



ORIGINAL

***Gluconobacter* spp. y *Paenibacillus polymyxa* causan pudrición en zanahorias comerciales aparentemente sanas**



Thelma J. Parra-Aguilar, María de Jesús Yáñez-Morales,
Alejandra Almaraz-Sánchez, Alfonsina Judith Hernández y Sergio Aranda-Ocampo  *

Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mexico

Recibido el 10 de septiembre de 2024; aceptado el 19 de diciembre de 2024

Disponible en Internet el 15 de febrero de 2025

PALABRAS CLAVE

Pudrición suave;
Zanahorias baby;
Zanahorias a granel;
Almacenamiento;
Gluconobacter spp.;
*Paenibacillus
polymyxa*

Resumen Las enfermedades de poscosecha en zanahoria son uno de los principales problemas durante su almacenamiento, afectan la vida de anaquel y ocasionan pérdidas económicas considerables. En este estudio se analiza la pudrición bacteriana en 10 muestras de zanahorias comerciales aparentemente sanas adquiridas en supermercados y mercados locales de Texcoco, Estado de México, México. Las zanahorias de 7 muestras desarrollaron pudrición bacteriana a los 5 días de incubación en cámara húmeda a 28 °C, y las zanahorias baby (industrializadas) mostraron la descomposición más grave. De las zanahorias con síntomas de pudrición se aislaron 23 cepas bacterianas. Para identificar y caracterizar a los agentes causales de la pudrición, las cepas se inocularon en zanahorias sanas en ensayos de laboratorio. De las 23 cepas analizadas, 8 causaron pudrición en el tejido de zanahoria. La caracterización bioquímica y molecular por secuenciación del gen 16S del ARNr identificó a estas 8 cepas como *Gluconobacter cerinus* (cepas 1032.2, 1059 y 1070.1), *Gluconobacter kondonii* (1027.1), *Gluconobacter wancherniae* (1033.1) y *Paenibacillus polymyxa* (cepas 1074.2, 1076 y 1077). Estas bacterias mostraron virulencia en otras pruebas de patogenidad vegetal; las cepas del género *Gluconobacter* indujeron reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco y las cepas de *P. polymyxa* mostraron actividad pectinolítica en tubérculo de papa. Esta investigación reporta por primera vez a *G. cerinus*, *G. kondonii*, *G. wancherniae* y *P. polymyxa* como agentes causales de pudrición en zanahorias comerciales.

© 2025 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la CC BY-NC-ND licencia (<http://creativecommons.org/licencias/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: arandasergio63@gmail.com (S. Aranda-Ocampo).

KEYWORDS

Soft rot;
Baby carrots;
Bulk carrots;
Storage;
Gluconobacter spp.;
Paenibacillus
polymyxa

***Gluconobacter* spp. and *Paenibacillus polymyxa* cause spoilage in apparently healthy commercial carrots**

Abstract Postharvest diseases of carrots are one of the most important concerns in carrot storage, as they affect the shelf life of carrots and cause significant financial losses. In this study, ten commercial carrot samples from supermarkets and local markets in Texcoco, State of Mexico, Mexico, were analyzed for bacterial spoilage after incubation at 28 °C in a humidity chamber. Carrots from seven samples developed bacterial spoilage after five days of incubation, of which baby carrots (industrially processed) showed the most severe rot. Twenty-three bacterial strains were isolated from the tissues of spoiled carrots. To identify and characterize the spoilage pathogens, the isolated strains were inoculated into healthy carrots in laboratory tests. Of the 23 strains analyzed, eight caused carrot tissue spoilage. Biochemical and molecular characterization by 16S ribosomal RNA gene sequencing identified *Gluconobacter cerinus* (1032.2, 1059 and 1070.1), *G. kondonii* (1027.1), *G. wancherniae* (1033.1) and *Paenibacillus polymyxa* (1074.2, 1076 and 1077) as the causal agents of the carrot rot evaluated in this study. In addition, these bacteria showed virulence in other plant pathogenicity tests; *Gluconobacter* strains induced a hypersensitivity reaction in tobacco leaves and *Paenibacillus* strains showed pectolytic activity in potato tubers. This study is the first to report *G. cerinus*, *G. kondonii*, *G. wancherniae* and *P. polymyxa* as causal agents of commercial carrot rot.

© 2025 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La zanahoria (*Daucus carota* L.), familia *Apiaceae*, es una de las hortalizas con mayor demanda comercial. Como parte de la dieta humana, se considera una fuente importante de hidratos de carbono, fibra, antioxidantes y carotenoides. Además, contribuye a la prevención de procesos degenerativos, como la arteriosclerosis, las cataratas y la enfermedad de Alzheimer, incluso reduce el riesgo de sufrir algunos tipos de cáncer³⁶. En México, la zanahoria ocupa el sexto lugar entre las hortalizas con mayor producción (355.441 t); el primer estado productor es Guanajuato (91,376 t), seguido de Puebla (88,902 t), Zacatecas (72,692 t) y Estado de México (26,692 t)²⁸. Las mayores pérdidas económicas en la producción de zanahoria ocurren durante el proceso de almacenamiento, transporte y comercialización. Se consigna que uno de los problemas más importantes del almacenamiento de zanahoria a largo plazo son las pudriciones ocasionadas por bacterias u hongos, las que disminuyen los estándares de calidad y causan pérdidas económicas considerables^{16,34}.

