



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE
LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**“EFECTO DE *Bacillus* spp. EN EL CONTROL DE *Salmonella* Y
EN EL CRECIMIENTO DE GERMINADO DE ALFALFA”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

IQAI. JUDITH MARCELA SALAZAR LÓPEZ

DIRIGIDA POR:

DRA. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., DICIEMBRE 2017.



Universidad Autónoma de Querétaro.
Facultad de Química.
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

“EFECTO DE *Bacillus* spp. EN EL CONTROL DE *Salmonella* Y EN EL
CRECIMIENTO DE GERMINADO DE ALFALFA”

TESIS

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

Presenta:
I.Q.AI. JUDITH MARCELA SALAZAR LÓPEZ

Dirigido por:
DRA. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA

SINODALES

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Presidente


Firma


Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Asesor


Firma

Dra. María del Pilar Escalante Minakata
Asesor



Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Asesor


Firma

Dra. Rocío Morales Rayas
Asesor


Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Diciembre 2017
Querétaro, Qro. México

RESUMEN

Durante la germinación de las semillas de alfalfa se generan condiciones ideales de crecimiento de microorganismos, que incluyen a las bacterias patógenas, por ello es necesaria la búsqueda de una alternativa natural y efectiva que se pueda aplicar durante el proceso para que se asegure la inocuidad de los germinados de alfalfa y que además, incremente el rendimiento de éstos sin afectar las características sensoriales. Es por ello, que el objetivo fue evaluar el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* HZ18 contra *Salmonella* y sobre el crecimiento de plántulas de alfalfa durante la germinación de semillas de alfalfa. Se evaluó la actividad antagónica de HZ18 contra *Salmonella* y de promoción de crecimiento durante la germinación mediante la aplicación de cuatro tipos de riego con HZ18: A) las primeras 24 h, B) las primeras 48 h, C) los días 1 y 3 de germinación y D) con metabolitos secundarios de HZ18; diariamente se cuantificó la población de *Salmonella*, se midió el tamaño de las plántulas, se determinó el porcentaje de germinación y se obtuvo el peso del germinado. Al finalizar la germinación de semillas de alfalfa se obtuvo una reducción de la población de *Salmonella* con respecto al control de 4.3, 3.45, 2.19 y 1.62 Log UFC/g con los tratamientos A, B, C y D, respectivamente. La aplicación de HZ18 no disminuyó el porcentaje de germinación, los cuatro tratamientos aumentaron la longitud de las plántulas con respecto al control ($p < 0.05$), e incrementaron los rendimientos de los germinados (46.44, 23.59, 36.39 y 18.69 % con A, B, C y D, respectivamente). Además, se determinó la producción de ácido indol acético y de giberelinas en cultivos de HZ18, resultando concentraciones de 1.30-6.55 $\mu\text{g/mL}$ y 25.35-1635.12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. *B. subtilis* HZ18 logró reducir considerablemente a *Salmonella* y fue una buena alternativa para incrementar el rendimiento del germinado de alfalfa.

Palabras clave: antagonismo, promoción de crecimiento, germinado de alfalfa.

ABSTRACT

During the germination of alfalfa seeds, the conditions favors the growth of microorganisms that includes pathogens. Thus, is necessary to seek for a natural and effective alternative that could be applied during the process to ensure its microbial safety and increase its yield. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* HZ18 on *Salmonella* and on the growth of alfalfa seedlings during seed germination. The antagonistic activity of HZ18 against *Salmonella* and of growth promotion during the alfalfa seed germination was evaluated at different irrigation time with HZ18: A) the first 24 h, B) the first 48 h, C) on days 1 and 3 of germination and D) with secondary metabolites from HZ18. Plate count of *Salmonella* was carried out daily and measurement of the size of seedlings, determination of the percentage of germination and weight of sprouts at the end of the process were obtained. A reduction of *Salmonella* population with respect to the control at the end of the germination of 4.3, 3.45, 2.19 and 1.62 Log CFU/g with treatments A, B, C and D, respectively, was observed. Application of HZ18 did not decrease the percentage of germination, the four treatments increased the length of the seedlings ($p < 0.05$), and the germination yield increased (46.44, 23.59, 36.39 and 18.69% with A, B, C and D, respectively). Then, the production of indole acetic acid and gibberellins were determined in HZ18 cultures; the concentrations range were 1.30-6.55 $\mu\text{g/mL}$ and 25.35-1635.12 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results showed that *B. subtilis* HZ18 was able to reduce considerably *Salmonella* population and increase the yield of alfalfa sprouts.

Key words: antagonism, growth promotion, alfalfa sprouts.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Páginas
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Germinados de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	3
2.1.1. Producción de germinados	3
2.1.2. Calidad de germinados de alfalfa	4
2.1.3. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas	5
2.1.4. Hormonas promotoras del crecimiento de plantas producidas por bacterias	8
2.1.4.1. Giberelinas (GAs)	8
2.1.4.2. Ácido indol acético (AIA)	9
2.2. Microbiología de los germinados	10
2.3. Brotes asociados al consumo de germinados de alfalfa	11
2.4. Medidas de control para reducir la carga microbiana en germinados de alfalfa	12
2.4.1. Tratamientos químicos	15
2.4.2. Tratamientos físicos	17
2.4.3. Biocontrol	19
2.5. Antagonismo microbiano	19
2.5.1. Microorganismos antagonistas	20
2.5.1.1. <i>Bacillus</i> sp.	21
2.5.2. Producción de metabolitos secundarios	22
2.5.2.1. Producción de bacteriocinas	23
2.5.3. Técnicas de identificación y caracterización de	

metabolitos secundarios	26
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. METODOLOGÍA	31
4.1. Materiales	31
4.1.1. Reactivos	31
4.1.2. Medios de cultivo	31
4.1.3. Equipo	32
4.1.4. Material biológico	32
4.2. Métodos	33
4.2.1. Evaluación del efecto antimicrobiano de cepas de <i>Bacillus</i> spp. y sus metabolitos secundarios contra <i>Salmonella</i> mediante pruebas de antagonismo de difusión en pozo	33
4.2.1.1. Preparación del inóculo de cepas antagonistas	33
4.2.1.2. Obtención de sobrenadante de las cepas antagonistas	33
4.2.1.3. Prueba de antagonismo de difusión en pozo	34
4.2.1.4. Evaluación del efecto de la temperatura y del medio de cultivo en la actividad antagónica de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Salmonella</i>	34
4.2.2. Evaluación del efecto antagónico de <i>B. subtilis</i> HZ18 y sus metabolitos secundarios contra <i>Salmonella</i> durante la germinación de semillas de alfalfa	35
4.2.2.1. Obtención de la suspensión de <i>B. subtilis</i> HZ18	35
4.2.2.2. Obtención de metabolitos secundarios de <i>B. subtilis</i> HZ18	35
4.2.2.3. Efecto de <i>B. subtilis</i> HZ18 y sus metabolitos secundarios contra <i>Salmonella</i> durante la	

germinación de semilla de alfalfa	35
4.2.3. Evaluación de efecto de <i>B. subtilis</i> HZ18 y sus metabolitos secundarios en el crecimiento de germinados de alfalfa	37
4.2.4. Identificación y cuantificación de compuestos promotores del crecimiento de germinados de alfalfa producidos por <i>B. subtilis</i> HZ18	37
4.2.4.1. Producción de giberelinas por <i>B. subtilis</i> HZ18 en medios de cultivo	37
4.2.4.1.1. Extracción de giberelinas a partir de medios de cultivo	37
4.2.4.1.2. Identificación de giberelinas por cromatografía en capa fina	38
4.2.4.1.3. Ensayo de actividad biológica de giberelinas	38
4.2.4.1.4. Cuantificación de giberelinas mediante HPLC-PDA	38
4.2.4.1.5. Identificación de giberelinas con UPLC-MS	39
4.2.4.2. Producción de ácido indol acético por <i>B. subtilis</i> HZ18	40
4.2.5. Análisis estadístico.	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. Efecto antimicrobiano de cepas de <i>Bacillus</i> spp. y sus metabolitos secundarios contra <i>Salmonella</i> mediante pruebas de antagonismo de difusión en pozo	42
5.1.1. Actividad antagónica de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Salmonella</i>	42
5.1.2. Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Salmonella</i>	46
5.1.3. Efecto de la temperatura y del medio de cultivo en la actividad antagónica de cepas de <i>Bacillus</i> spp. contra	

<i>Salmonella</i>	49
5.2. Efecto de <i>B. subtilis</i> HZ18 y sus metabolitos secundarios contra <i>Salmonella</i> durante la germinación de semilla de alfalfa	53
5.3. Efecto de <i>B. subtilis</i> HZ18 y sus metabolitos secundarios en el crecimiento de germinados de alfalfa	60
5.4. Identificación y cuantificación de compuestos promotores del crecimiento de germinados de alfalfa producidos por <i>B. subtilis</i> HZ18	65
5.4.1. Producción de giberelinas por <i>B. subtilis</i> HZ18	65
5.4.2. Producción de ácido indol acético por <i>B. subtilis</i> HZ18	80
6. CONCLUSIONES	82
7. BIBLIOGRAFÍA	84
8. ANEXO	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas		Página
1	Brotos asociados al consumo de germinados en los Estados Unidos durante el periodo de 1998 a 2014.	12
2	Serotipos de <i>Salmonella</i> identificados en brotes en los últimos siete años asociados al consumo de germinados de alfalfa en Estados Unidos.	13
3	Gradiente de concentración para la separación de compuestos en HPLC.	39
4	Gradiente de concentración para separación de giberelinas en UPLC-MS.	40
5	Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de células de <i>Bacillus</i> contra <i>Salmonella</i> .	43
6	Actividad antagónica de metabolitos secundarios producidos por cepas de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Salmonella</i> .	47
7	Efecto antagónico de cepas de <i>Bacillus</i> incubadas a 35°C en diferentes medios de cultivo contra <i>Salmonella</i> .	51
8	Efecto antagónico de cepas de <i>Bacillus</i> incubadas a 30°C en diferentes medios de cultivo contra <i>Salmonella</i> .	52
9	Rendimiento de germinado de alfalfa después de la aplicación de <i>B. subtilis</i> HZ18 o de sus metabolitos secundario.	63
10	Valores de movilidad cromatográfica (Rf) de los extractos de giberelinas producidos por <i>B. subtilis</i> HZ18 en diferentes medios de cultivo.	67
11	Azúcares reductores en semillas de cebada después de la actividad de giberelinas producidas por <i>B. subtilis</i> HZ18.	68
12	Producción de giberelinas por <i>B. subtilis</i> HZ18 en diferentes medios de cultivo.	71
13	Producción de giberelinas por cepas de <i>Bacillus</i> .	71
14	Espectros de masas reportados para AG ₇ y AG ₉ .	75

15	Producción de AIA por <i>B. subtilis</i> HZ18 en diferentes medios de cultivo.	81
16	Producción de ácido indol acético por cepas de <i>Bacillus</i> .	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Etapas de la producción de germinados	4
2	Comportamiento de <i>Salmonella</i> y BMA durante la germinación de semilla de alfalfa regado con <i>B. subtilis</i> HZ18 (6 Log UFC/mL.	56
3	Incremento de la población de <i>Salmonella</i> en el sexto día de germinación de semilla de alfalfa con los diferentes tipos de riego.	57
4	Efecto de la aplicación de <i>B. subtilis</i> HZ18 y sus metabolitos secundarios en la promoción del crecimiento de germinados de alfalfa.	61
5	Cromatografía en capa fina de giberelinas producidas por <i>B. subtilis</i> HZ18 en diferentes medios de cultivo.	66
6	Cromatograma del extracto de giberelinas producidas por <i>B. subtilis</i> HZ18 en CST y AG ₃ .	70
7	Estructura del ácido giberélico.	73
8	Cromatograma y espectro TOF-MS/MS de AG ₃ .	76
9	Cromatograma y espectro TOF-MS/MS del extracto de <i>B. subtilis</i> HZ18 en CST.	77
10	Cromatograma y espectro TOF-MS/MS del extracto de <i>B. subtilis</i> HZ18 en CST Trp (a).	78
11	Cromatograma y espectro TOF-MS/MS del extracto de <i>B. subtilis</i> HZ18 en CST Trp (b).	79

1. INTRODUCCIÓN

Los germinados de semillas se consumen crudos como componentes de ensaladas, siendo los de alfalfa los más populares. La ventaja adicional de una semilla germinada es su calidad nutricional; ya que durante la germinación se incrementa la biodisponibilidad de proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, carbohidratos y minerales. Sin embargo, la ingesta de germinados puede representar un riesgo para la salud del consumidor, ya que éste puede apoyar el crecimiento de microorganismos patógenos debido a las condiciones favorables que se generan durante la germinación de la semilla. Este tipo de alimentos se ha visto asociado a brotes de enfermedad alrededor del mundo, siendo *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 los microorganismos patógenos frecuentemente encontrados; tan sólo en Estados Unidos, el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) reportó 20 brotes relacionados al consumo de germinados de alfalfa en el periodo de 1998 a 2016, donde los agentes etiológicos fueron diversos serotipos de *Salmonella*. El control de patógenos en los germinados se lleva a cabo principalmente con la aplicación de desinfectantes. La desinfección efectiva de los germinados usualmente no se logra, pues resulta muy difícil eliminar la carga inicial de las bacterias patógenas de las semillas, y las células que logran sobrevivir se multiplican rápidamente durante la germinación y el almacenamiento. El uso de compuestos químicos convencionales como el cloro no ha sido efectivo, y además se ha restringido su uso en algunos países debido a los efectos carcinogénicos y teratogénicos en humanos. La búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas de origen natural e inocuas que puedan ser aplicadas a los germinados es una necesidad. Una alternativa que ha ganado popularidad y es bastante prometedora es el uso de antagonistas microbianos o de sus metabolitos secundarios. Especies del género *Bacillus* tienen características especiales que los hace buenos candidatos como agentes antagonistas, ya que son bien conocidos por producir bacteriocinas y antibióticos contra patógenos bacterianos y, además producen compuestos promotores del crecimiento de plantas. Estos últimos son sintetizados

en pequeñas cantidades y modifican el crecimiento y desarrollo de las plantas; dentro de los más reportados se destaca a las giberelinas, el ácido indol acético y las citoquininas.

Una gran cantidad de estudios se han realizado para determinar la capacidad antagónica de cepas de *Bacillus* principalmente contra microorganismos fitopatógenos; sin embargo, contra bacterias patógenas a humanos no ha sido ampliamente estudiado. Por otro lado, también se han evaluado los efectos benéficos directos sobre el rendimiento y crecimiento de plantas, desafortunadamente, se carece de información sobre ambos efectos asociados solamente a una cepa de *Bacillus* en germinados de alfalfa. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Bacillus* spp. contra *Salmonella* y sobre el crecimiento de plántulas de alfalfa mediante pruebas *in vitro* y durante la germinación de semillas de alfalfa.

2. ANTECEDENTES

2.1. Germinados de alfalfa (*Medicago sativa*)

2.1.1. Producción de germinados

La germinación es el proceso mediante el cual se incorporan aquellos eventos que inician con la absorción de agua por la semilla seca y terminan con la elongación del eje embrionario. El proceso concluye cuando la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean al embrión, lo que frecuentemente se conoce como “germinación visible” (Villalobos, 2006).

El proceso de germinación se divide en tres fases: a) en la fase I ocurre la imbibición, que consiste en la absorción del agua necesaria para la rehidratación de proteínas y organelos celulares, así como para el transporte y para que acurran las reacciones hidrolíticas. b) En la fase II se produce la activación del metabolismo, donde ocurre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. También se incrementan las actividades enzimáticas, así como la degradación inicial de las reservas. c) Finalmente, en la fase III tiene lugar la emergencia de la radícula, concluyendo el proceso germinativo (Villalobos, 2006).

La producción de germinado se lleva a cabo en una serie de etapas (Figura 1). Algunos productores pueden omitir o añadir alguna de ellas dependiendo de la semilla, el tamaño y los recursos del productor y el tipo de cultivo (CDC, 2000).

Para que la germinación se lleve a cabo son necesarios algunos factores externos como la humedad, el oxígeno y una temperatura adecuada para los procesos metabólicos (FDA, 2004).

La absorción de agua es el primer paso y el más importante que tiene lugar durante la germinación, ya que para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La entrada de agua a las semillas se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que la rodea. Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las

semillas, un exceso actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión (Nieto, 2005).

La temperatura es el factor decisivo en el proceso de germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La mayoría de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de oxígeno (Nieto, 2005).

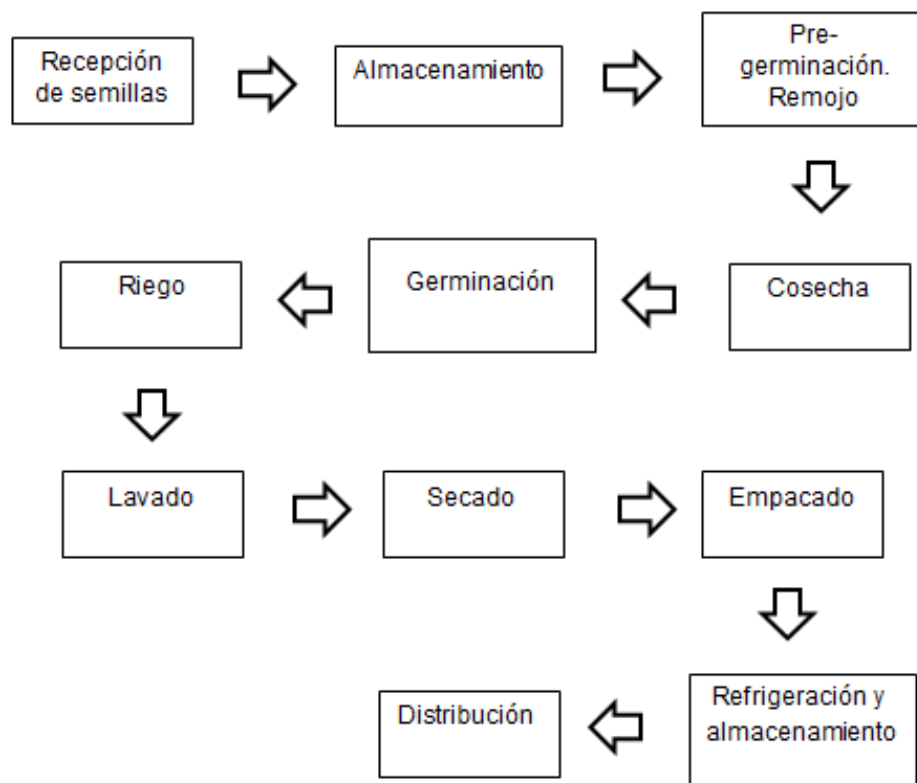


Figura 1. Etapas en la producción de germinados

2.1.2. Calidad de germinados de alfalfa

La producción de germinados implica un conjunto de mecanismos metabólicos y morfogenéticos mediante los cuales un embrión se transforma en una nueva plántula capaz de valerse por sí misma (Nieto, 2005). Antes de la germinación, las semillas absorben agua, resultando en la expansión y elongación

del embrión; cuando la radícula ha crecido fuera de la testa, el proceso de germinación es completado.

Los germinados se han caracterizado por tener un hipocótilo (tallo) y pequeños cotiledones inmaduros (hojas) que pueden emerger en pares o impares dependiendo de la planta; los cuales para su consumo humano son seleccionados por sus características de calidad (tamaño y sensorial) (Fan *et al.*, 2003). En los Estados Unidos, los germinados mayormente consumidos son los de alfalfa, los cuales se caracterizan por tener tallos estrechos blancos y pequeñas hojas de color verde oscuro, la cosecha de éstos se realiza a los 6 o 7 días de la germinación cuando las plántulas tienen una longitud entre 3.8 y 5 cm; el rendimiento que se obtiene de germinado es aproximadamente de 5 veces el peso de la semilla de alfalfa (Bosques, 2003; Baker, 2016).

Raíz corta y brotes largos son atributos de calidad deseables de los germinados de alfalfa para consumo humano. En la actualidad, existe la búsqueda de alternativas naturales y efectivas que ayuden a incrementar el rendimiento de los germinados de alfalfa y que generen productos de excelente calidad (Palomaque *et al.*, 2017). Dentro de las opciones que se han estudiado se incluye la obtención de semillas de buena calidad desde la siembra y la adición de fertilizantes sintéticos a los cultivos, sin embargo éstos presentan una baja eficiencia para ser asimilados (menor al 50 %) (Bojórquez *et al.*, 2010), pueden tener efectos nocivos a la salud y pueden dañar el medio ambiente (Dalal y Kulkarni, 2013). Debido a que, la tendencia es hacia el consumo de alimentos orgánicos libres de compuestos químicos, una alternativa prometedora para aumentar el rendimiento es la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento de plantas.

2.1.3. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas

En la naturaleza, las raíces de las plantas interactúan con un gran número de microorganismos diferentes. Estas interacciones, junto con el suelo y la condición

climática determinan el grado en que las plantas crecen y se propagan. Entre los microorganismos del suelo, varios géneros bacterianos estimulan la proliferación de las raíces y protegen a las plantas, estos microorganismos se denominan Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (BPCP) y representan una gran variedad de microorganismos que tienen el potencial de aumentar el crecimiento a través de la activación de diferentes mecanismos en las células de las plantas (Joo *et al.*, 2004; Peña-Yam *et al.*, 2016). Dentro de los mecanismos que se han reportado se incluyen: la liberación de hormonas vegetales, enzimas y sideróforos (Miransari y Smith, 2014), la fijación de nitrógeno en la rizósfera, la solubilización de nutrientes como fosfato, la promoción de la función micorrízica en las raíces y la regulación de la producción de etileno también en las raíces. Además, está bien establecido que algunas de estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar rápidamente la rizósfera y de suprimir los principales patógenos de las plantas (Joo *et al.*, 2004).

Con mayor frecuencia, las BPCP se han utilizado a nivel mundial en la agricultura sostenible como fertilizantes biológicos. Muchos estudios se han llevado a cabo para determinar los efectos benéficos directos sobre el rendimiento y crecimiento de las plantas (Turan *et al.*, 2014); sin embargo, no se ha explotado el uso de estos microorganismos en la producción de germinados de alfalfa. Dentro de las BPCP se encuentran principalmente diversas especies del género *Bacillus* (Solis *et al.*, 2014).

El género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a que contiene cientos de especies que en muchas ocasiones se encuentran asociadas a plantas ejerciendo un efecto positivo en el crecimiento de éstas. El ciclo de vida de *Bacillus* se divide en dos fases: el crecimiento vegetativo y la esporulación. Durante la primera fase, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio en donde las condiciones son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a escasear empieza la segunda fase, en la cual, la bacteria esporula, formando una endospora, la cual puede permanecer viable en el ambiente por largos periodos de

tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para volver a su forma vegetativa (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, hormonas de crecimiento vegetal, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno en la primera fase del ciclo (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Las cepas de *Bacillus* que han permitido ampliar el conocimiento en cuanto a la promoción de crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos incluyen: *B. megaterium* UMCV1, *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IB937a y FZB45, *B. cereus* L254, *B. simplex* L266, *Bacillus* sp. L272a y *B. thuringiensis* UM96 (Solis *et al.*, 2014).

Reetha *et al.* (2014) estimularon positivamente el crecimiento de brotes de cebolla mediante la inoculación de *Pseudomonas fluorescens* y *B. subtilis* con respecto al control (27.41, 25.30 y 25.10 cm, respectivamente). Por otro lado, Peña-Yam *et al.* (2016) aplicaron las cepa de *B. subtilis* MA12 y MA17 a chile pimiento morrón cv. Jalapeño y observaron que ambos microorganismos incrementaron la biomasa de las plántulas en 37 y 16 %, respectivamente. Joo *et al.* (2004) reportaron que *B. pumilus* tuvo la capacidad de promover significativamente el crecimiento de la planta de pimiento rojo mediante la producción de giberelinas. Lim y Kim (2009) estimularon la germinación de semillas y crecimiento de la raíz de pimiento verde, tomate, cebolla verde y espinaca mediante la aplicación de *B. licheniformis* K11 y *B. subtilis* AH18; también observaron que cuando aplicaron simultáneamente una combinación de las auxinas AH18 y K11, las tasas de crecimiento de pimiento y tomate fueron 20 % más altas que las observadas con el tratamiento sin auxinas.

2.1.4. Hormonas promotoras del crecimiento de plantas producidas por bacterias

Similar a las plantas, los microorganismos, incluyendo las BPCP también son capaces de producir hormonas vegetales como metabolitos secundarios. Se especula que la producción de hormonas vegetales puede tener un origen procariota. Esto es porque los genes algunas veces son intercambiados entre los dos organismos (plantas y microorganismos). Estas hormonas son utilizadas como sustancias promotoras del crecimiento de plantas al momento de que son inoculadas en la planta huésped (Miransari y Smith, 2014).

