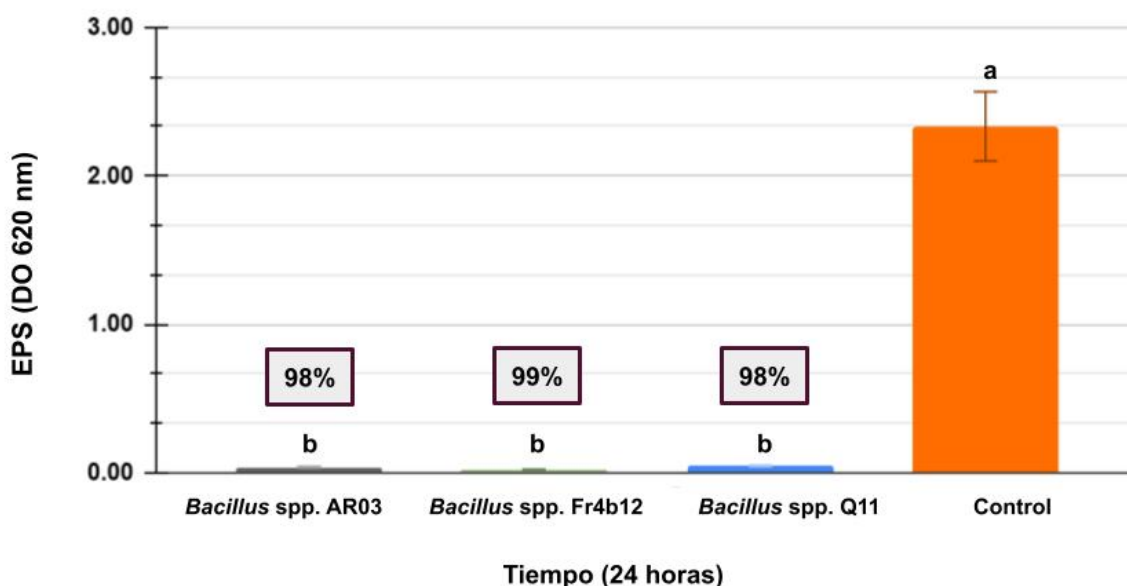


Figura 24. Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. sobre la formación de biopelículas producidas por *E. coli* (ATCC 11229) en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*).

Es importante destacar que al realizar los ensayos *in vivo* se observaron porcentajes de reducción aún mayores que los ensayos *in vitro*, hasta del 99% (**Figura 24**), lo cual podría indicar la activación de diversas rutas metabólicas en la planta. Se ha reportado que las familias de lipopéptidos iturinas, tienen propiedades antibacterianas, ya que altera las membranas celulares de hongos y bacterias al interactuar con sus componentes lipídicos, lo que conduce a la lisis celular (Saiyam *et al.*, 2024).

A pesar de los diversos reportes asociados a las propiedades antimicrobianas de los biosurfactantes, es importante destacar el uso de los biosurfactantes no purificados, ya que representan una alternativa económica de biocontrol (Das *et al.*, 2008).