Las especies bacterianas reportadas con mayor frecuencia como causantes de pudrición blanda en zanahorias, antes y después de la cosecha, son *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas viridiflava*¹⁴. En el caso de los géneros *Dickeya* y *Pectobacterium*, suelen causar pérdidas importantes a temperatura ambiente tanto en el campo como en el almacenamiento^{8,14}. Las pudriciones blandas de zanahoria en poscosecha se han atribuido al manejo inadecuado de plagas en los cultivos y a las heridas en las raíces, ocasionadas por los daños mecánicos durante la eliminación de hojas, el lavado y el transporte de esta hortaliza, lo cual aumenta la propensión a la infección y al desarrollo de microorganismos patógenos³⁴.

Por lo expuesto, se hipotetiza que las zanahorias comerciales están contaminadas por bacterias que afectan la calidad sanitaria de esta hortaliza. El objetivo del presente estudio fue evaluar la sanidad de las zanahorias que adquiere el consumidor en supermercados y mercados locales de Texcoco (Estado de México, México), así como identificar y caracterizar a aquellos agentes que causan pudrición en zanahorias aparentemente sanas.

Materiales y métodos**Muestreo de zanahorias comerciales sanas**

Entre abril y septiembre de 2023 se realizaron seis muestreos. Estas zanahorias constituyeron 10 muestras, identificadas como OZ1 a OZ10 (tabla 1). Las muestras consistieron en zanahorias baby con empaque comercial y zanahorias estándar (variedad Nantes) con empaque o a granel. Los empaques comerciales fueron bolsas de polietileno selladas sin perforaciones, mientras que las zanahorias sin empaque se encontraban a granel, totalmente expuestas al consumidor. En los supermercados, las zanahorias se muestrearon de anaqueles con temperatura de 18-20 °C, mientras que en los mercados locales, las muestras estaban a temperatura ambiente (~25 °C).

Desarrollo de síntomas

Para determinar la sanidad de las zanahorias a través de la inducción de síntomas, se tomaron 14 piezas de cada muestra, se colocaron en cámaras húmedas estériles y se incubaron a temperatura ambiente (~25 °C) durante 5 días.

Tabla 1 Calidad fitosanitaria de zanahorias comerciales en Texcoco, México

No. de muestra	Origen comercial		Síntomas de pudrición bacteriana	Incidencia de pudrición (%)	ID de agente causal	No. de cepas bacterianas aisladas
	Empaque/país	Mercado				
OZ1	Empaque I* / EE.UU.	Supermercado A	+	100	1027.1, 1033.1, 1076, 1077	5
OZ2	Empaque II* / MEX		+	100	1032.2	2
OZ3	Empaque III* / MEX		+	50	1074.2	3
OZ4	A granel** / MEX		+	20	1070.1	5
OZ5	Empaque IV** / CAN-MEX	Supermercado B	—	—	—	0
OZ6	A granel** / MEX		—	—	—	0
OZ7	A granel** / MEX	Mercado local C	+	33 ^a	1059	3
OZ8	A granel** / MEX	Mercado local D	—	—	—	0
OZ9	A granel** / MEX	Supermercado E	+	57 ^a	—	3
OZ10	A granel** / MEX	Mercado local F	+	33 ^a	—	2
Total de aislamientos				8	23	

OZ: origen de muestra; CAN: Canadá; EE.UU.: Estados Unidos de América; MEX: México.

* zanahorias baby;

** zanahorias estándar;

^a manchas húmedas.

Aislamiento de bacterias

Después de la incubación de las zanahorias, del tejido con síntomas de pudrición se tomó exudado bacteriano con un asa bacteriológica estéril y se sembró directamente en placas con medio papa-dextrosa-agar (PDA) (BD Difco™, Francia) y en placas con agar nutritivo (BD Bioxon, México). Del crecimiento bacteriano, las colonias se reaislaron y purificaron (por estriado de una sola colonia) en placas con medio B-King. Las cepas aisladas se preservaron a -70°C en caldo nutritivo (BD Bioxon, México) y glicerol al 20% (vol/vol) y se depositaron en la colección del Colegio de Postgraduados.

Pruebas de patogenicidad

Para determinar cuáles cepas bacterianas eran los agentes causales de la pudrición, cinco raíces de zanahorias estándar (variedad Nantes) visiblemente sanas se lavaron con agua corriente, se desinfectaron con etanol (70%) por 1 min y después con hipoclorito de sodio (0,5%) por 5 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron al aire en una campana de flujo laminar^{14,22}. De acuerdo con las pruebas de patogenicidad bacteriana establecidas y reportadas en zanahoria^{14,22}, se siguieron los siguientes procedimientos. 1) En un primer ensayo, las zanahorias desinfectadas se cortaron en rodajas de 5 mm de grosor con un cuchillo estéril y se colocaron en cámaras húmedas estériles (placas de Petri con papel absorbente y agua destilada estéril)^{14,22}, tras lo cual las cepas individuales ($n=23$) se inocularon en el centro de las rodajas empleando $50\ \mu\text{l}$ de una suspensión celular a una concentración de 3×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, según la escala de turbidez de McFarland^{18,21}. 2) En un segundo ensayo, cinco zanahorias sanas se desinfectaron por el método previamente descrito; a continuación,

las mismas 23 cepas se inocularon sobre la superficie de las zanahorias enteras, sin heridas, con el mismo volumen y título bacteriano ($50\ \mu\text{l}$, 3×10^8 UFC/ml). Los controles negativos se prepararon aplicando $50\ \mu\text{l}$ de agua destilada estéril en lugar de inóculo. Las zanahorias de ambos ensayos se incubaron en cámaras húmedas estériles a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se evaluaron a las 24 y 48 h después de la inoculación. Para cada ensayo se realizaron tres repeticiones.

