

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE

POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

(PROPAC)

**“Antagonismo microbiano como alternativa para controlar el desarrollo de
Salmonella enterica y *Escherichia coli* O157 en germinados de alfalfa”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

L.N. JOSÉ EMMANUEL CERVANTES CASTRO

DIRIGIDA POR

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

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

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Antagonismo microbiano como alternativa para controlar el desarrollo de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157 en germinado de alfalfa

TESIS

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

Presenta:

L.N. José Emmanuel Cervantes Castro

Dirigido por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

SINODALES

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Secretario

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche

Vocal

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Suplente

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

Suplente

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

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2013
México

RESUMEN

Los germinados de alfalfa en años recientes han adquirido gran importancia entre la población debido a sus propiedades nutritivas. Sin embargo, con frecuencia se han visto implicados en brotes de enfermedades causados por *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157, debido probablemente a que generalmente se consumen crudos sin la aplicación de un tratamiento de desinfección previo que asegure la eliminación de microorganismos patógenos, o bien a que los tratamientos aplicados no son efectivos. El uso de antagonistas microbianos se ha empleado con éxito en el control de fitopatógenos; sin embargo, escasa es la información respecto a su aplicación sobre microorganismos patógenos a humanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antagónico de microorganismos aislados de diversas fuentes contra *S. enterica* y *E. coli* O157 durante el proceso de germinación de semillas de alfalfa. *In vitro* se evaluó el efecto antagónico de 39 cepas aisladas de diversas fuentes (queso, coliflor, betabel, semillas de amaranto, materia fecal de bebé y suelo de cultivo orgánico) contra *S. enterica* y *E. coli* O157. Se seleccionaron las cepas con efecto antagónico contra los patógenos y se determinó si no había antagonismos entre ellas para poder establecer mezclas. Posteriormente se evaluó el efecto antagónico de las mezclas seleccionadas en semilla de alfalfa inoculada con *S. enterica* y *E. coli* O157, y se monitoreó el comportamiento de los patógenos a lo largo de la germinación. Se obtuvieron cuatro cepas antagonistas identificadas como *Bacillus* sp. Las cepas 9, 18, 21 y 51 con efecto contra *S. enterica* y las cepas 19 y 51 contra *E. coli* O157. Se establecieron tres mezclas: mezcla 2 (21 y 18), mezcla 3 (18 y 51) y mezcla 4 (21 y 51). Las mezclas 2 y 4 inhibieron a *S. enterica* y la mezcla 3 a *E. coli* O157. Cuando estas mezclas se aplicaron en H₂O purificada estéril en donde se colocó a remojar la semilla inoculada con los patógenos durante 4 horas, la reducción fue de aproximadamente 1.6 y 2.5 Log UFC/g para *S. enterica* y *E. coli*, respectivamente. Durante seis días de germinación, se logró controlar el desarrollo de los patógenos. Estas mezclas antagonistas no afectaron el índice de germinación de la semilla de alfalfa. Se detectó la producción de sideróforos y de ácido cianhídrico por parte de las bacterias antagonistas. Estos resultados sugieren que los metabolitos secundarios podrían ser útiles para el control de patógenos humanos, sin embargo estudios adicionales son necesarios para el mejoramiento de la seguridad microbiana en los germinados de alfalfa.

Palabras clave: Alfalfa, control biológico, microorganismos antagonistas, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157.

SUMMARY

Alfalfa sprouts in recent years have become very important in the population due to its nutritional properties. However, alfalfa sprouts have been implicated in disease outbreaks caused by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157, probably because they are frequently eaten raw without applying a treatment disinfection prior to ensure the elimination of pathogenic microorganisms, or treatments applied are not effective. The use of antagonistic microorganisms has been successfully used in the control of phytopathogenic microorganisms, however few is the information regarding their application on human pathogenic microorganisms. The aim of this work was to evaluate the antagonistic effect of microorganisms isolated from various sources against *S. enterica* and *E. coli* O157 during germination of alfalfa seeds. *In vitro*, antagonistic effect was evaluated in 32 strains isolated from different sources (cheese, cauliflower, beets, amaranth seeds, baby feces and organic farmland) against *S. enterica* and *E. coli* O157. Strains with antagonistic effect against pathogens were selected and determined whether there was antagonism between them in order to establish mixtures. Subsequently, the antagonist effect of the mixtures selected was evaluated in alfalfa seed inoculated with *S. enterica* and *E. coli* O157, and was monitored the behavior of pathogens throughout germination. Four antagonistic strains were obtained and identified as *Bacillus sp.*, strains 9, 18, 21 and 51 against *S. enterica* and strains 19 and 51 against *E. coli* O157. Three mixtures were established: Mix 2 (21 and 18), Mix 3 (18 and 51) and Mix 4 (21 and 51). Mix 2 and 4 inhibited *S. enterica* and the mixture 3 to *E. coli* O157. When these mixtures were applied in sterile purified water in which was placed the seed soak previously inoculated with a cocktail of *S. enterica* and a strain of *E. coli* O157 led to a reduction of 1.6 and 2.5 log CFU/g, respectively. They managed to control the development of the pathogens over six days of germination. These antagonistic mixtures did not affect the germination rate of alfalfa seed. It was detected siderophore production and hydrocyanic acid by the antagonistic bacteria. These results suggest that secondary metabolites can be useful for the control of humans pathogens, perhaps further studies are needed to further improve sprout safety.

Key words: Alfalfa, biological control, antagonistic microorganisms, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157.

Dedicatoria

A Dios, a mis Padres y a Gabriela.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

A la Dra. Montserrat Hernández Iturriaga.

A los profesores-investigadores que formaron parte de mi comité de sinodales.

A todos mis compañeros del laboratorio.

A todas aquellas personas, amigos y amigas, que estuvieron cerca de mí durante esta etapa.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	ii
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Germinados y sus beneficios	4
II.1.1 Generalidades de la alfalfa	4
II.1.2 Proceso de obtención de germinado	4
II.1.3 Aspecto nutrimental	6
II.1.4 Microbiota de los germinados	7
II.1.5 Mecanismos de contaminación de los germinados	8
II.2 Brotes asociados al consumo de germinado de alfalfa	8
II.3 Control de microorganismos patógenos en frutas y verduras	10
II.3.1 Tratamientos	10
II.3.2 Físicos	12
II.4 Control biológico	15
II.4.1 Antagonismo microbiano	16
II.4.2 Microorganismos antagonistas	16
II.4.3 Mecanismos de antagonismo	18
II.4.3.1 Competencia	18
II.4.3.2 Producción de metabolitos bioactivos	19
II.4.3.3 Producción de antibióticos o antibiosis	20
II.4.3.4 Producción de sideróforos	20

III. OBJETIVOS	22
III.1 Objetivo general	22
III.2 Objetivos específicos	22
IV. METODOLOGÍA	23
IV.1 Materiales	23
IV.1.1 Equipo	23
IV.1.2 Medios de cultivo	23
IV.1.3 Soluciones	24
IV.1.4 Material biológico	24
IV.2 Métodos	26
IV.2.1. Determinar el efecto antagónico <i>in vitro</i> de cepas seleccionadas contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157.	26
IV.2.2. Establecimiento de mezclas de bacterias antagonistas y evaluación de su efecto antagónico contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157 en medio de cultivo.	28
IV.2.2.1 Pruebas de inhibición entre en cepas antagonistas	28
IV.2.2.2. Pruebas de antagonismo con mezclas de cepas antagonistas.	29
IV.2.3. Evaluación del efecto antagónico de las mezclas de cepas seleccionadas contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157 en semilla de alfalfa.	30
IV.2.3.1 Índice de germinación de semilla de alfalfa inoculada con microorganismos antagonistas	30
IV.2.3.2 Inhibición de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157	31
IV.2.3.2.1 Producción de germinados de alfalfa	31
IV.2.3.2.2 Inoculación de semilla de alfalfa con <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157	32
IV.2.3.2.3 Cuantificación de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157	33

IV.2.3.2.4 Análisis microbiológico	36
IV.2.4 Determinación de los posibles mecanismos de acción de las cepas antagonistas	36
IV.2.4.1 Determinación de sideróforos	36
IV.2.4.2 Determinación de ácido cianhídrico	37
IV.3 Análisis estadístico	37
V. RESULTADOS y DISCUSIONES	38
V.1 Efecto antagónico de bacterias aisladas de diversas fuentes	39
V.2 Mezclas de bacterias antagonistas	44
V.3. Antagonismo microbiano en semilla de alfalfa	50
V.4 Determinación de los mecanismos de antagonismo	55
VI. CONCLUSIONES	59
VII. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Brotes de enfermedad asociados al consumo de germinados en Estados Unidos, 1985-1998	12
2. Cepas antagonistas aisladas de un estudio previo con efecto inhibitorio (100 %) <i>in vitro</i> contra cepas de <i>Salmonella</i> y <i>E.coli</i> O157:H7	25
3. Mezclas de cepas antagonistas	29
4. Estandarización de la técnica para evaluar el antagonismo microbiano	39
5. Características básicas de las cepas antagonistas seleccionadas	41
6. Cepas aisladas de diversas fuentes con efecto antagonista contra <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i> O157	42
7. Efecto antagónico de cepas aisladas de diversas fuentes contra <i>Salmonella enterica</i> y <i>E. coli</i> O157	43
8. Efecto antagónico entre cepas aisladas de diversas fuentes que presentan efecto antagónico contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157	45
9. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de mezclas de cepas antagonistas contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157	46
10. Comparación del efecto antagónico contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157 de cepas individuales con el efecto antagónico de mezclas de estas mismas cepas	48
11. Efecto de la aplicación de mezclas antagonistas sobre el índice de germinación	49
12. Efecto antagónico de mezclas de cepas contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157 en semilla de alfalfa después de 4 horas de remojo	50
13. Efecto antagónico de las mezclas 2 y 4 contra <i>Salmonella</i> inoculada en niveles bajos (10^3 Log UFC/mL) y altos	

(10 ⁷ Log UFC/mL) en semilla de alfalfa después de 4 horas de remojo.	52
14. Efecto antagónico de la mezcla 3 contra dos niveles de inóculo de <i>E. coli</i> O157 (10 ⁷ Log UFC/mL) y (10 ³ Log UFC/mL) en semilla de alfalfa después de 4 horas de remojo	55
15. Producción <i>in vitro</i> de sideróforos producidos por bacterias antagonistas aisladas de suelo de cultivo orgánico	57
16. Producción cuantitativa de HCN por cepas antagonistas	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción de germinado.	6
2. Ferricromo.	21
3. Enterobactina.	21
4. Evaluación del efecto antagónico de cepas aisladas de diversas fuentes contra <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> mediante la técnica de la gota.	27
5. Efecto de las mezclas de cepas antagonistas sobre el índice de germinación de semilla de alfalfa	31
6. Modelo para la germinación de semillas de alfalfa	32
7. Evaluación del efecto inhibitorio de cepas antagónicas sobre <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157:H7 en semilla de alfalfa	34
8. Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157:H7 durante la germinación de semillas inoculadas con bacterias antagonistas	35
9. Efecto inhibitorio de las cepas 18 (A) y 21 (B) contra <i>Salmonella</i> sp. (cepa 1) y <i>Salmonella</i> Montevideo mediante la técnica de la gota. El patógeno de prueba se encuentra inmerso en el agar y en las gotas las bacterias antagonistas	45
10. Crecimiento de <i>Salmonella</i> frente a mezclas de microorganismos antagonistas durante la germinación de alfalfa. A) Inóculo alto de <i>Salmonella</i> (10^7 Log UFC/g). B) Inóculo bajo de <i>Salmonella</i> (10^3 Log UFC/g)	53
11. Crecimiento de <i>E. coli</i> O157 frente a mezclas de microorganismos antagonistas durante la germinación de alfalfa. A) Inóculo alto de <i>E. coli</i> O157 (10^7 Log UFC/mL) B) Inóculo bajo de <i>E. coli</i> O157 (10^3 Log UFC/mL)	56

I. INTRODUCCIÓN

Los considerables beneficios para la salud humana relacionados con la ingesta de frutas y hortalizas frescas, principalmente para prevenir enfermedades cardiovasculares, ha favorecido la demanda mundial de estos productos. Sin embargo, en las últimas décadas, el aumento de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) ha ido en aumento (Taormina y Beuchat, 2002).

Las ETA's constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, a la aparición de grupos poblacionales vulnerables, al aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y al impacto socioeconómico que ocasionan.

Históricamente, las enfermedades transmitidas por alimentos fueron principalmente causadas por productos contaminados de origen animal, como la res, el pollo y productos cárnicos listos para comer. Sin embargo, una tendencia ha emergido en años recientes, con la aparición de altos números de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas. La proporción de productos frescos que se han reportado como vehículo de microorganismos patógenos en brotes de enfermedades se incrementó de 0.7 % en 1970s a 6 % en 1990s, y ha alcanzado el 21 % para principios del 2000.

El uso de germinados de semillas como alimento se originó en los países del lejano oriente y estos se han expandido en las últimas décadas al mundo occidental. Estos productos son consumidos solos como germinados o como mezclas de diferentes tipos. Usualmente se utilizan crudos como componentes de ensaladas o ligeramente cocidos en varios platillos. Los más populares son los de la alfalfa, frijoles y rábano (Weiss y Hammes, 2005).

La ventaja adicional de una semilla germinada es su calidad nutricional mejorada; se ha observado un incremento en la biodisponibilidad de proteínas,

aminoácidos esenciales, vitaminas, carbohidratos y minerales tales como Ca, Fe y Mg (Sangronis y Machado, 2007). Desgraciadamente, la ingesta de germinados puede representar un riesgo para la salud, ya que se han visto involucrados en brotes asociados a enfermedades transmitidas por alimentos. La Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. (FDA, por sus siglas en inglés) ha reportado que en el periodo 1999-2005, 40 % del total de las enfermedades transmitidas por alimentos estuvieron relacionados con semillas germinadas. También han sido reportados brotes en Japón, Finlandia, Dinamarca, Suiza y Canadá por consumo de germinados de alfalfa, rábano y judías (Prokopowich y Blank, 1991; Honish y Nguyen, 2001).

Los microorganismos implicados en brotes asociados a este tipo de alimentos son *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, norovirus y virus de la hepatitis A.

La demanda creciente del consumo de germinados, el alto contenido de nutrientes que soporta el desarrollo de los microorganismos (incluidos patógenos), la ausencia de un tratamiento térmico previo su consumo (ya que generalmente se consumen crudos) sitúa a los germinados como alimentos de alto riesgo para el consumidor. De aquí se deriva, la necesidad de contar con métodos de intervención que garanticen la inocuidad de este tipo de productos. Por lo tanto, el enfoque actual de prevención se centra en la descontaminación de la semilla, la cual apunta a la inactivación de patógenos previa a la iniciación del proceso de germinación. A pesar, de la gran diversidad de agentes desinfectantes evaluados, solamente unos cuantos selectos han probado ser efectivos en la eliminación de patógenos humanos en la semilla (Ye *et al.*, 2010).

Por ello, las propiedades antimicrobianas de algunos tipos de bacterias son de interés cómo estrategias de biocontrol durante la producción de productos hortofrutícolas.

En ambientes de alimentos, la microbiota nativa puede tener ventajas competitivas que podrían resultar en la supresión de microorganismos indeseables. Es posible que patógenos en los alimentos pudieran inhibir y hasta ser eliminados por la acción de competidores o microbiota antagonista presente en los alimentos. La presencia de microorganismos con propiedades inhibitorias pudiera mejorar la vida de anaquel y la inocuidad de los alimentos, reduciendo la necesidad de utilizar niveles mayores de agentes químicos (Schuenzel y Harrison, 2002).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de bacterias antagonistas contra *Salmonella enterica* y *E. coli* O157 en semillas de alfalfa durante su germinación.

II. ANTECEDENTES

II.1 Germinados y sus beneficios

El germinado es cualquier semilla cuyo metabolismo es activado al ponerse en contacto con el calor, el agua y el aire. Cuando un embrión de cualquier cereal o leguminosa cuenta con el agua, oxígeno y calor suficientes germina. Los germinados son alimentos vivos de primer orden que convierten a las secas y duras semillas de naturaleza ligeramente acidificante para el organismo en brotes tiernos alcalinos ricos en enzimas digestivas, vitaminas, aminoácidos, clorofila y minerales muy asimilables (Pitchford, 2007).

II.1.1 Generalidades de la alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una leguminosa perenne, de raíces profundas, con muchos tallos usualmente erectos que parten de yemas en la corona. En condiciones adecuadas es la leguminosa forrajera más productiva y probablemente haya sido, históricamente, la primera especie forrajera cultivada. Su cultivo inició en Irán alrededor del año 700 a.C. llegando a Grecia 200 años más tarde; se difundió a través del sur de Europa, norte de África y Asia y fue llevada a las Américas por los conquistadores españoles, difundiéndose en los Estados Unidos de América a mediados del siglo XIX. La alfalfa llegó a China en el segundo siglo a.C. Su uso se popularizó en Europa del Norte y en Australia en los últimos dos siglos. Es un cultivo común entre los pequeños agricultores en las partes más áridas de Asia y el Norte de África; en algunas regiones, los brotes jóvenes son consumidos como hortaliza (FAO, 1989).

II.1.2 Proceso de obtención de germinado

a) Semillas

Las plantas para la producción de semillas se cultivan en típicos entornos agrícolas, las semillas son generalmente tratadas como cualquier producto agrícola (jitomates, lechugas, rábanos, etc). Aproximadamente 80 millones de

libras de semilla de alfalfa son producidas cada año en EE.UU. (Muller, 1999). Los programas de certificación sirven como una herramienta de mercadotecnia y garantía de calidad para los vendedores de forraje. El uso de semillas certificadas es una garantía de que crecerán conforme a las expectativas en términos del campo y calidad de forraje. Muchos de los atributos de calidad de la semilla certificada tienen menos relevancia para los productores de germinado comparado con los productores de forraje. Sin embargo, la semilla no certificada o semilla común, es la más conveniente para la obtención de germinados. Por otra parte, el uso de un sistema de semillas certificadas puede utilizarse para rastrearlas y saber de qué campo provienen; esto puede ser considerado en la incorporación de programas para mejorar la seguridad de la germinación (FDA, 1989).