En años recientes, los metabolitos secundarios que son específicamente sintetizados por *Bacillus* se han vuelto muy importantes en la biotecnología (Karadeniz *et al.*, 2006). Un grupo de esos metabolitos secundarios son los reguladores (hormonas) de crecimiento vegetal (Turan *et al.*, 2014), que son producidos en pequeñas cantidades y que modifican el crecimiento y desarrollo de las plantas (Castro *et al.*, 2013), dentro de las más reportadas se destaca a las giberelinas (GAs) (Joo *et al.*, 2004), el ácido indol-3-acético (AIA) (Peña-Yam *et al.*, 2016) y las citoquininas (Solis *et al.*, 2014).

2.1.4.1. Giberelinas (GAs)

Las giberelinas son diterpenoides cíclicos que regulan el crecimiento de plantas. Fueron aisladas primeramente a partir del producto del metabolismo del hongo patógeno del arroz, *Gibberella fujikuroi* en 1938. La biosíntesis de giberelinas es a partir de geranildifosfato a través de una ruta que incluye varias enzimas, son reguladas negativamente por las proteínas DELLA, tienen un dominio GRAS C-terminal en su estructura y son eventualmente degradadas por la ubiquitina ligasa E3 (Miransari y Smith, 2014).

Se ha reportado que las GAs participan en varios procesos fisiológicos de las plantas, incluyendo: la elongación del tallo mediante la estimulación del

alargamiento y división celular, la estimulación de la fijación-floración en respuesta a los días largos, la expresión sexual, la estimulación de la producción enzimática (Joo *et al.*, 2004), el establecimiento de los frutos, el retraso de la senescencia en muchos órganos de una gran variedad de especies vegetales (Kapoor *et al.*, 2016) y en el ruptura de la latencia de semillas ya que aumentan el vigor y el porcentaje de germinación de las mismas (Wang *et al.*, 2016).

A pesar del efecto antagónico del ácido absísico, las giberelinas son capaces de liberar a las semillas de la dormancia (a pesar de que las hormonas no controlan la dormancia de las semillas) mediante el debilitamiento del endospermo, por la activación de los genes de giberelinas los cuales modifican las proteínas de la pared celular. Por lo cual, el endospermo de la semilla se pone a disposición del embrión (a través de síntesis de algunas enzimas hidrolasas, especialmente de α -amilasa), se hace parte del almidón de la semilla y de la capa aleurona, resultando en la germinación de las semillas (Miransari y Smith, 2014).

Hasta la fecha, se han identificado 126 GAs de plantas superiores (128 especies), 28 GAs de hongos (7 especies) y sólo 4 GAs (GA1, GA3, GA4 y GA20) de bacterias (7 especies) (Joo *et al.*, 2004).

2.1.4.2. Ácido indol acético (AIA)

El AIA es un auxina que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, el desarrollo y formación de tejidos vasculares, la inducción de la división celular (Miransari y Smith, 2014) y la diferenciación celular (Materán *et al.*, 2009).

Las auxinas por si mismas no son hormonas necesarias para la germinación de semillas. Sin embargo, según los análisis relativos a la expresión de los genes relacionados con auxina, ésta está presente en la punta de la radícula de la semilla durante y después de la germinación. Este proceso de control también es necesario para las etapas relacionadas con el crecimiento post-emergente, incluyendo la maduración de la semilla. Los mecanismos para tales efectos inhibitorios se han

atribuido a las interacciones con la ruta del ácido absólico. La acumulación de AIA en el cotiledón de la semilla es la mejor fuente de AIA para las plántulas. A pesar de que el AIA por sí mismo puede no ser importante para la germinación de la semilla, sus interacciones y cruces con las giberelinas puede influir en los procesos de germinación y establecimiento de las plantas (Miransari y Smith, 2014).

Se sabe que el AIA promueve la división, la elongación y la diferenciación celular apoyada por la acción de las giberelinas (GAs), particularmente en referencia a la activación del alargamiento de meristemas y restos sub-apicales, evitando el acortamiento de las zonas internodales (Materán *et al.*, 2009).

Las bacterias productoras de AIA frecuentemente poseen la enzima aminociclopropano carboxilato deaminasa (ACC), la cual reduce los niveles de etileno en la semilla, aumentando la germinación, y junto con la producción de AIA se estimula la división celular, de manera que, así se favorece el crecimiento del embrión. El AIA absorbido por las semillas y las raíces de las plantas también podría estimular la actividad de la ACC sintetasa, la cual está involucrada en la síntesis de etileno. Se ha reportado, que bajas concentraciones de etileno promueven el crecimiento de los pelos radicales de las plantas y así aumentan el área superficial de la raíz para una mayor absorción de nutrientes (Luna *et al.*, 2013).

2.2. Microbiología de los germinados de alfalfa

Las semillas germinadas cada vez son más populares en las dietas saludables debido a su alto valor nutritivo y otras propiedades como anticancerígeno y anticolesterolémico. A diferencia de otros productos frescos, la producción de los germinados implica un único proceso de germinación de las semillas y éste puede apoyar el crecimiento de microorganismos incluyendo a los patógenos (Jung *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2013).

Los microorganismos que están presentes en las semillas o que pueden introducirse durante el proceso de germinación crecen rápidamente debido a las condiciones favorables que se generan en el proceso como son: la disponibilidad de agua debido al riego, el pH del tejido de la planta y la abundancia de nutrientes disponibles. Si los patógenos están presentes, pueden incrementar exponencialmente de 2 a 6 Log UFC/g en los primeros días de germinación. Desafortunadamente, no hay una etapa en la producción de germinados tales como cocción o pasteurización que pueda reducir o eliminar agentes patógenos antes de su consumo (FDA, 2004).

Estudios realizados por Piernas y Guiraud, (1997) encontraron que el contenido microbiano de los germinados consistió principalmente de bacilos Gram negativos y Gram positivos, levaduras y hongos. Las bacterias mesófilas aerobias se detectaron en concentraciones que varían entre 7 y 9 Log UFC/g, las Enterobacteriaceae oscilaron entre 7 y 8 Log UFC/g, coliformes fecales, totales, levaduras y hongos variaron ampliamente entre 2 y 8 Log UFC/g.

2.3. Brotes asociados al consumo de germinados de alfalfa

Desde 1998 múltiples brotes han sido asociados al consumo de germinados crudos o ligeramente cocinados alrededor del mundo, los cuales se han relacionado con una amplia variedad de tipos de germinados, incluyendo, alfalfa, soya, frijol, berro y rábano (FDA, 2004; Ding *et al.*, 2013). *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 son los patógenos contaminantes más frecuentemente asociados a brotes de germinados (Ding *et al.*, 2013). El CDC (2016) reportó que entre los años de 1998 y 2014, se registraron 49 brotes en los Estados Unidos asociados con germinados, 25 de los cuales estuvieron relacionados con germinados de alfalfa y 18 de éstos debidos a diversos serotipos de *Salmonella* (Tabla 1).

Dentro de los germinados, los de alfalfa han sido los que con mayor frecuencia han estado implicados en brotes; sin embargo, puesto que todos los tipos de germinados se producen bajo condiciones similares, todos ellos (sin

cocinar) representan un riesgo microbiológico para el consumidor. En la mayoría de los brotes notificados, la fuente del patógeno fue la semilla contaminada (Hong y Kang, 2016); sin embargo, la calidad higiénica del agua de riego, el saneamiento deficiente, la falta de higiene en las instalaciones de germinación y el mal manejo por los operadores, también pueden contribuir a la contaminación de las semillas germinadas (FDA, 2004; Hong y Kang, 2016). En la Tabla 2 se muestran algunos brotes de *Salmonella* relacionados con la ingesta de germinados de alfalfa en los Estados Unidos en el periodo de 2009 a 2016.

Tabla 1. Brotes asociados al consumo de germinados en los Estados Unidos durante el periodo de 1998 a 2014.

	Germinados	Germinados de alfalfa*	Germinados de alfalfa contaminados con <i>Salmonella</i>
Brotes	49	25	18
Enfermos	1737	1014	943
Hospitalizados	178	91	80
Muertos	3	1	1

*Diversos agentes etiológicos incluido *Salmonella*.

2.4. Medidas de control para reducir la carga microbiana en germinados de alfalfa

Los microorganismos patógenos afectan la sanidad e inocuidad y son una amenaza importante y frecuente en la producción de alimentos y en la estabilidad del ecosistema en todo el mundo (Dalal y Kulkarni, 2013).

Uno de los principales problemas para la descontaminación de productos hortofrutícolas no es sólo la reducción de la carga inicial de las bacterias sino también evitar la multiplicación de las restantes células viables durante el almacenamiento (Molinos *et al.*, 2008; Neo *et al.*, 2013).

Tabla 2. Serotipos de *Salmonella* identificados en brotes ocurridos en los últimos siete años asociados al consumo de germinados de alfalfa en Estados Unidos.

Año	Serotipo de <i>Salmonella</i>	Lugar del brote	No. de casos	Fuente de contaminación
2016	Reading y Abony	Colorado, Kansas, Minnesota, Missouri, Nebraska, New York, Oregon, Texas, Wyoming	36	Desconocida
2016	Muenchen y Kentucky	Kansas, Maryland, Missouri, New Jersey, New York, Oklahoma y Pennsylvania	26	Semillas
2011	Enteritidis	Idaho, Montana, New Jersey, Dakota del Norte, Washintong	25	Semillas
2010	Newport	Oregon, Idaho, California, Nevada, Arizona, Nuevo México, Colorado Missouri, Illinois, Wisconsin	44	Semillas
2009	Saintpaul	Nebraska, Iowa, South Dakota, Michigan, Kansas, Pennsylvania, Minnesota, Ohio, Illinois y Virginia,	235	Semillas

(CDC, 2017)

Las principales medidas aplicadas en la desinfección de verduras frescas son los tratamientos físicos y químicos; sin embargo, el uso de compuestos químicos como el cloro, se ha restringido debido a sus efectos carcinogénicos, teratogénicos, residuabilidad alta y aguda, periodo largo de degradación, contaminación ambiental y otros efectos negativos en los alimentos y en humanos (Dalal y Kulkarni, 2013). Por otro lado, se tienen numerosos reportes que describen que la aplicación intensa de productos sintéticos (plaguicidas) generan resistencia en los microorganismos fitopatógenos (Bautista, 2006). La tendencia mundial parece estar cambiando hacia la reducción del uso de productos químicos y por lo tanto, muchas de las investigaciones científicas están dirigidas hacia la búsqueda de alternativas inocuas y ecológicas para reducir microorganismos patógenos a humanos y a plantas (Sharma *et al.*, 2009).

Se han llevado a cabo un gran número de estudios en los que se ha evaluado la efectividad de diversos tratamientos de desinfección para reducir la carga de microorganismos en semillas germinadas tales como: la aplicación de calor, ácidos orgánicos, agua ozonizada, agua electrolizada oxidante e irradiación. Desafortunadamente ningún tratamiento ha podido garantizar la eliminación completa de los microorganismos patógenos sin afectar negativamente la calidad organoléptica de los germinados, y sin influir fuertemente en el porcentaje y la velocidad de germinación (FDA, 2004; Jung *et al.*, 2009).

Para asegurar la inocuidad de los germinados la FDA recomienda: crecer las semillas para germinar con buenas prácticas agrícolas, acondicionar y almacenar las semillas bajo condiciones sanitarias, que las instalaciones de germinación tengan implementadas las buenas prácticas de manufactura, la aplicación de un tratamiento de desinfección a la semilla inmediatamente antes de la germinación y durante el proceso analizar el agua de riego del germinado para detectar la posible presencia de los patógenos de interés (Ding *et al.*, 2013).

Basado en los niveles de bacterias patógenas que se encuentran en las semillas asociadas a brotes de origen alimentario, el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) recomienda tratamientos de desinfección que aseguren una reducción de 5 Log del microorganismo patógeno para asegurar su inocuidad. Los métodos de desinfección química difícilmente logran este nivel de seguridad a diferencia de la cocción o pasteurización (en dónde se eliminan a los patógenos) (FDA, 2004).

Aún con estas recomendaciones, los brotes asociados a germinados no han sido controlados. Es por ello, que es importante examinar la eficacia de diferentes tratamientos antimicrobianos emergentes no sólo en la desinfección de la semilla sino a lo largo del proceso de germinación, para reducir la contaminación microbiana (Ding *et al.*, 2013). En muchos casos, los productores confían en métodos alternativos incluyendo desinfectantes o productos químicos con umbrales

bajos de residuos, métodos físicos, atmósferas controladas y el control biológico (Eshel *et al.*, 2009).

El uso de bioconservadores y antagonistas microbianos se ha investigado repetidamente como un medio de preservación de la inocuidad microbiológica de productos frescos y mínimamente procesados. La bioconservación se utiliza con el fin de prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos que puedan ingresar mediante contaminación cruzada a productos con el mínimo procesamiento o sin el uso de otras intervenciones químicas (Cálix-Lara *et al.*, 2014). Entre los diferentes métodos biológicos, el uso de antagonistas microbianos como levaduras, hongos y bacterias son bastante prometedores y han ido ganado popularidad (Sharma *et al.*, 2009).

2.4.1. Tratamientos químicos

Una herramienta clásica contra la contaminación con patógenos, ha sido el uso de productos químicos; sin embargo su eficacia podría estar limitada por el grado de exposición de los patógenos a éstos.

Para asegurar la inocuidad de los germinados, la FDA recomienda desinfectar las semillas con 20 000 ppm de hipoclorito de calcio antes de la germinación; no obstante, este compuesto químico puede corroer los equipos de metal y potencialmente puede producir humos tóxicos y, además requiere de estrictas precauciones en la manipulación (Hong y Kang, 2016). Sin embargo, los productores de germinados no aceptan ese tratamiento, en parte debido a la preocupación por la seguridad del trabajador y también por el impacto desfavorable al medio ambiente. De hecho, algunos autores sostienen que dicho tratamiento de desinfección de germinados no es coherente con la producción de semillas germinadas “orgánicas”, y debido a eso, su uso no está permitido en algunos países como Alemania. Algunos países y sus empresas de germinados están adoptando tratamientos alternativos. Por ejemplo, Japón uno de los principales

países consumidores de germinados utiliza un tratamiento térmico para la desinfección de éstos (Ding *et al.*, 2013).

Algunos agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio, el peróxido de hidrógeno, el ozono, el fosfato de trisodio y el ácido peracético han sido ampliamente estudiados en la desinfección de germinados. Sin embargo, su eficacia es similar a la del hipoclorito de calcio, y la mayoría de estos tratamientos sólo pueden conseguir una reducción moderada de los patógenos (< 3.5 Log UFC/g) (Ding *et al.*, 2013).

Neo *et al.* (2013) reportan sólo una reducción de 1.6 Log UFC/g cuando germinados de trigo se desinfectaron con cloruro de calcio a 20 000 ppm durante 15 min, lo que indicó la ineficacia del tratamiento con cloro. Por lo tanto, se deben explorar desinfectantes alternativos para aumentar la eficiencia de la inactivación de microorganismos patógenos sin impactos a la salud.

Uno de estos desinfectantes (actualmente aprobado por la FDA) es el ácido peracético (APA), su eficacia no depende de las fluctuaciones del pH, el efecto desinfectante no disminuye en presencia de materia orgánica, no forma productos perjudiciales; y si hay un exceso, éste se descompone en ácido acético y oxígeno; sin embargo, no ha demostrado ser efectivo en la desinfección de germinados. Neo *et al.* (2013) evaluaron la eficacia de diferentes concentraciones de ácido peracético en la desinfección de germinado de soya contaminado con *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. encontrando reducciones de 1.5-2.3 Log, 1.0-1.8 Log y 1.0-2.1 Log UFC/g, respectivamente, utilizando el ácido a una concentración de 70 ppm durante 80 s.

Hong y Kang (2016) evaluaron la eficacia de tratamientos secuenciales de calor seco a diferentes temperaturas y peróxido de hidrógeno al 2% para la eliminación de *S. Typhimurium* en semillas de alfalfa, encontrado que las poblaciones de *Salmonella* en las semillas tratadas con calor seco se redujeron

0.26-1.76 Log UFC/g, y con el tratamiento secuencial de peróxido de hidrógeno se redujo 1.66-3.60 Log UFC/g, sin afectar la tasa de germinación de las semillas.

A la fecha, la eficacia de los productos químicos no ha demostrado ser lo suficientemente adecuada para la inactivación de patógenos adheridos a las semillas. Algunos autores concluyen que lo anterior es debido a que las grietas y hendiduras en la superficie de las semillas albergan a los microorganismos patógenos, de manera que al realizar la desinfección, los compuestos químicos no entran en contacto directo con los patógenos (Hong y Kang, 2016), por lo cual, es una de las grandes preocupaciones en la industria de los germinados (Buck *et al.*, 2003).

2.4.2. Tratamientos físicos

Entre los métodos físicos, los tratamientos con calor y con alta presión se han utilizado para la inactivación microbiana en germinados. La adopción de estas estrategias parece ser prometedor, además de que son amigables con el medio ambiente (Ding *et al.*, 2013).

El objetivo principal de los tratamientos térmicos es la inactivación de microorganismos patógenos y esporas (dependiendo del tratamiento) para proporcionar a los consumidores un producto microbiológicamente seguro. Sin embargo, a pesar de los beneficios del tratamiento térmico, una serie de cambios tienen lugar en los germinados lo cual altera su calidad final, por ejemplo, sabor, color, textura y aspecto general (Barbosa y Bermúdez, 2010).

Trabajos recientes sobre el uso de calor para la desinfección, implican el tratamiento de semillas con agua caliente a 85 °C durante 10 s logrando una reducción bacteriana de aproximadamente 3 Log UFC/g, sin una reducción significativa de la tasa de germinación, sin embargo, este tratamiento sólo es aplicado a las semillas, ya que por las características organolépticas que el

consumidor busca en un germinado no es posible su aplicación en el producto terminado (Ding *et al.*, 2013).

La necesidad de alternativas que puedan lograr la inactivación microbiana, la conservación de alimentos con características similares al fresco, y ofrecer productos ecológicos, todo ello a un costo razonable, se ha convertido en el reto actual de numerosos científicos y tecnólogos de alimentos en el mundo. Las tecnologías no térmicas representan una nueva área de procesamiento de alimentos y se están estudiando actualmente en una escala global. Estas nuevas tecnologías son muy atractivas para ser utilizados en combinación, ya sea entre ellas o con las tradicionales buscando sinergismos para optimizar la calidad total de los alimentos. Una de las tecnologías no térmicas que ha mostrado un efecto insignificante sobre las características sensoriales y de la composición de los alimentos, por ejemplo en el procesamiento de frutas y verduras, es el uso de alta presión hidrostática. Otras de las tecnologías no térmicas aplicadas en algunos procesos son ultrasonido, campos eléctricos pulsados, campos magnéticos oscilantes, radiación, luz ultravioleta, plasma frío, así como el uso de envases inteligentes. Ya varias de estas tecnologías han sido probadas con éxito en la inactivación microbiana (Barbosa y Bermúdez, 2010).

La irradiación ha sido probada y aprobada para la desinfección de semillas por la FDA. Aunque la dosis máxima para el tratamiento es de 8 kGy, la mayoría de los estudios utilizan 2 o menos kGy como tratamiento aceptable en semillas destinadas a germinar. La irradiación en un rango de 1.5 a 2 kGy puede reducir la población bacteriana en 3.18 Log UFC/g; sin embargo, el impacto sobre el porcentaje de germinación de la semilla, el rendimiento y la potencial pérdida de nutrientes son cuestiones que impiden que este método sea aceptable para la desinfección (Ding *et al.*, 2013).

2.4.3. Biocontrol

El control biológico ha sido descrito como una estrategia no peligrosa para reducir los daños causados a los cultivos por fitopatógenos. El control biológico ha ganado importancia como una práctica agrícola eco-amigable, ya que de este modo, se reduce el uso de compuestos químicos y no se daña al ecosistema (Dalal y Kulkarni, 2013).

Por muchos años, los microorganismos han sido favorables en la preservación de alimentos incluyendo frutas y hortalizas. Se ha observado que microorganismos antagonistas inhiben el desarrollo de patógenos a humanos como *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en productos hortofrutícolas (Bautista, 2006).

El control biológico ofrece una gran promesa para el tratamiento de enfermedades postcosecha. Desafortunadamente este tipo de control muestra una eficiencia reducida, específicamente cuando la densidad del patógeno es alta o cuando se usa contra infecciones pre-existentes (Eshel *et al.*, 2009).

Los agentes de control biológico apoyan la sanidad vegetal a través de la supresión de patógenos a través de diversos mecanismos como: la competencia por nutrientes y espacio, la síntesis de compuestos antimicrobianos, parasitismo, o la inducción sistémica (Dalal y Kulkarni, 2013).

2.5. Antagonismo microbiano

Hay dos enfoques básicos para el uso de antagonistas microbianos en el control de patógenos en frutas y verduras: el primero es el uso de microorganismos que ya existen en el producto y el segundo es introducir artificialmente a los microorganismos. La introducción de antagonistas microbianos es el método más efectivo en el control patógenos en vegetales (Sharma, 2009).

El nivel de control proporcionado por los antagonistas microbianos es altamente dependiente de la concentración inicial de los antagonistas aplicados. La selección de microorganismos antagónicos se basa principalmente en: 1) la habilidad de los antagonistas para colonizar rápidamente las superficies de las frutas y verduras y persistir en ellas en niveles efectivos, 2) en su capacidad para superar al patógeno en la adquisición de nutrientes y 3) en que se desarrollen y sobrevivan bajo una amplia gama de condiciones ambientales (Bautista, 2006).

Un microorganismo con potencial antagónico debe tener ciertas características deseables que los convierten en un agente biológico ideal. El antagonista debe ser: genéticamente estable, efectivo a bajas concentraciones, no fastidioso en sus requerimientos nutricionales, capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, eficaz contra una amplia gama de agentes patógenos y diferentes frutas y hortalizas, no producir metabolitos dañinos para la salud humana, no patógeno al huésped, que se pueda preparar de forma que se almacene y dispense eficazmente y compatible con otros tratamientos físicos y químicos (Sharma, 2009).

Varios antagonistas microbianos han sido patentados y evaluados para su uso comercial, de los cuales ASPIRE, YieldPlus y BIOSAVE-110 se utilizan efectivamente en todo el mundo para el control de patógenos postcosecha. Sin embargo, poca es la información disponible respecto al control de patógenos a humanos mediante el uso de microorganismos antagonistas en alimentos crudos (Sharma, 2009).

2.5.1. Microorganismos antagonistas

Muchas bacterias del género *Bacillus* son consideradas eficientes en el control de microorganismos patógenos (Arguelles *et al.*, 2009).

2.5.1.1. *Bacillus* sp.

El género *Bacillus* se caracteriza por ser bacterias Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas que forman esporas; contiene más de 60 especies que tienen muy diferentes fenotipos (Wulff *et al.*, 2002; Baruzzi *et al.*, 2011; Gond *et al.*, 2015).

Hay una gran cantidad de literatura que informa sobre el uso potencial de bacterias de la rizosfera como agentes de control biológico. Entre ellas, varias cepas pertenecientes al género *Bacillus* y particularmente *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Los miembros del género *Bacillus* son por lo tanto, bacterias benéficas, en su mayoría explotados como microorganismos en bioplaguicidas (Arguelles *et al.*, 2009).

Cepas de *Bacillus* han sido usadas en la industria agrícola, alimentaria y farmacéutica para la manufactura de enzimas, bioinsecticidas, la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios (Muhammad *et al.*, 2016). Varios estudios se han realizado en un intento por dilucidar los mecanismos implicados en el control biológico por especies de *Bacillus*. La actividad antagónica a menudo se asocia con la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibióticas (Wulff *et al.*, 2002).

Las especies de *Bacillus* tienen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico, ya que son bien conocidos como productores de antibióticos contra hongos y algunos patógenos bacterianos, pueden formar esporas fácilmente, tienen una alta viabilidad en comparación con células vegetativas y se encuentran comúnmente en los suelos (Wulff *et al.*, 2002). Dentro de las sustancias antimicrobianas producidas por este género de microorganismos se incluyen: bacteriocinas, lipopéptidos, policétidos, fosfolípidos y aminoazúcares (Guo *et al.*, 2012).

En varias cepas de *Bacillus* se ha reportado la producción de antibióticos polipeptídicos incluyendo, bacitracina, polimixina, gramicidina y colistina en diversas condiciones ambientales. Estos polipéptidos por lo general están estrechamente relacionados entre sí y difieren uno de otro por uno o unos pocos residuos de aminoácidos. Se ha reportado que polipéptidos antibacterianos producidos por el género *Bacillus* son principalmente efectivos contra bacterias Gram positivas, sin embargo, la polimixina, la colistina y la circulina muestran actividad contra especies Gram negativas. (Muhammad *et al.*, 2016).