Caracterización fisiológica y bioquímica

Las cepas bacterianas que causaron pudrición en zanahoria se caracterizaron por la tinción de Gram utilizando un kit de colorantes Gram (HYCEL®, México), siguiendo el protocolo del fabricante, y por el metabolismo oxidativo/fermentativo de la glucosa con el medio Hugh & Leifson, según lo descrito por Schaad et al.²⁷. Para determinar la actividad enzimática de la catalasa, se tomó una asada de masa bacteriana de un cultivo de 24 h y se mezcló con una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%; la formación de burbujas de gas indicó una reacción positiva²⁷. La actividad de la citocromo-oxidasa se determinó empleando tiras de papel tratadas con una solución al 1% de sulfato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina²⁷. La actividad pectinolítica se evaluó en rodajas de papa (*Solanum tuberosum* L.) y la reacción de hipersensibilidad se probó en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), de acuerdo con los protocolos descritos por Schaad et al.²⁷. Además, por API®20E (bioMérieux, EE.UU.) se evaluó la actividad de las enzimas β -galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, gelatinasa y ureasa, así como la utilización de citrato, la producción de H_2S y la asimilación

de D-glucosa, D-manitol, inositol, D-sorbitol, L-rhamnosa, D-sacarosa, D-melibiosa, amigdalina y L-arabinosa.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las cepas bacterianas se realizó por el método de CTAB al 2%²⁴ a partir de cultivos puros con 48 h de crecimiento a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. La concentración y la pureza de las muestras de ADN se analizaron por espectrofotometría de luz UV a 260 nm con un NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific); la integridad del ADN se evaluó por medio de una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen™) al 1% a 70 V por 90 min²⁴.

Identificación molecular

La identificación molecular de las bacterias aisladas se realizó a partir de la amplificación por PCR y la secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal (ARNr) utilizando los iniciadores 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'⁷ y 1492R 5'-GGTTACCTGTTCAGACTT-3'²⁹. Las PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL, que contenían 1 X del buffer de PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de cada iniciador, 100 ng de ADN y 1 U de la enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Touch C1000 (Bio-Rad) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación a 58 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 1 min, seguidos de una extensión final a 72 °C por 8 min.

Los productos de PCR se secuenciaron bidireccionalmente con los iniciadores 8F y 1492R por el método Sanger en la empresa Psomagen (Brooklyn, NY, EE.UU.). Las secuencias remitidas se analizaron y editaron con el programa BioEdit para generar las secuencias consenso de cada cepa (~1300 pb). Las secuencias consenso se compararon con las secuencias nucleotídicas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a través del programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). La especie se determinó de acuerdo con el porcentaje de similitud, mínimo > 98,5%⁴.

Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó a partir de ocho secuencias nucleotídicas del gen 16S ARNr de las bacterias causantes de la pudrición de zanahoria y 39 secuencias de referencia: 27 del género *Gluconobacter*^{12,19} y 12 del género *Paenibacillus*^{13,23,35,37,38}. La secuencia KP274903.1 de *Pectobacterium carotovorum* se incluyó como grupo externo. Los árboles filogenéticos se construyeron a partir de los alineamientos múltiples de las secuencias nucleotídicas (~1300 pb) generados por el programa CLUSTALW y se utilizó el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas y el mejor modelo de sustitución nucleotídica HKY + G¹¹ en el programa MEGA 11³².

Secuencias de ácidos nucleicos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en el estudio se registraron en la base de datos GenBank de NCBI con los números de acceso PQ083548 a PQ083552 y PQ083678 a PQ083680.

Resultados

Aislamiento de bacterias a partir de zanahorias con síntomas de pudrición inducidos en cámara húmeda

Después del periodo de incubación, se observó pudrición bacteriana en todos los empaques de las zanahorias baby (OZ1, OZ2 y OZ3) y en 4/6 muestras sin empaque (zanahorias a granel; OZ4, OZ7, OZ9 y OZ10). En algunas muestras se desarrollaron manchas húmedas (tabla 1 y fig. 1). Del tejido de las raíces sintomáticas en cámara húmeda (fig. 1) se aislaron 23 cepas bacterianas: 10 de zanahorias con empaque y 13 de zanahorias a granel (tabla 1).

Pruebas de patogenicidad

De los 23 aislados bacterianos inoculados para analizar la patogenicidad, 8 causaron pudrición tanto en rodajas de zanahoria como en zanahorias enteras sin heridas. En rodajas de zanahoria, la inoculación de las cepas 1027.1, 1032.2, 1033.1, 1059 y 1070.1 causó áreas húmedas a las 24 h después de la inoculación (hdi) (fig. 2 B₁, C₁, D₁, E₁, F₁), seguido del ablandamiento del tejido y olores no característicos u *off odors* (que recuerdan o se asocian al vinagre) a las 48 hdi (fig. 2 B₂, C₂, D₂, E₂, F₂). La inoculación con las cepas 1074.2, 1076 y 1077 causó pudrición blanda desde las 24 hdi, en la cual se observó fermentación (formación de burbujas) en el tejido degradado (fig. 2 G₁, H₁, I₁), seguida de una maceración grave a las 48 hdi (fig. 2 G₂, H₂, I₂). En las rodajas de zanahoria del control negativo no se observó pudrición y el tejido permaneció íntegro hasta el final del ensayo (fig. 2 A₁, A₂). En el caso de las cepas bacterianas aisladas de las muestras OZ9 y OZ10, ninguna causó pudrición por sí sola.

Características de las colonias

En medio de cultivo B-King, la morfología de las colonias de las cepas 1027.1, 1032.2, 1033.1, 1059 y 1070.1 se caracterizó por una apariencia traslúcida, superficie suave, elevación convexa, margen uniforme y brillo iridiscente (fig. 2J). En tanto que las colonias de las cepas 1074.2, 1076 y 1077 se observaron de color crema, textura granular, margen uniforme y elevaciones radiales en forma de asteriscos (fig. 2K).