Las prácticas culturales correctamente coordinadas son la clave para una producción agrícola exitosa. Entre las más importantes con gran impacto en la producción de semillas pueden mencionarse la polinización, fertilización, riego, control de insectos y control de maleza (FDA, 1999).

b) Germinado

En la actualidad la producción de germinados en EE.UU. se estima en 250 millones de dólares; 475 agricultores producen 300,000 toneladas de germinado, según la Asociación Internacional de Productores de Germinados. Hasta 10 % de los estadounidenses consumen germinados regularmente (International Specialty Supply, 1999).

La producción de germinado consiste principalmente 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).

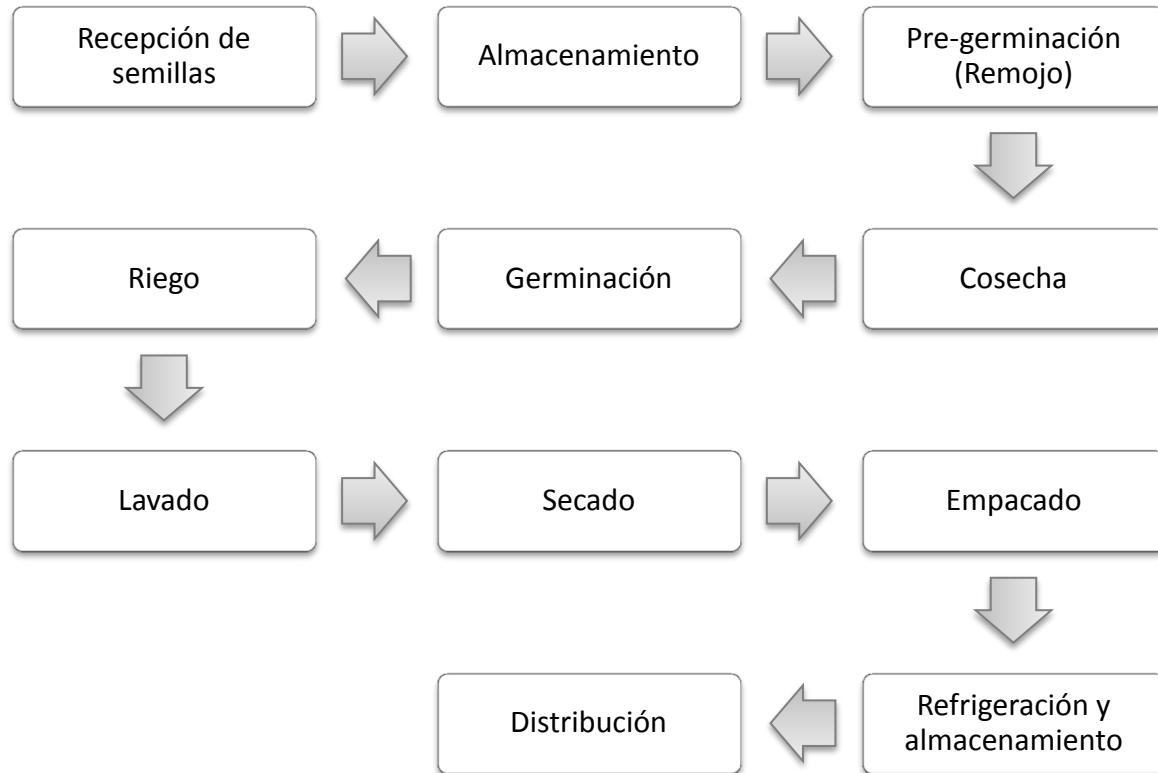


Figura 1. Producción de germinado.

II.1.3 Aspecto nutricional

Durante el proceso de germinación, bajo la influencia del agua, el calor y el oxígeno, se producen procesos biológicos que transforman favorablemente la composición de los granos. Durante la germinación, la calidad de las proteínas se mejora igualmente gracias a la descomposición de las cadenas complejas de proteínas en aminoácidos libres y al aumento del contenido en aminoácidos esenciales. Las grasas se transforman en ácidos grasos libres. Gracias a todas estas modificaciones y al aumento del contenido en humedad, los granos germinados se digieren más rápidamente y son más ricos en vitaminas A, B y E, calcio, potasio y magnesio y en oligoelementos como: hierro, selenio y zinc (Herrera *et al.*, 2005; USDA, 2005).

II.1.4 Microbiota de los germinados

La microbiología de los germinados de semillas ha sido ampliamente estudiada debido a que se trata de un producto con un alto contenido de nutrientes que se generan durante la germinación. El pH y nivel de humedad son factores que favorecen la actividad microbiana; se han encontrado elevadas concentraciones en la microflora nativa sin presentar signos de deterioro (Andrews *et al.*, 1979). La flora nativa puede estar en el interior de las semillas. Mundt y Hinkle (1976) encontraron que entre el 13 y 15 % de la superficie de semillas de alfalfa y soya respectivamente contenían en su interior bacterias. Una amplia variedad de hongos también pueden contaminar la superficie de germinados de semillas.

El contenido microbiano de los germinados consiste principalmente de bacilos Gram negativos, bacilos Gram positivos, levaduras y hongos. Las bacterias mesófilas aerobias se detectan en concentraciones que varían entre 7 y 9 Log UFC/g (Taormina *et al.*, 1999), las *Enterobacteriaceae* oscilan entre 7 y 8 Log UFC/g (O'Mahony *et al.*, 1990), coliformes totales, fecales, levaduras y hongos varían ampliamente entre 2 y 8 Log UFC/g (Piernas y Guiraud, 1997).

Entre las especies prominentes destacan *Pseudomonas fulva*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas marginalis*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia hermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas syringae tabaco*, *Pseudomonas fluorescens* biotipo A, *Pseudomonas fluorescens* biotipo G, *Pseudomonas asplenii*, *Erwinia rhapontici*, *Stenotrophomonas matophila*, *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter pyrinus* y *Pseudomonas putida* biotipo A (Fett, 2002).

La microbiota característica de las semillas de germinados puede ocasionalmente contener bacterias patógenas. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* y *E. coli* O157:H7 han sido aislados de semillas germinadas, incluyendo alfalfa,

judías, berro, rábano, soya y mostaza (Taormina *et al.*, 1999; Aabo y Baggesen, 1997).

II.1.5 Mecanismos de contaminación de los germinados

El origen de la contaminación con microorganismos patógenos en los germinados puede variar. El agua de irrigación y de remojo, la manipulación inadecuada que dañan la estructura de la semilla y la hacen más susceptibles, por contaminación cruzada con la maquinaria utilizada durante su producción, son algunas causas de contaminación. Se ha observado que algunos de los microorganismos patógenos pueden sobrevivir dentro de las semillas durante mucho tiempo (Moline y Kulik, 1997). Las condiciones asociadas al proceso de germinación, tales como la alta humedad de la semilla y el ambiente, la temperatura, un pH cercano a la neutralidad, la disponibilidad de carbohidratos y otros nutrientes, favorecen el crecimiento de las bacterias que se encuentran dentro o fuera de la semilla (Buck *et al.*, 2003).

En muchos casos la detección de patógenos es difícil por su distribución desigual en la totalidad de las semillas, o por una recuperación inadecuada del microorganismo en estudio de la muestra. La cubierta externa de las semillas puede tener un efecto protector para el crecimiento de algunas bacterias (Charkowski *et al.*, 2001). Se ha observado contaminación cruzada entre las mismas semillas de un mismo lote (Patterson y Woodburn, 1980). El agua utilizada para mantener la humedad de los germinados también puede ser una fuente de contaminación (Hara-Kudo *et al.*, 1997).

II.2 Brotes asociados al consumo de germinado de alfalfa

Las ETAs son un problema que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. Por ser un problema recurrente en los países en vías de desarrollo, las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones afines, tanto del sector público como privado, deberían dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua a fin de

prevenir o corregir situaciones que pueden ser muy peligrosas y que pueden afectar adversamente la salud de la población.

Los germinados vegetales han emergido recientemente como vehículo en brotes de enfermedades. En la mayoría de los brotes (Cuadro 1) causados por la ingesta de germinados, las semillas usadas han sido la fuente primaria de contaminación. Sin embargo, aun empleando semillas libres de microorganismos patógenos la contaminación también se puede dar a través del agua contaminada usada para la germinación o los remojos, o bien, durante el transporte del alimento (Sharma y Demirci, 2003).

La mayoría de los brotes infecciosos han estado relacionados principalmente con el germinado de alfalfa, sin embargo, el rábano, la mostaza, el germinado de soya y el berro también han estado asociados con infecciones. Estudios han demostrado que microorganismos patógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pueden alcanzar poblaciones de hasta 10^7 UFC/g en el germinado de alfalfa durante su producción y además mantener su viabilidad durante su almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Scouten y Beuchat, 2002).

II.3 Control de microorganismos patógenos en frutas y verduras

II.3.1 Tratamientos

Agentes antimicrobianos como el cloro, peróxido de hidrógeno, ozono, fosfato de trisodio y ácido peracético han sido estudiados como desinfectantes en la poscosecha para el uso de productos frescos (Adams y Hartley, 1989), y ninguno ha demostrado ser completamente efectivo para eliminar microorganismos patógenos. Investigaciones recientes han demostrado la habilidad de los patógenos entéricos para llegar a internarse en un gran número de frutas y hortalizas (Buck *et al.*, 2003). Esta habilidad para infiltrarse en el tejido de la plántula es una de las grandes preocupaciones en la industria de los

alimentos desde que los microorganismos presentes en el interior de las estructuras de las plantas como protección de desinfectantes superficiales.

Además del uso de cloro [NaOCl y Ca(OCl)₂], han sido probados antimicrobianos naturales y sintéticos como desinfectantes en las semillas, como el ácido acético, agua electrolizada ácida, ClO₂, NaClO₂, Ca(OH)₂, ácido cítrico, agua ozonificada, fosfato trisódico, y Tween 80 (Beuchat, 1997; Lang y Ingham, 2000; Kim y Lim, 2002; Bari *et al.*, 2003; Gandhi y Matthews, 2003). En todos los casos solamente se ha reportado disminución en las poblaciones de microorganismos patógenos sin llegar a eliminarlos por completo.

Se han realizado pretratamientos de semillas con surfactantes y adicionando germicidas a estas soluciones, pero tampoco han tenido un efecto significativo, tan solo una mínima reducción de 1 Log o menos del patógeno. El uso de desinfectantes a altas temperaturas (55°C) con y sin sonicación permite incrementar su eficacia pero disminuye la tasa de germinación de semillas de alfalfa (Beuchat y Scouten, 2002). El remojo de semillas en agua con 20,000 ppm por una hora, incrementa la muerte del patógeno hasta 2 Log UFC/g; sin embargo, se disminuye la tasa de germinación (Fett, 2002).

Nandiwada *et al.*, (2004) trataron semillas de alfalfa inoculadas con *E. coli* O157:H7 con una bacteriocina (colcin HU195, tipo E2) en una concentración de 10,000 AU/g resultando en una reducción en niveles de más de 10⁵ Log; desafortunadamente la bacteriocina resultó ser menos efectiva contra las dos cepas de *E. coli* O157:H7. Los resultados subrayan el problema de las diferencias entre las cepas es su susceptibilidad a las bacteriocinas, lo que constituye una restricción para el uso de bacteriocinas en general como antimicrobianos.

Existen escasos reportes sobre la combinación de tratamiento con germicidas químicos. Un tratamiento secuencial de semillas de alfalfa con ClO₂ (25 mg/L; 5 min), agua ozonificada (14.3 mg/L; 3 min) y una suspensión de aceite

de tomillo (5 mL; 3 min) redujo aproximadamente 1 Log los niveles de *E. coli* O157:H7. La combinación de germicidas fue mucho más efectiva que el empleo individual de cada componente. Un problema mayor es que después de tres días de germinación, las poblaciones del patógeno se elevaron a casi 10^8 Log UFC/g (Singh y Bhunia, 2003). A menos de que estos tratamientos garantizaran la eliminación de los microorganismos patógenos en las semillas, las combinaciones de tratamientos resultan poco prácticas para los productores.

Por otro lado, las biopelículas protegen a los patógenos de la actividad de germicidas. Mientras la contaminación de las semillas puede encontrarse en bajos niveles y dificultar su detección, los incrementos en las poblaciones de microorganismos son significativos durante el proceso de germinación (Jaquette *et al.*, 1996). Se han realizado estudios donde se recuperan niveles importantes de microorganismos en el agua de riego. Los recuentos de bacterias mesófilas y coliformes indican que el agua contiene al menos 90 % de los microorganismos totales en el propio germinado. El efecto de los tratamientos germicidas durante la germinación sobre los niveles de patógenos en el agua de irrigación no se conoce. Si los germicidas eliminan a los patógenos en el agua de irrigación pero permite la sobrevivencia en el propio germinado, las pruebas de riego no tendrían sentido (Totorello *et al.*, 2000).

La comparación de eficacia de los tratamientos químicos para la desinfección de semillas, es válida en el laboratorio, utilizando un solo protocolo de experimentación, pero la comparación de la eficacia entre laboratorios presenta problemas adicionales. Deben mencionarse las diferencias entre los lotes de semillas utilizados, incluyendo por ciento y severidad de los daños en las semillas, la metodología para la inoculación de semillas, condiciones de secado, almacenamiento y la población inicial del patógeno en la semilla (Scouten y Beuchat, 2002). Es importante resaltar que pueden existir células dañadas que no reflejan la eficacia del tratamiento y sobre estimarlo.

Cuadro 1. Brotes de enfermedad asociados al consumo de germinados en Estados Unidos, 1985-1998.

Año	Patógeno	No. De casos	Lugar del brote	Tipo de germinado	Fuente de contaminación
1995	S. Stanley	242	17 estados y Finlandia	Alfalfa	Semilla
1995-96	S. Newport	>133	7 estados y Canadá	Alfalfa	Semilla
1996	S. Montevideo/ Meleagridis	>500	California	Alfalfa	Germinado/semilla
2010	<i>Salmonella</i>	23	Estados Unidos	Alfalfa	Germinado
1997	S. Infantis/ Anatum	90	Kansas, Missouri	Alfalfa	Semilla
1997	<i>E. coli</i> O157:H7	108	Michigan, Virginia	Alfalfa	Semilla
1997/98	S. Senftenberg	60	California, Nevada	Trébol/ Alfalfa	Germinado/semilla
1998	<i>E. coli</i> O157:H7	8	California	Trébol/ Alfalfa	Semilla
1998	S. Havana/ Cubana	18	California	Alfalfa	Semilla
2011	<i>Salmonella</i>	6	Estados Unidos	Alfalfa	Germinado
1999	S. Mbandaka	75	Oregon, Washington	Alfalfa	Semilla

(Fuente: FDA, 1999; EFSA, 2011)

II.3.2 Físicos

Se han probado diversos tratamientos de desinfección en germinados de semillas: agua caliente, calor seco, radiaciones gamma, presión hidrostática, luz U.V., radiofrecuencias de calor y ultrasonido (sonicación) (Maude, 1996). El empleo de agua caliente fue estudiado por primera vez por Jaquette *et al.* (1996) encontraron que con un tratamiento de 5 minutos con agua caliente de 57 a 60 °C se lograron reducciones de 2.5 Log en poblaciones de *S. enterica* en semillas de alfalfa inoculadas en el laboratorio, sin reducir la tasa de germinación. Sin

embargo, un ligero incremento en la temperatura o prolongando el tiempo de contacto afectó significativamente la tasa de germinación. Enomoto (2004), estudió la eficacia de tratamientos con agua caliente para eliminar una cepa no patógena de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en semilla de alfalfa, usando tres pasos: 30 min de remojo a 25 °C, 9 segundos a 50 °C y 9 segundos a 85 °C; se alcanzó una reducción mayor a 4 Log sin afectar la tasa de germinación.

La exposición de semillas contaminadas con aproximadamente 260 UFC/g de *S. Stanley* por 5 -10 minutos, redujo el número a 6-9 UFC/g; pero a 60 °C por 5 minutos no hubo una reducción notable. Los tratamientos por 10 minutos redujeron la viabilidad de las semillas entre 42 y 96 %. Aunque los tratamientos de las semillas destruyen células de *S. Stanley*, el margen de operación es muy corto: 57 a 60 °C por 5 minutos. Temperaturas menores pueden quedar sin efecto, en tanto que más elevadas o mayores tiempos de exposición, es decir, más de 10 minutos disminuyen la tasa de germinación (Jaquette y Beuchat, 1996).

El empleo de tratamientos con agua caliente en germinados de semillas parece ser prometedor, si bien la aplicación en el comercio puede resultar problemática. Diversos estudios subrayan que existen diferencias en los niveles de tolerancias no solamente entre los tipos de semillas sino dentro de un lote de semillas, debido a la producción y almacenamiento al que son sometidos. Las semillas con bajo contenido de humedad son más resistentes al calor. Las que son almacenadas por largos períodos, aun en condiciones ideales (baja temperatura y humedad relativa) son afectadas por procesos de envejecimiento los cuales reducen su capacidad para resistir el estrés, incluyendo el calor (Fosberg, 2004).

Se ha evaluado el efecto de radiaciones ionizantes para eliminar patógenos como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 en semillas y germinados de alfalfa. Se ha reportado la eliminación de *S. Typhimurium* mediante radiaciones (0.5-2.0 kGy) en semillas inoculadas para ser usadas en la obtención de germinados; sin embargo existe una disminución en la tasa de germinación y

longitud de los germinados. La aplicación de radiaciones muestra que se pueden controlar las poblaciones de bacterias en las semillas, pero no de patógenos introducidos durante manejo ulterior (Saroj *et al.*, 2007).

Un problema con la aplicación comercial de radiaciones gamma para desinfectar semillas es que la dosis de absorbancia aplicada a las semillas es desigual, debido a los diferentes lugares en la cámara donde se aplica el tratamiento; es decir, la dosis absorbida por las semillas localizadas cerca del exterior de la cámara es más alta que la dosis que es absorbida por las semillas localizadas en el centro de la cámara. De ahí que se recomienda aplicar las radiaciones en el producto final y no en las semillas.