Cepas de *B. amyloliquefaciens* han demostrado actividad antifúngica mediante la producción de una proteína denominada α -1,3-glucanasa contra *Colletotrichum lagenarium*. El bacilo inhibió a *C. dematium* en hojas de mora mediante la producción de compuestos antifúngicos y *Rhizoctonia solani* mediante la producción de compuestos antifúngicos de Iturina A (Abdullah *et al.*, 2008).

2.5.2. Producción de metabolitos secundarios

La dinámica de las poblaciones microbianas es controlada principalmente por los productos que las bacterias producen y excretan al ambiente. Los compuestos excretados por las bacterias que reconocemos incluyen, una amplia gama de antibióticos de amplio espectro sintetizados no ribosomalmente, enzimas líticas (lisozimas), subproductos metabólicos tales como ácidos orgánicos, exotoxinas proteicas, y péptidos antimicrobianos producidos cromosomalmente y/o ribosomalmente, y bacteriocinas que son de particular importancia en la defensa de las bacterias. Se supone que la mayoría de las bacterias producen al menos una bacteriocina (Muhammad *et al.*, 2015; Subramanian *et al.*, 2015)

Los metabolitos primarios son los componentes químicos de los organismos vivos que son vitales para su funcionamiento normal, mientras que los metabolitos secundarios son compuestos que son prescindibles (Karlovsky, 2008). Los metabolitos secundarios son estructuralmente muy diversos y cada compuesto sólo se produce por un pequeño número de especies. Estos se pueden utilizar como: a)

armas competitivas contra otras bacterias, hongos, amibas, plantas, insectos y animales de gran tamaño, b) agentes de transporte de metales, c) agentes de simbiosis entre los microbios y las plantas, nematodos, insectos y los animales superiores, d) hormonas sexuales y e) efectores de diferenciación. Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular (< 3000) y con características químicas y taxonómicas muy diversas con funciones desconocidas (Sansinenea y Ortiz, 2011).

Los metabolitos pueden ser producidos por casi todos los tipos de vida. Se producen por procariotas (procariota y monera) y organismos eucariotas que pertenecen a plantas y a animales por igual. La capacidad de producir metabolitos secundarios es muy variable en las especies del mundo vivo. En el grupo de las bacterias unicelulares procariotas, las especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más frecuentes productores (Bérdy, 2005). Los metabolitos secundarios microbianos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, efectores de competencia ecológica y simbiosis, feromonas, inhibidores de enzimas, agentes inmunomoduladores, antagonistas de los receptores y agonistas, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento de animales y plantas. A menudo tienen estructuras inusuales y su formación está determinada por los nutrientes, la velocidad de crecimiento, el control de retroalimentación, la inactivación e inducción de enzimas. Su regulación es influenciada únicamente por compuestos de bajo peso molecular, ARN de transferencia, factores sigma y productos génicos formados durante el crecimiento post-exponencial (Demain y Fang, 2000).

2.5.2.1. Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias extracelulares producidas por bacterias (Muhammad *et al.*, 2015), que inhiben o inactivan microorganismos que por lo general están relacionados con la cepa productora (Bizandi, 2002). Estas sustancias, que con frecuencia son metabolitos producidos por microorganismos

Gram positivos y Gram negativos, son compuestos heterogéneos que muestran pesos moleculares y propiedades bioquímicas variables, en los cuales la actividad está predominantemente asociada con una proteína (Lisboa *et al.*, 2006). Son principalmente sintetizadas a partir de plásmidos, pero muchos también son de origen cromosomal y son sintetizados en varias etapas del crecimiento bacteriano y bajo diversas condiciones ambientales; que afectan el crecimiento de especies bacterianas relacionadas (Vázquez, 2009; Da silva *et al.*, 2010; Sabramanian *et al.*, 2015).

Las bacteriocinas son agrupadas en cuatro distintas clases basadas en las características del péptido como son: modificaciones pos-traduccionales, cadena lateral, estabilidad térmica, secuencia N-terminal homóloga y peso molecular. Especies de *Bacillus* fueron las primeras reportadas en la producción de bacteriocinas en 1976 y la diversidad de éstas es bien conocida (Sabramanian *et al.*, 2015).

Algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles (Vázquez, 2009). Se ha reportado que las bacteriocinas de bajo peso molecular de bacterias Gram positivas muestran actividad bactericida principalmente contra otras bacterias Gram positivas (Sabramanian *et al.*, 2015).

El espectro de inhibición de las bacteriocinas o sus extractos, puede verse afectado según el tratamiento al que son sometidas, como la liofilización, concentración del sobrenadante, purificación y neutralización, entre otros. En el caso de plantaricina, una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 la purificación puede disminuir su actividad y su termoresistencia. Sin embargo, la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente la acción inhibitoria (Vázquez, 2009).

En cuanto a los mecanismos de inhibición de las bacteriocinas, la formación de poros en la membrana citoplasmática de células sensibles parece ser el más importante. Las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una enzima proteolítica, entre las que conviene citar las de origen pancreático (tripsina y α -quimiotripsina) y gástrico (pepsina), característica que hace de estos metabolitos bacterianos, sustancias seguras para ser incluidas como biopreservantes de los alimentos, puesto que se inactivan durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por lo tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (Vázquez, 2009).

Se han reportado varias bacteriocinas producidas por el género *Bacillus*. Las mayormente caracterizadas son: la subtilina de *B. subtilis*, la megacina de *B. megaterium* y otras bacteriocinas de *B. cereus* y de *B. thuringiensis*. Algunas de estas cepas bacterianas producen bacteriocinas con un amplio espectro de actividad inhibitoria contra patógenos incluyendo *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Lisboa *et al.*, 2006).

B. subtilis tiene fuertes propiedades antimicrobianas y del 4 al 5% de su genoma está dedicado a la síntesis de compuestos antibióticos, principalmente lipopéptidos. Los lipopéptidos son compuestos antimicrobianos cíclicos y generalmente de bajo peso molecular, estos se componen esencialmente de unos 7-10 aminoácidos de cabeza hidrofílica asociados con una cola de ácido graso hidrofóbico. Las especies de *Bacillus* producen principalmente tres grupos de lipopéptidos, incluyendo las familias de la surfactina, iturina y fengicina (Gond *et al.*, 2015; Leães, *et al.*, 2015). *B. amyloliquefaciens* está estrechamente relacionado con *B. subtilis* y también se ha reportado que produce antibióticos de la familia lipopeptídica (Han *et al.*, 2015).

Las surfactinas y las iturinas consisten de 7 α -aminoácidos y las fengicinas de 10, éstos asociados a un único ácido graso β -amino (iturinas) o β -hidroxi (surfactina y fengicinas). La longitud de las cadenas de ácidos grasos puede variar

de C13 a C16 para surfactinas, de C14 a C17 para iturinas y de C14 a C18 en el caso de las fengicinas. Iturinas y fengicinas muestran fuerte actividad antifúngica, mientras que las surfactinas exhiben fuerte actividad antibacterial (Gond *et al.*, 2015).

La amilociclicina, es un péptido de 6.381 kDa producido por *B. amylobliquefaciens*, es una nueva bacteriocina circular sintetizada ribosomalmente con alta actividad antibacterial relacionada principalmente a bacterias Gram positivas (Subramanian *et al.*, 2015).

B. thuringiensis es la especie de *Bacillus* más estudiada debido a su interesante variedad de proteínas secretadas. Las bacteriocinas que produce este microorganismo han demostrado ser importantes en medicina veterinaria. Aislados de *S. aureus* mostraron susceptibilidad a cinco bacteriocinas, morricina 269, y Kurstacina 287 seguidas de keniacina 404, entomocina 420 y tolworthcina 524, sugiriendo un método alternativo para controlar la mastitis bovina (Subramanian *et al.*, 2015).

La cepa LFB112 de *B. subtilis* produce una bacteriocina de 6.3 kDa que es efectiva contra *E. coli*, *S. Pullorum*, *Pseudomona aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens* y *S. aureus*, todos son patógenos comunes relacionados a animales. Otra cepa de *B. subtilis* aislada de un condimento fermentado chino produce una bacteriocina de 3.4 kDa que es activa contra *B. cereus* y *L. monocytogenes* (Subramanian *et al.*, 2015).

2.5.3. Técnicas de identificación y caracterización de metabolitos secundarios

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se deriva de la cromatografía en columna clásica y hoy en día es una de las herramientas más importantes de la química analítica.

El principio de la técnica es que se inyecta una solución de la muestra en una columna de un material poroso (fase estacionaria) y un líquido (fase móvil) se

bombea a alta presión a través de la columna. La separación de la muestra se basa en las distintas tasas de migración a través de la columna ocasionada por las diferentes particiones de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. Dependiendo del comportamiento de fraccionamiento de los diferentes componentes, la elución se lleva a cabo en función del tiempo (Gupta *et al.*, 2012).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) es más versátil que la cromatografía de gases ya que no está limitada a muestras volátiles y térmicamente estables, y adicionalmente la elección de las fases móvil y estacionaria es más amplia. La HPLC en comparación con la técnica clásica se caracteriza por tener: alta eficiencia, diámetro pequeño (4.6 mm), columnas de acero, cristal y titanio inoxidable, llenado de la columna con partículas muy pequeñas (3, 5 y 10 μm), presiones relativamente altas de entrada y flujo controlado de la fase móvil, detectores de flujo continuo capaz de manejar pequeños caudales, capacidad para detectar cantidades muy pequeñas y un rápido análisis (Gupta *et al.*, 2012).

La HPLC es un método altamente sensible para la detección, identificación y cuantificación de cualquier sustancia química en una muestra en particular utilizando absorbancia ultravioleta y visible (Amber *et al.*, 2012). Es por ello que esta técnica se ha empleado para el análisis simultáneo de una amplia gama de metabolitos secundarios. Los métodos son simples, sensibles y altamente reproducibles. Además son aplicables a gran variedad de investigaciones de productos naturales en plantas y microorganismos; la sencillez y la sensibilidad de los protocolos permiten su aplicación directa a un gran número de muestras pequeñas, tales como las que se encuentran en investigaciones sobre las interacciones entre huésped-microorganismo (Graham, 1991).

La espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear también son técnicas que han sido ampliamente usadas para la secuenciación de bacteriocinas y son necesarias para la caracterización de los compuestos (Guo *et al.*, 2012).

Gond *et al.* (2015) utilizaron MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight- Mass Spectrometers) para analizar el peso molecular y determinar grupos polipeptídicos de compuestos antimicrobianos (lipopeptídicos) producidos por *Bacillus* spp. La caracterización mediante esta técnica mostró que todos los extractos de lipopéptidos contenían familias antifúngicas de iturina y fengicina; en los espectros de masas se observaron múltiples homólogos de cada grupo polipeptídico, lo que representó diferencias en el número de átomos de carbono de la cadena de ácidos grasos.

Guo *et al.* (2012) aislaron una nueva cepa de suelo con capacidad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas (*S. aureus* y *S. Pullorum*), la cual identificaron como *B. licheniformis*. Esta bacteria produce sustancias antimicrobianas como bacteriocinas al inicio de la fase exponencial y comienzo de la estacionaria. A partir del sobrenadante del cultivo del microorganismo, los autores precipitaron los compuestos inhibitorios con sulfato de amonio, y el extracto crudo que obtuvieron fue sujeto a SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio) para estimar el peso molecular, que resultó ser de 4 kDa aproximadamente. Sin embargo, no se identificó la naturaleza del compuesto.

Muhammad *et al.* (2015) aislaron una cepa bacteriana que produce péptidos antibacterianos, la cual fue identificada por sus características morfológicas, bioquímicas y de crecimiento como *Pseudomonas luteola*. El microorganismo fue cultivado en medio Infusión Cerebro Corazón a 35°C durante 18 h para obtener la máxima producción de compuestos antimicrobianos, enseguida se obtuvo el sobrenadante y se precipitó con sulfato de amonio, el precipitado se caracterizó por su peso molecular, encontrándose menor a 20 kDa y de naturaleza peptídica. El péptido mostró actividad inhibitoria contra *Shigella*, *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* y *Streptococcus*.

Una cepa de *B. amyloliquefaciens* con amplio espectro de actividad antifúngica fue utilizada como agente de biocontrol para suprimir *Fusarium oxysporum* y otros hongos patógenos a plantas. Los compuestos inhibitorios que secretó la bacteria fueron producidos en medio de cultivo, precipitados con ácido clorhídrico (HCl), purificados mediante RP-HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa) e identificados con TLC (Cromatografía en Capa Fina) y con espectrometría de masas. Basados en estas técnicas se lograron identificar dos péptidos cíclicos con actividad antifúngica, los cuales fueron Iturina A y un nuevo péptido cíclico con peso molecular de 852.4 Da (Han *et al.*, 2015).

B. licheniformis BFP011 aislado de papaya puede producir sustancias antimicrobianas extracelulares que son activas contra algunos microorganismos fitopatógenos (*Colletotrichum capsici*) y patógenos a humanos (*E. coli* O157:H7 y *S. typhi* ATCC 5784). Arbsuwan *et al.* (2014) caracterizaron nuevas sustancias antimicrobianas producidas por *B. licheniformis* BFP011. Mediante la técnica TLC purificaron parcialmente los compuestos antibacterianos y con RP-HPLC caracterizaron las fracciones activas. Se encontró que ese microorganismo produce tres nuevas sustancias antimicrobianas (las cuales no corresponden a Iturina A y Bacitracina como se ha reportado en otros trabajos) que en su estructura contienen péptidos y ácidos grasos insaturados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *Bacillus* spp. contra *Salmonella* y sobre el crecimiento de plántulas de alfalfa mediante pruebas *in vitro* y durante la germinación de semillas de alfalfa.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antimicrobiano de cepas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* mediante pruebas en medios de cultivo.
- Evaluar el efecto antagónico de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa.
- Evaluar el efecto de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios en el crecimiento de germinados de alfalfa.
- Identificar y cuantificar compuestos promotores del crecimiento de germinado de alfalfa producidos por *B. subtilis* HZ18.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos

Cloruro de sodio, J. T. Baker

Etanol, Karal

Fosfato diácido de sodio, Productos Químicos Monterrey S. A.

Fosfato ácido de potasio, J. T. Baker

Cloruro de amonio, J. T. Baker

Ácido succínico, Sigma

Fructosa, Merck

Glucosa, Karal

Triptófano, Merck

Hidróxido de potasio, J. T. Baker

Ácido clorhídrico, J. T. Baker

Hidróxido de sodio, J. T. Baker

4.1.2. Medios de cultivo

Caldo soya tripticasa (CST), Bioxon

Agar XLD, Bioxon

Agar de sulfito bismuto, Bioxon

Agar base sangre (ABS), Bioxon

Agar TSI, Bioxon

Agar LIA, Bioxon

Agar EMB, Bioxon

Caldo infusión cerebro corazón (ICC), Bioxon

Agar soya tripticasa (AST), Bioxon

Agar Mc-conkey, Bioxon

Peptona de caseína, Bioxon

4.1.3. Equipo

BioScreen, LABSISTEMS FP-1100C

Germinador, Easygreen Mikrofarm Modelo 220v/50Hz

Baño de precisión con agitación, MRC BT-150

Vortex, GENE 2 G-560

Incubadoras de precisión, Thermo Scientific DL207725

Bomba de vacío, GE MOTORS 5KH33ND16GX

Refrigerador, Whirpool WT1002

Micropipetas, Eppendorf

Balanza analítica, Instrument APX-612

Autoclave, All American 1925X

Centrífuga, HETTICH EVA 20

Ultracongelador, REVCO

Plato caliente, CIMAREC 2 SP46925

Espectrofotómetro, MILTON ROY COMPANY ESPECTRONIC 21

Campana de flujo laminar, ALDER

Rotaevaporador

Potenciómetro, ORION 410^a

4.1.4. Material biológico

Cepas de *Salmonella*

Se emplearon 5 cepas de *Salmonella*: *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Montevideo*, *Salmonella* spp. y *Salmonella* spp. aislada de germinado de alfalfa comercial.

Todas las cepas pertenecen al cepario del Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), Facultad de Química, UAQ.

Cepas antagonistas

Cuatro cepas antagonistas (*B. amyloliquefaciens* HZ9, *B. amyloliquefaciens* HZ21, *B. methylotrophicus* HZ51 y *B. subtilis* HZ18) aisladas en un estudio previo a partir de la rizósfera de un huerto de zarzamoras localizado en San Juan de Río, Querétaro.

Semilla de alfalfa (*Medicago sativa*) cv. 'San Miguelito' obtenida en la ciudad de Querétaro, Qro.

4.2. Métodos

4.2.1. Evaluación del efecto antimicrobiano de cepas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* mediante pruebas de antagonismo de difusión en pozo.

4.2.1.1. Preparación del inóculo de cepas antagonistas

Se prepararon cultivos frescos de las cuatro cepas de *Bacillus* spp. mediante tres transferencias sucesivas en 3 mL de CST a 30 y 35°C, 150 rpm por 24 h. Por separado, se tomó 1 mL de cultivo y se centrifugó a 6000 rpm por 7 min, se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de solución salina isotónica (SSI) y la pastilla se homogeneizó en Vortex. El procedimiento de lavado se llevó a cabo dos veces. A continuación, se realizaron las diluciones decimales correspondientes en SSI hasta tener una concentración de inóculo de 5 Log UFC/mL (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.1.2. Obtención de sobrenadante de las cepas antagonistas

Los cultivos frescos de las cuatro cepas de *Bacillus* spp. se centrifugaron a 10 000 x g por 20 min, los sobrenadantes se decantaron en tubos estériles, se filtraron con membranas de nitrocelulosa (0.22 µm) y los filtrados se recolectaron en tubos estériles nuevos (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.1.3. Prueba de antagonismo de difusión en pozo

Se prepararon cultivos frescos de las cinco cepas de *Salmonella*, mediante tres transferencias sucesivas en 3 ml de CST a 35°C por 24 h. Se centrifugó 1 mL del cultivo de cada uno de los microorganismos patógenos a 6000 rpm por 7 min, se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL SSI y se homogeneizó el paquete celular. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces. De la suspensión obtenida se tomaron 5 µL (aproximadamente 1×10^5 UFC/mL) y se inocularon tubos con 10 mL de AST temperados a 45°C, se homogeneizaron en Vortex por 8 s, el agar se vertió en cajas Petri estériles y se dejaron solidificar en campana de flujo laminar por 10 min. En las cajas de prueba, se realizaron seis perforaciones o pozos con pipetas Pasteur estériles. En cada uno de los pozos se depositaron 25 µL de los inóculos (apartado 4.2.1.1) y de los sobrenadantes (apartado 4.2.1.2) de las cepas antagonistas. Finalmente, se taparon las cajas Petri y se incubaron a 35°C por 24 h. Se midieron los halos de inhibición con un Vernier (mm). Las pruebas de antagonismos se realizaron por triplicado (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.1.4. Evaluación del efecto de la temperatura y del medio de cultivo en la actividad antagónica de *Bacillus* spp. contra *Salmonella*.

Se prepararon cultivos frescos de las cuatro cepas antagonistas mediante tres transferencias sucesivas en 3 mL de CST a 35°C, 150 rpm por 24 h. Se tomaron 100 µL de cada uno de los microorganismos antagonistas y por separado, se inocularon tubos con 10 mL de CST, ICC y Medio Mínimo (MM). Los tres caldos se incubaron a 30 y 35°C a 150 rpm, durante 24 h (CST e ICC) o 5 d (MM). Se realizó el lavado de las cepas antagonistas como se mencionó en el apartado 4.2.1.1. y posteriormente, se realizó la prueba de antagonismo de difusión en pozo (apartado 4.2.1.3.). Se midieron los halos de inhibición con un Vernier (mm). Los ensayos se realizaron por triplicado (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.2. Evaluación del efecto antagónico de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa.

4.2.2.1. Obtención de la suspensión de *B. subtilis* HZ18

Se preparó un cultivo fresco de la cepa de *B. subtilis* HZ18 mediante dos transferencias sucesivas en 3 mL de CST a 30°C, 150 rpm por 24 h. Del segundo cultivo se tomaron 100 µL, se inocularon en un frasco con 100 mL de CST y éste se incubó nuevamente a 30°C, 150 rpm por 24 h. Posteriormente, se lavaron 50 mL del cultivo con SSI como se describió en el apartado 4.2.1.1., la suspensión obtenida (8 Log UFC/mL) se diluyó en agua potable estéril (APE) hasta obtener 1.5 L a una concentración de 6 Log UFC/mL. Esta suspensión se utilizó para regar la semilla de alfalfa durante la germinación (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.2.2. Obtención de metabolitos secundarios de *B. subtilis* HZ18

Se preparó un cultivo fresco de la cepa de *B. subtilis* HZ18 mediante dos transferencias sucesivas en 3 mL de CST a 30°C, 150 rpm por 24 h. Del segundo cultivo se tomó 1 mL, se inoculó en un frasco con 1 L de CST y se incubó a 30°C, 150 rpm por 24 h, en seguida, se centrifugó a 10 000 x g por 15 min; el sobrenadante se filtró con membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 µm, se ajustó a un pH de 2 con HCl (6 M) y se dejó reposar por 24 h a 4°C. A continuación, la suspensión se centrifugó a 10 000 x g por 20 min; se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 L de APE. Esta suspensión se utilizó para regar la semilla de alfalfa durante la germinación (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.2.3. Efecto de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* durante la germinación de semilla de alfalfa.

Se prepararon cultivos frescos de las cinco cepas de *Salmonella* mediante tres transferencias sucesivas en 3 mL de CST a 35°C por 24 h; se lavó 1 mL de cada cultivo con SSI como se mencionó anteriormente. Se obtuvo una mezcla de las cepas de *Salmonella* (9 Log UFC/mL), se diluyó en APE (500 mL) a una

concentración de 3 Log UFC/mL. Esta última suspensión se agregó a 500 g de semilla de alfalfa, se dejó reposar por 20 min, se eliminó el sobrenadante y la semilla se extendió en una malla estéril por 24 h a temperatura ambiente.

Cinco lotes de semillas de alfalfa seca (70 g cada uno) inoculados con *Salmonella* fueron colocados en cámaras de germinación Easygreen Mikrofarm (85 % HR, 22°C), las cuales se programaron para que de manera automática regaran las semillas tres veces al día por 15 min durante 6 d. Tres de los lotes se regaron con la suspensión de *B. subtilis* HZ18 (apartado 4.2.2.1.) durante: a) las primeras 24 h, b) las primeras 48 h y c) las primeras 24 h y entre las 72 y 96 h; el cuarto lote se regó con la suspensión de metabolitos secundarios de *B. subtilis* HZ18 (apartado 4.2.2.2.) en las primeras 24 h y entre las 72 y 96 h. En los cuatro lotes, los días en los que no se aplicaron los tratamientos las semillas se regaron con APE. El quinto lote se empleó como control y se regó con APE.

Se cuantificó la población de *Salmonella* y de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en la suspensión bacteriana utilizada como inóculo, en la semilla recién inoculada, en la semilla inoculada después del reposo, en la semilla seca y diariamente durante la germinación.

Para realizar los recuentos en la semilla y durante la germinación, se tomaron 10 g de semilla o germinado, se adicionaron 90 mL de diluyente de peptona (0.1 %), se homogeneizó la mezcla y se hicieron las respectivas diluciones decimales. El recuento se realizó por vaciado en placa con AST suplementado con rifampicina (200 ppm) para *Salmonella* y AST para BMA; las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. La población de *Salmonella* se expresó en Log UFC/g. Este experimento se realizó por duplicado, con tres repeticiones de cada tratamiento en cada ocasión (Salazar y Cruz, 2015).

4.2.3. Evaluación del efecto de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios en el crecimiento de germinados de alfalfa.

De manera simultánea a la cuantificación de *Salmonella* y BMA, del segundo al sexto día de germinación se midió el tamaño de las plántulas de alfalfa (cm) con un vernier. Al término de la germinación (6 días) se obtuvo el peso fresco del germinado (g), también se determinó el porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa. Estos ensayos se realizaron por duplicado, con tres repeticiones de cada tratamiento en cada ocasión.

4.2.4. Identificación y cuantificación de compuestos promotores del crecimiento de germinados de alfalfa producidos por *B. subtilis* HZ18.

4.2.4.1. Producción de giberelinas por *B. subtilis* HZ18 en medios de cultivo

4.2.4.1.1. Extracción de giberelinas a partir de medios de cultivo

Se prepararon cultivos frescos de *B. subtilis* HZ18 (apartado 4.2.1.2.) en CST, CN y CST diluido al 10 %, todos adicionados o no de Triptófano (Trp) (1 g/L). Se obtuvo el sobrenadante de los diferentes medios de cultivo mediante centrifugación (7000 rpm por 6 min). Un total de 20 mL de cada uno de los sobrenadantes se mezclaron con 20 mL de metanol al 80 % por 1 min. La suspensión se sometió a rotaevaporación a 40°C hasta eliminar la fracción metanólica, el extracto se acidificó con HCl 0.1 N a pH de 3-3.5; en seguida, se colocó en un embudo de separación donde se añadieron 5 mL de acetato de etilo, se recolectó la fase orgánica; este procedimiento se realizó en tres ocasiones y el exceso de agua presente en la fase orgánica se eliminó con Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica de acetato de etilo se evaporó totalmente en rotaevaporador a 40°C. El extracto seco (localizado en la pared del matraz) se resuspendió en 2 mL de metanol al 100 % y se almacenó a 4°C hasta su utilización (Rodríguez, 2013).