Identificación molecular

Con el análisis BLAST de las secuencias del gen ARNr 16S (~1300 pb) se identificó a la cepa 1027.1 como *Gluconobacter kondonii* Malimas et al., 2008 (99,12% de identidad con la secuencia NR.104680.1), a la cepa 1033.1 como *Gluconobacter wancherniae* Yukphan et al. 2010 (99,92% de identidad con NR.112952.1) y a las cepas 1032.2, 1059 y 1070.1 como *Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984

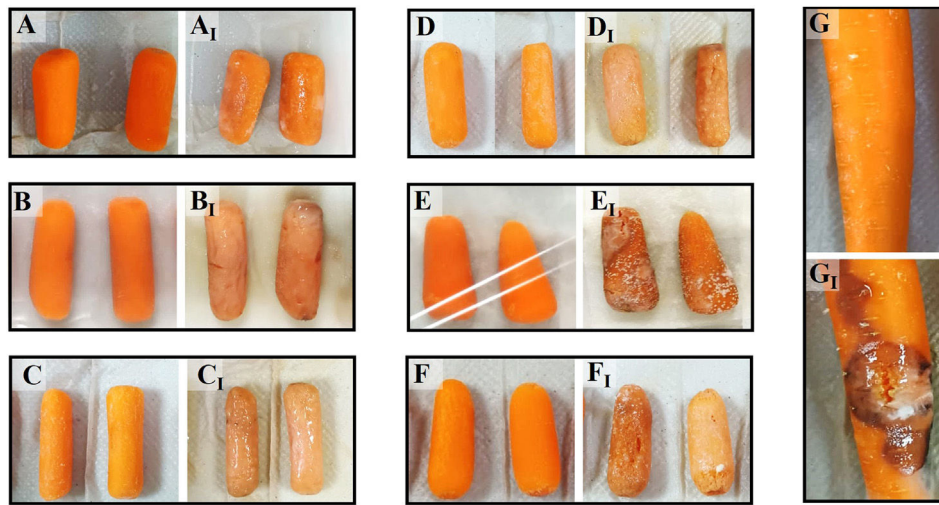


Figura 1 Síntomas de pudrición en zanahorias comerciales. Zanahorias sanas antes de la incubación (A, B, C, D, E, F y G) y zanahorias sintomáticas después de 5 días de incubación a $\sim 25^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda (A_1 , B_1 , C_1 , D_1 , E_1 , F_1 y G_1).

A_1 , B_1 , C_1 y D_1 : ejemplares de la muestra OZ1, origen de las cepas 1027.1, 1033.1, 1076 y 1077, respectivamente; E_1 : ejemplares de la muestra OZ2, origen de la cepa 1032.2; F_1 : ejemplares de la muestra OZ3, origen de la cepa 1074.2; G_1 : ejemplar de la muestra OZ4, origen de la cepa 1070.1.

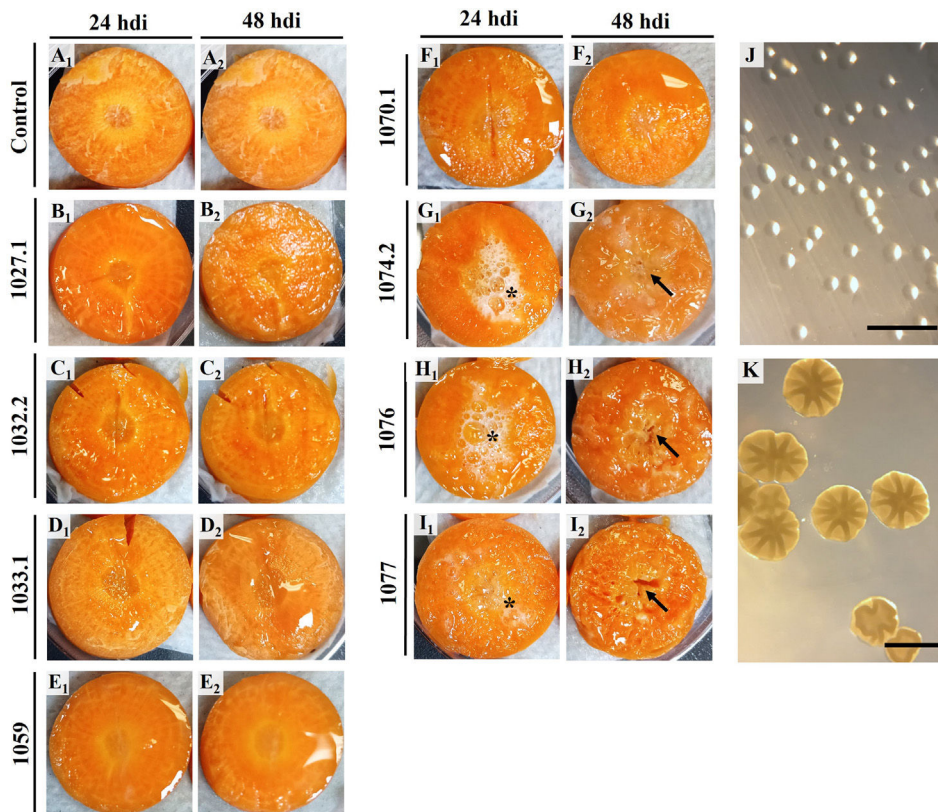


Figura 2 Pruebas de patogenicidad en rodajas de zanahoria y morfología de las colonias bacterianas causantes de pudrición. Pudrición del tejido a las 24 y 48 h después de la inoculación (hdi) con las cepas 1027.1 (B_1 y B_2), 1032.2 (C_1 y C_2), 1033.1 (D_1 y D_2), 1059 (E_1 y E_2), 1070.1 (F_1 y F_2), 1074.2 (G_1 y G_2), 1076 (H_1 y H_2) y 1077 (I_1 y I_2). Control negativo tratado con agua destilada estéril (A_1 y A_2). J) Morfología tipo de las colonias de las cepas 1027.1, 1032.2, 1033.1, 1059 y 1070.1 a las 48 h de crecimiento en medio B-King. K) Morfología tipo de las colonias de las cepas 1074.2, 1076 y 1077 a las 48 h de crecimiento en medio B-King.