Hay muy pocos estudios publicados en la combinación de tratamientos químicos y físicos para la desinfección de semillas. La combinación de dos o más germicidas puede tener diferentes modos de acción, lo que favorece la muerte del patógeno o bien como aditivo o sinérgico. Bari (2003), reportó que la combinación de tratamientos con calor seco (50°C/1 h), agua electrolizada caliente, y la sonicación reducen hasta 4.6 Log en semillas de frijol mungo, sin reducir la tasa de germinación o el promedio de la longitud del germinado en el cuarto día de crecimiento.

Una buena alternativa sería implementar tratamientos durante el proceso de germinación para prevenir o inhibir el crecimiento de patógenos que sobreviven al tratamiento en semillas. Sin embargo, existe escasa literatura publicada en esta área.

Por otra parte, existen muy pocos estudios en la aplicación de control biológico como estrategia para controlar el crecimiento y sobrevivencia de patógenos en alimentos, incluyendo los germinados de semillas. En contraste, ha sido ampliamente estudiado como una medida para controlar enfermedades en plantas desde 1920 (Campbell, 2003). Últimamente el control biológico de

patógenos humanos ha sido investigado en pollos, cerdos, terneros, carne y productos lácteos (Breidt y Fleming, 1997; Nisbet, 2002; Tkalcic *et al.*, 2003). Para el control de patógenos humanos en alimentos para animales o en alimentos para humanos, se han realizado estudios tanto con una sola cepa específica como en consorcios de cepas no definidas. Diversos estudios han demostrado que patógenos humanos son buenos competidores en las superficies de los germinados y pueden incrementar en niveles significativos durante la germinación ya sea en semillas inoculadas o contaminadas naturalmente (Schoeller *et al.*, 2002). Sin embargo, la exclusión competitiva ocurre de manera natural; Castro y Fernández (2000), detectaron un escaso crecimiento de 1 Log UFC menos de patógenos inoculados en germinados entre el primer y quinto día de germinación.

Diversas bacterias lácticas aisladas de semillas de alfalfa y germinados demostraron ser altamente inhibitorias frente a *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Palmai y Buchanan, 2002); sin embargo, cuando una cepa de *Lactobacillus lactis* SP26 (que demostró tener capacidad inhibitoria) fue inoculada en semillas contaminadas con *L. monocytogenes*, al germinar la semilla sólo se redujo el crecimiento del patógeno 1 Log UFC (Palmai y Buchanan, 2002). Las bacterias lácticas no constituyen una porción significativa de la flora nativa de los germinados de semillas (Becker y Holzapfel, 1997), por lo cual probablemente no puedan competir o exhibir un efecto antimicrobiano significativo contra patógenos durante la obtención del germinado.

II.4 Control biológico

No hay duda que la conservación de alimentos por métodos físicos y químicos ha sido una de las más importantes contribuciones a la inocuidad de los alimentos en la segunda mitad del Siglo XX; sin embargo, actualmente el consumidor está demandando alimentos mínimamente procesados y libres de aditivos químicos, es decir, más naturales, frescos y microbiológicamente seguros. Por este motivo el procesador de alimentos, percibiendo la inquietud del consumidor, se ha interesado en la bioconservación, que se refiere al uso de

microorganismos o sus metabolitos con potencial para inhibir o destruir microorganismos indeseables en alimentos lo que permitiría reducir el empleo de conservadores químicos y suavizar los tratamientos sin descuidar la inocuidad de los mismos (Alanis de la O, *et al.*, 2006).

II.4.1 Antagonismo microbiano

En la biología existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad.

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. La de estos son la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática), inducción de resistencia, producción de bacteriocinas, y otros compuestos antagonistas como ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno (Schillinger *et al.*, 1996).

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en la interacción entre los antagonistas y los patógenos. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico.

II.4.2. Microorganismos antagonistas

En el mundo se conoce un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos. Este efecto es aprovechado por el hombre para la regulación, tanto de patógenos cuyo hábitat es el suelo, como aquellos que se desarrollan en la parte foliar de las plantas. Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Estos atributos, y en conjunto con la capacidad de

multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico.

Desde los primeros estudios en esta temática y hasta el presente, entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico en plantas, se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos. También se ha empleado *Pseudomonas fluorescens* por su potencial como agente de biocontrol de patógenos humanos (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, y *Escherichia coli* O157:H7) y bacterias fitopatógenas (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas viridiflava*) (Ching-Hsing Liao, 2008).

Según Howell (2003), los controladores biológicos son organismos vivos cuya actividad depende de las condiciones ambientales donde habitan y de los mecanismos complejos que actúan sinérgicamente para el control de enfermedades.

El uso de bacterias para el control biológico de enfermedades bacterianas en plantas es una práctica comercial ya difundida (Martínez y Rodríguez, 2005). Las bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces.

Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Una de las formas de aplicación de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas no se debe exclusivamente al antagonismo con los

patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas. Con respecto a *B. subtilis*, se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas y otros antibióticos (Fernández y Vega, 2001).

II.4.3. Mecanismos de antagonismo

II.4.3.1 Competencia

La competencia constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia. Se puede dar la competencia por nutrimentos y por espacio, siendo la primera la más común (Fernández y Vega, 2001). En los últimos años ha aumentado la utilización de bacterias promotoras del crecimiento (*plant growth promoting rhizobacteria* o PGPR) que cumplen esta función y además pueden controlar determinadas bacterias patógenas que sobreviven en el suelo y afectan al sistema radicular (Glick y Bashan, 1997). Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipos de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Infante y Martínez, 2009).

En las plantas la competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas, entre otros) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico. Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en

suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz (Infante y Martínez, 2009).

La competencia por sustrato o espacio depende de la ausencia de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. Si el sustrato es estéril, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, si hay microbiota natural presente, la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Infante y Martínez, 2009).

II.4.3.2 Producción de metabolitos bioactivos

El control biológico o el uso de microorganismos antagonistas como las bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades en pre y postcosecha (Sharma *et al.*, 2009). El potencial de *Bacillus* spp. para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha utilizado en control biológico de fitopatógenos. La formación de endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, pudiéndose formular fácilmente en productos estables (Wulff *et al.*, 2002). De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Estos péptidos generalmente tienen un PM < 2000 Da. Particularmente, *Bacillus subtilis* es una especie que produce diferentes metabolitos secundarios en la forma de lipopéptidos con buena actividad antifúngica, antibacteriana y frente a algunas levaduras, como consecuencia son de alto valor biotecnológico y farmacéutico (Volpon *et al.*, 2000; Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011).

II.4.3.3 Producción de antibióticos o antibiosis

La colonización de un agente de biocontrol en la rizósfera acompañado por la producción de una o más sustancias, usualmente metabolitos secundarios que inhiban o maten al patógeno, es conocido como antibiosis (Infante y Martínez, 2009; Maheshwari, 2010).

Diversos mecanismos han evolucionado en bacterias que les confiere la resistencia a antibióticos. Estos mecanismos o pueden modificar químicamente al antibiótico o modificar el sitio de acción de tal manera que no sea reconocida por el antibiótico. El método más común es la inactivación enzimática del antibiótico. Una enzima celular existente es modificada para reaccionar con el antibiótico de tal manera que no afecte al microorganismo. Una estrategia alternativa utilizada por muchas bacterias es la alteración del sitio de acción del antibiótico (Todar, 2011).

II.4.3.4 Producción de sideróforos

Los sideróforos son péptidos de bajo peso molecular con alta afinidad a Fe^{3+} . Los sideróforos son producidos por microorganismos y plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pero ellos difieren en su eficiencia de producción. Los sideróforos quelan al ion férrico, en la rizosfera, y puede originar la inhibición del crecimiento de otros microorganismos, incluyendo patógenos, cuya afinidad por el hierro es baja. La competencia por el hierro es probablemente más importante en la rizosfera que en el resto del suelo (Carcaño *et al.*, 2006). La producción de sideróforos por bacterias inhibe a patógenos de plantas *in vitro* y también promueve el crecimiento de plantas en el suelo (Glick y Bashan, 1997).

Los sideróforos son sintetizados y secretados al medio extracelular, donde se unen al hierro y se recuperan gracias a transportadores específicos. En las bacterias Gram-negativas este proceso se realiza gracias a un receptor de membrana externa acoplado a un transportador de tipo ABC. Una vez en el

citoplasma el hierro debe liberarse del complejo hierro-sideróforo, proceso que se lleva a cabo por degradación enzimática del complejo o por reducción del hierro (Tortora *et al.*, 2007). Ejemplos de sideróforos: Ferricromo (figura 2) y Enterobactina (figura 3).

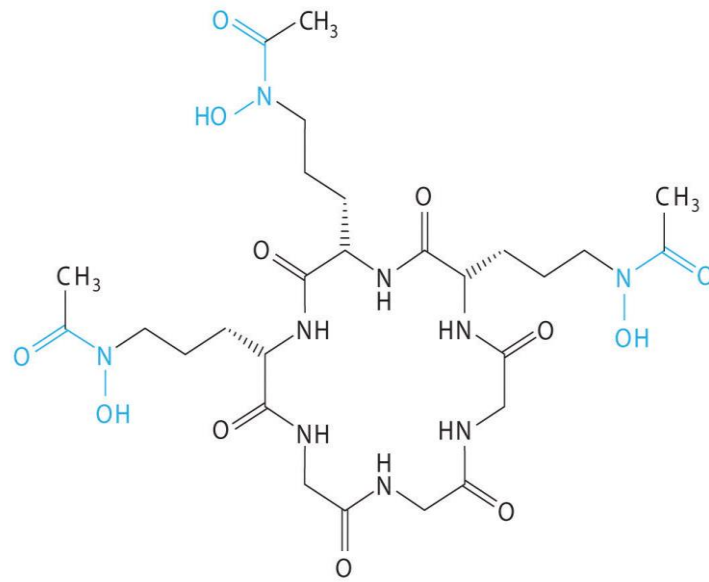


Figura 2. Ferricromo.

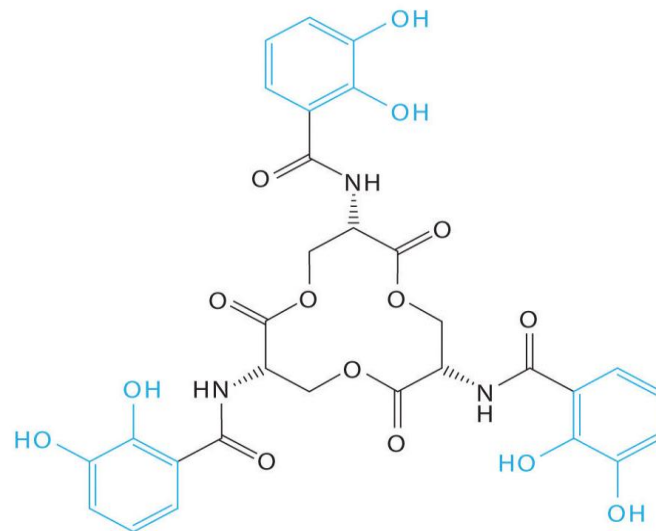


Figura 3. Enterobactina.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Abatir el desarrollo de *Salmonella* y *E. coli* O157 durante la germinación de semilla de alfalfa mediante la incorporación de microorganismos antagonistas.

III.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antagónico *in vitro* de cepas seleccionadas contra *Salmonella* y *E. coli* O157.
2. Evaluar el efecto de mezclas de bacterias antagonistas y contra *Salmonella* y *E. coli* O157 en medio de cultivo.
3. Evaluar el efecto antagónico de las mezclas de cepas seleccionadas contra *Salmonella* y *E. coli* O157 en semilla de alfalfa.
4. Elucidar los posibles modos de acción de las cepas antagonistas.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Materiales

IV.1.1 Equipo

Autoclave eléctrica de mesa, 121°C (Market-Forge, Sterilimatic)

Balanza analítica digital, 120 g x 0.0001 g (Sartorius)

Balanza granataria, sensibilidad 0.1g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)

Baño María de precisión de $43 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, Modelo 251 (Precisión Scientific)

Baño María de precisión de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$, Modelo 251 (Precisión Scientific)

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Centrifuga de mesa (HermLe)

Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)

Homogenizador (Stomacher, Seward 400)

Horno para esterilización (Shel-lab)

Incubadora de 35°C (Pecision Scientific, Seward 400)

Incubadora de 22°C (Pecision Scientific, Seward 400)

Lámpara de luz U.V. Modelo 56 (Blas-Ray)

Microscopio luminoso (Leica)

Potenciómetro óptico (Jenway), modelo 3510

Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)

Micropipetas 5-1000 μL (Labsystems)

Biolog

IV.1.2 Medios de cultivo

Agar Base Sangre (ABS), BD Bioxon

Agar cuenta estándar (ACE), BD Bioxon

Agar soya tripticasa AST), BD Bioxon

Caldo lactosado (CL), BD Bioxon

Caldo Soya Tripticasa (CST), BD Bioxon

IV.1.3 Soluciones

Diluyente de peptona de caseína 0.1 % (BD), BD Bioxon

IV.1.4 Material biológico

Semilla de alfalfa San miguelito de Celaya, Gto.

En estudios previos se eligió esta semilla de alfalfa y fue abastecida por el proveedor Veterinaria Zaragoza ubicado en la ciudad de Querétaro.

Cepas de *Salmonella*

- *Salmonella* Agona
- *Salmonella* Montevideo
- *Salmonella* Typhymurium
- *Salmonella* spp.
- *Salmonella* spp. (aislada de germinado)

Las cepas son parte de la colección del Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Facultad de Química, UAQ.

Cepas de *E. coli* O157

Se emplearon dos cepas de *E. coli* O157 (ECB 1 y ECB 2), donadas por la Universidad de Guadalajara.

Cepas antagonistas

Se evaluó el efecto de 13 cepas aisladas de un estudio previo (Esquivel *et al.*, 2012) (Cuadro 2) y de 19 cepas aisladas en este estudio.

Cuadro 2. Cepas antagonistas aisladas de un estudio previo con efecto inhibitorio (100 %) *in vitro* contra cepas de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

CEPA ANTAGONISTA	FUENTE DE AISLAMIENTO
137 B1	Queso
201 A1	Coliflor
160 A1	Betabel
160 B1	Betabel
113 1	Semillas de amaranto
130 C2	Queso
130 C1	Queso
245 1	Materia fecal de bebé
137 A1	Queso
129 1	Queso
131 A1	Queso
130 B1	Queso
137 A2	Queso

IV.2 MÉTODOS

OBJETIVO 1

IV.2.1. Determinar el efecto antagónico *in vitro* de cepas seleccionadas contra *Salmonella* y *E. coli* O157.

Para la estandarización de la técnica se probaron dos medios de cultivo (AST y MH) a dos volúmenes diferentes (6 y 10 mL) con tres técnicas diferentes (gota, papel filtro y pozo) y tres concentraciones de los patógenos (10^8 10^7 10^6).

Mediante la técnica de la gota (Figura 4) se evaluó el efecto inhibitorio de las cepas antagonistas aisladas en un trabajo previo (Cuadro 2) y en este estudio. La evaluación se llevó a cabo siguiendo el siguiente procedimiento:

Se prepararon cultivos frescos de los microorganismos patógenos de prueba (*Salmonella* y *E. coli* O157) y de los antagonistas mediante tres transferencias sucesivas en 3 mL de CST incubados a 35°C/18 h. Mediante tinción Gram se confirmó su pureza al microscopio. Los cultivos se lavaron tres veces con solución salina isotónica y se realizó recuento de las cepas patógenas y antagonistas mediante la técnica de vaciado en placa.

- a) Se inocularon 5 μ L de cada uno de las cepas patógenas en un tubo con 10 mL de AST temperado a 45°C, se homogenizaron en vortex por 10 segundos, se vertieron en cajas petri y las placas se dejaron solidificar en campana de flujo laminar.
- b) Sobre el medio (en áreas separadas) se inocularon gotas (5 μ L) de cada una de las cepas antagonistas y se dejaron secar 15 min en campana de flujo laminar. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas.
- c) Se midió el diámetro de los halos de inhibición del microorganismo antagonista (en relación con las placas control).

Una vez realizadas las pruebas de antagonismo se seleccionaron aquellas cepas que mostraron el máximo efecto antagónico en 24 horas contra cualquiera de los patógenos ensayados.