4.2.4.1.2. Identificación de giberelinas por cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos (obtenidos en el apartado 4.2.4.1.1.) utilizando placas de sílica gel con detección de fluorescencia a 254 nm. La fase móvil consistió de cloroformo, acetato de etilo y ácido acético (5:4:1 v/v, respectivamente) (Bautista, 2008).

4.2.4.1.3. Ensayo de actividad biológica de giberelinas

Se tomaron 100 µL de los extractos metanólicos de CST y CN y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, el solvente se evaporó en corriente de N₂ y los compuestos adheridos a la pared del vial se resuspendieron en 100 µL de agua destilada. En tubos Falcon de 15 mL se colocaron 4 granos de cebada previamente descascarillados y desembrionados, y se les agregó 100 µL del extracto acuoso. Las muestras se dejaron incubar a 35°C por 24 h. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de agua destilada, la mezcla se homogeneizó con Ultra Turrax (IKA T25 Basic) por 20 s. El homogeneizado se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C por 10 min. Del sobrenadante se cuantificaron los azúcares reductores por el método de DNS. La concentración de azúcares reductores presentes en los extractos (g/mL) se calculó mediante una curva de calibración de maltosa. Se utilizaron tres controles: semilla con embrión y agua, semilla sin embrión y agua, y semilla sin embrión y ácido giberélico (AG₃) (0.02 g/mL) (Rodríguez, 2013).

4.2.4.1.4. Cuantificación de giberelinas mediante HPLC-PDA

Los extractos metanólicos se sometieron a un análisis en HPLC Waters® Alliance® 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters™ 2998 con una columna Symetry C18 (3.5 µm de tamaño de partícula y de 4.6 x 150 mm). Se aplicó un doble gradiente de concentración de acetonitrilo con una fase móvil A (agua con 5 % de acetonitrilo y 0.01 % de ácido fosfórico) y una fase B (acetonitrilo con 5 % de agua y 0.01 % de ácido fosfórico) (Tabla 1). La fase móvil corrió a un flujo de 1 mL/min durante 35 min. El volumen de muestra inyectado al equipo fue

de 20 µL. Los tiempos de retención y espectros de absorción se compararon con el espectro de un estándar comercial de AG₃. Para la cuantificación de equivalentes de giberelinas (µg/mL) se realizó una curva de calibración con AG₃ (Rodríguez, 2013).

Tabla 3. Gradiente de concentración para la separación de compuestos en HPLC

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0 -15	1	90	10
15-20	1	30	70
20-30	1	0	100
30-35	1	90	10

4.2.4.1.5. Identificación de giberelinas con UPLC-MS

Para la identificación de giberelinas se utilizó un UPLC Acquity Class I (Waters, Inglaterra) acoplado a un espectrómetro de masas Vion IMS QTof (tiempo de vuelo con celda de movilidad iónica y cuadrupolo) (Waters, Inglaterra) equipado con electrospray (ESI). El sistema UPLC-MS fue controlado por Waters^R UNIFI^R 1.8 Software.

Los extractos metanólicos de las muestras de CST y CST con Trp obtenidos en el apartado 4.2.4.1.1 se sometieron al análisis por UPLC-MS. Para ello, 2 µL de cada muestra fueron inyectados en la columna del UPLC (Acquity UPLC^R BEH C18, 2.1 mm x 50 mm, 1.7 µm; Waters) acoplada al sistema ESI-MS/MS. Las giberelinas fueron analizadas en modo ion negativo como [M-H]⁻. Los compuestos de interés fueron separados en un doble gradiente de concentración de acetonitrilo con una fase móvil A (agua con 5 % de acetonitrilo y 0.01 % de ácido fosfórico) y una fase B (acetonitrilo con 5 % de agua y 0.01 % de ácido fosfórico) a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min y a una longitud de onda de 205 nm (Tabla 2).

La columna se mantuvo a 35°C y la muestra a 8°C. Los ajustes del MS fueron los siguientes: voltaje del capilar de 1.5 kV, voltaje del cono 40 V, temperatura de la fuente 120°C, temperatura del gas de solvatación 450°C, flujo de gas del cono 50 L/h, flujo de solvatación de gas 800 L/h, energía de colisión (se aplicó una rampa de alta energía) de 15-35 eV. Todos los datos fueron procesados con el Software Waters^R UNIFI^R 1.8. Las muestras se inyectaron por triplicado.

Tabla 4. Gradiente de concentración para la separación de giberelinas en UPLC-MS

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	0.2	90	10
5	0.2	30	70
7	0.2	30	70
7.5	0.2	0	100
10	0.2	0	100
10.5	0.2	90	10
12.5	0.2	90	10

4.2.4.2. Producción de ácido indol acético por *B. subtilis* HZ18

Se prepararon cultivos frescos de *B. subtilis* HZ18 a 35°C por 24 h y 150 rpm en diferentes medios de cultivo: CST, CN y CST diluido a 10 %, todos con y sin Trp (1 g/L). Los cultivos se centrifugaron por 10 min a 5 000 rpm, se tomó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 2 mL del reactivo de Salkowsky (H₂SO₄ 7.9 M y FeCl₃ 40 mM). La mezcla se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 530 nm. Para la cuantificación de AIA (µg/mL) se realizó una curva de calibración con un estándar de AIA. Como control se utilizaron los mismos medios de cultivo sin inocular *B. subtilis* HZ18 (Bautista, 2008).

4.2.5. Análisis estadístico.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* (halos de inhibición) se realizaron por triplicado y los resultados se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %. Las comparaciones entre las medias de los tratamientos se realizaron mediante la prueba de Tukey.

Para las evaluaciones del efecto de promoción de crecimiento de plántulas de alfalfa y de la actividad antagónica de *B. subtilis* HZ18 contra *Salmonella* durante la germinación de la semilla de alfalfa, se realizaron dos réplicas (completamente independientes) con tres repeticiones en cada una. Los datos se compararon mediante un ANOVA con un nivel de confianza del 95% y se compararon con la prueba t-Student.

Los análisis se realizaron con ayuda del paquete estadístico JMP 9.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto antimicrobiano de cepas de *Bacillus* spp. y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* mediante pruebas de antagonismo de difusión en pozo

5.1.1. Actividad antagónica de *Bacillus* spp. contra *Salmonella*

Las pruebas iniciales para evaluar la actividad inhibitoria de las cuatro cepas de *Bacillus* incubadas a 30 y 35°C contra cinco cepas de *Salmonella* se llevaron a cabo *in vitro* mediante la prueba de antagonismo de difusión en pozo (Tabla 5). Para realizar la prueba, los cultivos de las cepas de *Bacillus* se incubaron a 35 y 30°C para evaluar el efecto de la temperatura en la producción de metabolitos secundarios con efecto inhibitorio contra *Salmonella*. Cuando los cultivos de las cepas de *Bacillus* se incubaron en CST a 35°C se observó que las cepas HZ21 y HZ18 inhibieron a las cinco cepas de *Salmonella*, mientras que HZ9 y HZ51 sólo inhibieron a cuatro y dos cepas, respectivamente. Los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Bacillus* contra *Salmonella* oscilaron entre 9.16 y 15.61 mm. La cepa HZ18 presentó la mayor actividad antimicrobiana contra las cinco cepas de *Salmonella* ($P < 0.05$) y los mayores efectos antagónicos fueron contra *S. spp.* (aislada de germinado), *S. spp.* y *S. Typhimurium* con halos de inhibición de 15.61, 15.37 y 14.82, respectivamente ($P = 0.0070$). En contraste, la cepa HZ21 mostró el menor halo de inhibición contra *S. Montevideo* con 9.16 mm ($P = 0.0345$).

El análisis de varianza reveló que tanto los factores cepa antagonista y cepa de *Salmonella*, así como su interacción, fueron significativos a un nivel de confianza de 95 % ($P < 0.0001$). El efecto antagónico de las cepas HZ18 y HZ21 contra las cinco cepas de *Salmonella* fue relativamente homogéneo, mientras que las cepas HZ9 y HZ51 tuvieron un efecto variable, ambas mostraron mayor inhibición contra las cepas de *Salmonella* spp. aislada de germinado y *S. Typhimurium*. Es decir, el efecto antagónico observado, depende de la interacción entre las cepas antagonistas y las cepas de *Salmonella*.

Tabla 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de células de *Bacillus*¹ contra *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Diámetro de los halos de inhibición ² (mm)							
	<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ9		<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ21		<i>B. subtilis</i> HZ18		<i>B. methylotrophicus</i> HZ51	
	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C
S. Agona	16.33 ± 0.58 ^{a3}	11.98 ± 0.37 ^a	14.00 ± 1.73 ^{ab}	11.56 ± 1.41 ^a	12.67 ± 0.58 ^b	12.60 ± 1.14 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b
S. Montevideo	0.00 ± 0.00 ^b	12.08 ± 0.10 ^a	12.00 ± 0.00 ^a	9.16 ± 0.24 ^b	13.00 ± 1.00 ^a	13.06 ± 1.12 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c
S. spp.	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	13.67 ± 0.58 ^a	11.24 ± 0.65 ^b	14.00 ± 0.00 ^a	15.37 ± 0.59 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c
S. spp. (germinado)	13.67 ± 0.57 ^a	12.40 ± 0.88 ^b	13.33 ± 1.15 ^a	11.91 ± 0.30 ^b	15.00 ± 0.00 ^a	15.61 ± 0.50 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	11.68 ± 0.18 ^b
S. Typhimurium	16.33 ± 0.58 ^{ab}	14.96 ± 0.26 ^a	15.33 ± 0.58 ^b	11.56 ± 1.41 ^b	16.00 ± 0.00 ^{ab}	14.82 ± 1.04 ^a	16.67 ± 0.58 ^a	13.50 ± 0.20 ^{ab}

¹ Las cepas de *Bacillus* se cultivaron en CST. ² Media de tres valores ± desviación estándar. ³ Para cada temperatura y por cepa de *Salmonella* los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05) con la prueba de Tukey.

El efecto antagónico de las cepas de *Bacillus* incubadas a 30°C contra *Salmonella* también se muestra en la Tabla 5. A esta temperatura, nuevamente, se observó que las cepas HZ18 y HZ21 inhibieron a las cinco cepas de *Salmonella*; obteniendo halos de inhibición de 12.00 a 16 mm. Al realizar el análisis estadístico, se encontró que HZ18 y HZ21 presentaron el mismo efecto inhibitorio contra las cinco cepas de *Salmonella* ($P < 0.05$). La cepa HZ9 tuvo el mismo efecto antagónico contra *S. Agona* y *S. Typhimurium* con un diámetro de halo de inhibición de 16.33 mm, mientras que exhibió un menor efecto contra *S. spp.* aislada de germinado (halo de inhibición de 13.67 mm) ($P < 0.0001$). Por otro lado, la cepa HZ51 sólo presentó actividad antagónica contra *S. Typhimurium*.

El análisis de varianza demostró que cuando los cultivos de las cepas de *Bacillus* se incubaron a 30°C, ambos factores evaluados (cepa antagonista y cepa de *Salmonella*) y su interacción fue significativa ($P < 0.0001$). El efecto antagónico de HZ18 y HZ21 contra las cinco cepas de *Salmonella* fue el mismo y relativamente homogéneo, mientras que para las cepas HZ9 y HZ51 fue variable. Es decir, los resultados obtenidos cuando la incubación de las cepas antagonistas se llevó a cabo a 30°C fueron similares a los observados a 35°C.

Las temperaturas de incubación de 30 y 35°C se eligieron ya que son las condiciones de incubación principalmente reportadas para cepas de *Bacillus* en estudios en donde se evalúa su actividad inhibitoria contra otro tipo de microorganismos. Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad inhibitoria de *Bacillus* contra *Salmonella* se realizó otro análisis de varianza. El efecto inhibitorio fue el mismo para *S. Agona*, *S. spp.* (aislada de germinado), *S. Montevideo* y *S. Typhimurium* a 30 y 35°C ($P > 0.05$); sin embargo, para *S. spp.* el efecto antagónico fue diferente ($P = 0.0161$), a 35°C el diámetro de halo de inhibición fue mayor (15.37 mm) que a 30°C (14 mm). En base a este análisis para los estudios posteriores se estableció 35°C como la temperatura de incubación de las cepas de *Bacillus*.

Algunos autores han sugerido que el uso de cepas del género *Bacillus* con actividad antimicrobiana puede ser una alternativa o un método complementario a los tratamientos químicos de desinfección (Földes *et al.*, 2000). Las especies de este género tienen características especiales que las hace buenos candidatos como agentes antagonistas, ya que son bien conocidos por producir una gran cantidad de antibióticos contra hongos y algunos patógenos bacterianos, pueden formar esporas fácilmente, tienen una alta viabilidad en comparación con células vegetativas y se encuentran comúnmente en suelos (Wulff *et al.*, 2002).

La actividad antimicrobiana de cepas de *Bacillus* ya ha sido descrita por otros autores. Thirabunyanon y Thongwittaya (2012), aislaron 117 cepas de *Bacillus*, y de éstas, 10 presentaron habilidad para inhibir en medio de cultivo el crecimiento de bacterias patógenas, incluyendo *S. Enteritidis* DMST15676 y *S. Typhimurium* TISTR 292 mostrando halos de inhibición de 11-12 y 11-15 mm. Por otro lado Alnaimat *et al.* (2017), aislaron una cepa de *Bacillus* sp. HMB8 (de la cavidad oral de un voluntario sano) que mostró actividad antagónica contra *S. Typhimurium* ATCC 14028 (11.6 ± 0.6 mm), *E. coli* (26.1 ± 0.2 mm), *L. monocytogenes* (23 ± 0.9 mm), *Staphylococcus aureus* (23 ± 0.9 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (20.6 ± 0.7). Por su parte, Földes *et al.* (2000) aislaron una cepa de la rizósfera de cereales identificada como *B. subtilis* IFS-1, la cual mostró actividad antagonista *in vitro* contra varios fitopatógenos, patógenos transmitidos por alimentos y microorganismos esporulados. Sharif *et al.* (2016), aislaron seis cepas de *Bacillus* de muestras de monedas y billetes (obtenidos de personas de diferentes profesiones) que presentaron actividad antagónica contra otros aislados bacterianos (también del género *Bacillus*); los halos de inhibición que se encontraron presentaron valores de 11 a 30 mm. Los efectos antagónicos reportados en los estudios anteriores concuerdan con lo observado en este trabajo (halos de inhibición de 9.16-16 mm a temperaturas de 30 y 35°C); sin embargo, las cepas patógenas no son las mismas. De manera que, los microorganismos antagonistas estudiados en esta investigación, mayormente HZ18 y HZ21, tuvieron

la habilidad de inhibir el crecimiento de las cepas de *Salmonella* probadas, por lo cual podrían ser utilizadas en el control de ese patógeno.

5.1.2. Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* spp. contra *Salmonella*

En el apartado anterior se encontró que las células de los microorganismos antagonistas inhibieron el crecimiento de *Salmonella* cuando se enfrentaron mediante la prueba de antagonismo de difusión en pozo. Con el propósito de elucidar si dicho efecto inhibitorio se debió a la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana se llevaron a cabo una serie de experimentos. Para ello, se obtuvo el sobrenadante (libre de células) de los cultivos de las cepas antagonistas cultivadas en CST y se sometieron a la prueba de antagonismo de difusión en pozo a 35°C. Se observó que el sobrenadante de la cepa HZ9 inhibió el crecimiento de tres cepas de *Salmonella* mientras que los antagonistas HZ21, HZ51 y HZ18 inhibieron a las cinco cepas (Tabla 6). Los diámetros de los halos de inhibición de las cuatro cepas antagonistas contra *Salmonella* fueron en un rango de 12 a 16 mm. La cepa HZ18 mostró un mayor potencial antagónico contra las cinco cepas de *Salmonella* produciendo halos de inhibición de 13.5 a 16 mm.

Se realizó un análisis de varianza para evaluar si los factores estudiados (tipo de cepa de *Bacillus* y tipo de cepa de *Salmonella*), así como su interacción, tuvieron un efecto en la variable respuesta. Se encontró que los factores y su interacción fue significativa ($P < 0.0001$). El efecto antagónico de HZ18, HZ21 y HZ51 contra las cinco cepas de *Salmonella* fue relativamente homogéneo, mientras que para la cepa HZ9 fue variable. De manera que, el efecto antagónico (expresado en diámetro de halos de inhibición) va a depender de la interacción entre los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus* y las cepas de *Salmonella*.

Tabla 6. Actividad antagonica de metabolitos secundarios producidos por cepas de *Bacillus* spp. contra *Salmonella*.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Diámetro de los halos de inhibición ¹ (mm)			
	<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ9	<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ21	<i>B. methylotrophicus</i> HZ51	<i>B. subtilis</i> HZ18
<i>S. Agona</i>	13.00 ± 0.00 ^{b2}	13.00 ± 0.00 ^b	12.00 ± 0.00 ^b	15.50 ± 0.71 ^a
<i>S. Montevideo</i>	0.00 ± 0.00 ^c	14.00 ± 0.00 ^b	14.00 ± 0.00 ^b	16.00 ± 0.00 ^a
<i>S. spp.</i>	14.00 ± 0.00 ^b	14.00 ± 0.00 ^b	15.00 ± 0.00 ^{ab}	15.50 ± 0.71 ^a
<i>S. spp.</i> (germinado)	14.00 ± 1.41 ^a	13.50 ± 0.71 ^a	12.50 ± 0.71 ^a	13.50 ± 0.71 ^a
<i>S. Typhimurium</i>	0.00 ± 0.00 ^c	12.50 ± 0.71 ^b	13.00 ± 0.00 ^{ab}	14.00 ± 0.00 ^a

¹ Media de tres valores ± desviación estándar. ² Para cada cepa de *Salmonella* los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05) con la prueba de Tukey.

Con este experimento se demostró que la inhibición causada por las cuatro cepas de *Bacillus* se debió a la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, los cuales al difundirse en el agar inhibieron el crecimiento de *Salmonella*, esto ya había sido reportado por otros autores (Salazar y Cruz, 2015).

Las especies de *Bacillus* son conocidas por ser productoras de más de 200 antibióticos, los cuales difieren en su estructura y en su espectro de actividad. Algunas cepas de *Bacillus* sintetizan bacteriocinas, que son sólo efectivas contra bacterias de la misma especie, otras producen antibióticos contra bacterias Gram negativas y otras cepas tienen amplio espectro de actividad antibiótica (incluyendo actividad antifúngica) (Moore *et al.*, 2013). Por lo tanto, las bacteriocinas de *Bacillus* son de gran interés por sus potenciales aplicaciones como conservadores de alimentos y agentes terapéuticos (Avci *et al.*, 2016). Gramicidina, bacitracina, tirotricidina y polimixina son antibióticos ampliamente usados en tratamientos médicos (Sharif *et al.*, 2016).

Castañeda-Ramírez *et al.* (2011) evaluaron la capacidad de cinco nuevas bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis* (morricina 269, kurstacina 287, keniacina 404, entomocina 420 y tolwortcina 524) para inhibir el crecimiento de 10 aislados de *Salmonella* spp. y demostraron que el 50% de los aislados fueron susceptibles a las bacteriocinas, reportando zonas de inhibición de 45 a 481 mm². Finalmente, sugieren que el uso potencial de estos péptidos antibacterianos (aún sin identificar) como conservadores de alimentos podrían reducir la población de *Salmonella*. Por su parte, Avci *et al.* (2016) reportaron que seis aislados de *Bacillus* sp. (BAST2, BMZE4, GIT2, ZBP10, ZGT3 y ZGT9) mostraron actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos (Gram positivos y negativos) incluyendo *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, mostrando halos de inhibición en un rango de 6.5 a 9.5 mm; el efecto antagónico reportado para esas cepas es menor al observado en este estudio (12 a 16 mm de diámetro de halo de inhibición). Por otro lado, Liu *et al.* (2016) estudiaron la actividad antimicrobiana de dos cepas de *B. amyloliquefaciens* (CJW15 y SSD8) contra microorganismos patógenos de importancia en alimentos; se encontró que ambas cepas mostraron un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram positivas y negativas; sin embargo, no inhibieron el crecimiento de *S. Typhimurium*.

Este experimento se repitió tiempo después y desafortunadamente no se observó actividad antagónica contra ninguna cepa de *Salmonella*. Esto pudo deberse a que las condiciones de cultivo o de almacenamiento de los microorganismos antagónicos no fueron las adecuadas, ya que como menciona Romero (2005), las condiciones en la que un microorganismo se almacena y cultiva son los elementos críticos para el establecimiento de una producción eficiente de metabolitos secundarios. El efecto antagónico observado en este estudio y en los anteriores puede ser atribuido a la producción de bacteriocinas, las cuales generalmente se originan a partir de plásmidos que son producidos accidentalmente como un subproducto del mecanismo de proteínas. Debido a la mutación incidental en los plásmidos, las bacterias pueden inhibir la flora

competitiva y dominar en el medio (Avci *et al.*, 2016). De igual forma, el efecto puede desaparecer de un momento a otro.

5.1.3. Efecto de la temperatura y del medio de cultivo en la actividad antagónica de cepas de *Bacillus* spp. contra *Salmonella*

Una vez que se demostró que sí había efecto inhibitorio de las células de las cuatro cepas de *Bacillus* contra *Salmonella*, se determinó el efecto de la temperatura de incubación (30 y 35°C) y del medio de cultivo (CST, ICC y MM) en la actividad antagónica. Se eligieron esos medios de cultivo porque el contenido de nutrientes es diferente entre ellos, y lo que se busca es un medio en el cual se cultive a los microorganismos antagonistas y se obtenga la mayor actividad inhibitoria contra *Salmonella*. En la Tabla 7 se muestra el efecto antagónico de cepas de *Bacillus* incubadas a 35°C en los diferentes medios de cultivo contra *Salmonella*. Se observó que la cepa HZ9 no presentó actividad inhibitoria contra ninguna de las cuatro cepas de *Salmonella*. La cepa HZ21 sembrada en CST inhibió a *S. Agona*, *S. Montevideo*, *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium*; cuando se cultivó en ICC inhibió a *S. Agona*, *S. spp.*, *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium*; y cuando se incubó en MM sólo inhibió el desarrollo de *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium* con 10.33 y 11.67 mm. Los mayores halos de inhibición se observaron contra *S. Typhimurium* en los tres medio de cultivo ($P < 0.05$). Con respecto a la cepa HZ51, se encontró que sólo inhibió a *S. Typhimurium* cuando se cultivó en los tres caldos (halos de inhibición de 10.00 a 15.67 mm). Por su parte, la cepa HZ18 en CST inhibió a las cinco cepas de *Salmonella* con halos de inhibición de 10.33 a 14.33 mm; cuando esta cepa se cultivó en ICC sólo inhibió a *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium* y en MM inhibió a *S. spp.* y *S. Typhimurium*.

El análisis de varianza mostró que en los ensayos realizados a 35 °C con la cepa HZ18 los dos factores estudiados (medio de cultivo y cepas de *Salmonella*) así como su interacción fueron significativos ($P < 0.05$) por lo cual, el efecto

antagónico (expresado en diámetro de halos de inhibición) va a depender de la interacción entre el medio de cultivo y la cepa de *Salmonella*. Lo mismo ocurrió con la cepa HZ21 a 35°C.

Se realizó otro análisis de varianza para determinar en cual medio de cultivo se presentaron los mayores halos de inhibición independientemente de la cepa antagonista y de la cepa de *Salmonella*. Se encontró que los medios de cultivo fueron diferentes entre sí ($P = 0.0089$), y el medio en donde se observaron los mayores efectos inhibitorios a 35°C fue CST.

El efecto del medio de cultivo en la actividad antagónica de cepas de *Bacillus* incubadas a 30°C contra *Salmonella* se muestra en la Tabla 8. La cepa HZ9 cultivada en CST inhibió el crecimiento de *S. Agona*, *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium* con 12, 11 y 13.67 mm de diámetro de halo de inhibición, respectivamente; cuando se incubó en ICC sólo inhibió a *S. Typhimurium* con 12.33 mm. La cepa HZ21 presentó antagonismo contra las cinco cepas de *Salmonella* cuando se sembró en CST e ICC, mostrando halos de inhibición de 10 a 12.67 mm. Por su parte, la cepa HZ51 en CST inhibió *S. Agona*, *S. spp.*, *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium* con 12.33, 11, 12 y 12.33, respectivamente; en caldo ICC antagonizó a *S. spp.*, *S. spp.* (aislada de germinado) y *S. Typhimurium*. La cepa HZ18 mostró un efecto inhibitorio contra *Salmonella* similar al de HZ51. Las cepas de *Bacillus* cultivadas en MM no presentaron actividad antagónica contra ninguna cepa de *Salmonella*.

