

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 22: 1-8, 2019.

DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2019.0.195](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.195)

Detección e identificación molecular de *Pantoea vagans* en flores de *Dahlia* sp.

Estrella Lara-Cortés^{1*}, Silvia Bautista- Baños²,
Laura Leticia Barrera-Necha², Galdy Hernández-Zárate³
y Renato León- Rodríguez⁴

¹Laboratorio de Investigación del Complejo Regional Nororiental, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Calle Arias y Bulevard s/n. Teziutlán, 73800, Puebla, México. 3702, ORCID: 0000-0002-3581-0789. ²Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Morelos, 62531, México, ORCID: 0000-0003-1556-0759, 0000-0002-5151-3004. ³Colegio de Postgraduados-Campus Veracruz, Posgrado en Agroecosistemas, Mpio. de Manlio Fabio Altamirano, 91960, Veracruz, México. ORCID: 0000-0002-0004-7410. ⁴Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México, ORCID: 0000-0002-3679-3089. Emails: *laracort@hotmail.com

RESUMEN

Las Dalias (*Dahlia* spp.) son flores nativas de Mesoamérica y endémicas de México. Su consumo como alimento es una práctica antigua, en la actualidad es escasa la información y reglamentación sanitaria para su comercialización y consumo. Al respecto, el objetivo del presente estudio fue identificar morfológica, bioquímica y molecularmente, bacterias de origen entérico asociadas con flores de Dalia. Los resultados de la caracterización morfológica revelaron la predominancia de bacilos cortos Gram negativos. A partir de la observación de la morfología colonial en medios de cultivo selectivos y diferenciales se identificaron como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo, el uso de un método comercial automatizado los clasifica como *Enterobacter cancerogenus*. Debido a que ambas pruebas arrojaron resultados distintos en cuanto a la identidad del microorganismo aislado, no fueron concluyentes. Por lo tanto, se recurrió a la caracterización molecular para la identificación del aislado bacteriano. La bacteria predominante en flores de Dalia, correspondió a *Pantoea vagans* (Número de acceso CP002206). Éste es el primer reporte de *Pantoea vagans* aislada de flores de Dalia.

Palabras Clave: *Enterobacter cancerogenus*, *Dahlia*, flores comestibles, *Pantoea vagans*.

Detection and molecular identification of *Pantoea vagans* in flowers of *Dahlia* sp.

ABSTRACT

Dahlias (*Dahlia* spp.) are flowers native to Mesoamerica and endemic to Mexico. Its consumption as food is an ancient practice, at present there is little health information and regulation for its marketing and consumption. The objective of the study was to identify enteric bacteria associated morphologically, biochemically and molecularly with Dahlia flowers. The results of the morphological characterization revealed the predominance of short Gram-negative bacilli. From the observation of colonial morphology in selective and differential culture media *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. were identified. However, the use of an automated commercial method classified them as *Enterobacter cancerogenus*. Due to the fact that the two tests used gave different results when identifying the isolated microorganism, the findings were inconclusive. Therefore molecular characterization was used to identify the bacterial isolate. Thus, the predominant bacterium in Dahlia flowers was *Pantoea vagans* (Access Number CP002206. 1). This is the first report of *Pantoea vagans* isolated from Dahlia flowers.

Key words: *Enterobacter cancerogenus*, *Dahlia*, edible flowers, *Pantoea vagans*.

INTRODUCCIÓN

La flor de Dalia además de utilizarse como flor de ornato (nombrada la flor nacional mexicana), se ha usado como alimento en diversos platillos (Membre, Goubet & Kubaczka, 1995; Bye & Linares, 2008; Díaz-López, 2017). Existen investigaciones que indican que esta flor posee algunos compuestos fenólicos de importancia para la salud humana (Bye & Linares, 2008; Lara-Cortés *et al.*, 2014). Por su parte, Anan'ina, Andreeva, Mycots & Oganessian (2009) señalan que la raíz de Dalia en forma deshidratada y pulverizada se ha empleado como parte de la gastronomía y la medicina herbolaria de México. Además, otros estudios indican que la inulina presente en sus raíces tuberosas sirve como fibra dietética y es considerada como un compuesto prebiótico que estimula especies bacterianas presentes en el colon como lactobacilos y bifidobacterias (Gibson & Beatty, 1995; Gibson & Roberfroid, 1995; López, Romero & Ureta, 2001; Huebner, Wehling & Hutkins, 2007; Puerta- García & Mateos-Rodríguez, 2010).