*: Fermentación (formación de burbujas). Flechas negras: maceración grave del tejido. Las barras de escala corresponden a 0,5 mm (J) y 2 mm (K).

Tabla 2 Identificación de las bacterias causantes de pudrición en zanahorias comerciales en Texcoco, México

ID	Origen	Pudrición en zanahoria con herida	Pudrición en zanahoria sin herida	Actividad pectinolítica en papa	RH en tabaco	Tinción Gram	Actividad de catalasa	Metabolismo de glucosa	Identificación molecular / No. de acceso GenBank
1027.1	OZ1, baby	*+	*+	—	+	—	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Gluconobacter kondonii</i> / PQ083548
1033.1	OZ1, baby	*+	*+	—	+	—	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Gluconobacter wancherniae</i> / PQ083550
1032.2	OZ2, baby	*+	*+	—	+	—	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Gluconobacter cerinus</i> / PQ083549
1070.1	OZ4granel	*+	*+	—	+	—	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Gluconobacter cerinus</i> / PQ083552
1059	OZ7granel	*+	*+	—	+	—	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Gluconobacter cerinus</i> / PQ083551
1074.2	OZ3, baby	*++	*++	+	—	+	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Paenibacillus polymyxa</i> / PQ083678
1076	OZ1, baby	*++	*++	+	—	+	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Paenibacillus polymyxa</i> / PQ083679
1077	OZ1, baby	*++	*++	+	—	+	+	Oxidativo-fermentativo	<i>Paenibacillus polymyxa</i> / PQ083680

— negativo; + positivo; *+ pudrición ligera (ablandamiento de tejido en 48 horas); *++ pudrición grave (degradación del tejido en 24 h); RH: reacción de hipersensibilidad.

(99,93%, 99,78% y 99,48% de identidad con ON746595.1, MK883141.1 y PP386540.1, respectivamente). En tanto que las cepas 1074.2, 1076 y 1077 se identificaron como *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski 1880) Ash et al. 1994 (99,93%, 99,79% y 99,72% de identidad con EF532687.1, respectivamente).

Caracterización fisiológica y bioquímica

Las cepas del género *Gluconobacter* (1027.1, 1032.2, 1033.1, 1059 y 1070.1) y *P. polymyxa* (1074.2, 1076 y 1077) mostraron un metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa y actividad de la enzima catalasa positiva (tabla 2). En cuanto a las pruebas de patogenicidad vegetal, las cepas del género *Gluconobacter* indujeron reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, mientras que las cepas de *P. polymyxa* mostraron actividad pectinolítica en tubérculo de papa (tabla 2). La caracterización fisiológica y bioquímica mediante API®20E mostró que las cepas del género *Gluconobacter* fueron negativas a la actividad de las enzimas citocromo-oxidasa, β-galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, gelatinasa y ureasa, pero fueron capaces de oxidar diferentes fuentes de carbono (tabla 3). *G. cerinus* presentó una oxidación más rápida de D-manitol y D-sorbitol respecto de *G. kondonii*. En contraste, las cepas de *P. polymyxa* no asimilaron ninguna de

las fuentes de carbono evaluadas, pero resultaron positivas en las pruebas de β-galactosidasa y gelatinasa (tabla 3).

Análisis filogenético

Con el análisis filogenético se corroboró la especie de las cepas causantes de pudrición en zanahoria y se determinó su relación filogenética con los miembros de los géneros *Gluconobacter* y *Paenibacillus* que han sido asociados con pudrición vegetal (fig. 3). Con base en las secuencias del gen ARNr 16S, las cepas 1032.2, 1059 y 1070.1 se agruparon en un mismo clado con la secuencia KX578017.1 de *G. cerinus* que causó pudrición en plátano (*Musa paradisiaca* L.)¹², mientras que las cepas 1074.2, 1076 y 1077 resultaron filogenéticamente más cercanas a las cepas de *P. polymyxa* (AF515611.1) relacionadas con la pudrición de raíces de ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey.)¹³ y con la pudrición de tubérculos de cala (*Zantedeschia* spp., AM062684.1)²³ (fig. 3).

Discusión

Desde el campo, el procesamiento y el almacenamiento inadecuados de las zanahorias puede afectar la calidad del producto y favorecer el desarrollo de enfermedades bacterianas que disminuyen su tiempo de vida en el anaquel³⁴. Asimismo, las condiciones no asépticas del lavado y empa-

Tabla 3 Caracterización bioquímica de las bacterias causantes de pudrición en zanahorias comerciales en Texcoco, México

Prueba	<i>Gluconobacter kondonii</i> (1027.1)	<i>Gluconobacter cerinus</i> (1032.2)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (1076)
<i>Actividad enzimática de:</i>			
Citocromo-oxidasa	—	—	—
β-galactosidasa	—	—	+
Arginina dihidrolasa	—	—	—
Lisina decarboxilasa	—	—	—
Ornitina decarboxilasa	—	—	—
Gelatinasa	—	—	+
Ureasa	—	—	—
<i>Utilización de citrato</i>	—	—	—
<i>Producción de H₂S</i>	—	—	—
<i>Oxidación de:</i>			
D-glucosa	+	+	—
D-manitol	+	+	—
Inositol	+	+	—
D-sorbitol	+	+	—
L-rhamnosa	+	+	—
D-sacarosa	+	+	—
D-melibiosa	+	+	—
Amigdalina	+	+	—
L-arabinosa	+	+	—