El análisis de varianza de los experimentos a 30°C con HZ18, reveló que el efecto del medio de cultivo (CST e ICC) en la variable respuesta no fue significativo ($P = 0.7551$); mientras que el factor cepa de *Salmonella* y la interacción entre ambos factores (medio de cultivo y cepa de *Salmonella*) fueron significativos ($P < 0.05$); de manera que, el efecto antagónico de la cepa HZ18 a 30°C dependió de la interacción entre los factores. Se observó el mismo resultado con la cepa HZ21.

Tabla 7. Efecto antagónico de cepas de *Bacillus* incubadas a 35°C en diferentes medios de cultivo contra *Salmonella*.

Medio de cultivo	Cepas de <i>Salmonella</i>	Diámetro de los halos de inhibición ¹ (mm)			
		<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ9	<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ21	<i>B. methylotrophicus</i> HZ51	<i>B. subtilis</i> HZ18
CST	S. Agona	0.00 ± 0.00	10.67 ± 0.58 ^{b2}	0.00 ± 0.00 ^c	12.00 ± 0.00 ^{cd}
	S. Montevideo	0.00 ± 0.00	10.33 ± 0.58 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	10.33 ± 0.58 ^e
	S. spp.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	10.67 ± 0.58 ^{de}
	S. spp. (germinado)	0.00 ± 0.00	12.00 ± 1.73 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	14.33 ± 0.58 ^{ab}
	S. Typhimurium	0.00 ± 0.00	13.00 ± 0.00 ^a	15.33 ± 0.58 ^a	11.67 ± 0.58 ^{cde}
ICC	S. Agona	0.00 ± 0.00	10.67 ± 0.58 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f
	S. Montevideo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f
	S. spp.	0.00 ± 0.00	13.33 ± 0.58 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f
	S. spp. (germinado)	0.00 ± 0.00	13.00 ± 1.73 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	14.67 ± 0.58 ^a
	S. Typhimurium	0.00 ± 0.00	12.33 ± 0.57 ^{ab}	15.67 ± 0.57 ^a	13.67 ± 1.52 ^{ab}
MM	S. Agona	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f
	S. Montevideo	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f
	S. spp.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	13.00 ± 0.00 ^{bc}
	S. spp. (germinado)	0.00 ± 0.00	10.33 ± 0.58 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^f
	S. Typhimurium	0.00 ± 0.00	11.67 ± 0.58 ^{ab}	10.00 ± 0.00 ^b	14.33 ± 0.58 ^{ab}

¹ Media de tres valores ± desviación estándar. ² Para cada cepa de *Bacillus* los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05) con la prueba de Tukey.

Tabla 8. Efecto antagónico de cepas de *Bacillus* incubadas a 30°C en diferentes medios de cultivo contra *Salmonella*.

Medio de cultivo	Cepas de <i>Salmonella</i>	Diámetro de los halos de inhibición ¹ (mm)			
		<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ9	<i>B. amyloliquefaciens</i> HZ21	<i>B. methylotrophicus</i> HZ51	<i>B. subtilis</i> HZ18
CST	S. Agona	12.00 ± 0.00 ^{b2}	11.00 ± 0.00 ^{bc}	12.33 ± 0.58 ^a	12.33 ± 0.57 ^{abc}
	S. Montevideo	0.00 ± 0.00 ^d	10.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e
	S. spp.	0.00 ± 0.00 ^d	11.00 ± 0.00 ^{bc}	11.00 ± 0.00 ^a	10.33 ± 0.58 ^d
	S. spp. (germinado)	11.00 ± 0.00 ^c	11.33 ± 0.58 ^b	12.00 ± 1.00 ^a	10.67 ± 0.58 ^{cd}
	S. Typhimurium	13.67 ± 0.58 ^a	12.67 ± 0.58 ^a	12.33 ± 0.58 ^a	12.67 ± 0.58 ^{ab}
ICC	S. Agona	0.00 ± 0.00 ^d	12.00 ± 0.00 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^b	11.33 ± 0.58 ^{bcd}
	S. Montevideo	0.00 ± 0.00 ^d	10.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e
	S. spp.	0.00 ± 0.00 ^d	11.00 ± 0.00 ^{bc}	11.33 ± 0.58 ^a	10.67 ± 1.15 ^{cd}
	S. spp. (germinado)	0.00 ± 0.00 ^d	10.00 ± 0.00 ^c	11.00 ± 0.00 ^a	10.33 ± 0.58 ^d
	S. Typhimurium	12.33 ± 0.58 ^b	12.67 ± 1.15 ^a	12.33 ± 0.58 ^a	14.00 ± 0.00 ^a
MM	S. Agona	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e
	S. Montevideo	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e
	S. spp.	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e
	S. spp. (germinado)	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e
	S. Typhimurium	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^e

¹ Media de tres valores ± desviación estándar. ² Para cada cepa de *Bacillus* los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05) con la prueba de Tukey.

Con base en los resultados obtenidos, se determinó que los experimentos posteriores se realizarían únicamente con la cepa HZ18 cultivada en CST a 35°C, ya que esta cepa a esas condiciones mostró la mayor actividad antagónica contra *Salmonella*.

En los medios de cultivo se encuentran macroelementos, microelementos, vitaminas y minerales. Dado que el metabolismo de los microorganismos se ve afectado por la composición y concentración de los diferentes nutrientes, es posible inducir cambios en su crecimiento (Arias *et al.*, 2009). En los experimentos se observó que el mayor efecto antagónico contra *Salmonella* se presentó cuando los antagonistas se cultivaron en un medio rico en nutrientes (CST), mientras que en el medio pobre de nutrientes (MM) no hubo inhibición (composición de medios de cultivo en el ANEXO).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de lo reportado por Moore *et al.* (2013), en donde probaron la actividad antagonista de cultivos de *B. subtilis* en medios con diferentes contenidos de nutrientes (NZY agar, Nutrient agar, AST y Starch agar) y dos temperaturas (30 y 37°C). Ellos observaron que los cultivos si crecían en los medios seleccionados en ambas temperaturas, sin embargo, a 37°C no presentaron actividad antagonista. Los cultivos de *Bacillus* sólo inhibieron el crecimiento de *Salmonella* después de ser cultivados en Starch agar a 30°C, obteniendo zonas de inhibición de 6.7-29.6, 4.3-25.6 y 7-23.6 mm para *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Dublin* SA2424 y *S. Enteritidis*, respectivamente.

5.2. Efecto de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* durante la germinación de semilla de alfalfa.

Como se mencionó anteriormente, la cepa de *B. subtilis* HZ18 presentó el mayor efecto antagónico contra *Salmonella* en los estudios llevados a cabo en medio de cultivo; es por ello, que se decidió evaluar el efecto inhibitorio de esa cepa y de sus metabolitos secundarios contra *Salmonella* en un modelo de germinación de semilla de alfalfa.

La cepa HZ18 y sus metabolitos se aplicaron junto con el agua de riego en diferentes días durante la germinación de semilla de alfalfa inoculada con una mezcla de *Salmonella* (1 Log UFC/g). Durante la germinación se monitoreó el comportamiento de *Salmonella* y de BMA.

En la Figura 2 se muestra el comportamiento de *Salmonella* y BMA durante la germinación de semilla de alfalfa regada con *B. subtilis* HZ18 y con los metabolitos secundarios producidos por la misma cepa. Se observó que el comportamiento de BMA fue el mismo con la aplicación de los cuatro tipos de riego. En las primeras 24 h, la población de BMA incrementó de 2-3 a 7.5 Log UFC/g aproximadamente, y se mantuvo constante en 8 Log UFC/g hasta el sexto día de germinación. Un comportamiento similar se observó en los tratamientos control (riego con agua). Con respecto a *Salmonella*, su comportamiento fue diferente en cada uno de los tratamientos. En la semilla de alfalfa regada con HZ18 en las primeras 24 h de germinación (tratamiento A) la población de *Salmonella* incrementó en 2 Log UFC/g en el primer día, se mantuvo constante y en el cuarto día comenzó a disminuir hasta tener una concentración de 1.6 Log UFC/g al final de la germinación. En el control regado con APE se observó un incremento de 4.5 Log UFC/ en las primeras 48 h, del segundo al sexto día se mantuvo ligeramente constante, obteniendo números finales de 6 Log UFC/g. Por otro lado, con la aplicación del antagonista durante las primeras 48 h (tratamiento B) la carga de *Salmonella* aumentó 2.5 Log UFC/g en el día uno, de ahí al tercer día presentó un ligero incremento y posteriormente disminuyó gradualmente hasta el fin de la germinación, hasta una concentración de 1.6 Log UFC/g. En el riego con agua, la población incrementó aproximadamente 4 Log UFC/g en los primeros dos días, posteriormente, la concentración se mantuvo constante hasta el final del proceso con 5 Log UFC/g. Por su parte, el riego en los días uno y tres de germinación (tratamiento C) mostró un aumento de *Salmonella* de 3 Log UFC/g en el primer día, y se mantuvo constante (~4 Log UFC/g) hasta el sexto día. En el control, desde el inicio y hasta el final de la germinación se observó una tendencia de incremento de

la concentración del patógeno, terminando en 6 Log UFC/g. Finalmente, la aplicación de metabolitos secundarios producidos por HZ18 (tratamiento D), permitió el aumento de la población de *Salmonella* en aproximadamente 3 Log UFC/g en el primer día, posteriormente, se mantuvo en 4 Log UFC/g hasta el tercer día, al cuarto día disminuyó en 1 Log UFC/g y después incrementó, hasta tener una carga de 3.7 Log UFC/g al final de la germinación. El comportamiento de *Salmonella* en el riego con agua fue similar al control regado con el antagonista los días uno y tres, sólo que en este caso la población final fue de 5 Log UFC/g.

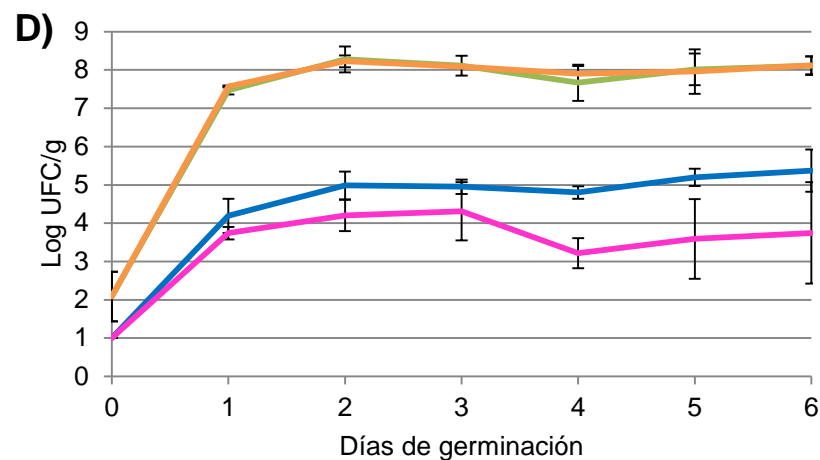
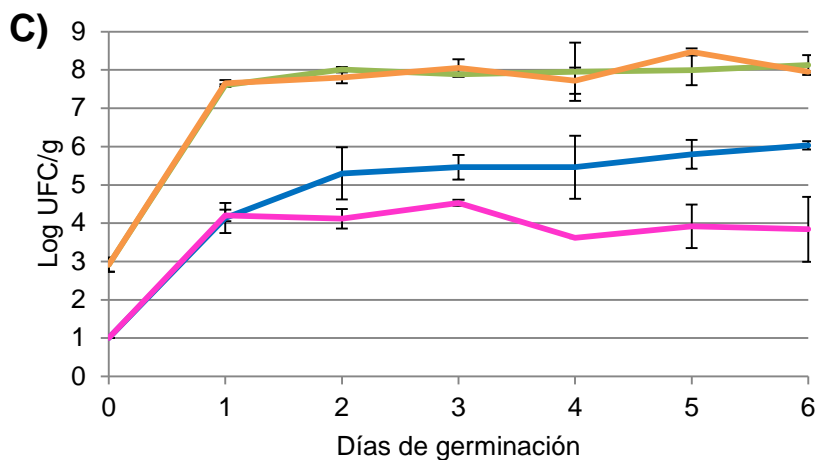
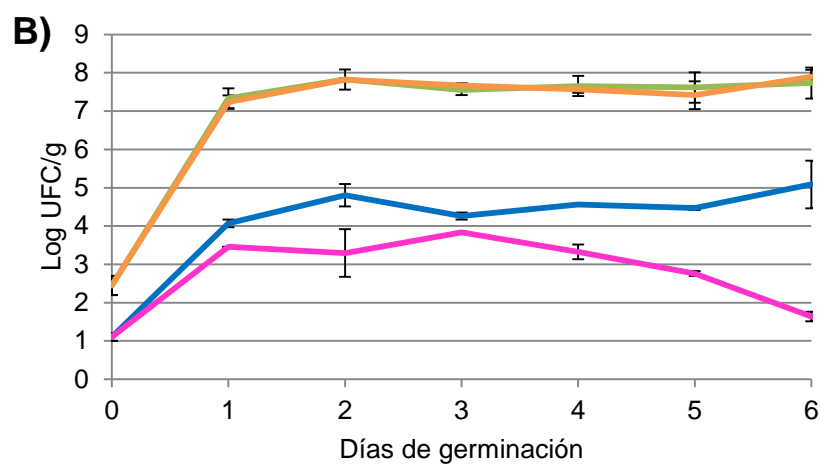
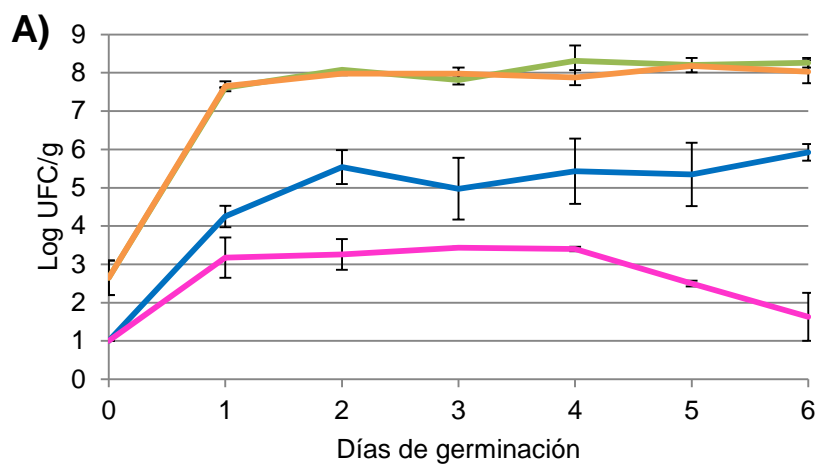


Figura 2. Comportamiento de *Salmonella* y BMA durante la germinación de semilla de alfalfa regado con *B. subtilis* HZ18 (6 Log UFC/mL). A) Riego en las primeras 24 h, B) Riego en las primeras 48 h, C) Riego en los días 1 y 3, y D) Riego con metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis* HZ18 en los días 1 y 3 de germinación. — *Salmonella* riego con agua. — *Salmonella* riego con *B. subtilis* HZ18. — BMA riego con agua. — BMA riego con *B. subtilis* HZ18.

A partir de los resultados obtenidos, para cada tipo de riego se determinaron los incrementos netos de la población de *Salmonella* en el sexto día de germinación que es el momento de la cosecha (Figura 3). En los germinados regados diariamente con agua (controles), la población de *Salmonella* alcanzó niveles entre 4 y 5 Log UFC/g. Los riegos con la cepa de *B. subtilis* HZ18 en las primeras 24 h, las primeras 48 h y los días 1 y 3 de germinación, limitaron significativamente el desarrollo de *Salmonella*. La aplicación de los metabolitos secundarios tuvo un efecto similar aunque con mayor variación. La aplicación de HZ18 durante las primeras 24 y 48 h de germinación presentaron los menores incrementos de *Salmonella*, con 0.63 y 0.51 Log UFC/g, respectivamente; y en relación a su respectivo control donde el incremento observado fue de 4.93 y 3.98 Log UFC/g, respectivamente. Por lo cual, estos tratamientos pudieran ayudar en el control de *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa.

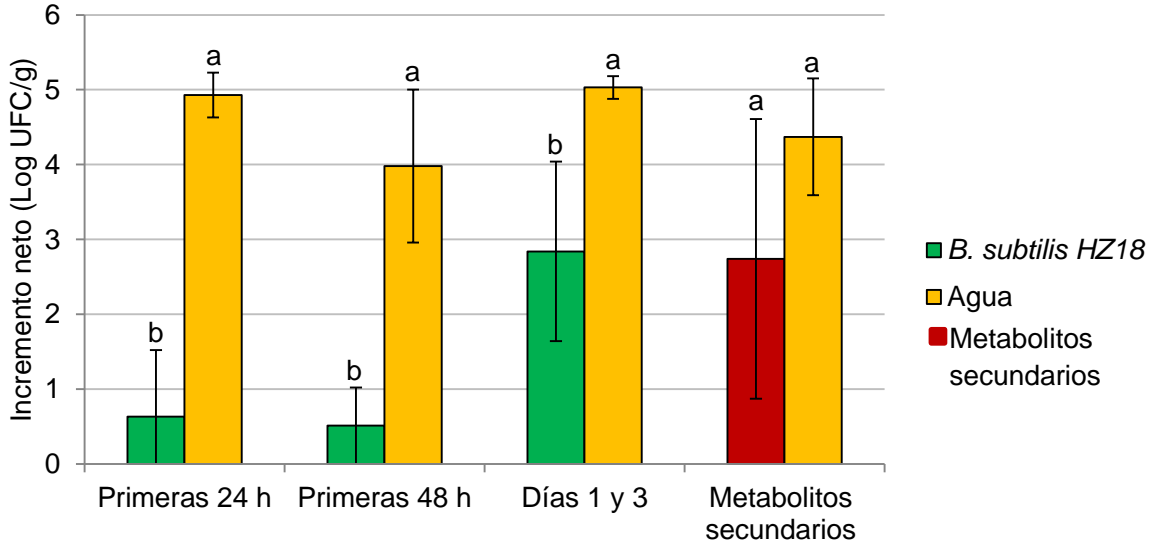


Figura 3. Incremento de la población de *Salmonella* en el sexto día de germinación de semilla de alfalfa con los diferentes tipos de riego. Para cada tipo de riego, las barras con letras diferentes son estadísticamente significativos ($P < 0.05$) con la prueba t de Student.

Una gran cantidad de consumidores alrededor del mundo han cambiado sus opciones dietéticas para incluir alimentos saludables, y uno de los productos más populares y consumidos es el germinado de alfalfa, el cual destaca por su elevado valor nutritivo y agradable sabor (Hong y Kang, 2016). Debido a que el consumo de este producto es principalmente en fresco, se han reportado una gran cantidad de brotes asociados a su consumo, en donde *Salmonella* se ha visto implicada en la mayoría de ellos (Liao, 2008). Con base en los brotes previos y en investigaciones epidemiológicas, se ha reportado que las semillas han sido la principal fuente de contaminación (Neo *et al.*, 2013). Uno de los principales problemas para asegurar la inocuidad de los germinados, no sólo es reducir la carga patógena presente en la semilla, sino también, evitar la multiplicación de células viables remanentes durante la germinación y el almacenamiento (Molinos *et al.*, 2008). Ya que, con una célula de algún patógeno que esté presente en la semilla, ésta puede crecer exponencialmente durante la germinación, debido a que el proceso se realiza en condiciones de temperatura, humedad y contenido de nutrientes que son óptimos para el crecimiento de microorganismos (Neo *et al.*, 2013). La mayoría de los estudios de desinfección se han centrado en eliminar a los patógenos de las semillas; sin embargo, ninguno ha logrado garantizar la eliminación completa sin afectar el porcentaje de germinación de las semillas y las características sensoriales de los germinados (Hong y Kang, 2016).

Una alternativa prometedora es la aplicación de microorganismos antagonistas o de sus metabolitos secundarios durante la germinación de la semilla, como se sugirió en este estudio. Aunque la aplicación de *B. subtilis* HZ18 en las primeras 24 y 48 h no redujo en 5 Log la población de *Salmonella* como lo recomienda la FDA, sí logró controlar el desarrollo de *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa, y esto se observó al obtener incrementos de aproximadamente 0.5 Log UFC/g en el día de la cosecha del germinado.

Otros autores han realizado estudios similares con la finalidad de eliminar por completo a los microorganismos patógenos; sin embargo, ninguno ha tenido

éxito. Liao (2008) investigó cómo el crecimiento de *Salmonella* durante la germinación de semilla de alfalfa es afectado por el tamaño del inóculo y *P. fluorescens* 2-79. En semilla inoculada con diferentes concentraciones de *Salmonella*, encontró que en los días 2 y 3 de germinación se alcanzó la máxima población de *Salmonella* y ésta no fue afectada por la carga inicial del patógeno (en nuestro estudio se observó el mismo comportamiento en la semilla inoculada con 1 Log UFC/g y regada con agua). Cuando las semilla fueron tratadas con la cepa de *P. fluorescens* 2-79, en el sexto día de germinación *Salmonella* incrementó en 1.2-1.6 Log, mientras que en la semillas control (sin adición de antagonista) la población incrementó en 3.6-3.8 Log. Los incrementos de *Salmonella* que se observaron con la aplicación de *P. fluorescens* 2-79 fueron mayores a los que se obtuvieron en el presente estudio. Fett (2006) evaluó el efecto de la aplicación de suspensiones de cepas de *P. fluorescens* 2-79, 2-79LacZ y 2-79.59.34 (8 Log UFC/g) antes de la germinación en semillas de alfalfa inoculadas con *Salmonella* (3 Log UFC/g). Encontró que esas cepas inhibieron eficazmente el crecimiento de *Salmonella* durante la germinación de las semillas, obteniendo reducciones de 4 a 5 Log UFC/g en el sexto día con respecto al control regado con agua. También observó que los germinados parecían normales y los pesos frescos de los mismos fueron similares al control. Neo *et al.* (2013) evaluaron la eficacia de cloro y de ácido peroxiacético en la desinfección de germinado de frijol mungo inoculado con *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. Los tratamientos de desinfección fueron aplicados en diferentes concentraciones y tiempos de contacto. Los resultados arrojaron que las mayores reducciones logarítmicas se obtuvieron con el aumento de la concentración del desinfectante y del tiempo de contacto. Los mejores tratamientos fueron el ácido peroxiacético a 70 ppm y cloro a 170 ppm por 180 s, reduciendo a los patógenos en un rango de 1.5 a 2.3 Log UFC/g. Aunque lo autores sugieren que el ácido peroxiacético puede ser utilizado para diseñar una estrategia de desinfección eficaz de germinados de frijol mungo, este tratamiento no logró eliminar a los patógenos y por lo tanto no aseguró la inocuidad del producto.

El uso de *B. subtilis* HZ18 como agente de control biológico puede ser una alternativa para controlar el crecimiento y supervivencia de bacterias patógenas como *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa, y podría aplicarse después de intervenciones físicas y químicas a las semillas, tales como, 20 000 ppm de cloro que es recomendado actualmente por la FDA, esto con la finalidad de reducir aún más el riesgo de enfermedades asociadas al consumo de germinados contaminados.

5.3. Efecto de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios en el crecimiento de germinados de alfalfa.

Los resultados de los estudios previos demostraron que *B. subtilis* HZ18 controló moderadamente el crecimiento de *Salmonella* durante la germinación de semillas de alfalfa; sorprendentemente, durante la realización de los experimentos, se observó que la aplicación de esa cepa incrementaba el tamaño de las plántulas de alfalfa. Es por ello, que se decidió evaluar simultáneamente el efecto de HZ18 y sus metabolitos secundarios sobre el crecimiento del germinado de alfalfa. La aplicación de la cepa promotora de crecimiento y sus metabolitos secundarios se realizó junto con el agua de riego en distintos tiempos durante la germinación de la semilla. Se determinó el porcentaje de germinación de la semilla, el tamaño de las plántulas de alfalfa y el rendimiento del germinado.

Se observó que la aplicación tanto de *B. subtilis* HZ18 como de sus metabolitos secundarios no disminuyó el porcentaje germinación de las semillas de alfalfa con respecto al tratamiento con agua (control). Los porcentajes de germinación fueron 95.6, 94.5 y 92.3 % con la aplicación de HZ18, metabolitos secundarios y agua, respectivamente. Es decir, la aplicación de ambos tratamientos (*B. subtilis* HZ18 y metabolitos secundarios) no afectó la germinación de las semillas de alfalfa.