Dentro de las características con las que debe contar un producto para ser utilizado como alimento, destaca su inocuidad. Esto es que no contenga objetos, sustancias o microorganismos que pongan en riesgo la salud de quién los consume. Al respecto, los productos vegetales frescos merecen atención especial, ya que la transmisión de enfermedades entéricas a través de su consumo es un problema ampliamente conocido (Berger *et al.*, 2010; Santana-Legorreta, Villanueva-Carvajal, Morales-Rosales, Laguna-Cerda & Domínguez-López, 2016; Alegbeleye, Singleton & Sant'Ana, 2018). Cabe destacar que, en plantas, esta contaminación proviene principalmente del agua de riego, que funciona como vehículo de transmisión de agentes patógenos como bacterias, virus y protozoos procedentes de la materia fecal de origen humano y animal (Marchetti, Casadei & Guerzoni, 1992; Leonila *et al.*, 2017). Aunado a ello, la microbiota de los vegetales y frutas que crecen a ras del suelo está compuesta principalmente por microorganismos presentes de forma natural en el suelo, así como los que albergan las plantas en descomposición o bien por agentes microbianos que son incorporados después de la cosecha debido a la falta de higiene (Leonila *et al.*, 2017).

Los principales agentes etiológicos relacionados con enfermedades transmitidas por vegetales y frutas frescas incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos. Dentro de la población bacteriana que coloniza los vegetales frescos-cortados, típicamente encontramos levaduras, hongos, bacterias ácido-lácticas y bacterias de los géneros *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Janthinobacterium* spp., *Enterobacter* spp.; y actualmente, como consecuencia de diversas prácticas agrícolas también se ha aislado en este tipo de productos, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* (Miceli & Settanni, 2019). Como principales enterobacterias (familia *Enterobacteriaceae*) que causan enfermedades transmitidas

por el consumo de vegetales y frutas frescas, encontramos a *E. coli*, *Enterobacter*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Alegbeleye *et al.*, 2018).

Con respecto a la familia *Enterobacteriaceae*, ésta constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas, cuya reclasificación de varios de sus miembros ha sido propuesta actualmente con base a estudios de genómica comparativa (Alnajjar & Gupta, 2017). Las bacterias miembros de este grupo reciben su nombre por la localización habitual como comensales intestinales, aunque se trata de bacterias ubicuas, que se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales, además del hombre (NOM-093-SSA1-1994; Pachón-Cubillos, 2009). La importancia de este tipo de bacterias radica en que algunas son patógenos primarios para el ser humano (diversos patotipos diarreicos de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) y en ocasiones cuando el paciente está inmunosuprimido (incluyendo pacientes alcohólicos y diabéticos), algunos miembros de esta familia se han reportado como causantes de infecciones, por lo que son considerados como patógenos oportunistas (*E. coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp.), (Guentzel, 1996). Estas bacterias potencialmente patógenas, son comúnmente transmitidas por el agua contaminada, ocasionando diversas enfermedades de tipo gastrointestinal.

A nivel internacional, existe poca reglamentación con respecto al consumo de flores como alimento. En México, esta reglamentación es nula, no obstante, el Reglamento de control sanitario de productos y servicios de la Constitución, considera a las flores como un derivado de las frutas y hortalizas, por lo cual su objetivo es regular, controlar y fomentar la calidad sanitaria del proceso, importación y exportación, así como las actividades de servicios y establecimientos (DOF, 1999). La norma oficial mexicana NOM-093-SSA1-1994 (Mera-Ovando & Boettler, 2006), establece los límites máximos permisibles para coliformes fecales presentes en ensaladas verdes crudas o en frutas que son preparados en establecimientos fijos.

Por lo anteriormente expuesto, el aseguramiento de la calidad microbiológica de flores comestibles de Dalia resulta de vital importancia en la obtención de un alimento que sea inocuo para el consumo humano. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar bacterias entéricas predominantes en flores de Dalia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las flores de Dalia (*Dahlia* spp. var. *Pompom*) color púrpura fueron donadas por la Asociación Mexicana de la Dalia (AMD; Xochitla, Parque Ecológico, Tepetzotlán, México). Las flores fueron tratadas siguiendo los cuidados de riego, fertilización, control de plagas y enfermedades propios de la Dalia (Jiménez-Mariña, 2015).