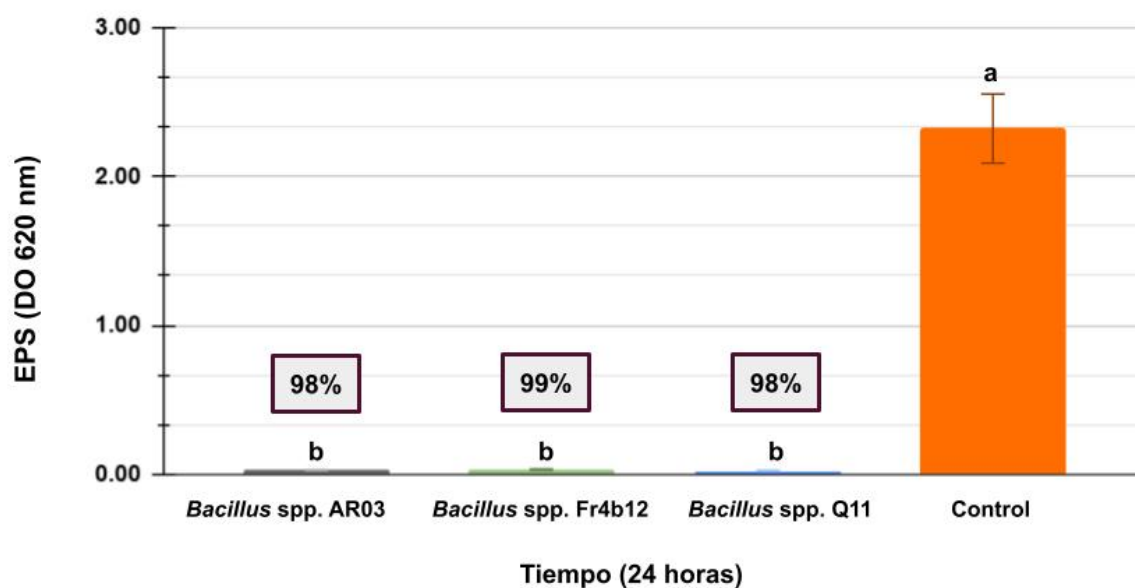


Figura 25. Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. sobre la formación de biopelículas producidas por *E. coli* (ATCC 25922) en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*).

Tal como lo muestran los resultados del agente de biocontrol, *Bacillus subtilis* Q11, el cual presenta porcentajes de reducción de hasta el 98% para las diversas cepas de *E. coli* (Figuras 24, 25 y 26). Dando la pauta para el uso de microorganismos previamente identificados y que tiene papeles ecológicos importantes en los entornos agroecológicos.

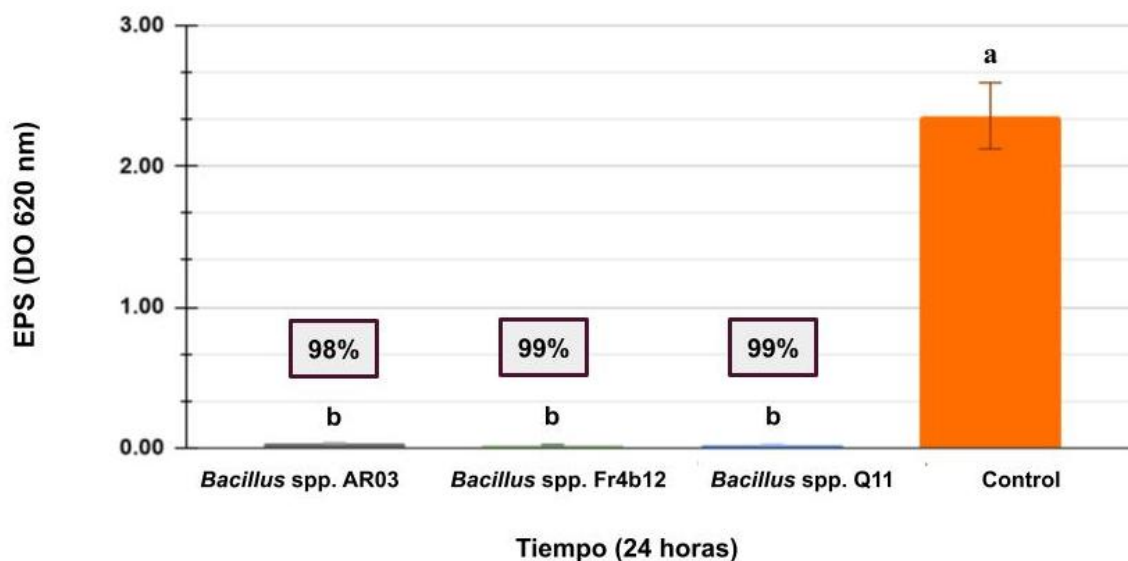


Figura 26. Efecto inhibitorio de los biosurfactantes producidos por *Bacillus* spp. sobre la formación de biopelículas producidas por *E. coli* (ATCC 35218) en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*).