Con respecto al efecto de HZ18 y de los metabolitos secundarios en la promoción del crecimiento de plántulas de alfalfa, en la Figura 4 se muestra la

dinámica de crecimiento de las plántulas de alfalfa durante la germinación. Se observó que desde el segundo y hasta el sexto día del proceso, hubo diferencia significativa entre los tamaños de las plántulas de los tratamientos, y estos fueron mayores a las plántulas regadas con agua ($P < 0.05$). Durante el proceso, los germinados regados con *B. subtilis* HZ18 en las primeras 24 y 48 horas de germinación tuvieron las mayores longitudes de plántulas con respecto a los demás tipos de riegos. En el día seis, los tamaños de los germinados tratados con HZ18 y con metabolitos secundarios fueron similares entre sí y mayores al control, alcanzando tamaños de 7.5-8.2 y 5.6 cm, respectivamente. Es decir, claramente se observó un efecto en el crecimiento de las plántulas de alfalfa con la aplicación de los tratamientos.

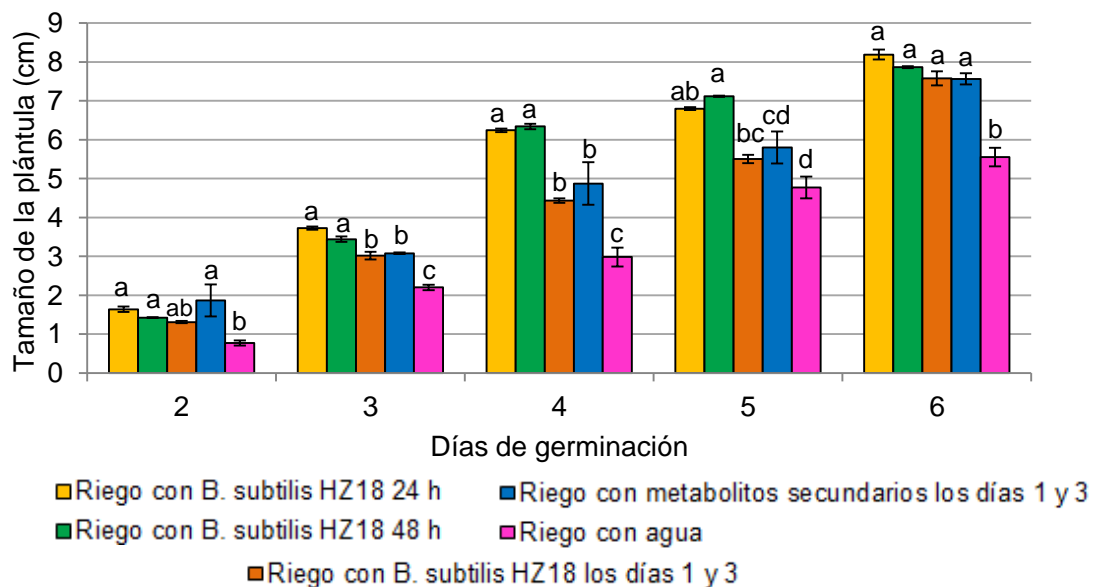


Figura 4. Efecto de la aplicación de *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios en la promoción del crecimiento de germinados de alfalfa. Para cada día de germinación las barras con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey.

Para consumo humano, los germinados de alfalfa se seleccionan por sus características de calidad, es decir, deben tener tallos estrechos blancos y pequeñas hojas de color verde oscuro. Por lo regular, la cosecha de este tipo de germinados se realiza en los días seis o siete de germinación, cuando las plántulas alcanzan una longitud de 3.8 a 5 cm (Baker, 2016). En este estudio, en el sexto día de germinación el tamaño de las plántulas de alfalfa tratadas con *B. subtilis* HZ18 y sus metabolitos secundarios fue de 8 cm aproximadamente, mayor a la longitud de calidad deseada. Por lo cual, bajo las condiciones de trabajo y con la aplicación de los tratamientos, el germinado de alfalfa se podría estar cosechando en el cuarto día de germinación (en este día alcanzó una longitud de entre 4 y 6 cm). Lo cual para los productores de germinados es una gran opción, ya que les representaría ahorros en gastos de dos días de producción.

Al finalizar el proceso de germinación se cosechó el germinado de alfalfa, se pesó y se calculó el rendimiento con respecto al peso del germinado regado con agua (Tabla 9). El tratamiento en el cual se aplicó el riego con las células de *B. subtilis* HZ18 durante las primeras 24 h presentó el mayor porcentaje de incremento con un 46.44 %, mientras que el menor lo exhibió el germinado tratado con los metabolitos secundarios. Se ha reportado que el rendimiento que se obtiene de germinado de alfalfa es de 5 veces el peso de la semilla (Baker, 2016). En este estudio, se encontraron rendimientos superiores y fueron de 7.7, 6.5, 7.2 y 6.4 veces el peso de la semilla, para el riego con células de *B. subtilis* HZ18 en las primeras 24 h, en las primeras 48 h, en los días 1 y 3, y con metabolitos secundarios, respectivamente.

En la naturaleza, los brotes de las plantas interactúan con un gran número de microorganismos diferentes. Estas interacciones, junto con el suelo y la condición climática, determinan el grado en que las plantas crecen y se propagan. Se ha reportado que el género *Bacillus* tienen el potencial de aumentar el crecimiento de plantas directamente, liberando fitohormonas, fijando N₂ en la rizósfera, solubilizando nutrientes como fosfatos, promoviendo la función

micorrízica en las raíces y regulando la producción de etileno en las raíces (Joo *et al.*, 2004).

Tabla 9. Rendimiento de germinado de alfalfa después de la aplicación de *B. subtilis* HZ18 o de sus metabolitos secundarios.

Tratamiento	Riego	Peso de germinado ¹ (g)	% de incremento ²
<i>B. subtilis</i> HZ18	Primeras 24 h	541.49	46.44
	Primeras 48 h	457.19	23.59
	En los días 1 y 3	504.30	36.39
Metabolitos secundarios	En los días 1 y 3	450.30	22.81

¹ Germinado obtenido de 70 g de semilla de alfalfa. ² Con respecto al peso de germinado de alfalfa regado con agua potable (control).

Bacterias del género *Bacillus*, en particular *B. amyloliquefaciens*, promueven el crecimiento de plantas mediante la producción de compuestos que estimulan el alargamiento de las mismas, además de que se encuentran entre los microorganismos de la rizósfera y también producen metabolitos secundarios que inhiben o suprimen a los patógenos de plantas (Boottanun *et al.*, 2017). La cepa de *B. subtilis* HZ18 empleada en este estudio, presentó las mismas cualidades, ya que fue aislada de la rizósfera de un cultivo de zarzamoras, controló el crecimiento de *Salmonella* durante el proceso de germinación y también promovió el alargamiento de las plántulas de alfalfa.

Como se mencionó, ya se ha realizado estudios con cepas de *Bacillus* para determinar los efectos benéficos directos sobre el rendimiento y crecimiento de las plantas; sin embargo, anterior a este trabajo se carecía de información sobre el efecto de *Bacillus* en el crecimiento de plántulas de alfalfa. Algunos de los trabajos realizados se describen a continuación.

Joo *et al.* (2004) encontraron que la aplicación de *B. pumilus* promovió significativamente el crecimiento de la planta de pimiento rojo (24 ± 0.2 cm) con respecto al control (21.4 ± 0.1 cm), la estimulación del alargamiento fue atribuida a la producción de giberelinas.

Lim y Kim (2009) encontraron que *B. licheniformis* K11 y *B. subtilis* AH18 estimularon la germinación de semillas y crecimiento de la raíz de pimiento verde, tomate, cebolla verde y espinaca. En particular las plantas de pimiento verde y tomate mostraron hasta 20 % de incremento en la raíz, tallos y crecimiento de hojas. Cuando se trató simultáneamente con una combinación de las auxinas AH18 y K11 (fracciones de este estudio), las tasas de crecimiento de pimiento y tomate fueron 20 % más altas que las observadas con el tratamiento sin auxinas.

Reetha *et al.* (2014) evaluaron el efecto de *P. fluorescens* y *B. subtilis* sobre el crecimiento de plantas de cebolla; los brotes tratados con los microorganismos presentaron una longitud significativamente mayor al control. Los tamaños de las plantas fueron de 27.41, 25.30 y 24.10 cm, con *P. fluorescens*, *B. subtilis* y agua, respectivamente. Los autores determinaron que el efecto de promoción de crecimiento se debió a la producción de ácido indol acético.

Hernández-Castillo *et al.* (2014) determinaron el efecto de tres cepas de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*) en la promoción de crecimiento y rendimiento de chile jalapeño cv. Tampiqueño en condiciones de invernadero. La altura de las plantas expuestas a los microorganismos fue estadísticamente superior ($P < 0.05$) a las expuestas a tiabendazol y agua; los tratamientos con las cepas de *Bacillus* tuvieron un incremento promedio en la altura de 28 % en comparación al tratamiento con tiabendazol, y de 34.5 % en relación con el control.

Pea-Yam *et al.* (2015) aplicaron la cepa de *B. subtilis* ITC-N67 a chile pimiento morrón cv. Jalapeño y observaron que no sólo incrementó el peso del fruto, sino también el número de frutos por planta.

Finalmente, la aplicación de tanto de *B. subtilis* HZ18 como de sus metabolitos secundarios, estimuló el crecimiento e incrementó el rendimiento de los germinados de alfalfa, sin afectar el porcentaje de germinación de las semillas.

5.4. Identificación y cuantificación de compuestos promotores del crecimiento de germinados de alfalfa producidos por *B. subtilis* HZ18

Una vez que se determinó que la cepa de *B. subtilis* HZ18 promovió el crecimiento de germinados de alfalfa, se procedió a dilucidar a los posibles compuestos que estaban ejerciendo el efecto promotor de crecimiento en las plántulas. Se ha reportado, en la mayoría de los estudios presentados en el apartado 5.3, que los incrementos en el tamaño, en la biomasa aérea y subterránea de las plantas tratadas con microorganismos promotores del crecimiento de plantas, se atribuyen principalmente a que esos microorganismos tienen la habilidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo del suelo y producir hormonas de crecimiento vegetal. Estas últimas juegan un rol importante en las plantas, muchos estudios han evaluado sus efectos en la germinación de semillas y en el crecimiento de las plántulas (Wang *et al.*, 2016). Estas hormonas están formadas por un grupo de sustancias con actividad biológica que actúan sobre una determinada parte de la planta causando un efecto de crecimiento específico o de diferenciación. Entre ellas se pueden encontrar principalmente a auxinas, giberelinas y citoquininas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, en este estudio se determinó la producción de giberelinas y ácido indol acético por la cepa de *B. subtilis* HZ18 a partir de medio de cultivo.

5.4.1. Producción de giberelinas por *B. subtilis* HZ18

El género *Bacillus* comprende una amplia variedad de especies que se encuentran en muchas ocasiones asociadas a plantas, ejerciendo un efecto positivo sobre el crecimiento a través de una serie de mecanismos que involucran la promoción de crecimiento vegetal (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Uno de estos mecanismos, es la producción de giberelinas (Karadeniz *et al.*, 2006). Por esta

razón, se determinó la presencia de estos compuestos en cultivos de *B. subtilis* HZ18. Para ello, se cultivó la cepa en seis caldos de cultivo, posteriormente se extrajeron las giberelinas mediante rotaevaporación con acetato de etilo y a los extractos se les realizó una cromatografía en capa fina para evidenciar la posible presencia de dichos compuestos, se utilizó ácido giberélico (AG_3) como control positivo. En la Figura 5, se muestra la cromatografía en capa fina de los extractos de giberelinas producidos por *B. subtilis* HZ18 a partir de diferentes medios de cultivo. La aparición de las manchas oscuras en los extractos a la misma distancia de la mancha del AG_3 , podría indicar la presencia de giberelinas en los extractos. Al calcular y comparar el R_f de cada extracto con el control, estos fueron similares (Tabla 10). Por lo cual, hasta este punto se determinó que los extractos posiblemente contenían compuestos de giberelinas.

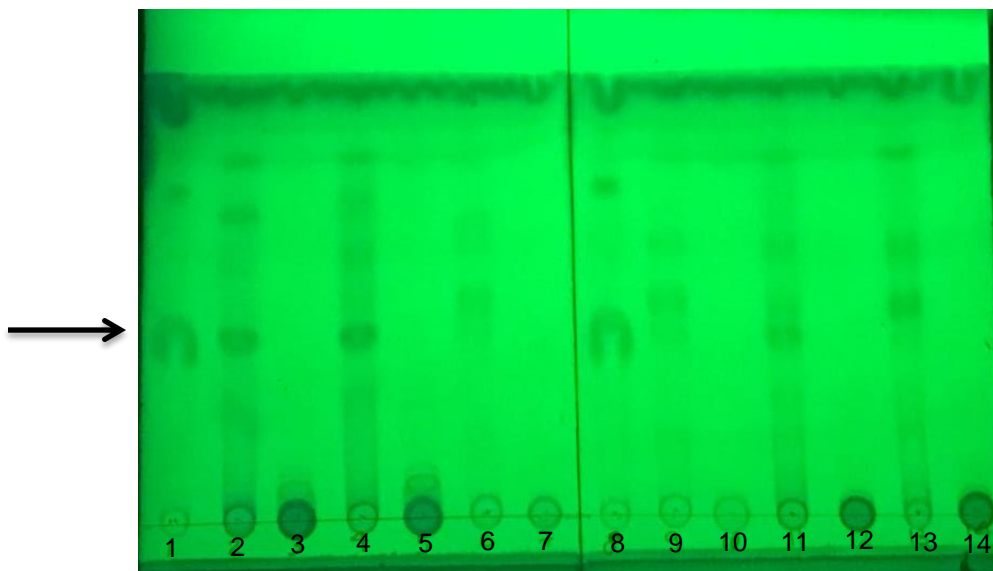


Figura 5. Cromatografía en capa fina de giberelinas producidas por *B. subtilis* HZ18 en diferentes medios de cultivo. 1: AG_3 , 2: extracto CST Trp, 3: control CST Trp, 4: extracto CST, 5: control CST, 6: extracto CST 10 % Trp, 7: control CST 10 % Trp, 8: AG_3 , 9: extracto CST 10 %, 10: control CST 10 %, 11: extracto CN Trp, 12: control CN Trp, 13: extracto CN y 14: control CN.

Tabla 10. Valores de movilidad cromatográfica (Rf) de los extractos de giberelinas producidos por *B. subtilis* HZ18 en diferentes medios de cultivo.

No. de carril	Medio de cultivo del extracto de giberelinas ¹	Valor Rf
1	AG ₃	0.45
2	CST Trp	0.45
4	CST	0.45
6	CST 10 % Trp	0.46
9	CST 10 %	0.46
11	CN Trp	0.45
13	CN	0.46

¹AG₃: Ácido giberélico; CST Trp: Caldo Soya Trypticosa con triptófano; CST: Caldo Soya Trypticosa; CST 10 % Trp: Caldo Soya Trypticosa diluido al 10 % con triptófano; CST 10 %: Caldo Soya Trypticosa diluido al 10 %; CN Trp: Caldo Nutritivo con triptófano y CN: Caldo nutritivo.

La cromatografía en capa fina como tal, no es una técnica de identificación; sin embargo, sirve para ver la presencia de compuestos afines a una fase móvil, por tal motivo, con esta técnica no se pudo asegurar con certeza la presencia de giberelinas en los extractos.

Para evidenciar la existencia de giberelinas en extractos, algunos autores han determinado la actividad de α -amilasa mediante un ensayo de actividad biológica, como el que se llevó a cabo en esta investigación. Se seleccionaron los extractos producidos en CST y CN, debido a que son los medios de cultivo mayormente utilizados para el cultivo de cepas de *Bacillus*. Se pusieron en contacto semillas de cebada desembrionadas con los extractos de HZ18 obtenidos en CST y CN, se dejaron reposar por 24 h y se determinó el contenido de azúcares reductores. En la Tabla 11 se muestra el contenido de azúcares reductores en semillas de cebada después de la actividad de giberelinas producidas por *B. subtilis* HZ18. Las semillas con embrión y tratadas con agua (control de germinación)

presentaron el mismo contenido de azúcares reductores que los tratamientos sin embrión y con los extractos de CST y CN ($P < 0.05$). Incluso esta concentración fue mayor a la de las semillas sin embrión y GA_3 (control con giberelina). Las semillas sin embrión tratadas con agua, CST y CN (controles negativos) tuvieron una concentración similar de azúcares.

Tabla 11. Azúcares reductores en semillas de cebada después de la actividad de giberelinas producidas por *B. subtilis* HZ18.

Semilla	Tratamientos	Concentración de azúcares reductores ¹ (g/L)
Con embrión	Agua	$5.77 \pm 0.05^{a^2}$
Sin embrión	Agua	2.18 ± 0.13^c
	Extracto de CST	5.87 ± 0.89^a
	CST	1.63 ± 0.09^c
	Extracto de CN	5.51 ± 0.24^a
	CN	1.67 ± 0.11^c
	GA_3 (0.02 g/mL)	3.53 ± 0.12^b

¹ Media de tres valores \pm desviación estándar. ² Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos ($P < 0.05$) con la prueba de Tukey.

La germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas están asociados con un conjunto de genes y fitohormonas que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica. Este efecto hormonal se puede atribuir principalmente a GA_3 , ya que estudios demuestran que puede liberar a una semilla de la latencia, aumentar tanto el porcentaje de germinación como el vigor de la misma y degradar el endospermo (Wang *et al.*, 2016). El debilitamiento del endospermo es por la activación de genes de giberelinas (la cual se realiza en el embrión de la semilla) que modifican las proteínas de la pared celular. De manera que, el endospermo de la semilla se pone a disposición del embrión, a través de las actividades de algunas enzimas hidrolasas, principalmente α -amilasa, se hace

parte del almidón de la semilla y de la aleurona que rodean (Miransari y Smith, 2014). α -amilasa como miembro principal de las proteínas secretoras, se libera de la capa de aleuronas al endospermo para la hidrólisis del almidón a azúcares simples. La actividad de α -amilasa puede indicar el estado de crecimiento de la plántula en germinación (Wang *et al.*, 2016).

En este estudio se utilizó un control de germinación, el cual simuló el proceso de germinación normal, de manera que el contenido de azúcares reductores obtenido fue por la actividad de α -amilasa inducida solamente por las giberelinas presentes en el embrión de la semilla. En los tratamientos realizados, a las semillas se les retiró el embrión, de manera que sin éste no habría giberelinas presentes de manera natural, por lo cual, al ponerlas en contacto con los extractos producidos por HZ18 o con los controles negativos, si hubiera presencia de giberelinas en éstos, dichos compuestos inducirían la síntesis de α -amilasa y con ello la hidrólisis de almidón a azúcares reductores. Sorprendentemente, se encontró que al poner en contacto las semillas sin embrión con los extractos de giberelinas producidas por HZ18, la concentración de azúcares reductores fue igual al control de germinación. Por lo cual, en los extractos obtenidos del cultivo de *B. subtilis* HZ18 sí había presencia de giberelinas, y se observó claramente al inducir la síntesis de α -amilasa en las semillas de cebada desembrionadas.

Ya que se observó la presencia de giberelinas en los extractos de los cultivos de HZ18, se procedió a realizar la identificación y cuantificación de dichos compuestos mediante HPLC-PDA. Al realizar el análisis de los extractos se observaron cromatogramas similares, en todos se observaron dos picos mayoritarios alrededor de los tiempo de retención de 17 y 24 min. En la Figura 6 sólo se muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos y corresponde al extracto de *B. subtilis* HZ18 en CST, claramente se observan dos picos con absorbancias máximas a 16.79 y 23.89 min. Al inicio se pensó que los dos picos correspondían a giberelinas; sin embargo, al compararlos con el cromatograma obtenido para el estándar de AG₃, no correspondieron los tiempos de retención por

lo cual, los compuestos que aparecieron en ambos tiempos no son ácido giberélico. Es decir, en los extractos no estaba presente el AG₃, de manera que el efecto biológico observado en las semillas de cebada puede ser atribuido a alguna de las otras 128 giberelinas reportadas en la literatura. Se realizó una curva de calibración con AG₃, y con los picos de máxima absorbancia se determinó la concentración de equivalentes de giberelinas presentes los extractos de *B. subtilis* HZ18 (Tabla 12), esto, en base al efecto biológico observado anteriormente.

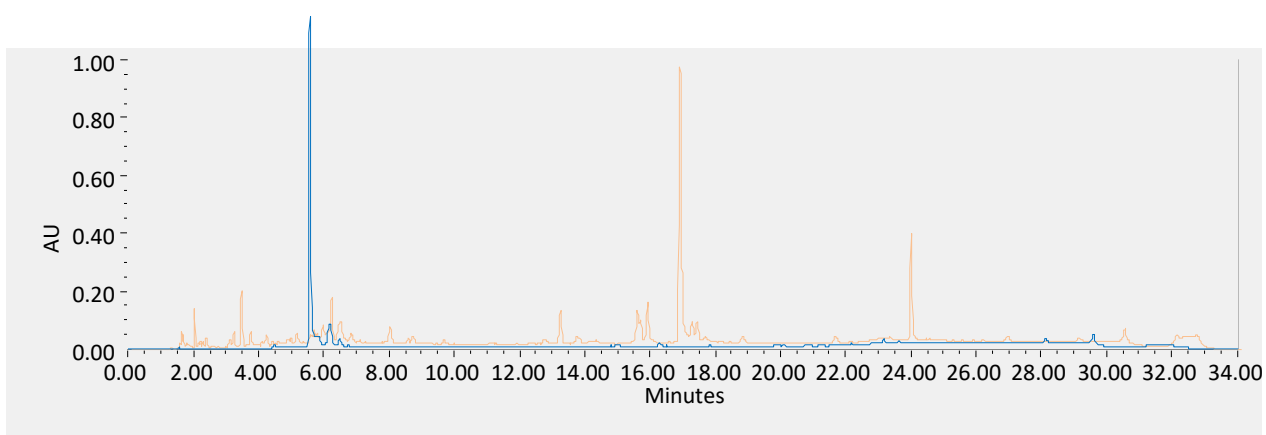


Figura 6. Cromatograma del extracto de giberelinas producidos por *B. subtilis* HZ18 en CST (naranja) y AG₃ (azul).

Las concentraciones de equivalentes de giberelinas que se encontraron en los extractos fueron en un rango de 25.35 a 2057.25 µg/mL. Los extractos de HZ18 a partir de CST Trp y CST presentaron la mayor concentración de equivalentes de giberelinas, mientras que los extractos de CST 10%, CN Trp y CN la menor.

La cuantificación de giberelinas siempre ha sido extremadamente difícil ya que estos compuestos tienen poca absorción ultravioleta, ninguna fluorescencia y ninguna característica química distintiva que pueda constituir la base de un ensayo químico específico, es por eso que para su cuantificación se prefiere utilizar HPLC (Xie *et al.*, 2011).

Tabla 12. Producción de giberelinas por *B. subtilis* HZ18 en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Equivalentes de giberelinas (µg/mL) ¹
CST Trp	2057.25 ± 29.57 ^{a2}
CST	1635.12 ± 22.76 ^{ab}
CST 10 % Trp	1404.79 ± 10.09 ^b
CST 10 %	611.70 ± 1.77 ^c
CN Trp	28.53 ± 3.45 ^c
CN	25.35 ± 6.75 ^c

¹ Media de dos valores ± desviación estándar. ² Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05) con la prueba de Tukey.

Se ha reportado que una gran cantidad de microorganismos en especial los del género *Bacillus*, promueven el crecimiento vegetal mediante la producción de giberelinas; algunos de ellos se ilustran en la Tabla 13, donde se observa que las concentraciones producidas por la cepa HZ18 son mayores a las reportadas, resaltando que en este trabajo la concentración se reportó como equivalentes de giberelinas.

Tabla 13. Producción de giberelinas por cepas de *Bacillus*.

Microrganismo	Concentración de giberelinas	Referencia
<i>B. pumilus</i> CJ-69 <i>B. macroides</i> CJ-29 <i>B. cereus</i> MS-1	60.2 ng/100 mL 21.9 ng/100 mL 44.6 ng/100 mL	Joo <i>et al.</i> , 2004
<i>B. megaterium</i> <i>B. cereus</i>	1.60 µg/100 mL (GA ₃) 0.84 µg/100 mL (GA ₃)	Karadeniz <i>et al.</i> , 2006
<i>B. megaterium</i> TV-91C <i>B. subtilis</i> TV-17C	215 ng/µL (GA ₃) 214 ng/µL (GA ₃)	Turán <i>et al.</i> , 2014

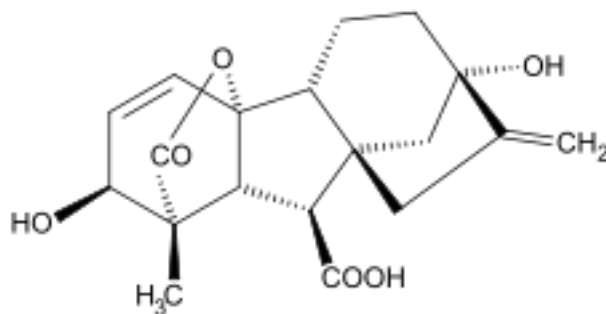
Debido a que existen una gran cantidad de giberelinas con actividad biológica reportadas, y a que con el HPLC no se pudo identificar al compuesto o compuestos responsables del efecto promotor de crecimiento en el germinado de alfalfa, los extractos fueron sometidos a un análisis en UPLC-MS/MS.