Medios de cultivo y aislamiento bacteriano

Para el aislamiento bacteriano, fueron seleccionadas flores libres de daños mecánicos, insectos o signos de deterioro. Se pesaron 10 g de liguas de flores de Dalias frescas y se incorporaron en 90 mL de caldo soya tripticaseína y caldo lactosado (MCD Lab.), respectivamente. Las muestras se homogenizaron y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Al término de la incubación, las muestras se sembraron por estría cruzada en cajas de Petri que contenían gelosa soya tripticaseína (MCD Lab). Las cajas se incubaron a 35 °C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se realizó la tinción de Gram a los aislados obtenidos, así como la siembra de los aislados en medios de cultivo selectivos y diferenciales: gelosa de Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) (Becton, Dickinson de México), gelosa Verde Brillante (VB) (Laboratorios Britania), gelosa Mac Conkey (MCK) y gelosa Sulfito de Bismuto (SB) (MCD Lab.), con el propósito de observar las características morfológicas microscópicas y macroscópicas de las colonias aisladas. Cada medio de cultivo inoculado se incubó a 35 °C durante 24 horas.

Perfil bioquímico de los aislados bacterianos

Las colonias aisladas de Dalia se caracterizaron bioquímicamente usando el sistema de identificación *BD BBL™ Crystal™ Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit* (Becton Dickinson). Se hicieron determinaciones adicionales como las pruebas de oxidasa e indol. Los resultados fueron registrados posterior a las 24 horas de incubación a 35 °C ± 2 °C.

Identificación molecular de los aislados bacterianos

Preparación del cultivo

La bacteria se cultivó aeróbicamente en gelosa soya tripticaseína (AST) a 35 °C ± 2 °C durante 18-24 horas. Las células de un cultivo reciente (50-100 mg de biomasa bacteriana) (Toledo Hernández, 2013) se lavaron y resuspendieron en una solución de Mg₂SO₄ (10 mM). Y se mantuvieron hasta su utilización.

Extracción y purificación del DNA de los aislados bacterianos

La extracción del DNA fue realizada usando el método comercial *ZR Fungal/ Bacterial DNA®* (Zymo Research), con base en las instrucciones del fabricante. La integridad del DNA cromosomal, y los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta a 254 nm. La concentración y pureza del DNA cromosómico se evaluó por espectrofotometría a 260/280 nm.

Amplificación de los genes 16S *rRNA* y *gyrB* del aislado bacteriano.

Los genes 16S *rRNA* y *gyrB* se amplificaron por PCR, con el método comercial *DreamTaq PCR Master Mix 2X* (Thermo Fisher Scientific, México). Los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 10 pmol cada uno y 100 ng del DNA molde, en un volumen final de reacción fue de 50 µL. La secuencia de los oligos fueron: Pro K 63 5'-CAG GCC TAA CAC ATG

CAA GTC-3' y L1041 5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3' para el RNA 16 S (López et al., 2001), *gyrB*-UP1 5' GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN AAR TTY GA 3' y *gyrB*-UP2r 5' AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT 3', para amplificar *gyrB* (Weinthal et al., 2007), *gyrB*-UP1 Sec 5' GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA 3' y *gyrB*-UP2r Sec 5' AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CC 3', para secuenciar *gyrB* (Weinthal et al, 2007). La programación del termociclador (Lab. Net, Mod. Axigen MaxigeneII) consistió de una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 1 min, desnaturalización; 54 °C (16S *rRNA*) y 58 °C (*gyrB*) por 40 seg, alineamiento; y extensión a 72 °C por 80 seg; y al final un ciclo de extensión por 10 min a 72 °C. Los productos amplificados de los genes fueron: ~1.3 pb para 16S *rRNA* y ~1.2 pb para *gyrB*. Los productos de PCR fueron purificados a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (1%) con un método comercial de purificación de PCR (*GeneJet® Thermo Fisher Scientific*), con base en las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR fueron secuenciados (en ambas direcciones) en la unidad de síntesis y secuenciación del DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias se analizaron y editaron con el *software ApE. APlasmid Editor v2.0.45*. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas y comparadas para determinar la similitud con otras secuencias disponibles en la base de datos del *Gen Bank* (<http://www.nlm.nih.gov>) a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de EE.UU., utilizando el programa bioinformático *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Construcción del árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron las secuencias obtenidas de la base de datos del *Gen Bank*, correspondientes a los genes del marcador molecular *gyrB*, que codifican para la enzima DNA girasa. El árbol se enraizó tomando como referencia el clado externo *Azotobacter vinelandii*. El árbol filogenético fue construido con base en los valores de similitud de las secuencias, utilizando el método *Neighbor Join* (JN) y para el cálculo de las distancias genéticas se empleó el método *Jukes-Cantor*, ambos del programa de acceso libre *MEGA 7* (<http://www.megasoftware.net>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de aislados bacterianos