De acuerdo con lo previamente analizado dentro de los sistemas productivos agroecológicos de hortalizas se encuentran microorganismos con capacidad de biocontrol; ya que en este nicho ecológico se aisló y caracterizo una cepa de *Bacillus* procedente de hortalizas de hoja verde con capacidad de biocontrol sobre poblaciones de *Escherichia coli* *in vitro* e *in vivo* en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*). Lo que re afirma la importancia del estudio de los biosurfactantes, ya que brindan la posibilidad de desarrollar diversas estrategias biocompatibles con el entorno, con capacidad para biodegradarse y que presenten efectividad ante diversas condiciones o en combinación con diversas estrategias (Patel *et al.*, 2021).

Al evaluar las interacciones antagonistas de los aislados frente a *Escherichia coli*, mediante ensayos de confrontación por estría en placa. El aislado *Bacillus* spp. AR03 presenta actividad antagonista sobre *Escherichia coli*, comparada a cepas de *Bacillus* previamente identificadas como *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12.

Este efecto antagónico ha sido previamente reportado por Cordisco (2023), dónde se observa como la presencia de bacileno, metabolito híbrido de péptido no ribosómico, genera un efecto antagónico sobre la formación de biopelículas *E.coli*, pero principalmente inhibe la síntesis de proteínas procariotas, reportando una actividad de tipo antibiótica bacteriostática. Concordando con lo reportado en este estudio dónde al determinar la producción bacteriana de lipopéptidos y evaluar su actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* el extracto crudo de biosurfactantes producidos las cepas *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* spp. AR03 muestran actividad bacteriostática (Jessel & Chapman, 2024; Cordisco *et al.*, 2023).

Lo cual podría contribuir al desarrollo de estrategias de desinfección basadas en tecnología de barrera, ya que el uso de extractos crudos de *Bacillus* ha demostrado su efectividad, de acuerdo a lo reportado por Lin (2021) el sobrenadante de *Bacillus subtilis natto* tiene un efecto inhibitorio sobre *E. faecalis*, en este caso se observa una mayor efectividad usando este método ante una bacteria con alta resistencia, demostrando que el fluido de cultivo de *B. subtilis natto* regulaba a la baja la biosíntesis de peptidoglicanos y la biosíntesis de glicolípidos de membrana (Lin *et al.*, 2021).

Al evaluar el efecto inhibitorio de los biosurfactantes sobre *Escherichia coli* en espinaca (*Spinacia oleracea*) y su efecto sobre la producción de biopelículas; El efecto inhibitorio de los lipopéptidos sobre la formación de biopelículas bacterianas *in vitro*, puede ser una estrategia eficaz en el desarrollo de recubrimientos microbianos, así como el desarrollo de estrategias de biocontrol en superficies inertes. Como se mencionó con anterioridad la presencia de biopelículas bacterianas no representa un riesgo para el consumidor, también afecta la producción, ya que cuando las bacterias se encuentran es este estadio de resistencia intervienen con diversos antimicrobianos como los antibióticos o los desinfectantes, lo cual se refleja en un incremento de los costos asociados a la producción (Adnan *et al.*, 2021).

El uso de los biosurfactantes representa una estrategia eficaz, ya que en estudios previos se ha evaluado su estabilidad ante diversos rangos de pH, reportando un amplio rango de estabilidad (5 a 9), con porcentajes de emulsificación de hasta el 53.4-61.2% a las 24 horas (Giri *et al.*, 2019). Ofreciendo una alternativa de biocontrol, que puede contribuir a la prevención de la sobrevivencia de agentes patógenos desde la siembra hasta la cosecha sobre las hojas de espinaca.