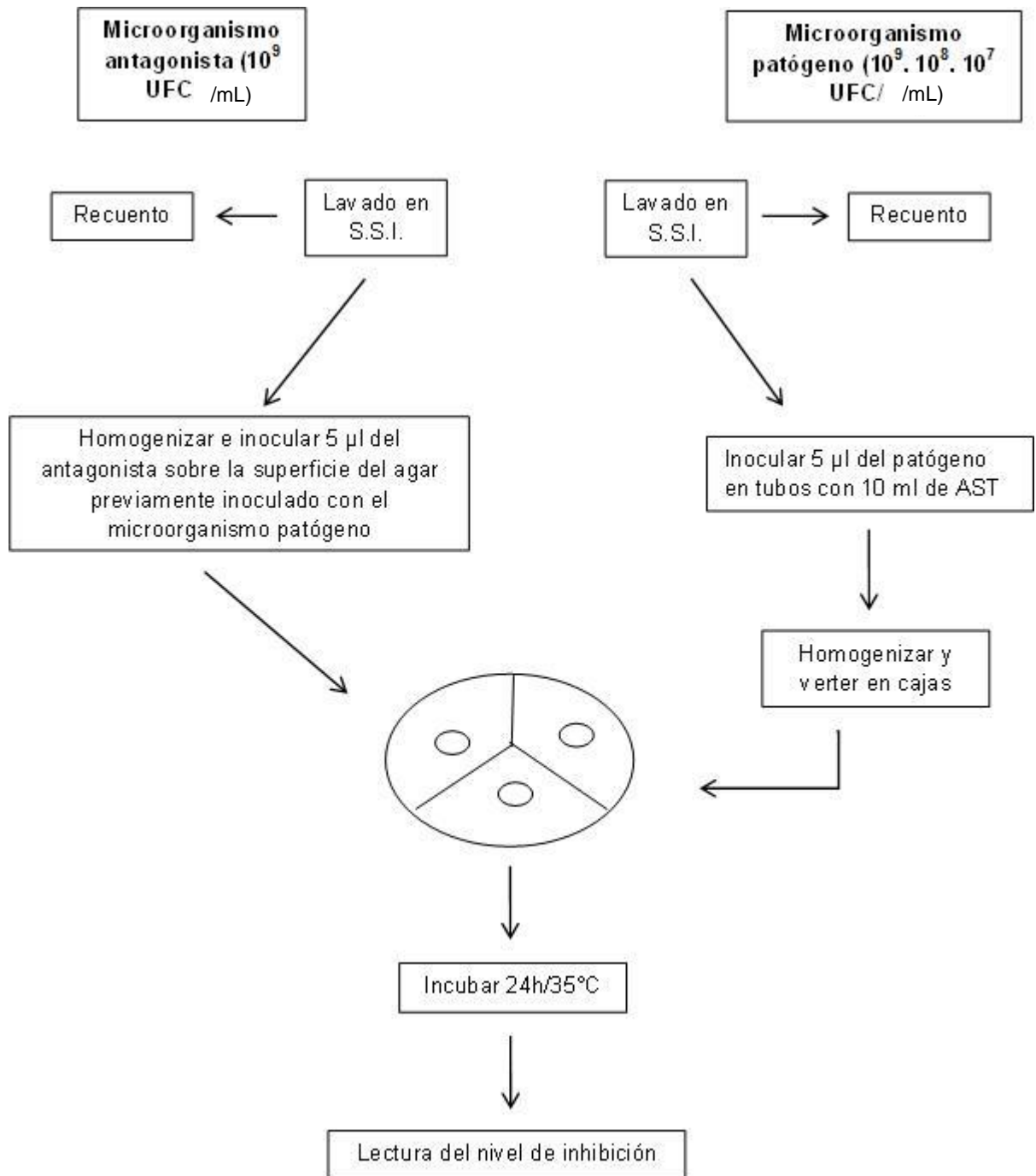


Figura 4. Evaluación del efecto antagónico de cepas aisladas de diversas fuentes contra *Salmonella* y *E. coli* O157 mediante la técnica de la gota.

OBJETIVO 2

IV.2.2. Establecimiento de mezclas de bacterias antagonistas y evaluación de su efecto antagónico contra *Salmonella* y *E. coli* O157 en medio de cultivo.

IV.2.2.1. Pruebas de inhibición entre cepas antagonistas

A partir del experimento realizado en el apartado IV.2.1. se seleccionaron cuatro cepas que mostraron efecto antagónico contra *Salmonella* y *E. coli* O157. Para evaluar el posible efecto antagónico entre cepas antagonistas se empleó nuevamente la técnica de la gota (Figura 4), esta vez colocando a una de las cepas inmersa en el agar y sobre la superficie de la caja (una vez solidificada) a cada una de las cepas restantes para evaluar el posible efecto en su desarrollo. Brevemente:

- a) Se prepararon cultivos frescos de los microorganismos antagonistas mediante tres transferencias sucesivas en 3 mL de CST incubados a 35°C/18 h. Los cultivos se lavaron tres veces con solución salina isotónica:
- a) Se realizó el recuento de cada una de las cepas antagonistas mediante la técnica de vaciado en placa en AST; las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas.
- b) Se inocularon 5 µL de cada una de las cepas antagonistas (por separado) en un tubo con 10 mL de AST temperado a 45°C; los tubos se homogenizaron en vortex por 10 segundos, se vertieron en cajas petri y se dejaron solidificar en campana de flujo laminar. Sobre el medio (en áreas separadas) se inocularon 5 µL de cada una de las cepas antagonistas restantes y se dejaron secar 15 min en campana de flujo laminar. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas. Al término de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición del microorganismo antagonista (en relación con las placas control).

Una vez realizadas las pruebas de antagonismo se seleccionaron aquellas cepas en las que se observó la presencia de un halo de inhibición en el agar inoculado con cualquiera de las cepas antagonistas ensayadas.

IV.2.2.2. Pruebas de antagonismo con mezclas de cepas antagonistas

Con los resultados de las pruebas de antagonismos contra *Salmonella* y *E. coli* O157 se seleccionaron aquellas cepas que:

- a) Mostraron un mayor efecto inhibitorio contra ambos patógenos.
- b) No inhibieron el desarrollo de otras cepas antagonistas.

Se prepararon cinco mezclas de cepas antagonistas (Cuadro 3) y se realizaron las pruebas de inhibición contra ambos patógenos mediante la técnica de la gota (Figura 4).

Cuadro 3. Mezclas de cepas antagonistas.

Mezcla	Cepa antagonista
1	9,18
2	21,18
3	18, 51
4	21, 51
5	18, 21, 51

PROCEDIMIENTO

- a) Se prepararon tubos con cultivos frescos de los microorganismos antagonistas (9, 18, 21 y 51) en 3 mL de CST por cuadruplicado para luego incubar a 35°C/24 h. Posteriormente se tomaron 14 mL de cada cepa para la realización de las mezclas 1, 2, 3 y 4 (10^7 Log) y 12 mL para la mezcla 5 (10^7 Log) para efectuar tres lavados sucesivos con solución isotónica centrifugando a 4,500 r.p.m por 15 minutos.

- b) De manera simultánea se prepararon cultivos frescos de los patógenos de prueba (*Salmonella* y *E. coli* O157) como se describió previamente para los microorganismos antagonistas.
- c) Se inocularon por separado, 5 µL de cada microorganismo patógeno en un tubo con 10 mL de AST temperado a 45°C; los tubos se homogenizaron en vortex por 10 segundos, el agar se vertió en cajas Petri y las placas se dejaron solidificar en campana de flujo laminar.
Sobre el medio (en áreas separadas) se inocularon 5 µL de cada una de las mezclas de cepas antagonistas y se dejaron secar 15 min en campana de flujo laminar.
- c) Se incluyeron placas control inoculadas con solución salina. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas. d) Se midió el diámetro de los halos de inhibición de cada mezcla de cepas antagonistas (en relación con las placas control).

OBJETIVO 3

IV.2.3. Evaluación del efecto antagónico de las mezclas de cepas seleccionadas contra *Salmonella* y *E. coli* O157 en semilla de alfalfa.

IV.2.3.1. Índice de germinación de semilla de alfalfa inoculada con microorganismos antagonistas (Figura 5).

Con el propósito de conocer el posible efecto que pudieran tener los microorganismos antagonistas inoculados en la semilla sobre su índice de germinación se realizó el siguiente experimento:

- a) Se colocó semilla de alfalfa previamente cribada en H₂O purificada estéril durante 4 horas.
- b) Posterior a las 4 horas de remojo se decantó el H₂O. Y se pesaron aproximadamente 0.065 g de semilla lo que equivale a 100 semillas de alfalfa.

- c) Posteriormente las semillas se colocaron a germinar en cajas de Petri de plástico con 2 mL de H₂O destilada estéril y cubiertas con parafilm, durante 48 h a 22°C.
- d) Al cabo de las 48 h de incubación se midió el índice de germinación restando al total de semillas puestas a germinar menos las semillas que no germinaron.

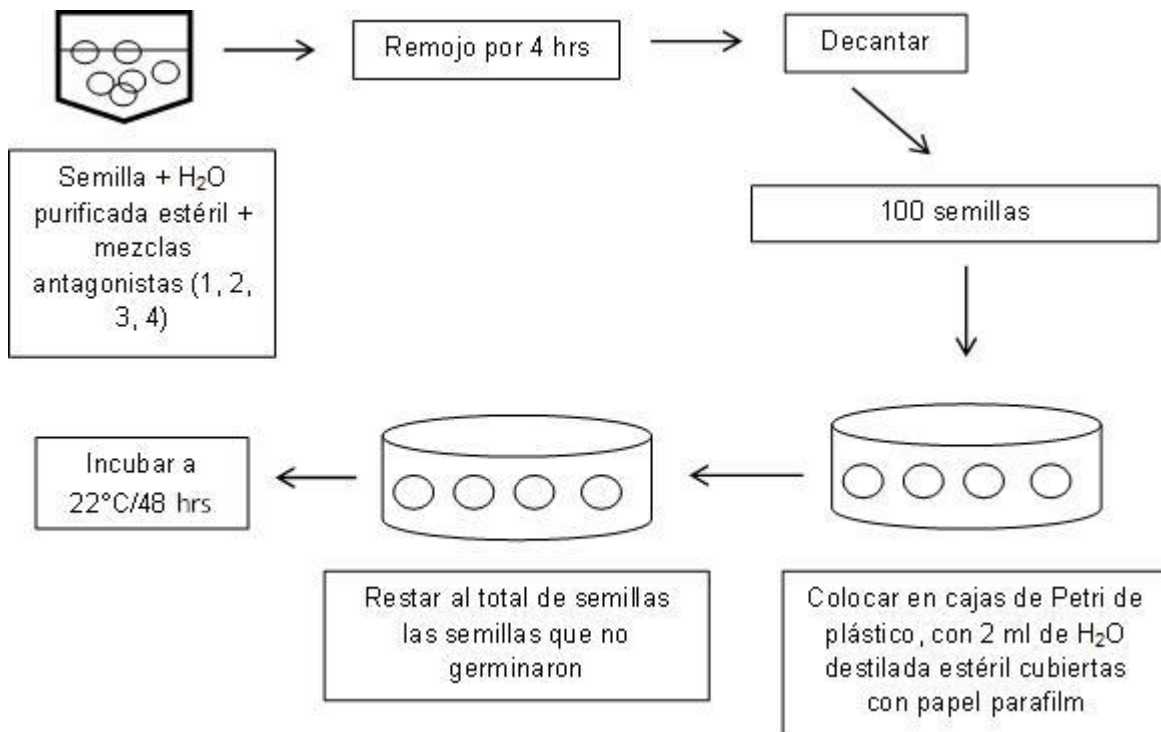


Figura 5. Efecto de las mezclas de cepas antagonistas sobre el índice de germinación de semilla de alfalfa.

IV.2.3.2. Inhibición de *Salmonella* y *E. coli* O157

IV.2.3.2.1 Producción de germinados de alfalfa

Para llevar a cabo el estudio de las cepas antagonistas sobre *Salmonella* y *E. coli* O157 en germinado de alfalfa, se empleó un modelo de germinación de las semillas previamente evaluado en el laboratorio. Brevemente, semillas lavadas (4 g) se colocaron en un recipiente con 500 µL de agua de la llave, se cubrió con

una película plástica y se almacenaron a 22 °C durante 24 horas. Del segundo al cuarto día de germinación se colocaron 3 mL de agua en la mañana y 3 mL en la noche. En el quinto día de germinación se colocaron 6 mL por la mañana y 6 mL por la noche. Al sexto día los germinados alcanzaron el desarrollo deseable y estuvieron listos para la cosecha (Figura 6).

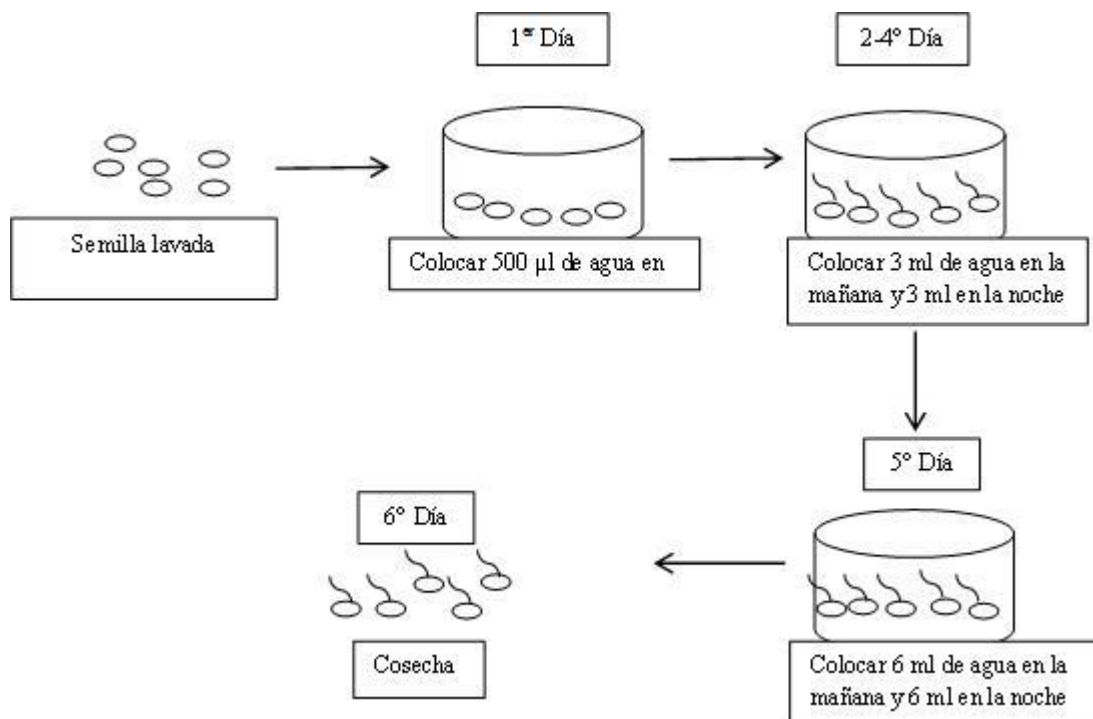


Figura 6. Modelo para la germinación de semillas de alfalfa.

IV.2.3.2.2. Inoculación de semilla de alfalfa con *Salmonella* y *E. coli* O157 (Figura 7)

- Se prepararon en tubos cultivos frescos de cada uno de los microorganismos patógenos (5 cepas de *Salmonella* y 2 cepas de *E. coli* O157:H7) mediante 2 transferencias sucesivas en 3 mL de CST adicionado con 400 ppm de rifampicina. A partir del segundo cultivo se transfirieron 100 µl a 60 mL de CST con rifampicina (400 ppm).

- b) Se colocaron 14 mL de cada cepa en tubos falcon y se centrifugaron a 4,500 r.p.m. por 15 minutos. El procedimiento se realizó dos veces más con 7 mL de solución salina isotónica.
- c) Se tomaron 6 mL de cada cepa de *Salmonella* y se obtuvo un pool de 30 mL. Se realizó el mismo procedimiento para la obtención de 30 mL de una suspensión celular de las cepas de *E. coli* O157.
- d) Se tomó una alícuota de 28.5 mL y de 21.5 mL del concentrado de 30 mL de cada patógeno y se colocaron en volúmenes de 412 mL de H₂O purificada estéril para obtener dos niveles de inóculo final de aproximadamente 10⁷ y 10³ UFC/mL, respectivamente. A estas suspensiones bacterianas se les agregaron 400 g de semilla de alfalfa cribada. Se realizó el recuento de los patógenos en la semilla mediante la técnica de vaciado en placa con AST adicionado de rifampicina (400 ppm).
- e) Se dejó reposar la semilla en la suspensión bacteriana durante 20 minutos y posteriormente se retiró el sobrenadante y se colocó la semilla a secar sobre una malla de tul estéril durante 24 horas a temperatura ambiente. De la semilla seca se tomaron 3 porciones de 10 g para realizar el conteo del patógeno presente en la semilla como se describió previamente.
- f) Como control se utilizó semilla sumergida en agua purificada estéril no inoculada con los patógenos de prueba.

IV.2.3.2.3 Cuantificación de *Salmonella* y *E. coli* O157

La semilla inoculada con dos concentraciones (10⁷ y 10³) de *Salmonella* y *E. coli* O157 se sometió a remojo que es el primer paso en el modelo de germinación previamente descrito (Figura 6). Brevemente, la semilla se colocó a remojar durante 4 horas en las suspensiones celulares (~1 x 10⁹ UFC/mL) de las mezclas 1 y 2 para *Salmonella* y la mezcla 3 para *E. coli* O157; y como control se utilizó semilla sin inocular la cual se sometió a remojo durante 4 horas en agua purificada estéril (Figura 8). De cada uno de los tratamientos se tomaron 3 porciones de semilla (10 g) para realizar un recuento inmediatamente después de la inoculación (tiempo cero) y después de las cuatro horas de remojo.

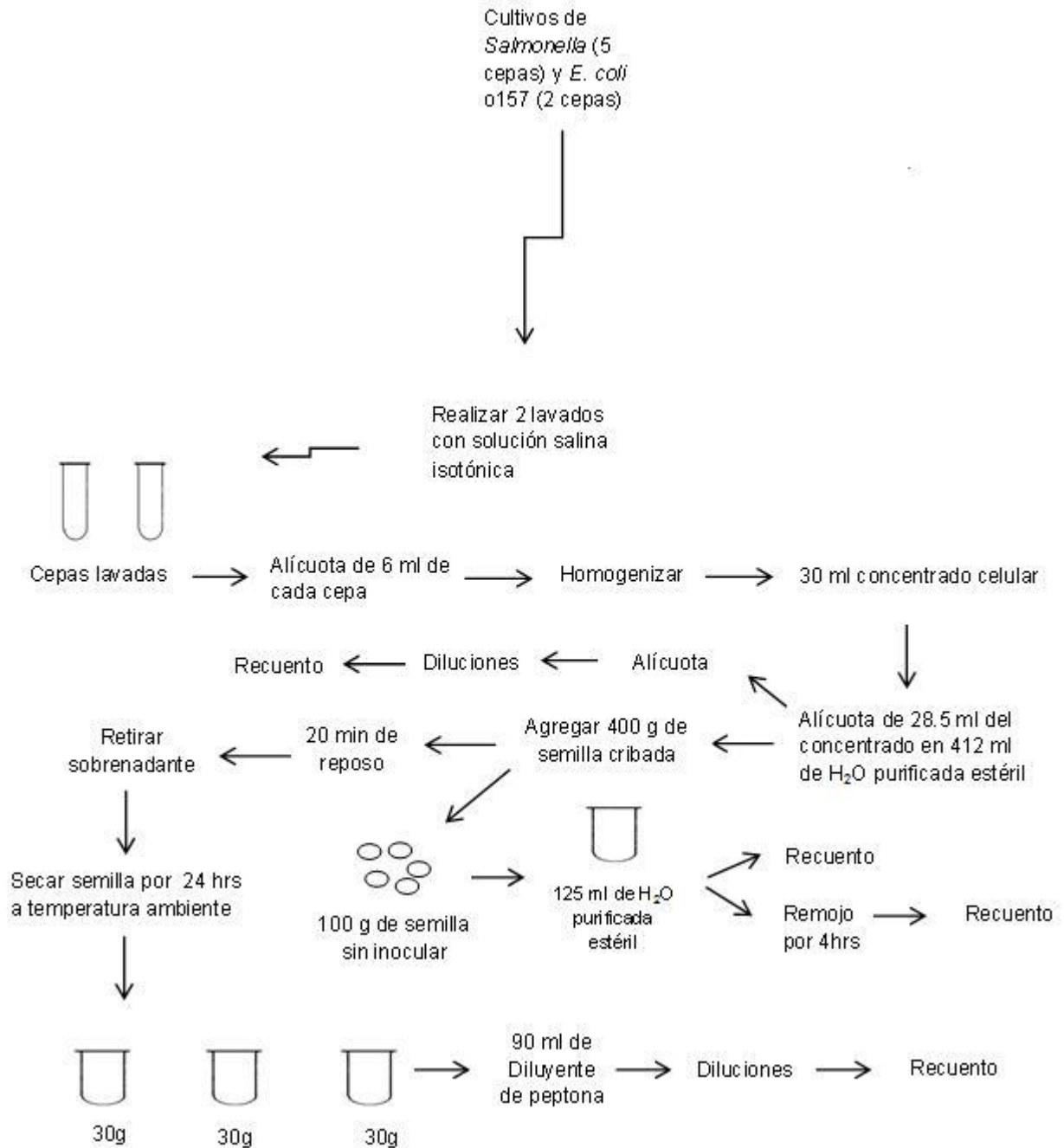


Figura 7. Evaluación del efecto inhibitorio de cepas antagónicas sobre *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en semilla de alfalfa.