— reacción negativa; + reacción positiva a las 24 h; +* reacción positiva a las 48 h.

cado pueden provocar contaminaciones bacterianas que podrían afectar la salud del consumidor. En esta investigación, las zanahorias de tipo baby presentaron pudrición bacteriana grave después de la incubación, a pesar de que los empaques indican que las zanahorias fueron desinfectadas y que no es necesario lavarlas para su consumo. Las zanahorias baby son un producto industrializado generado a partir del lavado, pelado y corte de zanahorias crudas²; por lo tanto, cabe considerar que las bacterias aisladas únicamente de estas muestras (*P. polymyxa*) podrían haber derivado de una contaminación originada durante alguna etapa del procesamiento de las zanahorias. Por otra parte, en zanahorias a granel las bacterias también afectaron la calidad para su consumo, ya que después de la incubación de las muestras, estas desarrollaron manchas húmedas y síntomas de pudrición, aunque la descomposición de las zanahorias fue menos frecuente y grave que la observada en las zanahorias baby industrializadas.

En este estudio, las bacterias identificadas con mayor frecuencia como causantes de pudrición de las zanahorias comerciales fueron del género *Gluconobacter* (familia *Acetobacteriaceae*) y se obtuvieron de una muestra con empaque en Estados Unidos y de tres muestras producidas en México. Las especies de *Gluconobacter* tienen la capacidad de oxidar etanol a ácido acético. Esta propiedad las hace importantes en la industria alimentaria y biotecnológica, principalmente en la producción de vinagre; sin embargo, también pueden promover la pudrición en diferentes frutas y causar pérdidas poscosecha⁹. Diversas especies del género *Gluconobacter* se han vinculado con la pudrición de uva, manzana, pera y piña^{9,10,26,33}.

En uva, se ha evidenciado que la densidad y la diversidad de las poblaciones de *Gluconobacter* incrementan progresivamente durante la maduración del fruto y son mayores

en las uvas podridas^{3,15}, las cuales se caracterizan por tener un fuerte olor a vinagre asociado a altos niveles de ácido acético²⁰. Las dos especies más frecuentemente vinculadas con la pudrición agria de las uvas son *G. cerinus* y *Gluconobacter oxidans*³. *G. cerinus* (syn. *G. asaii*) también causa pudrición húmeda en remolacha (*Beta vulgaris* L.)³⁰. En manzana, la pudrición causada por *Gluconobacter* spp. se caracteriza por generar áreas acuosas en el punto de inoculación. En este estudio, la pudrición de las raíces de zanahoria causada por *G. cerinus*, *G. kondonii* y *G. wancherniae* también produjo áreas acuosas (fig. 2), además del ablandamiento del tejido y *off odors* que evocan el olor a ácido acético o vinagre. Este cambio de olor en frutos infectados con *Gluconobacter* spp. ha sido reportado frecuentemente. En piña, *Ananas comosus* (L.) Merr., *G. oxydans* puede causar «la enfermedad rosa», principalmente en frutos maduros^{25,26}, y los tejidos podridos tienen un olor similar a melón (*cantaloupe-like*)²⁶.

En cuanto a la fisiología, de las 23 cepas aisladas, solo las especies de *Gluconobacter* generaron reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco y así se evidenció su patogenicidad. Cabe recordar que esta reacción está relacionada con el sistema de secreción de tipo III de bacterias gram negativas, a través del cual exportan factores de virulencia específica; además, se considera un indicador de virulencia y un rasgo común de muchas bacterias patógenas de plantas (*Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp. y *Xanthomonas* spp.)⁶ y de humanos (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., etc.)^{6,31}. Asimismo, las cepas de *Gluconobacter* y de *P. polymyxa* aisladas en este estudio presentaron una elevada actividad de la enzima catalasa. Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo cual resulta ser uno de los elementos más eficaces de protección de las bacterias fito-