7. CONCLUSIONES

- Dentro de los sistemas productivos agroecológicos de hortalizas se encuentran microorganismos con capacidad de biocontrol.
- El aislado *Bacillus* spp. AR03 presenta actividad antagonista sobre *Escherichia coli*, comparada a cepas de *Bacillus* previamente identificadas como *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus methylotrophicus* Fr4B12.
- El extracto crudo de biosurfactantes producidos las cepas *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* spp. AR03 muestran actividad bacteriostática sobre *Escherichia coli*, lo cual podría contribuir al desarrollo de estrategias de desinfección basadas en tecnología de barrera.
- El efecto inhibitorio de los lipopéptidos sobre la formación de biopelículas bacterianas *in vitro*, puede ser una estrategia eficaz en el desarrollo de recubrimientos microbianos, así como el desarrollo de estrategias de biocontrol en superficies inertes.
- El efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas bacterianas sobre hojas de espinaca, es una alternativa de biocontrol, que puede contribuir a la prevención de la sobrevivencia de agentes patógenos desde la siembra hasta la cosecha sobre las hojas de espinaca.

8. REFERENCIAS

1. Adnan, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Ashraf, S. A., Hassan, M. I., Snoussi, M., Badraoui, R., Jamal, A., Bardakci, F., Awadelkareem, A. M., Sachidanandan, M., & Patel, M. (2021). *Caracterización funcional y estructural del biosurfactante derivado de Pediococcus pentosaceus y su potencial biomédico frente a la adhesión bacteriana, la detección de quórum y la formación de biopelículas*. Antibióticos (Basilea, Suiza), 10(11), 1371. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111>
2. Blount Z. D. (2015). *The unexhausted potential of E. coli*. eLife, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
3. Banach, J. L., van Bokhorst-van de Veen, H., van Overbeek, L. S., van der Zouwen, P. S., Zwietering, M. H., & van der Fels-Klerx, H. J. (2020). *Effectiveness of a peracetic acid solution on Escherichia coli reduction during fresh-cut lettuce processing at the laboratory and industrial scales*. International journal of food microbiology, 321, 108537. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108537>
4. Balbuena Alonso, M. (2024). *Análisis de los elementos genéticos que movilizan determinantes de virulencia y resistencia a antimicrobianos en cepas de Escherichia coli aisladas de productos crudos*. Tesis doctorado en Ciencias (Microbiología) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Pp 63-64. Consultado el 12 de octubre del 2024, Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/27936>
5. Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2018). *Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review*. Postharvest Biology And Technology, 148, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.003>
6. Centro de control y prevención de enfermedades (CDC). *Ficha informativa sobre Lechuga, otras verduras de hoja verde y seguridad de los alimentos*, 29 de septiembre del 2023. Disponible en [Lechuga, otras verduras de hoja](#)

[verde y seguridad de los alimentos | Seguridad alimenticia | CDC](#). Consultado el 26 de febrero de 2024.

7. Cedillo, E., et al. (2021). Manual de producción de espinaca (*Spinacea oleracea*) en invernadero. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 6-18. Consultado el 04 de agosto del 2024, Disponible en: [Manual de Produccion de Espinacas en Invernadero.pdf \(planificacionfesaragon.com\)](#)
8. Chalen-Moreano, F., Saeteros-Hernández, A., Abdo-Peralta, P., Frey, C., Peralta-Saa, L. O., Hernández-Allauca, A. D., Rosero-Erazo, C. R., & Toulkeridis, T. (2024). *Explorando la eficacia antimicrobiana de los desinfectantes comerciales de bajo costo utilizados en los tanques de lavado de la industria agroalimentaria: hacia mejores prácticas de higiene*. Alimentos (Basilea, Suiza), 13(12), 1915. <https://doi.org/10.3390/foods13121915>
9. Cao, X. H., Liao, Z. Y., Wang, C. L., Yang, W. Y., & Lu, M. F. (2009). *Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from Bacillus natto TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities*. Brazilian Journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 40(2), 373–379. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000030>
10. Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). *Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
11. Chávez-Ambriz, L. A., Hernández-Morales, A., Cabrera-Luna, J. A., y Pacheco Aguilar, J. R. (2016). *Aislados de Bacillus provenientes de la rizósera de cactus incrementan la germinación y floración en Mammillaria spp.* Revista Argentina de Microbiología 48 (4): 333- 341, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.001>.
12. Cordisco, E., Zanol, M. I., Moreno, D. M., & Serra, D. O. (2023). *Selective inhibition of the amyloid matrix of Escherichia coli biofilms by a bifunctional microbial metabolite*. NPJ Biofilms and Microbiomes, 9(1), 81. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00449-6>