LC-MS/MS es un método efectivo para la cuantificación de hormonas de crecimiento vegetal porque MS/MS mejora la selectividad y especificidad de los análisis debido a que la aplicación de MRM utiliza un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. En el primer cuadrupolo de MRM se selecciona un ion precursor para cada compuesto y luego éste es fragmentado en la celda de colisión para producir otro ion "producto" que es monitoreado por el tercer cuadrupolo. Posteriormente, se detecta una señal sólo si el ion precursor seleccionado en el primer cuadrupolo produce el ion producto elegido en el tercer cuadrupolo, por lo que, cada compuestos proporciona una transición iónica distinta de los iones producto, lo cual es un diagnóstico para la presencia de un ese compuestos en particular. Es por ello que LC-MS/MS se ha utilizado con frecuencia para discriminar múltiples hormonas vegetales con diferentes precursores y masas de iones producto (Pan y Wang, 2009).

Las condiciones del método que se emplearon en el análisis de HPLC fueron ajustadas al UPLC-TOF MS/MS. Nuevamente, se utilizó AG₃ como estándar (giberelina control), los extractos de *B. subtilis* HZ18 seleccionados para el análisis fueron de CST y CST Trp, por ser los medios en los que se observó mayor concentración de equivalente de giberelinas. Al realizar el análisis del AG₃ (Figura 7) se obtuvo el cromatograma y la espectrometría de masa que se muestra en la Figura 8, en donde el pico de AG₃ apareció en 1.96 min. En el espectro de masas se pudo identificar la masa de 345.149 m/z correspondiente al ion precursor, también se observaron tres fragmentos mayoritarios con 239.15, 143.09 y 221.14 m/z. Estos iones o fragmentos se encontraron en la base de datos del Mass bank, lo que permitió la identificación y confirmación del estándar. Además, se determinó que el método empleado ajustado a UPLC-TOF MS/MS sí podría ser utilizado para

la identificación de giberelinas en los extractos de HZ18. En ambos extractos no se observó la presencia de AG₃.

Figura 7. Estructura del ácido giberélico.



Posteriormente, se analizó el extracto proveniente de CST, arrojando el cromatograma y el espectro TOF-MS/MS de la Figura 9. Se observó un pico a los 2.02 min que correspondió a AG₇ (de acuerdo con la base de datos del Mass bank), para este compuesto se observaron dos fragmentos de 211.08 y 311.13 m/z. Al hacer el análisis MS-MS se encontraron 285.15, 128.04 y 196.11 m/z como fragmentos mayoritarios. Aunque la base de datos identificó la presencia de esta giberelina en el extracto, el patrón de fragmentación se comparó con lo ya reportado (Tabla 14), se observó que de los fragmentos mayoritarios sólo el de 285.15 m/z estaba en la literatura; también se encontraron los fragmentos 211.08 y 311.13 m/z, y si bien éstos no fueron iones mayoritarios, sí estuvieron presentes en el patrón de fragmentación, aunque en baja intensidad. En la Figura 9, se puede apreciar la estructura sugerida de los iones mayoritarios obtenidos para AG₇.

EL resultado del análisis del extracto de CST Trp reveló la presencia de AG₇ y AG₉. El pico de AG₇ apareció en un tiempo de retención de 2.00 min y los fragmentos que se identificaron fueron 211.08 y 311.14 m/z. El espectro del análisis

MS-MS mostró a 285.15, 196.11 y 128.04 m/z como fragmentos mayoritarios, además de las estructuras iónicas sugeridas (Figura 10). Cuando se comparó el patrón de fragmentación con la literatura, sólo se encontró el pico mayoritario de 285.15 m/z; sin embargo, también se localizaron los fragmentos identificados de 211.08 y 311.14 m/z, y aunque no fueron mayoritarios, estuvieron presentes en baja intensidad en el patrón de fragmentación. Por su parte, el pico de AG₉ se observó a los 4.37 min y sólo se identificó el fragmento de 271.09 m/z. El análisis MS-MS reveló que 314.25, 74.02 y 240.15 m/z fueron los picos mayoritarios; sin embargo, sólo el de 314.25 m/z se encontró en la literatura (Figura 11). El ion de 271.09 m/z aunque no fue de los principales, sí estaba reportado (Tabla 14).

Para poder identificar a un compuesto, deben corresponder al menos tres de los fragmentos mayoritarios con los reportados en las bases de datos o literatura, como se observó con en el análisis del estándar de AG₃. En este estudio, para ambos extractos, sólo uno de los fragmentos mayoritarios para cada giberelina se encontró en la literatura. Por lo cual, no fue posible identificar con certeza la presencia de AG₇ y AG₉ en los extractos y por consiguiente la producción de éstas por *B. subtilis* HZ18. Sin embargo, si se podría sugerir la posible presencia de AG₇ y AG₉ en los extractos de HZ18, ya que con anterioridad se evidenció el efecto biológico en semillas de cebada, al inducir la síntesis de α -amilasa.

Algunos microorganismos producen giberelinas a concentraciones muy bajas, normalmente en un intervalo de 10^{-9} a 10^{-16} M, dependiendo de la cepa. Por lo tanto, es esencial un enriquecimiento elevado de giberelinas antes de su detección por técnicas analíticas estándar. Idealmente, el disolvente de extracción debe de extraer eficientemente a las giberelinas, mientras que la cantidad de sustancias interferentes extraídas debe ser lo más baja posible. La eficiencia de extracción de giberelinas depende de la medida en que éstas se asocian con otros compuestos, tales como proteínas, lípidos, entre otros (Urbanová *et al.*, 2013). De manera que, para poder identificar con exactitud a los compuestos que ejercieron el efecto promotor de crecimiento en germinados de alfalfa, hace falta realizar más

estudios a los extractos, esto con la finalidad de purificar lo más que se pueda a los compuestos de interés y así eliminar las interferencias.

Tabla 14. Espectros de masas reportados para AG₇ y AG₉.

Referencia	Fragmentos de AG ₇ (m/z)	Fragmentos de AG ₉ (m/z)
Mass bank	223.053, 211.079, 329.303	253.325, 271.084, 314.943
FoodB	329.138, 311.128, 285.149 283.133, 267.138, 241.159	271.169, 315.159, 297.149 269.154, 227.179, 225.160 253.159, 255.130
Urbanová <i>et al.</i> , 2013	287, 223, 211, 168	271, 253, 121

Figura 8. Cromatograma y espectro TOF MS/ MS de AG₃.

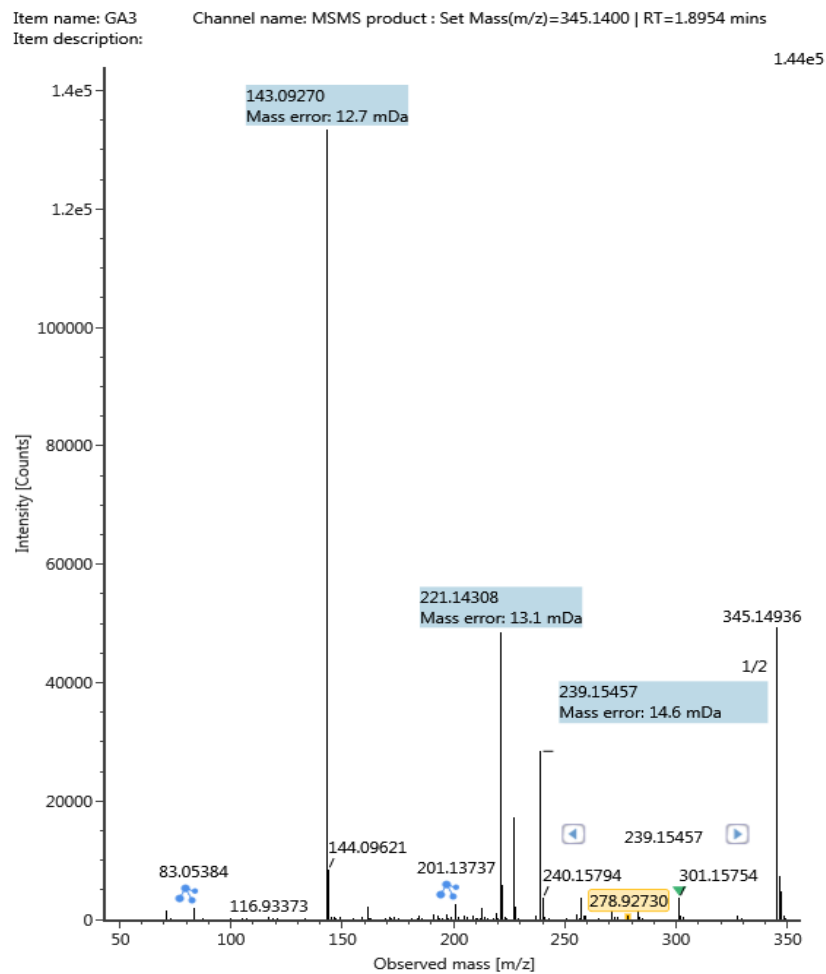
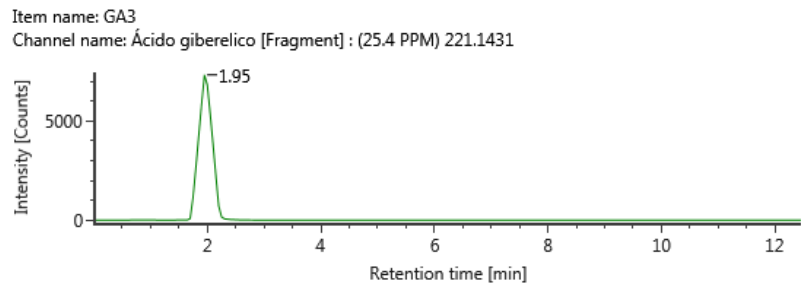
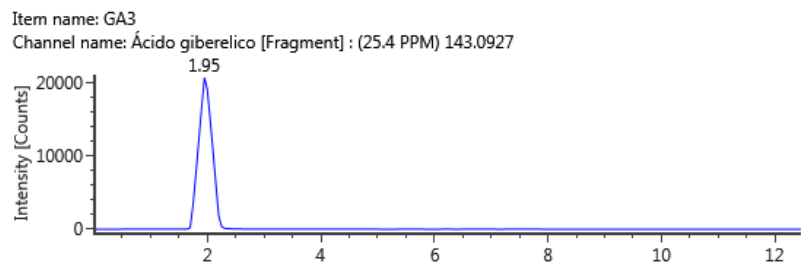
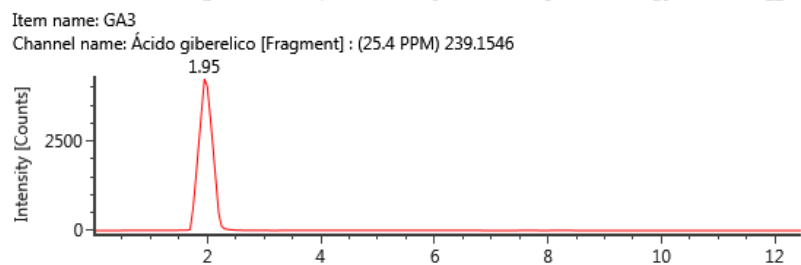
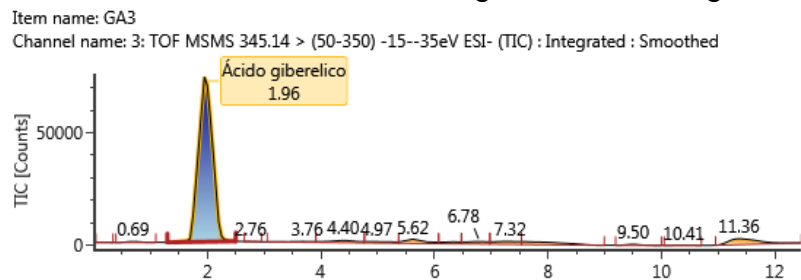


Figura 9. Cromatograma y espectro TOF-MS/MS del extracto de *B. subtilis* HZ18 en CST.

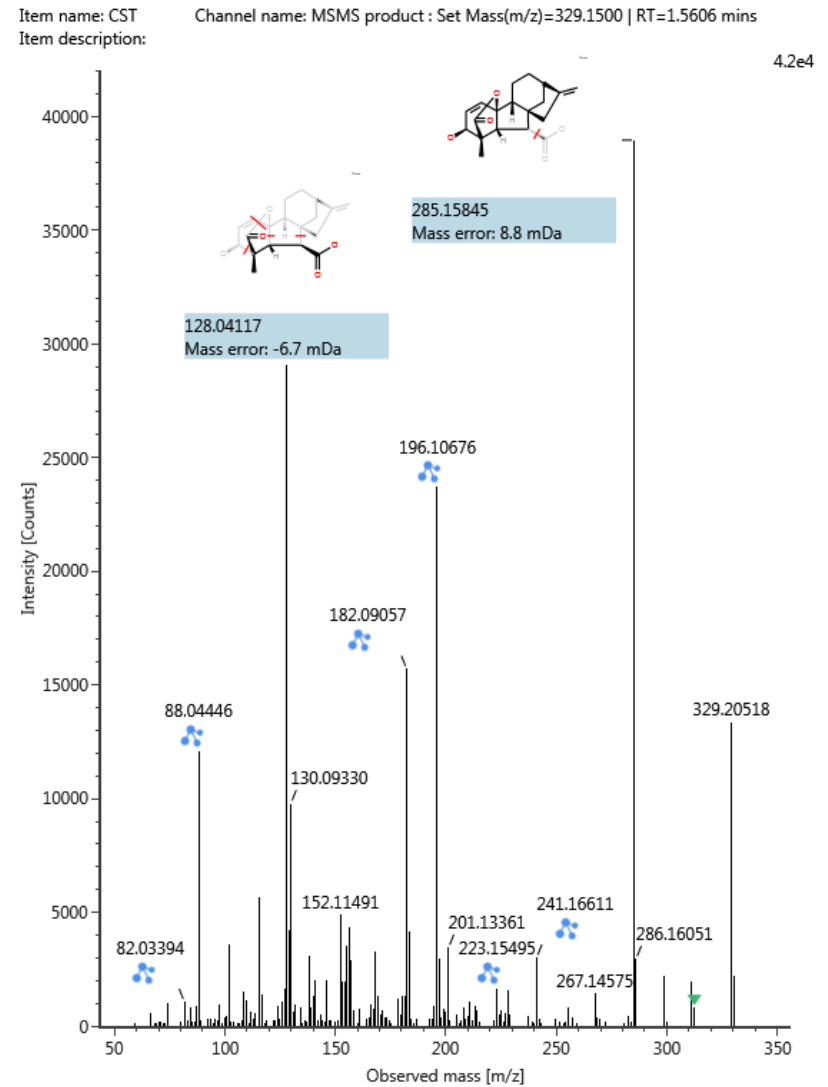
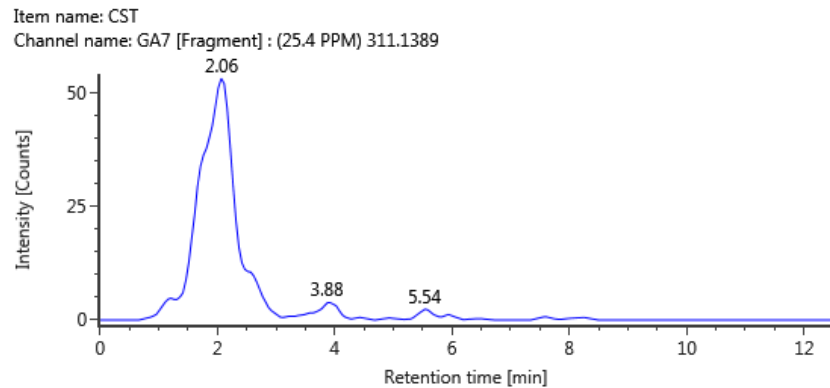
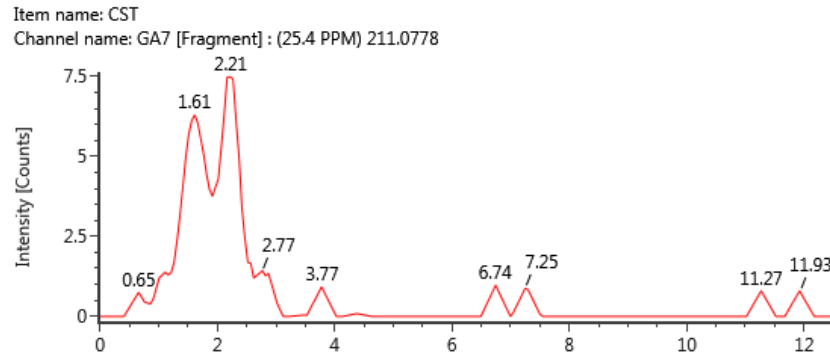
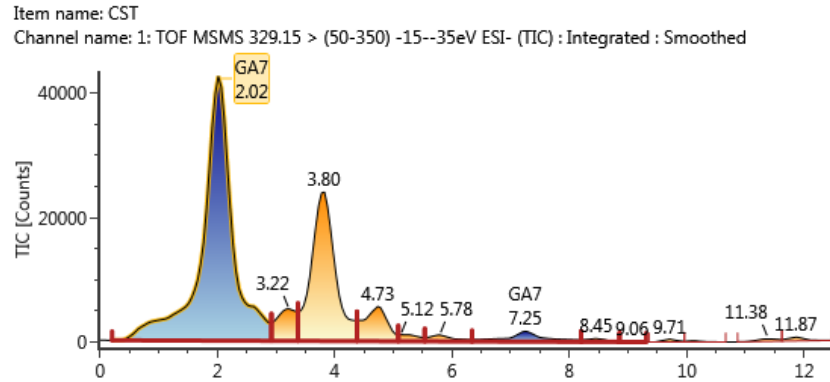


Figura 10. Cromatograma y espectro TOF-MS/MS del extracto de *B. subtilis* HZ18 en CST Trp (a).

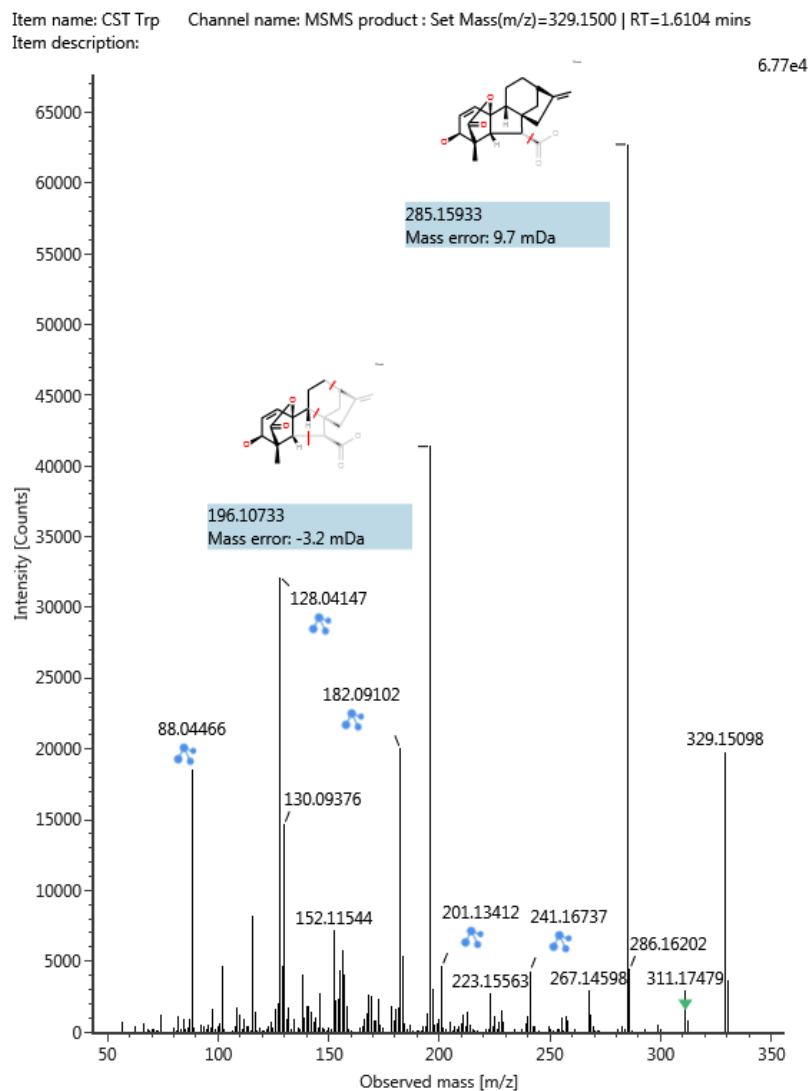
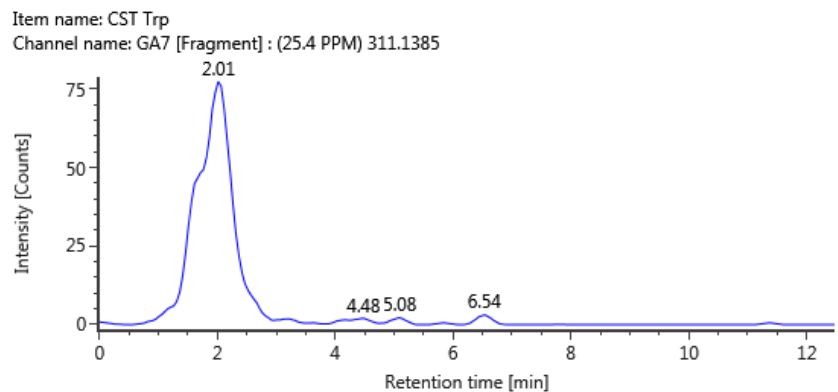
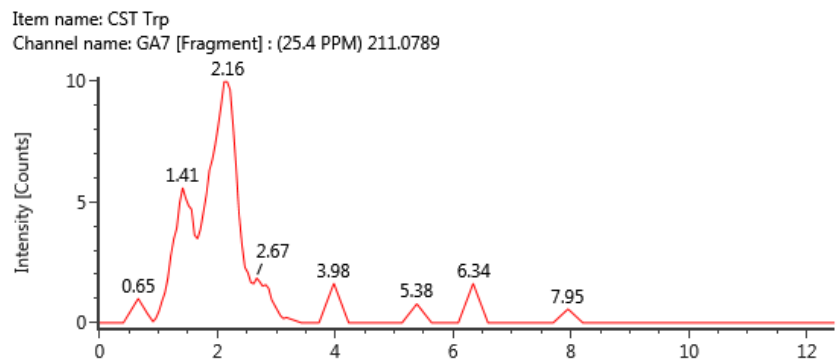
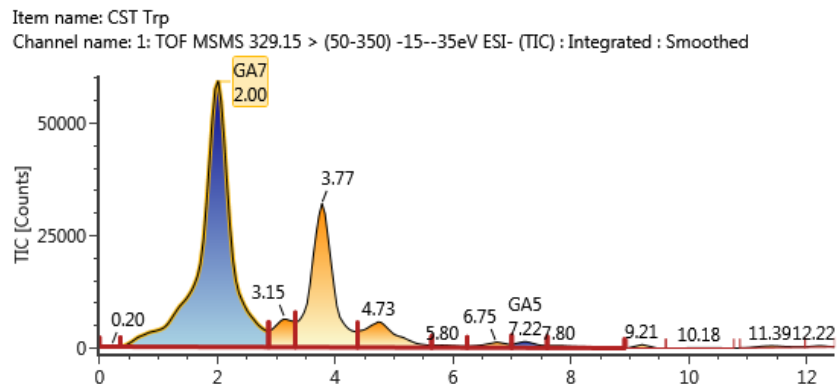
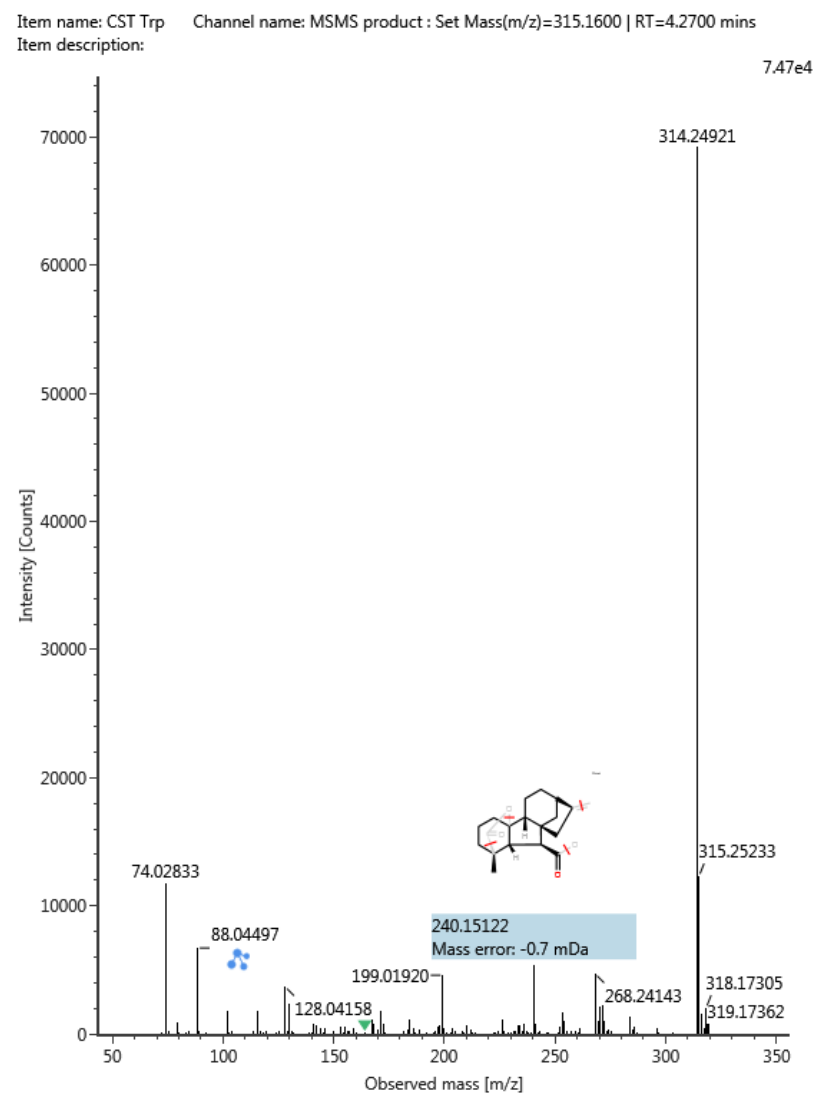
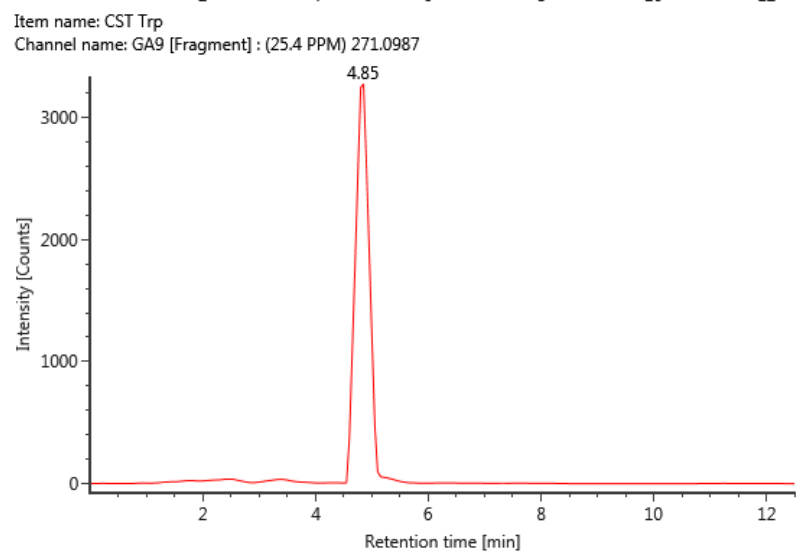
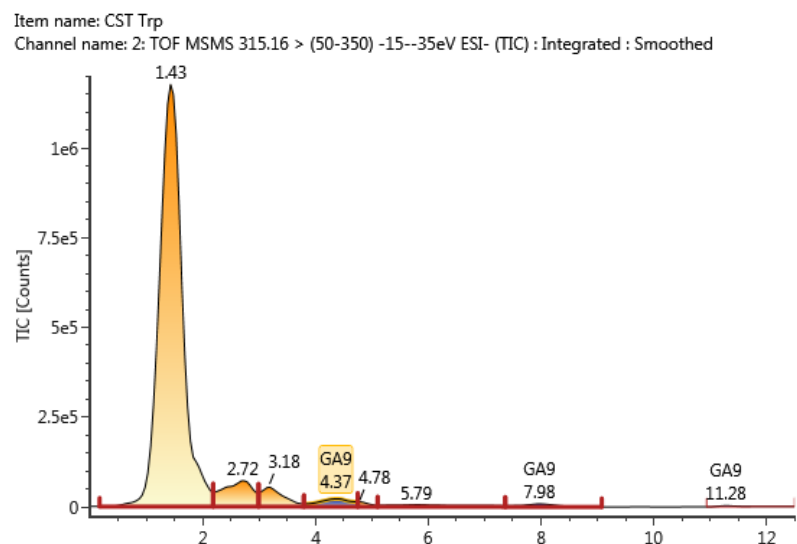