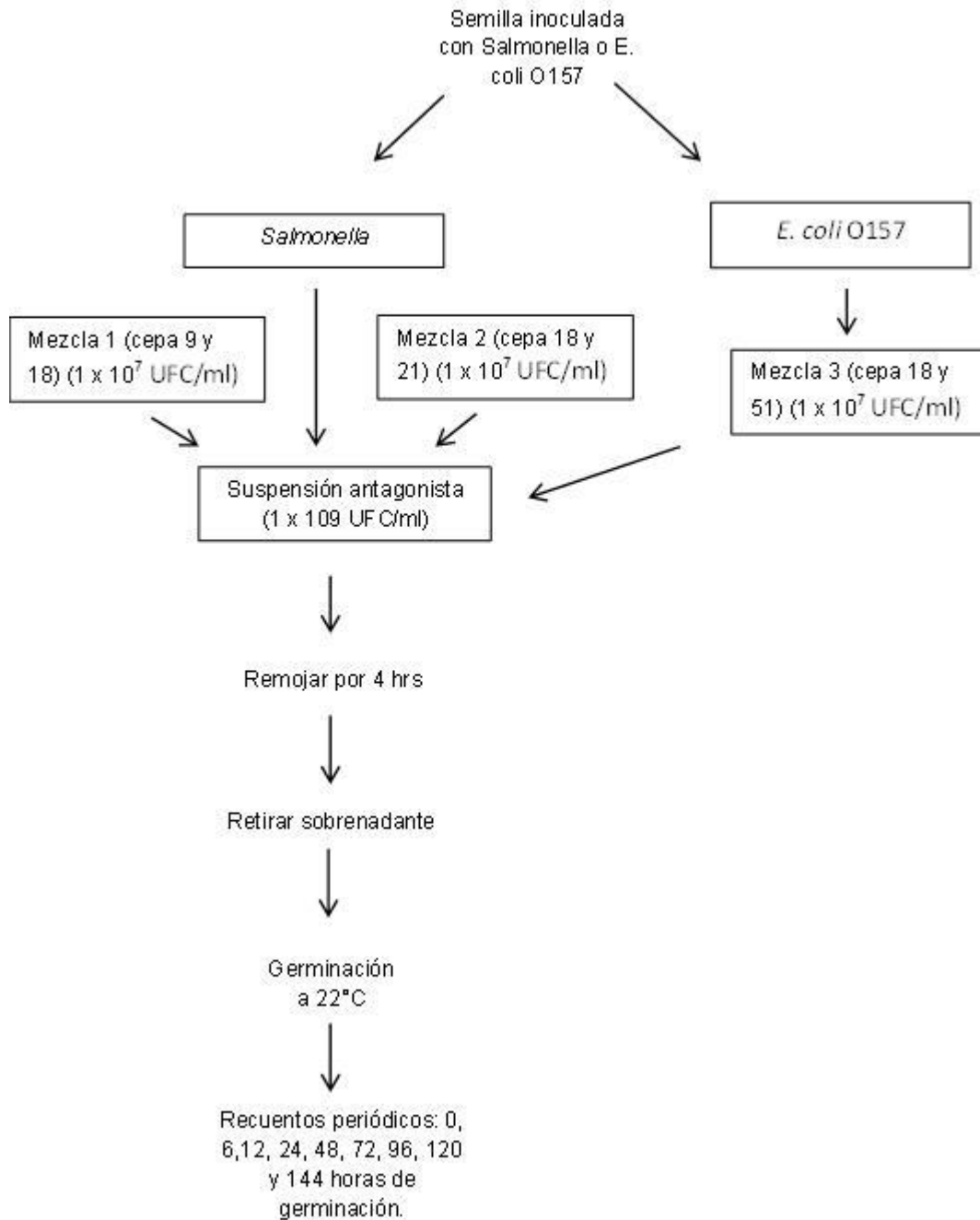


Figura 8. Comportamiento de *Salmonella* y *E. coli* O157 durante la germinación de semillas inoculadas con bacterias antagonistas.

IV.2.3.2.4 Análisis microbiológico

De cada uno de los tratamientos se tomaron 3 porciones de semilla (10 g) para realizar un recuento inmediatamente después de la inoculación (tiempo cero) y después de las cuatro horas de remojo. Se realizó el mismo procedimiento a las 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de germinación. Se realizó el recuento de los patógenos inoculadas a ambas concentraciones (10^7 y 10^3) en la semilla, utilizando la técnica de vaciado en placa y AST con rifampicina (400 ppm) y sin rifampicina, para obtener por un lado el recuento únicamente de patógenos, el de patógenos + flora nativa y antagonistas; y el de únicamente la flora nativa (figura 8).

OBJETIVO 4

IV.2.4. Determinación de los posibles mecanismos de acción de las cepas antagonistas

Se realizaron ensayos con los sobrenadantes extraídos de los cultivos de las cuatro cepas antagonistas (9, 18, 21 y 51) para determinar si el efecto inhibitorio se debía a la presencia de sideróforos o a la producción de ácido cianhídrico.

IV.2.4.1. Determinación de sideróforos

- a) Las cepas antagonistas se inocularon en medio mínimo (NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NH_4Cl , NaCl , ácido succínico, fructosa, triptófano, MgSO_4 y CaCl_2) y se incubaron a 30°C durante 48 h en agitación.
- b) Se centrifugó el medio (10,000 r.p.m. por 10 min). El sobrenadante se recolectó y se filtró asépticamente a través de un filtro de membrana de 0.2 μm de tamaño del poro.
- c) Se tuvieron 2 blancos que contuvieron 750 μL de CAS (cromo azurol S) y 750 μl de las cepas incubadas en medio mínimo, los tubos restantes contuvieron 750 μL de CAS, 400 μL de las cepas incubadas en medio mínimo y 350 μL de H_2O destilada.
- d) Los tubos se dejaron en reposo durante 5 horas.

- e) Posteriormente las muestras se leyeron por triplicado a una absorbancia de 630 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mesilato de ferroxamina.

IV.2.4.2. Determinación de ácido cianhídrico

- a) Se prepararon cultivos frescos de las cepas antagonistas mediante una transferencia sucesiva en 3 mL de CST.
- b) Se centrifugaron a 4,500 r.p.m por 15 minutos hasta obtener un medio completamente claro.
- c) Se colocaron 5 mL del sobrenadante de cada cepa en 5 tubos a los cuales se les adiciona 165 μ L de ácido pícrico (neutralizado con Na_2CO_3).
- d) Los tubos se incubó en baño María a ebullición durante 30 min.
- e) Posteriormente se midió absorbancia a 492 nm de cada uno de las cepas por triplicado en el espectro.

IV.3. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar y se analizaron a través de un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey, utilizando el programa JMP 10.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Es generalmente conocido que el uso de semillas contaminadas con microorganismos patógenos para la producción de germinados es el principal factor detectado en los brotes reportados (Gill *et al.*, 2003; Montville y Schaffner, 2005; Winthrop, 2003). Aunque estén presentes en números bajos (0.1 Log UFC/g), los patógenos pueden crecer rápidamente bajo el calor (20 a 30°C) y las condiciones húmedas utilizadas para la producción de germinados (Fu *et al.*, 2008; Liu y Schaffner, 2007). Numerosos estudios han demostrado que una vez que microorganismos patógenos al humano ingresan al germinado difícilmente pueden ser removidos por el lavado y desinfección posterior a su cosecha (Warriner *et al.*, 2003). Por lo tanto la mayoría de los enfoques preventivos hasta la fecha se enfocan a la descontaminación de la semilla, la cual se dirige a inactivar a los patógenos antes de iniciar el proceso de germinación (Holiday *et al.*, 2001; Weissinger y Beuchat, 2000).

A pesar de la variedad de agentes desinfectantes que existen, ninguno ha resultado completamente efectivo en la eliminación de patógenos en la semilla. Para abordar tales limitaciones asociadas con la descontaminación química de la semilla, ha surgido cierto interés en usar métodos de biocontrol para reducir o inactivar patógenos a humanos en la semilla y en los germinados (Goodridge, 2004; Greer, 2005; Hudson *et al.*, 2005; Kocharunchitt *et al.*, 2009). No solamente los agentes de biocontrol pueden inhibir el crecimiento de patógenos humanos sino que también pueden proveer un tampón biológico para prevenir la contaminación producida durante la germinación. Hasta la fecha, las estrategias de biocontrol han estado principalmente enfocadas al uso de bacterias antagonistas (Matos y Garland, 2005).

V.1. Efecto antagónico de bacterias aisladas de diversas fuentes

En la naturaleza todas las poblaciones de microorganismos suelen ser mixtas e inevitablemente se presentan relaciones de antagonismo y sinergismo en ciertos ambientes.

Se probó el efecto antagónico de 13 cepas que fueron obtenidas de un estudio previo (Cuadro 4) en donde se reportó que ejercían un efecto de inhibición del 100 % contra *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7. Sin embargo, al repetir la evaluación veces se observó que no presentaban ningún efecto antagónico. Esta pérdida del efecto antagónico contra los patógenos de prueba se puede atribuir a la activación de las cepas en CST en repetidas ocasiones o bien a que como las cepas se encontraban congeladas en viales y para su uso era necesario descongelarlas, de alguna manera pudo contribuir a la pérdida del efecto inhibitorio.

El estudio se inició con la estandarización de la técnica para evaluar el antagonismo microbiano. Se probaron tres técnicas, dos medios de cultivo, tres volúmenes de medio, y diferentes concentraciones de los patógenos de prueba. Los resultados de esta evaluación se muestran en el (Cuadro 4). Se observa que el medio que resultó más efectivo fue el AST a una concentración de 10^8 y un volumen de 10 mL, utilizando la técnica de la gota.

Cuadro 4. Estandarización de la técnica para evaluar el antagonismo microbiano.

Medio	Volumen	Técnica	Concentración de patógeno
AST	10 mL	Gota	10^8 UFC/g

Al no observar efecto antagónico en las cepas aisladas previamente, se tuvo que proceder a la búsqueda de cepas con capacidad antagónica contra *Salmonella* y *E. coli* O157 a pesar de no ser uno de los objetivos de este trabajo. Seleccionamos algunos sustratos para aislar microorganismos con potencial

antagónico. Entre dichos materiales se incluyeron materia fecal de bebé y suelo de un cultivo orgánico de zarzamoras, debido a que en estos ambientes ocurren relaciones naturales de antagonismo. Específicamente la competencia de los microorganismos en el suelo puede reducir el nivel de microorganismos patógenos en el estiércol (Ingaham *et al.*, 2004).

Se aislaron 19 cepas y se probó su efecto antagónico utilizando la técnica de la gota ya estandarizada previamente. Cuatro de las 19 cepas (9, 18, 21 y 51) inhibieron al menos a alguno de los patógenos. Las cuatro cepas resultaron antagonistas contra *Salmonella* y las cepas 18 y 51 contra *E. coli* O157 (Cuadro 6). Estas cepas fueron seleccionadas por la presencia de un halo de inhibición en el AST en el que se encontraba inmerso los patógenos de prueba (Figura 9). A las cepas seleccionadas se les realizó una tinción de Gram y las pruebas de catalasa y oxidasa (Cuadro 5).

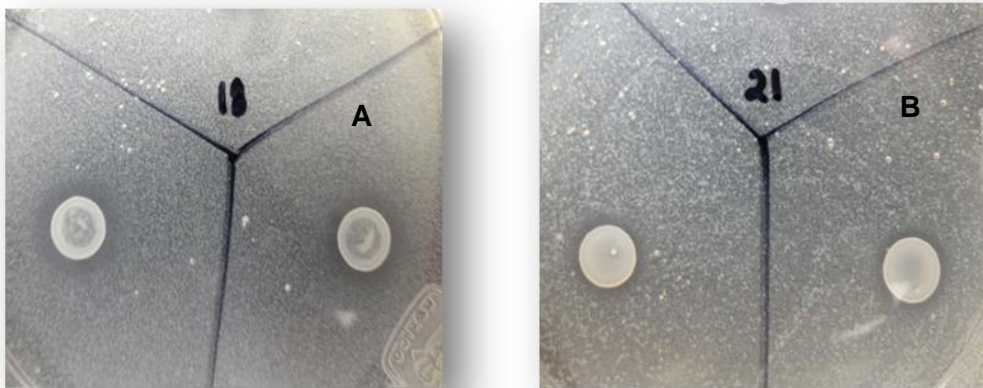


Figura 9. Efecto inhibitorio de las cepas 18 (A) y 21 (B) contra *Salmonella* sp. (cepa 1) y *Salmonella* Montevideo mediante la técnica de la gota. El patógeno de prueba se encuentra inmerso en el agar y en las gotas las bacterias antagonistas.

Como se sabe, los resultados del efecto antagónico están fuertemente determinados por la concentración relativa de los microorganismos involucrados. Para conocer si el efecto inhibitorio observado previamente podía tener alguna

variación con respecto al nivel de inóculo, se decidió probar tres niveles de los patógenos de prueba (10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/mL) y una sola concentración de bacterias antagonistas (Cuadro 7). Se observó un mayor efecto de inhibición por parte de las bacterias antagonistas al disminuir la concentración utilizada del patógeno de prueba. Este efecto puede atribuirse a que hay una menor concentración del patógeno y por lo tanto, una menor competencia en el medio, lo que permite un mayor crecimiento de las bacterias antagonistas. Nuevamente únicamente las cepas 18 y 51 inhibieron a *E. coli* O157, mientras que las cuatro (cepas 9, 18, 21 y 51) inhibieron al menos a una de las cepas de *Salmonella*. La cepa 18 resultó ser más efectiva ya que presentó los mayores halos de inhibición contra las cuatro cepas de *Salmonella*, mientras que la cepa 9 fue la menos efectiva al solamente inhibir a una cepa de *Salmonella* sp. (cepa 1).

Cuadro 5. Características básicas de las cepas antagonistas seleccionadas.

Cepa antagonista	Forma microscópica	Gram	Catalasa	Oxidasa
9	Bacilo	+	Positivo	Negativo
18	Bacilo	+	Positivo	Negativo
21	Bacilo	+	Positivo	Negativo
51	Bacilo	+	Positivo	Negativo

El antagonismo es un fenómeno común en ambientes en los que coexisten mezclas activas de microorganismos. Aun en ausencia de competencia por nutrientes o producción de sustancias antimicrobianas, puede presentarse competencia por el espacio biológico (Wood y Holzappel, 1995). El resultado final suele ser el predominio de un solo grupo de microorganismos, y en ocasiones de una cepa particular sobre el resto de la flora. Aunque se han desarrollado diferentes métodos físicos y químicos para detectar y cuantificar el antagonismo, el bioensayo sigue siendo el método de elección, porque mide el efecto sobre el patógeno de interés (Daeschel, 1989).

Cuadro 6. Cepas aisladas de diversas fuentes con efecto antagonista contra *Salmonella* y *Escherichia coli* O157.

CEPA ANTAGONISTA	FUENTE DE AISLAMIENTO	Efecto inhibitorio ¹	
		<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
O1	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
O2	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
O3	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
O4	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
D1	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
D2	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
D3	Materia fecal de bebé	Negativo	Negativo
8	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
9	Suelo de cultivo orgánico	Positivo	Negativo
10	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
13	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
18	Suelo de cultivo orgánico	Positivo	Positivo
21	Suelo de cultivo orgánico	Positivo	Negativo
23	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
26	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
30	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
30	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
34	Suelo de cultivo orgánico	Negativo	Negativo
51	Suelo de cultivo orgánico	Positivo	Positivo

¹Efecto inhibitorio observado mediante la técnica de la gota

Cuadro 7. Efecto antagónico de cepas aisladas de diversas fuentes contra *Salmonella enterica* y *E. coli* O157.