13. Dees, M. W., Lysøe, E., Nordskog, B., & Brurberg, M. B. (2015). *Bacterial communities associated with surfaces of leafy greens: shift in composition and decrease in richness over time*. Applied and Environmental Microbiology, 81(4), 1530–1539. <https://doi.org/10.1128/AEM.03470-14>
14. Das P., Mukherjee S., Sen R. *Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine Bacillus circulans*. Journal of Applied Microbiology. 2008;104:1675–1684. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x
15. Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 61(1), 47–64. <https://doi.org/10.1128/membr.61.1.47-64.1997>
16. Dirección General del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). *Acciones y programas: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Disponible en: [Anuario Estadístico de la Producción Agrícola](#). Consultado el 16 de noviembre del 2024
17. Food and Drug Administration (2024). *Avisos de salud pública de investigaciones de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos*. Disponible en: [Avisos de salud pública de investigaciones de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos | FDA](#). Consultado el 16 de noviembre del 2024.
18. Finger, J. A. F. F., Santos, I. M., Silva, G. A., Bernardino, M. C., Pinto, U. M., & Maffei, D. F. (2023). Minimally Processed Vegetables in Brazil: An Overview of Marketing, Processing, and Microbiological Aspects. Foods, 12(11), 2259. <https://doi.org/10.3390/foods12112259>
19. Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura; FAOSTAT). 2022. *Estadísticos: Producción*. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>. Consultado el 16 de noviembre del 2024.
20. Gomes, B. A. F., Alexandre, A. C. S., De Andrade, G. A. V., Zanzini, A. P., De Barros, H. E. A., Silva, L. M. D. S. F. E., Costa, P. A., & De Barros Vilas Boas, E. V. (2023). *Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: A review – Part 2: Physical*

- methods and global market outlook*. Food Chemistry Advances, 2, 100304.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100304>
21. Giri, S. S., Ryu, E. C., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2019). *Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from Bacillus strains*. Microbial Pathogenesis, 132, 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.035>
 22. Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). *Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins And Proteomics, 1834(12), 2849-2858.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>
 23. Jiménez, J., Arias L., Espinosa, L., Luz S, Gazón C. Gil R., Niño, N. & Rodríguez M., (2010). *El cultivo de la espinaca y su manejo fitosanitario en Colombia*. Editorial Tadeo Lozano. Disponible en: [El cultivo de la espinaca y su manejo fitosanitario en Colombia - Arias, Luis, Espinosa, Ligia, Fuentes, Luz, Garzón, Catalina, Niño, Nancy, Jiménez, Jaime, Rodríguez, Marcela, Gil, Rodrigo - Google Libros](#) Consultado el 27 de febrero de 2024.
 24. Jessel, K., & Chapman, M. R. (2024). *Microbial warfare: B. subtilis antagonizes E. coli biofilm formation*. Trends in Microbiology, 32(3), 221–223.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.12.006>
 25. Kroupitski, Y., Brandl, M. T., Pinto, R., Belausov, E., Tamir-Ariel, D., Burdman, S., & Sela Saldinger, S. (2013). *Identification of Salmonella enterica genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by recombinase-based in vivo expression technology*. Phytopathology, 103(4), 362–372. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-12-0254-FI>
 26. Kim, S. Y., & Kang, S. S. (2020). *Anti-Biofilm Activities of Manuka Honey against Escherichia coli O157:H7*. Food Science of Animal Resources, 40(4), 668–674. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e42>
 27. Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M. P., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). *The Role of Pathogenic E. coli in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive*