Figura 11. Cromatograma y espectro TOF-MS/MS del extracto de *B. subtilis* HZ18 en CST Trp (b).



5.4.2. Producción de ácido indol acético por *B. subtilis* HZ18

La promoción de crecimiento de plantas por microorganismos, en este caso del género *Bacillus*, también se ha atribuido a la síntesis de ácido indol acético (AIA) (Kapoor *et al.*, 2016). Esta auxina es una hormona de crecimiento vegetal, que juega un rol importante en la regulación de las siguientes funciones: ciclo celular, crecimiento y desarrollo, formación de tejidos vasculares y polen, desarrollo de otras partes de las plantas y la elongación de células vegetales (Miransari y Smith, 2014).

En este trabajo se cuantificó la producción de AIA en cultivos de *B. subtilis* HZ18 a partir de medios con y sin Trp (Tabla 15). Las concentraciones de AIA se encontraron en un rango de 1.30 a 6.55 µg/mL. Las cantidades mayores se obtuvieron en los medios de cultivo de CST 10 % y CN con triptófano, éstas fueron de 5.77 y 6.55 µg/mL ($P < 0.05$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores para cepas de *Bacillus* (Tabla 16).

Con base en lo anterior, el efecto promotor de crecimiento de plantas de la cepa de *B. subtilis* HZ18, también se debió a la producción de AIA. Como se mencionó, se sabe que el AIA promueve la división, la elongación y la diferenciación celular apoyada principalmente por la acción de giberelinas, particularmente en referencia a la activación del alargamiento de meristemas y restos sub apicales (Materán *et al.*, 2009).

Tabla 15. Producción de AIA por *B. subtilis* HZ18 en diferentes medio de cultivo.

Medio de cultivo	Presencia de Trp	Ácido indol acético (µg/mL)*
CST	+	3.83 ± 0.19 ^{b**}
	-	1.68 ± 0.10 ^c
CST diluido (10 %)	+	5.77 ± 0.34 ^a
	-	1.30 ± 0.16 ^c
CN	+	6.55 ± 0.23 ^a
	-	1.68 ± 0.14 ^c

* Media de cuatro valores ± desviación estándar. ** Los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente significativos (P < 0.05) con la prueba de Tukey

Tabla 16. Producción de ácido indol acético por cepas de *Bacillus*.

Micorganismo	Concentración de AIA	Referencia
<i>B. megaterium</i>	2.15 µg/100 mL	Karadeniz <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus</i> spp.	1-17 µg/mL	Tejera-Hernández <i>et al.</i> , 2011
<i>B. megaterium</i> Jz11 y ESH-7, <i>B. subtilis</i> A055	2.3 – 6.8 mg/mL	Martínez <i>et al.</i> , 2013
<i>B. subtilis</i>	12.67 µg/mL	Reetha <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus</i> spp.	4-25 µg/mL	Peña-Yam <i>et al.</i> , 2016

6. CONCLUSIONES

Las cepas antagonistas evaluadas (*B. amyloliquefaciens* HZ9, *B. amyloliquefaciens* HZ21, *B. methylotrophicus* HZ51 y *B. subtilis* HZ18) mostraron efecto inhibitorio contra *Salmonella in vitro*; no obstante, la cepa HZ18 presentó la mayor actividad antagónica contra el patógeno.

Los metabolitos secundarios producidos por las cepas antagonistas presentaron actividad antimicrobiana contra *Salmonella*; sin embargo, el efecto se perdió con el tiempo.

Los microorganismos antagonistas cultivados a 35°C y en CST mostraron los mayores efectos antagónicos contra *Salmonella*.

Las aplicación de *B. subtilis* HZ18 durante las primeras 24 y 48 h de germinación de semillas de alfalfa fue una buena alternativa en el control de *Salmonella*, por lo cual, estos tratamientos podrían ayudar a asegurar la inocuidad de los germinados de alfalfa.

El uso tanto de *B. subtilis* HZ18 como de sus metabolitos secundarios, promovió el crecimiento e incrementó el rendimiento de germinados de alfalfa, sin afectar el porcentaje de germinación de las semillas. Además, el proceso de germinación se podría reducir a 4 días, los que representaría ahorros en costos de producción.

No fue posible identificar con certeza la presencia de AG₇ y AG₉ en los extractos de *B. subtilis* HZ18. Sin embargo, si se podría sugerir su posible presencia ya que se observó la síntesis de α -amilasa en semillas de cebada desembrionadas.

La cepa de *B. subtilis* HZ18 produjo ácido indol acético en diferentes medios de cultivo, lo que indicó que la actividad promotora de crecimiento en los germinados también pudo deberse a la presencia de estos compuestos.

La cepa de *B. subtilis* HZ18 presentó simultáneamente un efecto antagónico y promotor de crecimiento cuando se aplicó durante la germinación de semillas de alfalfa, lo cual es sumamente importante ya que es difícil encontrar a un microorganismo que presente ambas bondades. Aprovechar y explotar al máximo las cualidades de la cepa a nivel piloto es una buena alternativa y podría traer consigo grandes beneficios económicos a los productores de germinados de alfalfa.

Perspectivas:

Escalar el proyecto a nivel piloto y evaluar que el efecto antagónico y de promoción de crecimiento de *B. subtilis* HZ18 permanezca.

Continuar con el análisis de los extractos de *B. subtilis* HZ18 para dilucidar qué compuestos están ejerciendo el efecto promotor del crecimiento de los germinados de alfalfa.

Evaluar el efecto antagónico de *B. subtilis* HZ18 contra otros microorganismos patógenos asociados brotes de enfermedad por el consumo de germinados de alfalfa, por ejemplo contra *E. coli* O157:H7.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, M., Ali, N., y Suleman, P. (2008). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop protection*, 27(10), 1354-1359.

Alnaimat, S., Aladaileh, S., Shattal, S., Al-asoufi, A., Nassarat, H., y Abu-Zaitoon, Y. (2017). Isolation and molecular characterization of a newly isolated strain of *Bacillus* sp. HMB8 with a distinct antagonistic potential against *Listeria monocytogenes* and some other food spoilage pathogens. *Jordan journal of biological sciences*, 10(2), 135-143.

Amber, P., Akram, A., Qureshi, R., y Akram, Z. (2012). HPLC analysis for secondary metabolites detection in *Sclerotium rolfsii* isolated from chickpea. *Pakistan journal botanic*, 44(2), 417-422.

Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., y Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories*, 8(1), 1.

Arbsuwan, N., Sirithorn, P., Daduang, S., Dhiravisit, A., y Thammasirirak, S. (2014). Purification and characterization of antimicrobial substances from *Bacillus licheniformis* BFP011. *Applied biochemistry and microbiology*, 50(6), 580-587.

Avci, A., Üzmez, S., Alkan, F., Bagana, İ., Nurçeli, E., y Çiftçi, E. (2016). Antimicrobial activity spectrums of some *Bacillus* strains from various sources. *GIDA/The Journal of food*, 41(5), 323-328.

Baker, K. A. (2016). *Microbiological and quality characteristics of alfalfa (Medicago sativa) and mung bean (Vigna radiata) sprouts grown using different water sources and treated post-harvest* (Doctoral dissertation). Clemson University, United States.

Barbosa, G., y Bermúdez, D. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos. *Scientia agropecuaria*, 1(1), 81-93.

Bautista, L. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos* (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javerina, Bogotá, Colombia.

Bautista-Baños, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagonicos. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 8(1), 1-6.

Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., y Caputo, L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2(1), 1102-1111.

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.

Bizani, D., y Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *Journal of applied microbiology*, 93(3), 512-519.

Bojórquez, A., Gutiérrez, G., Báez, C., Sánchez, A., Montoya, G., y Pérez, N. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra ximhai*, 6(1), 51-56.

Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, G., y Sermswan, W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB express*, 7(1), 16.

Bosques, J. (2003). *Curso básico de hidroponía*, Capá, Moca.

Buck, W., Walcott, R., y Beuchat, R. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant health progress*, 10(1), 1094.

Cálix-Lara, F., Rajendran, M., Talcott, T., Smith, B., Miller, K., Castillo, A., y Taylor, T. (2014). Inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial lactic acid bacteria food safety intervention. *Food microbiology*, 38(1), 192-200.

Castañeda-Ramírez, C., Cortes-Rodríguez, V., Bideshi, K., Rincón-Castro, M., y Barboza-Corona, E. (2011). Isolation of *Salmonella* spp. from lettuce and

evaluation of its susceptibility to novel bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* and antibiotics. *Journal of food protection*®, 74(2), 274-278.

Castro, O., Cantero, V., y Bucio, L. (2013). Participación de las citocininas en la estimulación del crecimiento vegetal por *Bacillus megaterium*. *Biológicas revista de la DES ciencias biológico agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 11(1), 64-72.

CDC. (2000) Foodborne illnesses-adding fresh fruits and vegetables to the equation. Recuperado el 20 de mayo de 2016, de <http://foodsafety.psu.edu>.

CDC. (2017). Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Recuperado el 25 junio de 2016, de <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>.

CDC. (2016). Multistate Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Alfalfa Sprouts from One Contaminated Seed Lot (Final Update). Recuperado el 16 de mayo de 2016, de <http://www.cdc.gov/salmonella/muenchen-02-16/index.html>.

Dalal, J., y Kulkarni, N. (2013). Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *Current research in microbiology and biotechnology*, 1(2), 62-69.

Da Silva Malheiros, P., Daroit, J., y Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in food science and technology*, 21(6), 284-292.

Demain, L., y Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *In history of modern biotechnology* springer, 1(1), 1-39.

Ding, H., Fu, J., y Smith, A. (2013). Microbial contamination in sprouts: how effective is seed disinfection treatment?. *Journal of food science*, 78(4), 495-501.

Eshel, D., Regev, R., Orenstein, J., Droby, S., y Gan-Mor, S. (2009). Combining physical, chemical and biological methods for synergistic control of postharvest diseases: a case study of black root rot of carrot. *Postharvest biology and technology*, 54(1), 48-52.

Fan, X., Rajkowski, K. T., & Thayer, D. W. (2003). Quality of alfalfa sprouts grown from irradiated seeds. *Journal of food quality*, 26(2), 165-176.

FDA. (Octubre de 2004). Growing sprouts in retail food establishment CFP issues 02-III-01 and 04-III-012. Recuperado el 16 de mayo de 2016, de <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/ucm078758.htm>

Fett, F. (2006). Inhibition of *Salmonella enterica* by plant-associated pseudomonads in vitro and on sprouting alfalfa seed. *Journal of food protection*, 69(4), 719-728.

Földes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., y Szigeti, J. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of applied microbiology*, 89(5), 840-846.

Gond, K., Bergen, S., Torres, S., y White Jr. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological research*, 172(1), 79-87.

Graham, T. L. (1991). A rapid, high resolution high performance liquid chromatography profiling procedure for plant and microbial aromatic secondary metabolites. *Plant physiology*, 95(2), 584-593.

Guo, Y., Yu, Z., Xie, J., y Zhang, R. (2012). Identification of a new *Bacillus licheniformis* strain producing a bacteriocin-like substance. *Journal of microbiology*, 50(3), 452-458.

Gupta, V., Jain, K., Gill, S., y Gupta, K. (2012). Development and validation of HPLC method-a review. *International research journal of pharmaceutical and applied sciences*, 2(4), 17-25.

Han, Y., Zhang, B., Shen, Q., You, C., Yu, Y., Li, P., y Shang, Q. (2015). Purification and identification of two antifungal cyclic peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(8), 2202-2212.

Hernández-Castillo, D., Lira-Saldivar, H., Gallegos-Morales, G., Hernández-Suárez, M., y Solis-Gaona, S. (2014). Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. *Phyton (Buenos Aires)*, 83(1), 49-55.

Hernández, C., Aguilera, M., y Castro, E. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 31(4), 137.

Hong, J., y Kang, H. (2016). Effect of sequential dry heat and hydrogen peroxide treatment on inactivation of *Salmonella* Typhimurium on alfalfa seeds and seeds germination. *Food microbiology*, 53(1), 9-14.

Joo, J., Kim, M., Lee, J., Song, S., y Rhee, K. (2004). Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology letters*, 26(6), 487-491.

Jung, Y., Choi, M., y Rhee, S. (2009). Potential use of supercritical carbon dioxide to decontaminate *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium in alfalfa sprouted seeds. *International journal of food microbiology*, 136(1), 66-70.

Kapoor, R., Soni, R., y Kaur, M. (2016). Gibberellins production by fluorescent *Pseudomonas* isolated from Rhizospheric soil of Malus and Pyrus. *International journal of agriculture, environment and biotechnology*, 9(2), 193.

Karadeniz, A., Topcuoğlu, F., y Inan, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World journal of microbiology and biotechnology*, 22(10), 1061-1064.

Karlovsky, P. (2008). Secondary metabolites in soil ecology. *Secondary metabolites in soil ecology, Heidelberg*, 1(1), 1-19.

Leães, L., Velho, V., Caldas, G., Ritter, C., Tsai, M., y Brandelli, A. (2015). Expression of essential genes for biosynthesis of antimicrobial peptides of *Bacillus* is modulated by inactivated cells of target microorganisms. *Research in microbiology*, 167(2), 83-89.

Liao, C. H. (2008). Growth of *Salmonella* on sprouting alfalfa seeds as affected by the inoculum size, native microbial load and *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Letters in applied microbiology*, 46(2), 232-236.

Lim, J. H., y Kim, S. D. (2009). Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *Journal of the korean society for applied biological chemistry*, 52(5), 531-538.

Lisboa, P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, A., y Brandelli, A. (2010). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International microbiology*, 9(2), 111-118.

Liu, X., Shim, M., Yao, Z., Lee, Y., Lee, W., Kim, J., y Kim, H. (2016). Properties of antimicrobial substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CJW15 and *Bacillus amyloliquefaciens* SSD8. *Microbiology biotechnology letters*, 44(1), 9-18.

Luna-Martínez, L., Martínez-Peniche, A., Hernández-Iturriaga, M., Arvizu-Medrano, M., y Pacheco Aguilar, R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 63-69.

Materán, E., Fernández, M., Valenzuela, S., Sáez, K., Seemann, P., Sánchez-Olate, M., y Ríos, D. (2009). Abscisic acid and 3-indolacetic acid levels during the reinvigoration process of *Pinus radiata* D. *Plant growth regulation*, 59(2), 171-177.

Miransari, M., y Smith, L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and experimental botany*, 99(1), 110-121.

Molinos, C., Abriouel, H., López, L., Valdivia, E., Omar, B., y Gálvez, A. (2008). Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food and chemical toxicology*, 46(8), 2912-2921.

Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V., y Sorokulova, I. (2013). Antagonistic activity of *Bacillus* bacteria against food-borne pathogens. *Journal of probiotics and health*, 1(3), 1-6.

Muhammad, N., Akbar, A., Shah, A., Abbas, G., Hussain, M., y Khan, A. (2015). Isolation optimization and characterization of antimicrobial peptide

producing bacteria from soil. *Journal of animal and plant sciences*, 25(4), 1107-1113.

Muhammad, A., Ali, A., Naz, A., Hassan, A., Riaz, N., Saeed-ul-Hassan, S., y Barh, D. (2016) New broad-spectrum peptide antibiotic produced by *Bacillus brevis* strain MH9 isolated from margalla hills of Islamabad, Pakistan. *International journal of peptide research and therapeutics*, 22(2), 271-279.

Neo, Y., Lim, Y., Phua, K., Khoo, H., Kim, J., Lee, C., y Yuk, G. (2013). Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. *Food microbiology*, 36(2), 475-480.

Nieto, R. (2005). *Estructura y fisiología de las semillas*. Chapingo, México: ISBN.

Palomeque, E., Reséndez, M., Ríos, C., Reyna, Á., Mata, S., Galván, S., y Rodríguez, G. (2017). Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afroditá en invernadero. *Revista tierra latinoamericana*, 35(2), 169-178.

Pan, X., y Wang, X. (2009). Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 877(26), 2806-2813.

Pea-Yam, P., Ruz-Snchezauthor, E., Barboza-Coronaauthor, E., y Reyes-Ramrezauthor, A. (2015). Isolation of mexican *Bacillus* species and their effects in promoting growth of chili pepper (*Capsicum annum* L. cv Jalapeño). *Indian journal of microbiology*, 56(3), 375-378.

Piernas, V. y Guiraud, P. (1997). Microbial hazards related to rice sprouting. *Journal food science technology*, 32(1), 297-305.

Reetha, S., Bhuvaneshwari, G., Thamizhiniyan, P., y Mycin, R. (2014). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). *International journal of current microbiology and applied sciences*, 3(2), 568-574.

Rodríguez, G. (2013) Efecto de la aplicación de paclobutrazol y metil jasmonato en la bulbificación y diferenciación de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Coreano' (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

Romero, M. (2005). *Discovery of the new antimicrobial compound 7-O-malonyl macrolactin A* (Doctoral dissertation). Dissertation Van Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Salazar, M. y Cruz, G. (2015). *Capacidad antagónica de metabolitos secundarios producidos por Bacillus sp. contra Salmonella enterica y Escherichia coli O157* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

Sansinenea, E., y Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33(8), 1523-1538.

Sharif, M., Yazdani, M., Almas, Z., Ghias, W., Qureshi, R., Zakki, S., y Qazi, H. (2016). *Bacillus* species found antagonistic against bacteria isolated from currency notes in local circulation. *Biomedical letters*, 2(2), 86-90.

Sharma, R., Singh, D., y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.

Solís, R., Pérez, C., y Santoyo, G. (2014). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas revista de la DES ciencias biológico agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 15(2), 36-41.

Subramanian, S., y Smith, L. (2015). Bacteriocins from the rhizosphere microbiome—from an agriculture perspective. *Frontiers in plant science*, 1(1), 6.

Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M., y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista ciencias biológicas*, 42(3), 131-138.

Thirabunyanon, M., y Thongwittaya, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection. *Research in veterinary science*, 93(1), 74-81.

Turan, M., Ekinçi, M., Yildirim, E., Günes, A., Karagöz, K., Kotan, R., y Dursun, A. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 38(3), 327-333.

Urbanová, T., Tarkowská, D., Novák, O., Hedden, P., y Strnad, M. (2013). Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 112(1), 85-94.

Vásquez, M., Suárez, H., y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71.

Villalobos, E. (Primera edición). (2006). Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica: Editorial universidad de Costa Rica, ciudad universitaria “Rodrigo Facio”.

Wang, L., Chen, Y., Yang, Y., Wang, Z., y Xiong, F. (2016). Effects of exogenous gibberellic acid and abscisic acid on germination, amylases, and endosperm structure of germinating wheat seeds. *Seed science and technology*, 44(1), 64-76.

Wulff, G., Mguni, M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., y Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant pathology*, 51(5), 574-584.

Xie, W., Han, C., Zheng, Z., Chen, X., Qian, Y., Ding, H., y Lv, C. (2011). Determination of Gibberellin A3 residue in fruit samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 127(2), 890-892.

8. ANEXO

Composición de medios de cultivo

Caldo Soya Trypticaseína (CST)

Tripteína	17 g
Peptona de soya	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Agua destilada	1 L
pH	7.3

Infusión Cerebro Corazón (ICC)

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Peptona de gelatina	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2.5 g
Dextrosa	2 g
Agua destilada	1 L
pH	7.4

Medio Mínimo (MM)

NaH ₂ PO ₄	6 g
K ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl	1 g
NaCl	0.5 g
cido succínico	0.1 g
Fructosa	0.5 g
Triptófano	0.1 g
MgSO ₄ 1M	0.2 mL
CaCl ₂ 1M	10 L
Agua destilada	1 L
pH	7.2