Microorganismo patógeno	Concentración de m.o. patógeno	Halo de inhibición (mm) por cepa antagonista (10 ^{9,1})			
		9	18	21	51
<i>E. coli</i> O157 (cepa 1)	10 ⁹	0	0	0	0
	10 ⁸	0	0	0	0
	10 ⁷	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157 (cepa 2)	10 ⁹	0	0	0	0
	10 ⁸	0	1 ± 0.0	0	1 ± 0.0
	10 ⁷	0	1 ± 0.0	0	1 ± 0.0
<i>Salmonella</i> sp. (cepa 1)	10 ⁹	0	0	0	0
	10 ⁸	1 ± 0.0	2 ± 0.0	0	0
	10 ⁷	1 ± 0.0	2 ± 0.0	0	0
<i>Salmonella</i> sp. (cepa 2)	10 ⁹	0	0	0	0
	10 ⁸	0	1 ± 0.0	1 ± 0.0	0
	10 ⁷	0	1.66 ± 0.58	1 ± 0.0	0
<i>Salmonella</i> Agona	10 ⁹	0	0	0	0
	10 ⁸	0	1 ± 0.0	0	1 ± 0.0
	10 ⁷	0	1 ± 0.0	1 ± 0.0	1 ± 0.0
<i>Salmonella</i> Montevideo	10 ⁹	0	0	1 ± 0.0	0
	10 ⁸	0	0	2 ± 0.0	0
	10 ⁷	0	0	2 ± 0.0	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10 ⁹	0	0	0	0
	10 ⁸	0	1.33 ± 0.58	0	0
	10 ⁷	0	1.83 ± 0.28	3 ± 0.0	0

¹ Halo de inhibición (mm) ± Desviación estándar. El valor reportado representa la media de seis mediciones.

V.2. Mezclas de bacterias antagonistas

Un enfoque alternativo de control biológico envuelve el uso de mezclas de cultivos de exclusión competitiva, en lugar de cepas individuales, para limitar el crecimiento de patógenos. Las composiciones bacterianas son mezclas de diferentes aislados bacterianos obtenidos a partir de una comunidad bacteriana estable de un organismo adulto y que son introducidos en un organismos joven para así poder controlar la colonización de patógenos. Este enfoque ha probado ser efectivo al establecer una microflora gastrointestinal estable que prevenga la colonización de *Salmonella* a través de competición directa por los sitios de unión o por competición de nutrientes entre la flora nativa y *Salmonella* (Ha *et al.*, 1994).

El uso de composiciones bacterianas para el biocontrol de patógenos en germinados asume que la flora nativa de germinados “maduros” reduciría el crecimiento de patógenos si se inocularán en las semillas (Matos y Garland, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, se probó el efecto antagónico *in vitro* de 32 cepas aisladas de diversas fuentes contra *Salmonella* y *E. coli* O157. De las cuales cuatro presentaron inhibición contra *Salmonella* (9, 18, 21 y 51) y dos (9 y 51) contra *E. coli* O157. Una vez obtenidas las cepas antagonistas, se procedió a la preparación de mezclas. Para ello, en primer término fue necesario hacer pruebas para observar cualquier posible inhibición entre las cuatro cepas seleccionadas. La cepa 9 fue la que mayor efecto antagónico presentó al inhibir a las cepas 51 y 21, las cepas 9 y 51 se inhiben entre ellas y las cepas 18 y 21 no presentaron ningún efecto antagónico contra ninguna de las demás cepas (Cuadro 8).

En base a estos resultados, se seleccionaron aquellas cepas que no se inhibieran entre sí y se prepararon cinco mezclas (Cuadro 9). Las cinco mezclas de microorganismos antagonistas se sometieron a ensayos *in vitro* utilizando nuevamente la técnica del botón para evaluar el efecto antagónico contra los

patógenos de prueba (Cuadro 10). En el cuadro se observa que de todas la mezclas, las más efectiva resulto ser la mezcla 3 (cepas 18 y 51) la cual inhibió a *E. coli* O157 (cepa 1), *Salmonella* Agona, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* sp. (cepa 2) y a *Salmonella* Typhimurium. La mezcla 5 (cepas 18, 21 y 5) fue la única que no tuvo efecto antagonista contra ninguno de los dos microorganismos patógenos.

Cuadro 8. Efecto antagónico entre cepas aisladas de diversas fuentes que presentan efecto antagónico contra *Salmonella* y *E. coli* O157.

Cepa antagonista ¹		Halo de inhibición (mm) por cepa antagonista ^{2,4}			
Identificación	Concentración (UFC/mL)	9	18	51	21
9	10 ⁹	NA	0	0	0
	10 ⁸	NA	0	1 ± 0.0	0
	10 ⁷	NA	0	2 ± 0.0	0
18	10 ⁹	0	NA	0	0
	10 ⁸	0	NA	0	0
	10 ⁷	0	NA	0	0
21	10 ⁹	0	0	0	NA
	10 ⁸	3 ± 0.0	0	0	NA
	10 ⁷	4.33 ± 0.57	0	0	NA
51	10 ⁹	0	0	NA	0
	10 ⁸	0	0	NA	0
	10 ⁷	8 ± 0.0	0	NA	0

¹ Cepa antagonista inmersa en AST

² Concentración de 1x10⁹ UFC/mL

³ NA: No aplica

⁴ Halo de inhibición (mm) ± Desviación estándar. El valor reportado representa la media de seis mediciones.

Cuadro 9. Efecto inhibitorio *in vitro* de mezclas de cepas antagonistas contra *Salmonella* y *E. coli* O157.

Microorganismo patógeno	Concentración de m.o. patógeno	Halo de inhibición de las mezclas antagonistas (mm) ¹				
		Mezcla 1 (9 y 18)	Mezcla 2 (21 y 18)	Mezcla 3 (18 y 51)	Mezcla 4 (21 y 51)	Mezcla 5 (18, 21 y 51)
<i>E. coli</i> O157 (cepa 1)	10 ⁹	0	0	0	0	0
	10 ⁸	0	0	0	0	0
	10 ⁷	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157 (cepa 2)	10 ⁹	0	0	0	0	0
	10 ⁸	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁷	0	0	2 ± 0.0	0	0
<i>Salmonella</i> sp. (cepa 1)	10 ⁹	0	0	0	0	0
	10 ⁸	0	0	0	0	0
	10 ⁷	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp. (cepa 2)	10 ⁹	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁸	0	1 ± 0.0	1.83 ± 0.29	1 ± 0.0	0
	10 ⁷	1 ± 0.0	2 ± 0.0	2.33 ± 0.58	2 ± 0.0	0
<i>Salmonella</i> Agona	10 ⁹	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁸	0	1 ± 0.0	2 ± 0.0	0	0
	10 ⁷	1 ± 0.0	2 ± 0.0	3 ± 0.0	0	0
<i>Salmonella</i> Montevideo	10 ⁹	0	0	0	0	0
	10 ⁸	0	0	0	0	0
	10 ⁷	0	1.33 ± 0.28	0	0	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10 ⁹	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁸	0	0	1.17 ± 0.28	1 ± 0.0	0
	10 ⁷	1.17 ± 0.28	1 ± 0.0	1.66 ± 0.28	1.17 ± 0.28	0

¹ El valor reportado representa la media del halo de inhibición (mm) de seis mediciones ± desviación estándar

Diversos estudios reportan que los microorganismos antagonistas funcionan mejor en mezclas que por sí solas (Matos y Garland, 2005). Sin embargo, en este estudio se demostró que no necesariamente se presenta este efecto, ya que como se puede ver en el Cuadro 10, las bacterias por sí solas presentan un efecto similar que al de sus mezclas. Sin embargo, la ventaja que podría tener usar

mezclas en lugar de cepas individuales, es que el efecto antagónico pudiera ser contra un mayor número de cepas de patógenos, y tal vez resultar más efectivo al probarse en las semillas.

Por germinación se entiende el proceso fisiológico donde la semilla produce una plántula con sus partes esenciales normales (radícula y plúmula). La capacidad de germinar una semilla está influenciada por varios factores internos como externos. Dentro de los factores internos están la viabilidad del embrión, la cantidad y calidad del tejido de reserva y los diferentes tipos de dormancia. Algunos de los factores externos que regulan el proceso son el grosor de la testa, disponibilidad de agua, momento de la cosecha, ataque de plagas y enfermedades, secado y condiciones de almacenamiento, temperatura y tipos de luz. La incorporación de microorganismos antagonistas podría afectar la tasa de germinación de las semillas de alfalfa por la producción de ciertos metabolitos secundarios (fitohormonas, antibióticos, ácidos orgánicos y enzimas) secretados por estas bacterias.

Primeramente se evaluó el efecto de las mezclas de los microorganismos antagonistas sobre la tasa de germinación de la semilla de alfalfa (Cuadro 11). Ninguna de las mezclas de microorganismos antagonistas afectó el índice de germinación al compararse con el control. Hay estudios en donde se reporta que las bacterias antagonistas pueden tener un efecto positivo o negativo sobre el índice de germinación (Ogata *et al.*, 2008). Fransisca *et al.*, (2012) reportaron que la producción de metabolitos secundarios por parte de microorganismos antagonistas aplicados en germinado de alfalfa para controlar bacterias patógenos afectó negativamente el índice de germinación. Lo cual podría explicar el porcentaje bajo de germinación obtenido.

Cuadro 10. Comparación del efecto antagónico contra *Salmonella* y *E. coli* O157 de cepas individuales con el efecto antagónico de mezclas de estas mismas cepas.

Microorganismo patógeno	Concentración de patógeno (UFC/mL)	Halo de inhibición de las mezclas antagonistas (mm) ¹								
		Cepas				Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5
		18	21	9	51	(9 y 18)	(21 y 18)	(18 y 51)	(21 y 51)	(18, 21 y 51)
<i>E. coli</i> O157 (cepa 1)	10 ⁹	0 ³	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157 (cepa 2)	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁸	1 ± 0.0	0	0	1 ± 0.0	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁷	1 ± 0.0	0	0	1 ± 0.0	0	0	2 ± 0.0	0	0
<i>Salmonella</i> sp. (cepa 1)	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁸	2 ± 0.0	0	1 ± 0.0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁷	2 ± 0.0	0	1 ± 0.0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp. (cepa 2)	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁸	1 ± 0.0	1 ± 0.0	0	0	0	1 ± 0.0	1.83 ± 0.29	1 ± 0.0	0
	10 ⁷	1.66 ± 0.58	1 ± 0.0	0	0	1 ± 0.0	2 ± 0.0	2.33 ± 0.58	2 ± 0.0	0
<i>Salmonella</i> Agona	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁸	1 ± 0.0	0	0	1 ± 0.0	0	1 ± 0.0	2 ± 0.0	0	0
	10 ⁷	1 ± 0.0	1 ± 0.0	0	1 ± 0.0	1 ± 0.0	2 ± 0.0	3 ± 0.0	0	0
<i>Salmonella</i> Montevideo	10 ⁹	0	1 ± 0.0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁸	0	2 ± 0.0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁷	0	2 ± 0.0	0	0	0	1.33 ± 0.28	0	0	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	1 ± 0.0	0	0
	10 ⁸	1.33 ± 0.58	0	0	0	0	0	1.17 ± 0.28	1 ± 0.0	0
	10 ⁷	1.83 ± 0.28	3 ± 0.0	0	0	1.17 ± 0.28	1 ± 0.0	1.66 ± 0.28	1.17 ± 0.28	0

¹ El valor reportado representa la media del halo de inhibición (mm) de seis mediciones ± desviación estándar

Cuadro 11. Efecto de la aplicación de mezclas antagonistas sobre el índice de germinación.

Tratamiento	Índice de germinación ^{1,2,3}
Control	64 ± 3.15 % ^a
Mezcla 2	64 ± 3.42 % ^a
Mezcla 3	64 ± 3.26 % ^a
Mezcla 4	63 ± 2.92 % ^a

¹ Los valores son expresados como la media de las determinaciones de nueve repeticiones ± desviación estándar.

Datos transformados para su análisis a grados angulares de x, y expresados en la tabla en términos de la variable original.

² No hay diferencias significativas entre valores en la misma columna (P > 0.7341).

³ Índice de germinación fue determinada a partir del número de semillas germinadas, luego de 48 hrs de germinación a 22°C.

Una vez que se comprobó que las mezclas de bacterias antagonistas no tienen un efecto adverso sobre el índice de germinación de la semilla, se procedió a evaluar el antagonismo microbiano durante las cuatro horas de remojo de las semillas de alfalfa inoculadas con *Salmonella* y *E. coli* (10⁷ UFC/g). En el Cuadro 12 se observa el efecto de las mezclas de antagonistas sobre los microorganismos patógenos antes y después del remojo de las semillas. En las semillas remojadas en agua hubo un incremento en la población aproximadamente de 1 Log UFC/g para *Salmonella* y *E. coli*. Sin embargo, cuando se utilizaron los consorcios de microorganismos antagonistas se observó una reducción en las poblaciones de los patógenos. Las mezclas 2 y 4 fueron las más efectivas contra *Salmonella* y la mezcla 3 contra *E. coli* O157.

Al comparar los resultados en semilla y los ensayos *in vitro* se observó que la efectividad se redujo al aplicarse en semilla, al igual que la mezcla 1 que resulto ser efectivo *in vitro* pero no al aplicarse en la semilla, mientras que la mezcla 2 y 4 mantuvieron su efecto contra *Salmonella* tanto *in vitro* como en la semilla.

Cuadro 12. Efecto antagónico de mezclas de cepas contra *Salmonella* y *E. coli* O157 en semilla de alfalfa después de 4 horas de remojo.

Tratamiento	<i>Salmonella</i> (Log UFC/g) ^{1,2}			<i>E. coli</i> O157 (Log UFC/g) ^{1,2}		
	Sin remojo	Con remojo	Aumento/reducción	Sin remojo	Con remojo	Aumento/reducción
Control	6.32 ± 1.22 a	7.15 ± 0.57 a	0.83	6.42 ± 0.55 a	7.55 ± 0.51 a	1.13
Mezcla 1*	6.98 ± 0.32 a	6.83 ± 0.25 a	-0.15	NA	NA	NA
Mezcla 2**	6.39 ± 0.81 a	5.51 ± 0.99 b	-0.88	NA	NA	NA
Mezcla 3 [†]	6.61 ± 0.24 a	6.65 ± 0.36 a	-0.04	6.86 ± 0.69 a	4.98 ± 0.70 b	-1.88
Mezcla 4 [‡]	6.37 ± 0.76 a	5.48 ± 0.91 b	-0.89	NA	NA	NA

¹ Los valores son expresados como la media de las determinaciones de nueve repeticiones ± desviación estándar.

² Diferencias significativas entre valores en la misma columna están indicados por diferentes letras (P < 0.001).

* Mezcla 1: cepas antagonistas 9 y 18; Mezcla 2: cepas antagonistas 21 y 18; Mezcla 3: cepas antagonistas 18 y 51; Mezcla 4: cepas antagonistas 21 y 51.

NA: No aplica.

V.3. Antagonismo microbiano en germinado de alfalfa

Diversos estudios reportan que los microorganismos patógenos a humanos son buenos competidores en las superficies de los germinados y pueden incrementarse en niveles significativos durante la germinación ya sea en semillas inoculadas o contaminadas naturalmente (Schoeller *et al.*, 2002). Sin embargo, la exclusión competitiva ocurre de manera natural.

En el experimento anterior se observó un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Salmonella* y *E. coli* O157 luego de las 4 horas de remojo de las semillas en agua inoculada con las mezclas de microorganismos antagonistas. Sin embargo, la cantidad de microorganismos patógenos con la que se contaminó la semilla fue alta (~7 Log UFC/g), situación poco probable de ocurrir. Para plantear un escenario que pudiera semejar una contaminación real se decidió utilizar un nivel de inóculo más bajo (10³ Log UFC/mL) de microorganismos patógenos. Se cuantificó el efecto de los antagonistas antes y después del remojo de la semilla

contaminada y se evaluó el comportamiento de los patógenos y de la flora asociada durante la germinación de estas semillas.

En las semillas inoculadas con el inóculo alto de *Salmonella* (10^7 Log UFC/g) el efecto de la mezcla 2 de microorganismos antagonistas, posterior a 4 horas de remojo en H₂O (0 horas) consistió en una reducción de 0,06 Log. El efecto de la mezcla 4 de microorganismos antagonistas sobre la concentración de *Salmonella enterica* posterior al remojo fue de una reducción en la concentración de 0.50 Log mientras que el control presentó un incremento en la concentración de aproximadamente 1 Log (Cuadro 13). El efecto de las mezclas 2 y 4 no afectó considerablemente la concentración de *Salmonella* debido a que esta se mantuvo constante a lo largo de la germinación (Figura 10 A).

Por otro lado, en las semillas inoculadas con un inóculo bajo de *Salmonella* (10^3 Log UFC/mL) se observó que las mezclas de microorganismos antagonistas posterior a las 4 horas de remojo (0 horas de germinación) tuvieron un efecto similar que al aplicarse con un nivel de inóculo alto (Cuadro 13). Sin embargo, a lo largo de la germinación se obtuvo una mayor reducción de la concentración de *Salmonella* con respecto al control, el cual presentó un aumento en la concentración con respecto al inóculo alto, esto debido a que al inocular una concentración elevada de *Salmonella* en la semilla no se obtiene un aumento en su concentración debido a la alta cantidad del inóculo del patógeno al cual ya no puede aumentar, comparado con el inóculo bajo en el cual todavía *Salmonella* aun es capaz de aumentar su concentración (Figura 10 B).

Ahora bien, en las semillas inoculadas con un inóculo alto de *Escherichia coli* O157 (10^7 Log UFC/mL) el efecto de la mezcla 3 de microorganismos antagonistas posterior a las 4 de remojo (0 horas) no afectó la concentración del patógeno, siendo efectiva el consorcio de microorganismos antagonistas, mientras que el control luego del remojo presentó un aumento en la concentración de 1.5 Log (Cuadro 14). Después de las 4 horas de remojo (0 horas de germinación), el

efecto de la mezcla 3 empezó a decaer, presentándose en la semilla inoculada con la mezcla 3 de microorganismos antagonistas y el patógeno una concentración muy similar a la del control a lo largo de la germinación (Figura 9 A).

Por otro lado, en las semillas inoculadas con un inóculo bajo de *Escherichia coli* O157 (10^3 Log UFC/mL) posterior a las cuatro horas de remojo en agua purificada estéril (0 horas de germinación) se observó que la mezcla 3 tuvo un efecto en la reducción de aproximadamente medio Log, mientras el control presento un incremento de aproximadamente 3 Log, esto es debido a que *E. coli* O157 tiene una mayor facilidad para desarrollarse en agua que *Salmonella* (Cuadro 14). La concentración del patógeno en semilla inoculada con la mezcla 3 de microorganismos antagonistas se logró controlar a lo largo de la germinación (Figura 9 B). Mientras que el control con inóculo bajo presento un mayor aumento que la semilla con un inóculo alto, esto debido a que al inocular una alta concentración de *E. coli* O157 está ya no es capaz de seguir desarrollándose en el medio debido a su alta concentración, caso contrario lo que ocurre al utilizar un inóculo bajo.