- Measures. International Journal of Microbiology, 2019, 2894328.
<https://doi.org/10.1155/2019/2894328>
28. Lertcanawanichakul, M. & Sawangnop, S., (2008). *A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of Bacillus Species*. Walailak Journal of Science and Technology 2008; 5(2): 161-171. <https://doi.org/10.2004/wjst.v5i2.86>
 29. López González, R. C., Martínez Peniche, R. A., & Pacheco Aguilar, J. R. (2019). *Bacterias antagonistas a Botrytis cinerea aisladas de flor de manzano*. Revista Nthe, 31, 69-75. Disponible en: <http://nthe.mx/revista.php>. Consultado el 01 de marzo del 2024.
 30. López-González, R. C., Juárez-Campusano, Y. S., Rodríguez-Chávez, J. L., Delgado-Lamas, G., Medrano, S. M. A., Martínez-Peniche, R. Á., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2021). *Antagonistic Activity of Bacteria Isolated from Apple in Different Fruit Development Stages against Blue Mold Caused by Penicillium expansum*. The Plant Pathology Journal, 37(1), 24–35. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2020.0121>
 31. Lin, Y. C., Wu, C. Y., Huang, H. T., Lu, M. K., Hu, W. S., & Lee, K. T. (2021). *Bacillus subtilis natto* Derivatives Inhibit Enterococcal Biofilm Formation via Restructuring of the Cell Envelope. Frontiers in Microbiology, 12, 785351. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.785351>
 32. Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., & Brahmaprakash, G. P. (2020). *Lesson from Ecotoxicity: Revisiting the Microbial Lipopeptides for the Management of Emerging Diseases for Crop Protection*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(4), 1434. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>
 33. Ministerio de salud de Perú. (2002). *Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias*. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/284839-manual-de-procedimientos-bacteriologicos-en-infecciones-intrahospitalarias>. Consultado en 03 de diciembre del 2024.

34. Mieke U., Franz E. y Schlüter, O. (2016). "Food Safety, a Global Challenge". International Journal of Environmental Research and Public Health, 13, no. 1: 67. <https://doi.org/10.3390/ijerph13010067>
35. Mendoza, I. C., Luna, E. O., Pozo, M. D., Vásquez, M. V., Montoya, D. C., Moran, G. C., Romero, L. G., Yépez, X., Salazar, R., Romero-Peña, M., & León, J. C. (2022). *Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie/Food Science & Technology*, 165, 113714. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>
36. Macarisin, D., Patel, J., Bauchan, G. R., Girón, J. A., & Ravishankar, S. (2013). *Effect of Spinach Cultivar and Bacterial Adherence Factors on Survival of Escherichia coli O157:H7 on Spinach Leaves. Journal Of Food Protection*, 76(11), 1829-1837. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-556>
37. Milijašević-Marčić, S., Todorović, V., Stanojević, O., Berić, T., Stanković, S., Todorović, B. & Potočnik, I. (2018). *Antagonistic potential of Bacillus spp. isolates against bacterial pathogens of tomato and fungal pathogen of pepper. Pestic. Phytomed*, 33(1), 2018, 9–18. <https://doi.org/10.2298/PIF1801009M>
38. Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V., & Sorokulova I. (2013). *Antagonistic Activity of Bacillus Bacteria against Food-Borne Pathogens. Journal of Probiotics & Health*, 01(03). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000110>
39. Niemira, B. A., & Fan, X. (2014). *FRUITS AND VEGETABLES | Advances in Processing Technologies to Preserve and Enhance the Safety of Fresh and Fresh-Cut Fruits and Vegetables*. En Elsevier eBooks (pp. 983-991). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00428-6>
40. Nair, M. S., Upadhyay, A., Fancher, S., Upadhyaya, I., Dey, S., Kollanoor-Johny, A., Zhao, J., & Venkitanarayanan, K. (2018). *Inhibition and Inactivation of Escherichia coli O157:H7 Biofilms by Selenium. Journal of Food Protection*, 81(6), 926-933. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-427>