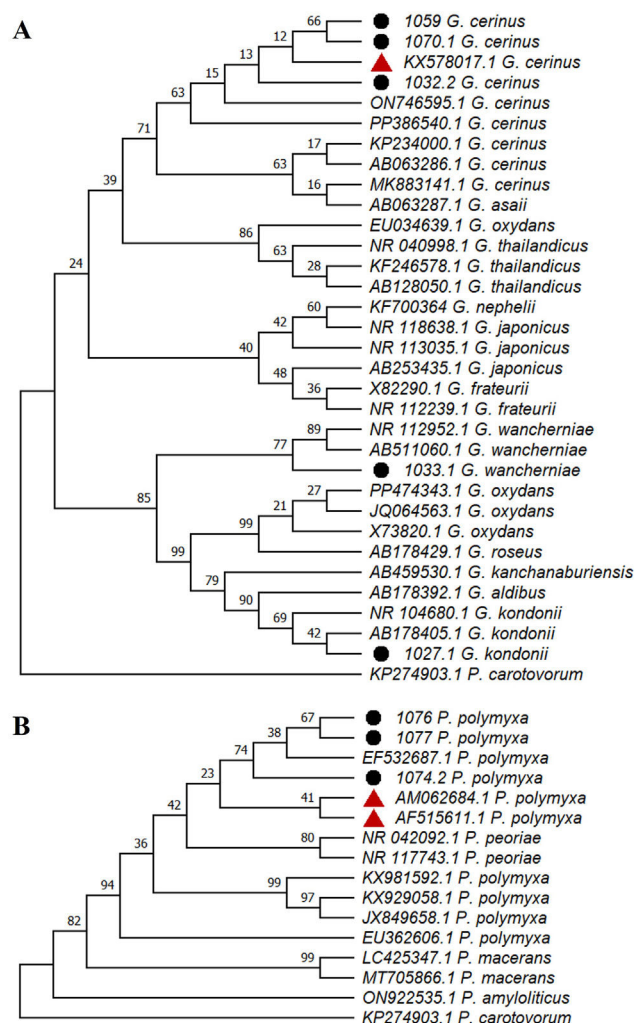


Figura 3 Análisis filogenético de las cepas bacterianas 1027.1, 1032.2, 1033.1, 1059, 1070.1, 1074.2, 1076 y 1077, causantes de pudrición en zanahorias comerciales. Árboles filogenéticos consenso inferidos por el método de máxima verosimilitud (1000 réplicas) a partir de 32 secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S (~1300pb) de especies del género *Gluconobacter* (A) y de 15 secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S (~1300pb) de especies del género *Paenibacillus* (B). La secuencia KP274903.1 de *Pectobacterium carotovorum* se incluyó como grupo externo. Los árboles (A) y (B) se construyeron con el programa MEGA 11. Los números en los nodos indican el porcentaje de réplicas en el que los taxones se asociaron en el mismo grupo. Los círculos negros indican las cepas aisladas en este estudio y los triángulos rojos indican las secuencias de *Gluconobacter* spp. (A) y *Paenibacillus* spp. (B) reportadas anteriormente como agentes causales de pudrición.

patógenas contra el estrés oxidativo generado por la defensa de las plantas⁵.

En relación con el perfil bioquímico, *G. cerinus* y *G. kondonii* (aisladas de zanahorias con pudrición en cámara húmeda) asimilaron todas las fuentes de carbono evaluadas en el sistema API®20E. En este sentido, se ha demostrado que las bacterias del género *Gluconobacter* prefieren ambientes ricos en azúcares, a diferencia de las acetobacterias de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*,

que prefieren al etanol como fuente de carbono³. En uvas y manzanas, los daños mecánicos al fruto aumentan la accesibilidad del azúcar y permiten la infección por *Gluconobacter*; sin embargo, en pera, estas bacterias pueden causar descomposición sin la presencia de heridas^{3,33}. En el caso de zanahoria, se observó que las diferentes cepas de *Gluconobacter* pueden descomponer las raíces sin la necesidad de que existan heridas.

Por otro lado, *P. polymyxa* también fue uno de los agentes causales de la pudrición de las zanahorias baby en muestras de dos empaques (uno de Estados Unidos y el otro de México); los resultados de las pruebas bioquímicas corroboran su patogenicidad. Debido a que *P. polymyxa* solo se aisló de zanahorias industrializadas, es posible que los procesos de lavado y corte hayan contaminado al producto con esta bacteria. Las especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* raramente son consideradas como fitopatógenas, e incluso se consideran potenciales agentes de control biológico contra diversos patógenos de plantas. Sin embargo, se ha encontrado que las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus amyloliticus*, *Paenibacillus macerans* y *P. polymyxa* están implicadas en pudriciones blandas y pueden causar problemas de almacenamiento de algunos vegetales^{17,23,35}. Así, *P. polymyxa* ocasiona pudrición blanda en tubérculos de papa y cala, tallos de *Hylocereus undulatus* Britt. y raíces de ginseng^{13,23,37}. En el caso de la pudrición de raíces de ginseng, se documentó que existen cepas no patógenas y cepas patógenas de *P. polymyxa*, y que la virulencia está relacionada con la capacidad de hidrolizar el almidón de dicha raíz¹³. En el caso de la pudrición blanda en tubérculos de cala causada por esta misma especie, la patogenicidad se debió a la actividad pectinolítica²³. Además de la actividad pectinolítica, se ha descrito que *P. polymyxa* producen enzimas proteolíticas extracelulares, las cuales son influenciadas por los componentes del medio, como la presencia de azúcares (glucosa) fáciles de metabolizar o la relación de carbón/nitrógeno¹. En cuanto a las cepas de *P. polymyxa* causantes de la pudrición de zanahoria en este estudio, se sugiere que su patogenicidad está dada por la actividad pectinolítica e incluso también por una actividad proteolítica, ya que resultaron positivas a la hidrólisis de gelatina.

Conclusiones

Las zanahorias altamente procesadas y empacadas, a pesar de su desinfección industrial, pueden albergar bacterias causantes de pudrición que afectan su almacenamiento. Se reporta por primera vez la descomposición de zanahorias comerciales aparentemente sanas causada por las bacterias *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter kondonii*, *Gluconobacter wancherniae* y *Paenibacillus polymyxa*, principalmente en zanahorias baby. Preventivamente, para evitar el desarrollo bacteriano, se recomienda al consumidor conservar las zanahorias a una temperatura de 4-6 °C. Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que es recomendable realizar una desinfección adicional de las zanahorias industrializadas antes de su consumo fresco y la remoción de la epidermis de las zanahorias sin procesar.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología EDOMEX (beca a Thelma J. Parra-Aguilar, folio ESYCA2023-1-7842) y por el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, a través del Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT) y de los Laboratorios de Bacterias y Hongos Fitopatógenos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por Gema Jiménez, Paulina Romero y Martín Rivera del Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT).