Cuadro 13. Efecto antagónico de las mezclas 2 y 4 contra *Salmonella* inoculada en niveles bajos (10^3 Log UFC/mL) y altos (10^7 Log UFC/mL) en semilla de alfalfa después de 4 horas de remojo.

Tratamiento	Inóculo alto (~7 Log UFC/g) ^{1,2}			Inóculo bajo (~3 Log UFC/g) ^{1,2}		
	Sin remojo	Con remojo	Aumento/reducción	Sin remojo	Con remojo	Aumento/reducción
Control	6.41 ± 0.48	7.25 ± 0.76	0.84	3.13 ± 0.33	4.67 ± 0.33	1.54
Mezcla 2**	6.31 ± 0.52	6.25 ± 0.51	-0.06	2.99 ± 0.23	3.09 ± 0.33	0.10
Mezcla 4 [‡]	6.48 ± 0.74	5.98 ± 0.33	-0.50	3.02 ± 0.41	3.46 ± 0.44	0.44

¹ Los valores son expresados como la media de las determinaciones de nueve repeticiones ± desviación estándar.

² Diferencias significativas entre valores en la misma columna están indicados por diferentes letras (P < 0.001).

* Mezcla de cepas antagonistas 9 y 18.

** Mezcla de cepas antagonistas 21 y 18.

† Mezcla de cepas antagonistas 18 y 51.

‡ Mezcla de cepas antagonistas 21 y 51.

NA: No aplica

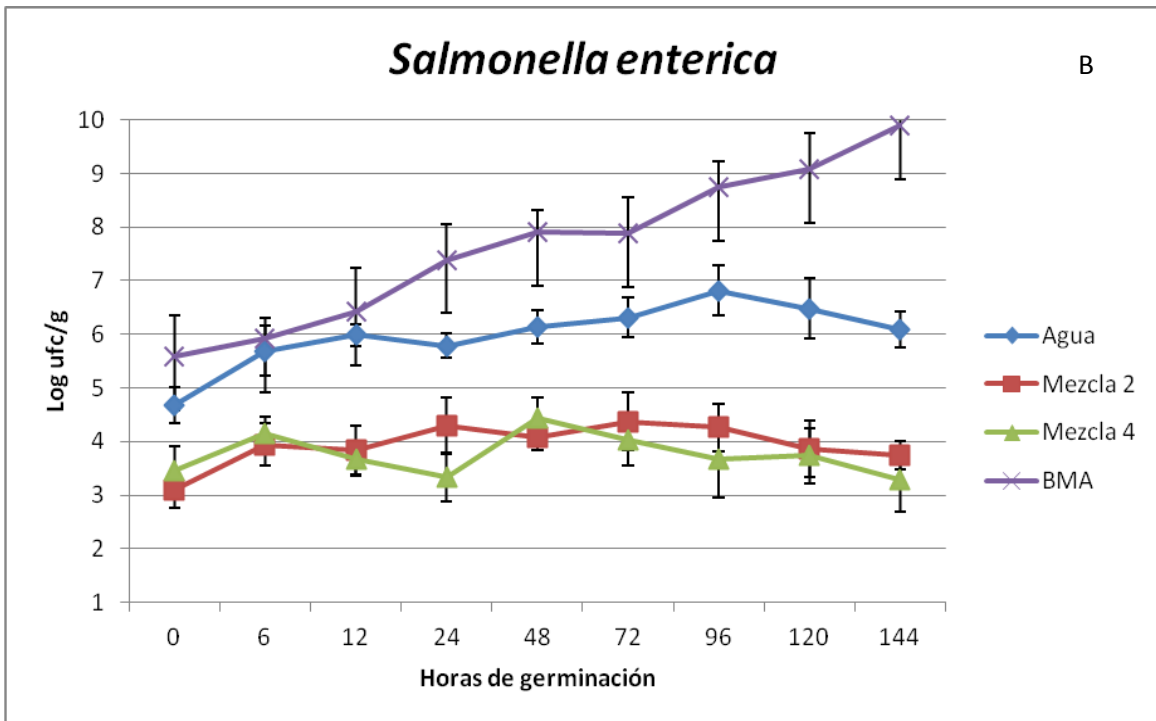
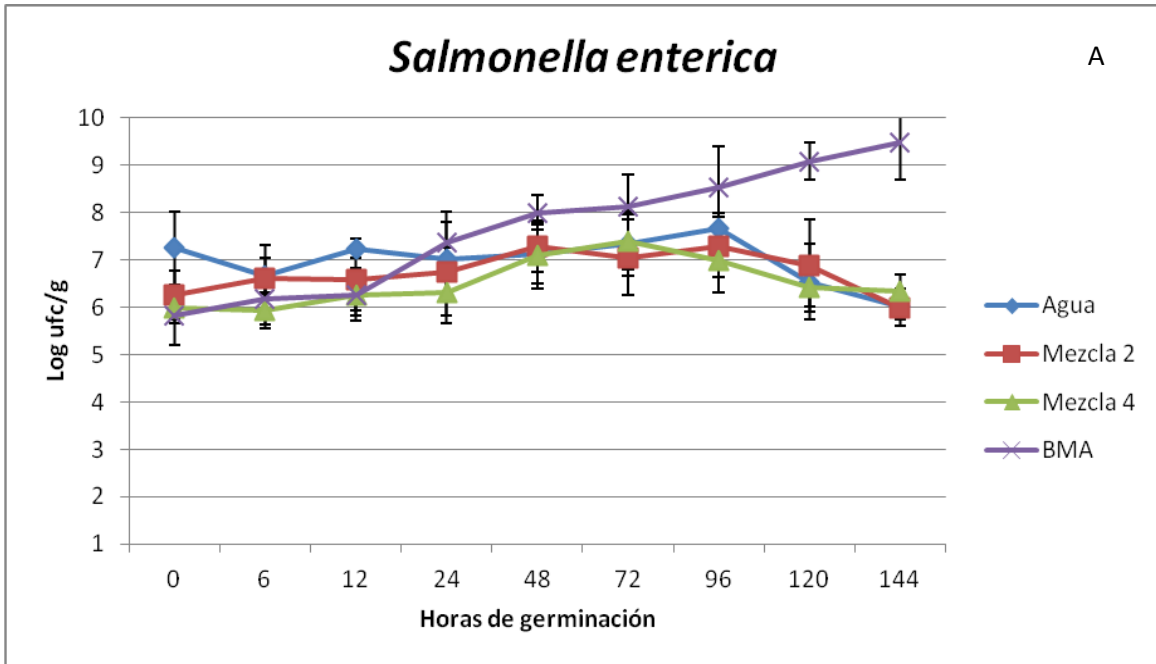


Figura 10. Crecimiento de *Salmonella* frente a mezclas de microorganismos antagonistas durante la germinación de alfalfa. A) Inóculo alto de *Salmonella* (10^7 Log UFC/g). B) Inóculo bajo de *Salmonella* (10^3 Log UFC/g).

Existen reportes que indican que hay un incremento significativo de *E. coli* O157 de 10^4 o 10^5 Log UFC/mL a 10^7 o 10^8 Log UFC/mL después de 96 horas de germinación, esto debido a la abundancia de nutrientes liberados a partir de las raíces del germinado (Warriner *et al.*, 2003). Diversos estudios han demostrado que exudados provenientes de semillas germinadas favorecen el crecimiento bacteriano (Andrews *et al.*, 1982; Joce *et al.*, 1990 y Hara-Kudo *et al.*, 1997).

Johnston *et al.* (2009) y Fett (2005), encontraron una mayor de reducción de *Salmonella* y *E. coli* O157 en lechuga y espinaca comparado con lo encontrado en este estudio. Esto puede deberse a que los microorganismos antagonistas se aislaron de la flora nativa presente en estos alimentos. Lo que hace suponer que el efecto antagónico pudiera deberse a la acción conjunta de la flora nativa con las mezclas, que de las mezclas *per se*.

La flora nativa de los germinados puede provenir de la semilla estando albergada en el interior o en la superficie de esta e incrementar su número durante la germinación condicionado por: temperatura, humedad, etc., que ahí prevalecen (Ponka *et al.*, 1995). En la literatura se consigna que tanto las *Enterobacteriaceae* como *Pseudomonas* son los principales microorganismos nativos en varios tipos de germinado (Becker y Holzapfel, 1997). Existen reportes que indican que hay un incremento significativo después del 2° día de germinación (3 a 5 Log UFC/g) (Castro y Escartín, 2000). Las semillas secas contienen entre 10^3 y 10^5 de flora nativa por gramo, la cual rápidamente se multiplica durante la producción del germinado, y las semillas germinadas pueden contener entre 10^8 y 10^9 de flora nativa por gramo hasta su consumo. Esta alta población de flora nativa puede limitar el crecimiento de bacterias patógenas a través de competencia, durante la germinación y el subsecuente almacenaje de los germinados (EFSA, 2011).

El germinado se trata de un producto por naturaleza con alto contenido microbiano que no afecta necesariamente su frescura. Aparentemente los microorganismos desarrollan muy activamente en el germinado y alcanzan una

población con un máximo que ya no se modifica ostensiblemente a lo largo del proceso de germinación.

Resultó importante conocer la dinámica de los microorganismos mencionados durante la germinación porque permitió observar las condiciones del ambiente a las que se enfrentarían los patógenos inoculados.

Cuadro 14. Efecto antagónico de la mezcla 3 contra dos niveles de inóculo de *E. coli* O157 (10^7 Log UFC/mL) y (10^3 Log UFC/mL) en semilla de alfalfa después de 4 horas de remojo.

Tratamiento	Inóculo alto (~7 log UFC/g) ^{1,2}			Inóculo bajo (~3 log UFC/g) ^{1,2}		
	Sin remojo	Con remojo	Aumento/reducción	Sin remojo	Con remojo	Aumento/reducción
Control	6.31 ± 0.55	7.82 ± 0.29	1.51	3.03 ± 0.54	5.76 ± 0.26	2.73
Mezcla 3 [†]	6.48 ± 0.47	6.67 ± 0.74	0.19	3.03 ± 0.28	3.50 ± 0.59	0.47

¹ Los valores son expresados como la media de las determinaciones de nueve repeticiones ± desviación estándar.

² Diferencias significativas entre valores en la misma columna están indicados por diferentes letras (P < 0.001).

* Mezcla de cepas antagonistas 9 y 18.

** Mezcla de cepas antagonistas 21 y 18.

[†] Mezcla de cepas antagonistas 18 y 51.

[‡] Mezcla de cepas antagonistas 21 y 51.

NA: No aplica

V.4. Determinación de los mecanismos de antagonismo

En contraste con lo que ocurre con la mayoría de los compuestos utilizados como antimicrobianos químicos, no se comprenden por completo los complejos modos de acción de los microorganismos, incluyendo a la mayoría de los agentes de control biológico. Son, regularmente, más difíciles de manejar y aplicar que los antimicrobianos químicos comunes, especialmente cuando es necesaria la conjunción de varios factores para que sean eficaces o ecológicamente competentes. Sin embargo, la complejidad de los modos de acción de muchos agentes de control biológico representa una ventaja sobre los productos químicos, pues el patógeno tendrá mayor dificultad para desarrollar resistencia hacia ellos.

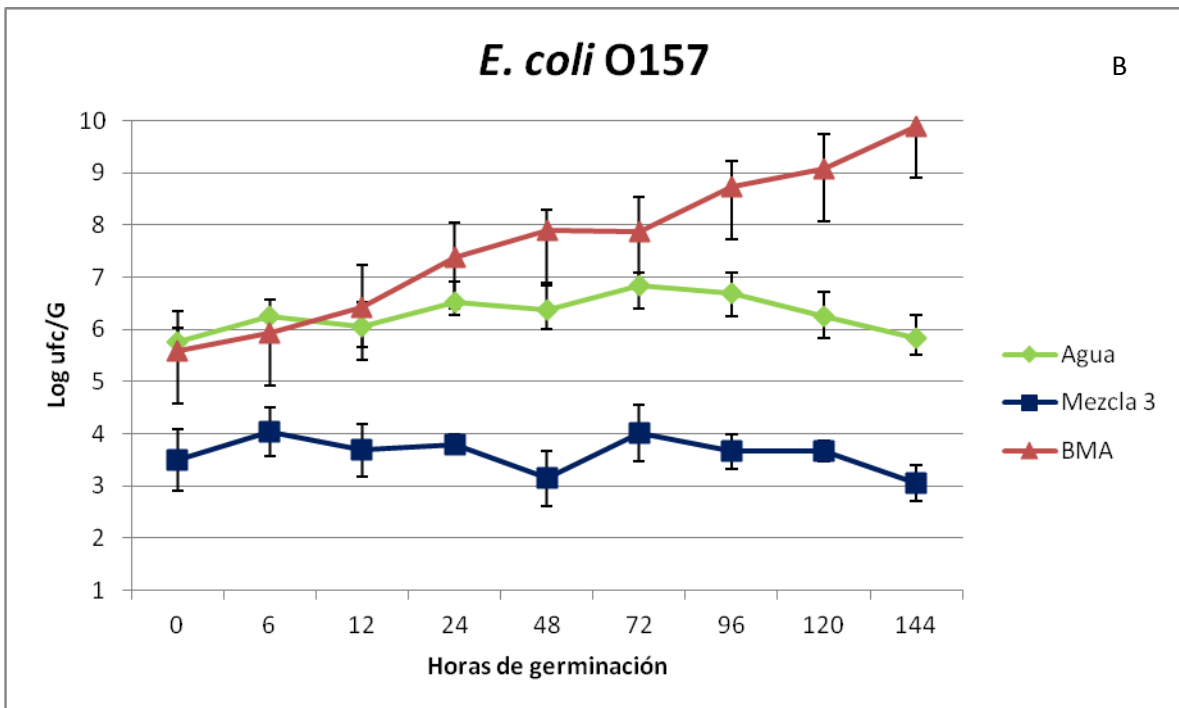
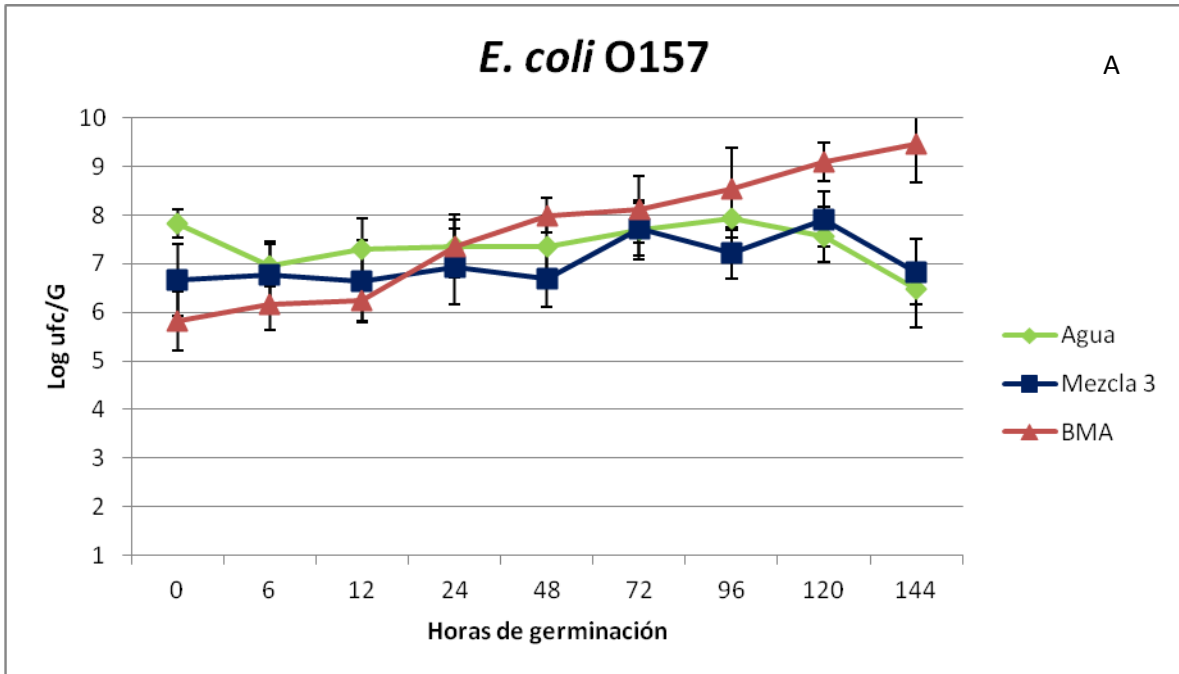


Figura 11. Crecimiento de *E. coli* O157 frente a mezclas de microorganismos antagonistas durante la germinación de alfalfa. A) Inóculo alto de *E. coli* O157 (10^7 Log UFC/mL). B) Inóculo bajo de *E. coli* O157 (10^3 Log UFC/mL).

Aunque en algunos casos se cuenta con un conocimiento amplio del modo de acción, no es así para la mayoría de los agentes de control biológico. Esto es debido, en parte, a que es raro que sólo un mecanismo antagonista sea responsable del control o supresión del patógeno. Un agente de control biológico eficaz cuenta, generalmente, con varios mecanismos antagonistas que actúan de manera conjunta para controlar al patógeno. En nuestro estudio se buscó la presencia de (ácido cianhídrico) y la producción de sideróforos como posibles mecanismos de acción de las cuatro cepas antagonistas.

Por un lado, en cuanto a la producción de sideróforos (Cuadro 15) se puede observar que las cuatro cepas los produjeron, lo cual concuerda con lo reportado por Alexander y Zuberer (1991). Esto puede deberse a que la cantidad y el tipo de sideróforo producido por un organismo depende de la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos presentes en el medio.

Por otra parte, se observó una baja producción de HCN (Cuadro 16) comparado con lo encontrado con Devi *et al.* (2006), lo que pudiera contribuir a que el efecto antagónico de estos microorganismos antagonistas no fuera el suficiente para controlar estos patógenos. Si la producción de HCN hubiera sido alta como la de sideróforos, entonces el efecto antagónico de estos microorganismos hubiera sido mayor.