41. Oni, F. E., Esmaeel, Q., Onyeka, J. T., Adeleke, R., Jacquard, C., Clement, C., Gross, H., Ait Barka, E., & Höfte, M. (2022). *Pseudomonas* Lipopeptide-Mediated Biocontrol: Chemotaxonomy and Biological Activity. *Molecules*, 27(2), 372. <https://doi.org/10.3390/molecules27020372>
42. O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). *Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis*. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1f998.00797.x>
43. Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., & Briandet, R. (2017). *Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents?*. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 719–734. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12693>
44. Puligundla, P., & Lim, S. (2022). *Biocontrol Approaches against Escherichia coli O157:H7 in Foods*. *Foods*, 11(5), 756. <https://doi.org/10.3390/foods11050756>
45. Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Mégraud, F., & Urdaci, M. C. (2001). *In vitro anti-Helicobacter pylori activity of the probiotic strain Bacillus subtilis 3 is due to secretion of antibiotics*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), 3156–3161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3156-3161.2001>
46. Patel, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Surti, M., Awadelkareem, A. M., Ashraf, S. A., Alreshidi, M., Snoussi, M., Rizvi, S. M. D., Bardakci, F., Jamal, A., Sachidanandan, M., & Adnan, M. (2021). *Inhibition of Bacterial Adhesion and Antibiofilm Activities of a Glycolipid Biosurfactant from Lactobacillus rhamnosus with Its Physicochemical and Functional Properties*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1546. <https://doi.org/10.3390/antibiotics1012>
47. Reisner, A., Krogfelt, K. A., Klein, B. M., Zechner, E. L., & Molin, S. (2006). *In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic Escherichia coli strains: impact of environmental and genetic factors*. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3572–3581. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3572-3581.2006>

48. Rafique, M., Hayat, K., Mukhtar, T., Amna, Aa, K., Ms, A., Hussain, T., Sultan, T., Mfh, M., Imran, M., & Hj, C. (2015). *Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens*. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances And Educational Programs. 373-382
Disponble en:
https://www.researchgate.net/publication/282440188_Bacterial_biofilm_formation_and_its_role_against_agricultural_pathogens . Consultado el 26 de febrero del 2024.
49. Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*. Biomédica, 22(2), 106.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>
50. Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V., Coaker, G. L., & Leveau, J. H. J. (2012). *Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce*. The ISME Journal, 6(10), 1812-1822. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.32>
51. Rodríguez-Chávez, J. L., Juárez-Campusano, Y. S., Delgado, G., Pacheco, J. R. (2019). *Identification of lipopeptides from Bacillus strain Q11 with ability to inhibit the germination of Penicillium expansum, the etiological agent of postharvest blue mold disease*. Postharvest Biology and Technology. 155 (2019) 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.011>
52. Rodríguez, C., & Del Rocío, E. M. (2015). *Plata coloidal: xenobiótico, antígeno y disruptor hormonal*. REB. Revista de Educación Bioquímica, 34(1), 10-25. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2015/reb151c.pdf>
53. Salgado-Escobar, I., Hernández-Rodríguez, G., Del Carmen Suárez-López, Y., Mancera-Ugarte, M. J., & Guerra-Ramírez, D. (2020). *Eficacia de métodos de desinfección y los efectos sobre las propiedades nutraceuticas en cilantro y fresa*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 11(2), 327-337. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.1892>
54. Solanki M., Solanki A., Kumaric, B., Kashyapd, B. & Singhe, R. (2020). *Plant and soil-associated biofilm-forming bacteria: Their role in green agriculture*.