Bibliografía

- Alvarez VM, von der Weid I, Seldin L, Santos AL. Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Lett Appl Microbiol*. 2006;43:625–30.
- Amin S, Jung S, Kang I, Duval A. Valorization of baby carrot processing waste. *J Culin Sci Technol*. 2023;21:1–17.
- Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2012;154:152–61.
- Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:601–8.
- Chamnongpol S, Mongkolsuk S, Vattanaviboon P, Fuangthong M. Unusual growth phase and oxygen tension regulation of oxidative stress protection enzymes, catalase and superoxide dismutase, in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:393–6.
- Chang JH, Desveaux D, Creason AL. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*. 2014;52:317–45.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:7843–53.
- Farrar JJ, Nunez JJ, Davis RM. Influence of soil saturation and temperature on *Erwinia chrysanthemi* soft rot of carrot. *Plant Dis*. 2000;84:665–8.
- Gao Q, Zhang Y, Gao C, Li H, Cheng Y, Qian X, Zhang L, Liu J, Ogunyemi SO, Guan J. The microbial diversity in relation to postharvest quality and decay: Organic vs. conventional pear fruit. *Foods*. 2023;12:1980.
- Hall ME, O'Bryon I, Wilcox WF, Osier MV, Cadle-Davidson L. The epiphytic microbiota of sour rot-affected grapes differs minimally from that of healthy grapes, indicating causal organisms are already present on healthy berries. *PLoS One*. 2019;14:e0211378.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. 1985;22:160–74.
- He M, Jiang J, Cheng D. The plant pathogen *Gluconobacter cerinus* strain CDF1 is beneficial to the fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *AMB Express*. 2017;7:207.
- Jeon YH, Chang SP, Hwang I, Kim YH. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng. *J Microbiol Biotechnol*. 2003;13:881–91.
- Kahala M, Blasco L, Joutsjoki V. Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot. *J Food Prot*. 2012;75:523–32.
- Kecskeméti E, Berkelmann-Löhnertz B, Reineke A. Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes? *PLoS One*. 2016;11:e0160852.
- Kora C, McDonald MR, Boland GJ. Occurrence of fungal pathogens of carrots on wooden boxes used for storage. *Plant Pathol*. 2005;54:665–70.
- Leary JV, Nelson N, Tisserat B, Allingham EA. Isolation of pathogenic *Bacillus circulans* from callus cultures and healthy offshoots of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Appl Environ Microbiol*. 1986;52:1173–6.
- Lonsway DR. McFarland Standards. En: Leber A, Burnham C, editores. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 5th edition California: American Society of Microbiology; 2023. p. 3792.
- Malimas T, Yukphan P, Lundaa T, Muramatsu Y, Takahashi M, Kaneyasu M, Potacharoen W, Tanasupawat S, Nakagawa Y, Suzuki KI, Tanticharoen M, Yamada Y. *Gluconobacter kanchanaburiensis* sp. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium for Thai isolates in the Alphaproteobacteria. *J Gen Appl Microbiol*. 2009;55:247–54.
- Mateo E, Torija MJ, Mas A, Bartowsky EJ. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *Int J Food Microbiol*. 2014;178:98–106.
- McFarland J. The Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*. 1907;49:1176–8.
- Michalik B, Simon PW, Gabelman WH. Assessing susceptibility of carrot roots to bacterial soft rot. *HortScience*. 1992;27:1020–2.
- Mikicinski A, Sobiczewski P, Pulawska J, Treder J. Involvement of *Paenibacillus polymyxa* in the etiology of bacterial soft rot of calla lily. *J Plant Pathol*. 2010;92:375–80.
- Minas K, Mcewan NR, Newbold CJ, Scott KP. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;325:162–9.
- Rohrbach KG. Unusual tropical fruit diseases with extended latent periods. *Plant Dis*. 1989;73:607–9.
- Rohrbach KG, Pfeiffer JB. The interaction of four bacteria causing pink disease of pineapple with several pineapple cultivars. *Phytopathology*. 1976;66:396–9.
- Schaad NW, Jones B, Chun W. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd edition St Paul, USA: American Phytopathological Society Press; 2001. p. 373.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. 2022. México. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Stackebrandt E, Liesack W. Nucleic acids and classification. En: Goodfellow M, O'Donnell AG, editores. *Handbook of New Bacterial Systematics*. London: Academic Press; 1993. p. 152–89.
- Strausbaugh CA, Gillen AM. Bacteria and yeast associated with sugar beet root rot at harvest in the intermountain west. *Plant Dis*. 2008;92:357–63.
- Stuber K, Frey J, Burnens AP, Kuhnert P. Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. *Mol Cell Probes*. 2003;17:25–32.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38:3022–7.
- Van Keer C, vanden Abeele P, Swings J, Gosselé F, de Ley J. Acetic acid bacteria as causal agents of browning and rot of

- apples and pears. Zentralblatt Bakteriell Parasitenkd Infekt Hyg. 1981;2:197–204.
34. Verdugo-Fuentes A, Peñuelas-Rubio O, Argente-Martínez L, Leyva-Ponce JA, González-Aguilera J. Algunas consideraciones sobre el manejo poscosecha de la zanahoria. Acta Agric Pecuar. 2021;7:E0071009.
35. Yahyaoui A, Oueslati M, Motyka-Pomagruk A, Kaczynska N, Sledz W, Tarhouni B, Hajlaoui MR, Lojkowska E, Sadfi-Zouaoui N. Characterisation of pectinolytic *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus amyloliticus* strains, new pathogens of potato in Tunisia. Agriculture. 2023;13:1275.
36. Yi X, Li J, Liao D, Peng G, Zheng X, Xu H, Zhang T, Ai J. Carrot and carotene and multiple health outcomes: An umbrella review of the evidence. J Sci Food Agric. 2023;103:2251–61.
37. Zhang RY, Zhao SX, Tan ZQ, Zhu CH. First report of bacterial stem rot disease caused by *Paenibacillus polymyxa* on *Hylocereus undulatus* in China. Plant Dis. 2017;101:1031.
38. Zhou WW, Huang JX, Niu TG. Isolation of an antifungal *Paenibacillus* strain HT16 from locusts and purification of its medium-dependent antagonistic component. J Appl Microbiol. 2008;105:912–9.