Cuadro 15. Producción *in vitro* de sideróforos producidos por bacterias antagonistas aisladas de suelo de cultivo orgánico.

Cepa antagonista	Sideróforo (μM equi. DFOM) ^a
Control	0.001
9	44.55
18	55.84
21	55.53
51	57.85

^a Equiv. DFOM, equivalente de mesilato deferroxamina

Cuadro 16. Producción cuantitativa de HCN por cepas antagonistas.

Cepa antagonista	Concentración HCN (mM/mL)
Control	0.0055
9	0.7193 ± 0.37
18	0.9771 ± 0.37
21	0.72 96 ± 0.28
51	0.8115 ± 0.32

Los valores representan la media de tres réplicas ± la desviación estándar.

VI. CONCLUSIONES

1. Cinco cepas de microorganismos antagonistas seleccionados mostraron efecto inhibitorio de los patógenos durante los ensayos *in vitro*.
2. La utilización de mezclas de microorganismos antagonistas no afecta el índice de germinación del germinado de alfalfa.
3. Las mezclas (2 y 4) y (3) de microorganismos antagonistas reducen la concentración de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157 en el germinado de alfalfa 1.5 y 2.5 Log, respectivamente, luego de las cuatro horas de remojo.
4. Las mezclas de microorganismos antagonistas logran controlar el desarrollo de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157 durante la germinación.
5. La inoculación de las mezclas de microorganismos antagonistas en la semilla ante un nivel de inóculo bajo de los patógenos, resultó ser más efectiva que ante un nivel de inóculo alto, al controlar el desarrollo de los patógenos durante la germinación.
6. Entre los diversos mecanismos de antagonismo que pudieran ejercer estas bacterias antagonistas están la competencia por espacio o nutrientes, la producción de sideróforos o la antibiosis o producción de antibióticos.
7. No se observó una relación franca entre la actividad antagónica contra *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* O157 demostrada por cepas bacterianas aisladas de fuentes muestreadas en los ensayos *in vitro*, y en el germinado de alfalfa.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aciego J. Efecto rizosfera del cultivo de maíz sobre algunas poblaciones microbianas y características químicas de un suelo tropical. *Rev Venesuelos*. 2006; 6:39-45.
- Alexander BA, Zuberer DA. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Department of Soil and Crop Sciences, Texas A&M University, Texas Agricultural Experiment Station, TX 77843, USA 1991.
- Andrews W, Wilson P, Poelma P, Mislivec. Bacteriological survey of sixty health foods. *Appl Environ Microbiol*. 1979; 37:559-566.
- Andrews WH, Mislivec PB, Wilson CR, Bruce VR, Poelma PL, Gibson R, Trucksess MW, Young K. Microbial hazards associated with bean sprouting. *J Assoc Off Anal Chem*. 1982; 65:241-248.
- Bari M, Al-Haq M, Kawasaki T, Nakumana S, Isshiki. Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on ready to eat radish and mung bean sprouts. *J Food Prot*. 2003; 66:767-774.
- Becker B, Holzapfel H. Microbiological risk of prepacked sprouts and measures to reduce total counts. *Arch Lebensm hyg*. 1997; 48:81-84.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. (2004). Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
- Beuchat L. Pathogenic microorganism associated with fresh produce. *J Food Prot*. 1996; 59:204-216.

- Beuchat LR, Scouten AJ. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 92:668-674.
- Breidt F, Fleming H. Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol*. 1997; 51:44-49.
- Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. En línea. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP- 2003-0121-01-RV. 2003.
- CDC. Foodborne illness-Adding Fresh Fruits and Vegetables to the Equation (13 de mayo de 2000). Recuperado el 20 de Octubre de 2011, de Throughout the Food System: <http://foddsafety.psu.edu>.
- Campbell R. Biological control of Microbial Plant pathogens. Cambridge University Press. EE.UU., 2003.
- Carcaño MG, Ferrera R, Pérez J, Molina JD, Bashan Y. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de Azospirillum y Klebsiella aisladas de maíz y teocintle. *TERRA Latinoamericana*. 2006; 24(4):493-502.
- Castro J, Escartín E. (2000). Survival and growth of *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella typhi* y *E. coli* O157:H7 in alfalfa sprouts. *J Food Sci*. 2000; 65:162-165.
- Charkowski A, Sarreal Z, Mandrell. Wrinkled alfalfa seeds harbor more aerobic and are more difficult to sanitize than smooth seeds. *J Food Prot*. 2001; 64:1292-1298.

- Charkowski AO, Barak JD, Mnadrell RE. Differences in Growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* 0157:H7 on Alfalfa sprouts. Department of plant Pathology, University of Wisconsin-Madison. *Appl. Environ Microbiol.* 2002; 34:3114-3120.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science.* 1993; 262:1883-1886.
- Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 1989; 43(1):164-193.
- Danovaro R, Luna GM, Dell'Anno A, Pietrangeli B, Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 34:345-359.
- Devi KK, Seth N, Kothamasi S, Kothamasi D. Hydrogen Cyanide-Producing Rhizobacteria Kill Subterranean Termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by Cyanide Poisoning Under *In vitro* conditions. Laboratory of Soil Biology and Microbial Ecology, Centre for Environmental Management of Degraded Ecosystems, University of Delhi, Delhi 110007, India, 2006.
- Durrant WE, Dong X. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 2004; 42:185-209.
- Enomoto K, Ishikawa N, Suzuki T. Hot-water treatments for disinfecting alfalfa seeds inoculated with *Escherichia coli* ATCC 25922. *Food Sci Technol Res.* 2002; 8:247-251.

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italia, 2011.

FDA. Seeds for sprouting Prior to Food Use, i.e., Dried Mung, Beans, Alfalfa seeds, etc. *Complice guide*, 1989. Recuperado el 20 de febrero de 2011, de http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg555-750.html.

FDA. Guidance for industry: reducing microbial food safety hazard for sprouted seeds and guidance for industry: sampling and microbial testing of spent irrigation water during sprout production (15 de Septiembre de 1999). Recuperado el 20 de enero de 2012, de <http://www.cfsan.fda.gov/dms/prodguid.html>.

Fernández O, Vega L. Avances en el fomento de productos fitosanitarios No-sintéticos. *Manejo integrado de plagas*. 2000; 62:96-100.

Fett W. Reduction of the native microflora on alfalfa sprouts during propagation by addition of antimicrobial compounds to the irrigation water. *J Food Microbiol*. 2002; 72:13-18.

Fosberg G. Control of cereal seed-borne diseases by hot humid air seed treatment. Tesis de doctorado. Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, Sweden, 2004.

Fransisca L, Park HK, Feng H. *E. coli* O157:H7 Population reduction from alfalfa seeds with malic acid and thiamine dilauryl sulfate and quality evaluation of the resulting sprouts. *Journal of Food Science*. 2012; 77(2):M121-M126.

Fu TJ, Reineke KF, Chirtel S, VanPelt OM. Factors influencing the growth of Salmonella during sprouting of naturally contaminated alfalfa seeds. *J Food Prot*. 2008; 71:888-896.

- Gandhi M, Matthews R. Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa seeds and sprouts to eliminate *Salmonella*. *Int J Food Microbiol.* 2003; 87:301-306.
- Gill CJ, Keene WE, Mohle-Boetani JC, Farrar JA, Waller PL, Hahn CG, Cieslak PR. Alfalfa seed decontamination in a *Salmonella* outbreak. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:474-479.
- Glick BR, Bashan Y. Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol Adv.* 1997; 15:353-378.
- Goodridge LD. Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? *Trends Biotechnol.* 2004; 22:384-385.
- Greer GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot.* 2005; 68:1102-1111.
- Ha SD, Ricke SC, Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR. Serine utilization as a potential competition mechanism between *Salmonella typhimurium* and a chicken cecal bacterium. *J Food Prot.* 1994; 57:1074-1079.
- Hammerschmid, R, Smith R. A survey of plant defense responses to pathogens. In. *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture.* 2000; pp. 55-71.
- Hara-Kudo Y, Konuma H, Iwaki M, Kasuga F, Sugita-Konishi Y, Ito Y, Kumagai S. Potential hazard of sprouts as a vehicle of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* 1997; 60:1125-1127.
- Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum* spp. *Phytopatology.* 2006; 96:190-194.

- Herrera J, Alizaga R, Guevara E. Germinación y crecimiento de la planta. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales, Vol. 4. Editorial UCR, Costa Rica. 2005.
- Holliday SL, Scouten AJ, Beuchat LR. Efficacy of chemical treatments in eliminating *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on scarified and polished alfalfa seeds. *J Food Prot.* 2001; 64:1489-1495.
- Honish L, Nguyen Q. Outbreak of *Salmonella enteritidis* Phage type 913 gastroenteritis associated with mung bean sprouts. Edmonton Canada Communicable Disease Report 27, 2001.
- Howell CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts of plant disease. *The American Phytopathological Society.* 2003; 87:4-10.
- Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G. Bacteriophages as biocontrol agentes in food. *J Food Prot.* 2005; 68:246-247.
- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a Hongos Fitopatógenos. Dpto. Fitopatología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). 2009; 24(1):14-21.
- Ingham S, Losinski J, Andrews M. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden scale studies. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:6420-6427.
- Supply, IS, (15 de Mayo de 1999). *Sprout net.* Recuperado el 20 de febrero de 2011, de <http://www.sproutnet.com/sprouts.htm>.

- Jaquette C, Beuchat L, Mahon B. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella* Stanley inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:2212-2215.
- Joce R, Sullivan DG, Strong C, Rowe B, Hall MLM, Threlfall EJ. A national outbreak of *Salmonella* Gold-Coast. *Commun Dis Rep.* 1990; 4:3-4.
- Kim H, Hung C, Brackett, Lin C. Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *J Food Prot.* 2002; 56:211-236.
- Kim WJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservatives. *Food Rev Int.* 1993; 9:299-313.
- Lamg M, Ingham H, Ingham C. Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *Int J Food Microbiol.* 2000; 58:73-82.
- Lecuona RE. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. M. Mas, Buenos Aires. 1996; pp. 143-150.
- Lemanceau P, Bakker PAHM, Raaijmakers JM, Bloemberg G, Höfte M, Cooke BM (eds). *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research.* Springer-Verlag New York, EE.UU., 2008. 126 pp.
- Liu B, Schaffner DW. Quantitative analysis of the growth of *Salmonella* Stanley during alfalfa sprouting and evaluation of *Enterobacter aerogenes* as its surrogate. *J Food Prot.* 2007; 70:316-322.

- Maheshwari DK, Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Berlin, 2011. pp. 41-76.
- Malik MA, Williams RD. Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. In: Zeng RS, Malik AU, Luo SM, editors *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry*. New York: Springer. 2008; 321-345.
- Mateos JL, Lucas-García JA, Colón-Flores JJ, Ruiz-Palomino M, Gutiérrez-Mañero FJ. Efecto de la inoculación con PGPRs sobre el crecimiento de distintas variedades de plántulas de tomate y pimiento. Universidad San Pablo CEU, Fac. CC. Exp. y Técnicas. Dpto Biología. Sección Biología Vegetal. 1994.
- Matos A, Garland JL. Effects of community versus single strain inoculants on the biocontrol of *Salmonella* and microbial community dynamics in alfalfa sprouts. *J Food Prot.* 2005; 68:40-48.
- Maude R, Sharma R, Demiel A, Ziegler R. *Seedborne diseases and Their control: principles practice*. CAB International, Wallingford, Oxford, United Kingdom, 1996.
- Medeiros-Caires NC, Magalhaes-Matos A, Macedo-Farias L, Roque-Carvalho M, Nardi-Drummond RM, Nicoli-Robert J, Ribeiro-Sobrinho AP. Partial characterization of antagonistic substance produced by a *Clostridium butyricum* strain. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38:265-269.
- Moline H, Kulik M. Contamination and deterioration of alfalfa sprouts caused by a seedborne isolate of *Erwinia herbicola*. *J Food Qual.* 1997; 20:53-60.

- Montville R, Schaffner D. Monte Carlo simulation of pathogen behaviour during the sprout production process. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:746–753.
- Muller S. Título. University of California, Davis. U.S. Cooperative Extension Service. Personal communication. 1999.
- Mundt J, Hinkle F. Bacteria within ovules and seeds. *Appl Environ Microbiol.* 1976; 32:694-698.
- Nandiwada L, Schamberger H, Schafer W, Diez-González F. Characterization of a novel E2-type colicin and its application to treat alfalfa seeds to reduce *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* 2004; 93:267-279.
- Nisbet D. Defined competitive exclusive cultures in the prevention of enteropathogenic colonization in poultry and swine. *Antonie Leewenhoek.* 2002; 81:841-846.
- O'Mahony M, Cowden J, Smyth B. An outbreak of *Salmonella* saint-paul infection associated with bean sprouts. *Epidemiol Infect.* 1990; 104:229-235.
- Ogata K, Arellano C, Zúñiga D. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizosfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. Lima, Perú. 2008; 12(1):137-153.
- Palmai M, Buchanan L. Growth of *Listeria monocytogenes* during germination of alfalfa sprouts. *Food Microbiol.* 2002; 19:195-200.
- Palmai M, Buchanan L. The effect of *Lactococcus lactis* on the growth characteristic of *Listeria monocytogenes* in alfalfa sprout broth. *Acta Aliment.* 2002; 31:379-392.

- Patterson JE, Woodburn MJ. *Klebsiella* and other bacteria on alfalfa and bean sprouts at the retail level. *J Food Sci.* 1980; 45:492-495.
- Piernas V, Guirad P. Microbial hazards related to rice sprouting. *Int J Food Sci Technol.* 1997; 32:297-305.
- Pitchford P. Sanando con alimentos integrales, Tradiciones asiáticas y nutrición moderna. EE.UU, 2007. pp. 629-631.
- Pönkä A, Siitonen Y, Jong B, Kuhmonen, Pakkala P. *Salmonella* in alfalfa sprouts. *Lancet.* 1995; 345:462-463.
- Primavera K, Davidson M. Laboratorio nacional de Alto campo Magnético. 2010.
- Prokopowich D, Blank G. Microbiological evaluation of vegetable sprouts and seeds. *J Food Prot.* 1991; 54:560-562.
- Ragazzo-Sánchez JA, Robles-Cabrera A, Lomelí-González L, Luna-Solano G, Calderón-Santoyo M. Selección de cepas de *Bacillus spp.* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. Laboratorio integral de Investigación en Alimentos (LIIA). Instituto tecnológico de Orizaba. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 2011; 17(Especial 1):5-11.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasan V, Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection.* 2001; 20:1-11.
- Riveros-Angarita AS, Inducción de Resistencia en Plantas. Interacción: Planta-Patógeno. Universidad del Tolima Ibagué, Tolima Colombia. 2010.

- Sangronis E, Machado C. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *Lebensm-wis. Technol.* 2007; 40:116-120.
- Saroj S, Sachin H, Shashidar R. Radiation processing for elimination of *Salmonella* Typhimurium from inoculated seeds used for sprout making in India and effect of irradiation on germination of seeds. *J Food Prot.* 2007; 70:1961-1965.
- Schillinger U, Geisen R, Holzapfel WH. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology.* 1996; 7:23-29.
- Scholler N, Ingham S, Ingham B. Assessment of the potential for *Listeria monocytogenes* survival and growth during alfalfa sprouts production and use of ionizing radiation as a potential intervention treatment. *J Food Prot.* 2002; 65:1259-1266.
- Schuenzel KM, Harrison MA. Microbial Antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection.* 2002; 65(12):1909–1915.
- Scouten A, Beuchat L. Combined effects of chemical, heat and ultra-sound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Appl Microbiol.* 2002; 92:668-674.
- Sharma RR, Singh D, Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control.* 2009; 50: 205–221.

- Sharma RR, Demirci A. Inactivation of *E. coli* O157:H7 on alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light. *J Food Science*. 2003; 68:1448-1453.
- Singh N, Bhunia K. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. *LWT Food Sci. Technol.* 2003; 36:235-243.
- Slabbert E, Heerden CJ, Jacobs K. Optimization of automated ribosomal intergenic spacer analysis for the estimation of microbial diversity in fynbos soil. Department of Microbiology, Stellenbosch University, South Africa, 2010.
- Taormina P, Beuchat L. Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatment with various chemicals. *J Food Protect.* 2002; 62:850-6.
- Taormina P, Beuchat L, Slutskert. Infections Associated with eating seed Sprouts: an international concern. University of Georgia, Griffin, Georgia, USA. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. 1999; 5(5).
- Todar K. Online textbook of bacteriology. Recuperado el 12 de abril de 2013, de <http://textbookofbacteriology.net/>.
- Tortora, Funke y Case. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana. 9ª Edición. Madrid, 2007. pp. 561-562.
- Tortorello M, Stewart K, Reineke K, Ulaszek M. Detection of *Salmonella* in alfalfa sprout spent irrigation water by immunoassays. *Food and Drug Administration laboratory information bulletin*. 2000; 23:4214.

USDA, 2005).

Volpon L, Besson F, Lancelin JM. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS Letters* 2000; 485:76-80.

Warriner K, Spaniolas S, Dickinson M, Wright C, Waites WM. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *J Appl Microbiol.* 2003; 95:719–727.

Weiss A, Hammes W. Efficacy of heat treatment in the reduction of salmonellae and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa, mung bean and radish seeds used for sprout production. *Eur Food Res Technology.* 2005; 78:424-430.

Weissinger WR, Beuchat LR. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate *Salmonella* on alfalfa seeds. *J Food Prot.* 2000; 63:1475–1482.

Winthrop KL, Palumbo MS, Farrar JA, Mohle-Boetani JC, Abbott S, Beatty ME, Inami G, Werner SB. Alfalfa sprouts and *Salmonella* Kottbus infection: a multistate outbreak following inadequate seed disinfection with heat and chlorine. *J Food Prot.* 2003; 66:13–17.

Wood BJB, Holzapfel WH. *The genera of lactic acid bacteria.* Washington, D.C.: *Blackie Academic & Professional.* 1995; 2:1-12.

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

Ye J, Kostrzynska M, Dunfield K, Warriner K. Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. *J Food Prot.* 2010; 73(1):9-17.