- New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms, Elsevier, 151-164, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00012-8>.
55. Sharma, D., Shovon, S. M., Jahan M.G S., Asaduzzaman A.K.M, Rahman, M. A, Biswas, K. K., Abe, N., Roy, N. (2013). *Antibacterial and cytotoxic activity of Bacillus methylotrophicus-SCS2012 isolated from soil*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2 (4) 2293-2307. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/236014960 ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF BACILLUS METHYLOTROPHICUS-SCS2012 ISOLATED FROM SOIL](https://www.researchgate.net/publication/236014960_ANTIBACTERIAL_AND_CYTOTOXIC_ACTIVITY_OF_BACILLUS_METHYLOTROPHICUS-SCS2012_ISOLATED_FROM_SOIL) . Consultado el 01 de marzo del 2024
 56. Shomura, T., Omoto, S., Ohba, K., Ogino, H., Kojima, M., & Inouye, S. (1980). *SF-1961, a new antibiotic related to bleomycin*. The Journal of antibiotics, 33(11), 1243–1248. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.1243>
 57. Saiyam, D., Dubey, A., Malla, M. A., & Kumar, A. (2024). *Lipopeptides from Bacillus: unveiling biotechnological prospects-sources, properties, and diverse applications*. Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 55(1), 281–295. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01228-3>
 58. The Interagency Food Safety Analytics Collaboration (Colaboración Interinstitucional para el Análisis de la Inocuidad Alimentaria; IFSAC), (2023). *Estimaciones de la atribución de fuentes de enfermedades transmitidas por alimentos para Salmonella, Escherichia coli O157 y Listeria monocytogenes — Estados Unidos, 2021*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ifsac/media/pdfs/P19-2021-report-TriAgency-508.pdf> . Consultado: 16 de noviembre del 2024.
 59. Tolker-Nielsen T. (2015). *Biofilm Development*. Microbiology Spectrum, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>
 60. Tatsika, S., Karamanoli, K., Karayanni, H., & Genitsaris, S. (2019). Metagenomic Characterization of Bacterial Communities on Ready-to-Eat Vegetables and Effects of Household Washing on their Diversity and

- Composition. Pathogens, 8(1), 37.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8010037>
61. Tomičić, R., Tomičić, Z., Nićetin, M., Knežević, V., Kocić-Tanackov, S., & Raspor, P. (2023). *Food grade disinfectants based on hydrogen peroxide/peracetic acid and sodium hypochlorite interfere with the adhesion of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes to stainless steel of differing surface roughness*. Biofouling, 39(9-10), 990-1003.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2288886>
62. Van Hasselt, P., Gashe, B. A., & Ahmad, J. (2004). *Colloidal silver as an antimicrobial agent: fact or fiction*. Journal of Wound Care, 13(4), 154–155.
<https://doi.org/10.12968/jowc.2004.13.4.2>
63. Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*. Revista Mexicana de Fitopatología (En Línea) /Revista Mexicana de Fitopatología, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
64. Yadav, R. K. P., Papatheodorou, E. M., Karamanoli, K., Constantinidou, H. A., & Vokou, D. (2008). *Abundance and diversity of the phyllosphere bacterial communities of Mediterranean perennial plants that differ in leaf chemistry*. Chemoecology, 18(4), 217-226. <https://doi.org/10.1007/s00049-008-0408-1>
65. Yaron, S., & Römling, U. (2014). *Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence*. Microbial biotechnology, 7(6), 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>
66. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. Journal of Bacteriology, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
67. World Health Organization: WHO. (2019). *Dieta sana*. Consultado el 16 de septiembre del 2025. Disponible en: https://www.who.int/es/health-topics/healthy-diet#tab=tab_2