En los resultados de todas las muestras analizadas se observaron únicamente bacilos Gram negativos, delgados y cortos (Figura 1), al aislado se le denominó ET1. Las características del aislado ET1 de flores de Dalia se muestran en la Figura 2 y Tabla I. Los resultados de las características de la morfología colonial del aislado ET1 en medios de cultivo selectivos y diferenciales descartan que el microorganismo aislado, sea *E. coli* o *Salmonella* spp. (Balows, 1991). Esto debido a que no presenta las características típicas de estos microorganismos en los medios de cultivo utilizados (Tabla I).

Perfil bioquímico del aislado bacteriano

Los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas al aislado bacteriano ET1 de flores de Dalia se muestran en la Tabla II, los cuales sugieren que corresponden a *Enterobacter cancerogenus*, bacteria que forma parte de la familia de las enterobacterias, recientemente propuesto por Adeolu, Alnajjar, Naushad & Gupta (2016). Esta bacteria es considerada como un patógeno oportunista hospitalario, resistente a álcalis y antibióticos (Springer, Stockman, Teschner, Roberts & Bottger, 1996). Debido a que los resultados morfológicos y bioquímicos no coinciden con el perfil bioquímico y por tanto no pueden ser concluyentes, se procedió a la identificación del aislado ET1 de flores de Dalia con marcadores moleculares.

Identificación molecular de los aislados bacterianos ET1

El resultado del alineamiento de la secuencia 16S *rRNA* del aislado bacteriano ET1 de flores de Dalia, mostró un 88% de identidad con diferentes especies del género *Pantoea*. Este hecho ha sido previamente señalado, indicando que las interrelaciones de los miembros del orden *Enterobacteriales*, se describen de forma limitada con árboles filogenéticos basados en este gen (Adeolu *et al.*, 2016). Sin embargo, para el alineamiento del gen *gyrB*, se demostró una identidad de un 98% con cepas de *Pantoea vagans*, la cual incluye la cepa tipo *P. vagans* C9-1, de la cual se tiene su genoma secuenciado (Número de acceso CP002206). Estos resultados sugieren que el aislado ET1 aislado de flores de Dalia corresponde a *Pantoea vagans* ET1. Se construyó un árbol filogenético (Figura 3), con la secuencia de *gyrB* de *P. vagans* ET1, y de otras enterobacterias que se obtuvieron del *Gen Bank* (NCBI). En el árbol se observa que *P. vagans* ET1 aislada de flores de Dalia, se agrupa con otras cepas de *P. vagans*, la cual incluye a *P. vagans* PV989 (CP028349), cepa con la que exhibió la mayor similitud en los resultados de alineamiento con *gyrB*. En la identificación de aislados bacterianos con marcadores moleculares, el más usado es el 16S *rRNA*, pero como ya se mencionó, hay grupos bacterianos donde la identificación

está limitada (Adeolu *et al.*, 2016). En cambio *gyrB* presenta una mayor resolución tanto en grupos de *Bacillus* (Weinthal *et al.*, 2007) como en este estudio. También comparando la identificación morfológica y bioquímica (fenotipo) con la identificación a nivel molecular (genotipo) de *P. vagans* ET1, se observa que éstas no coinciden. Al respecto Springer y colaboradores (1996) mencionan que el fenotipo (características morfológicas y bioquímicas) de una especie bacteriana, no es una propiedad absoluta, si no que puede exhibir una gran variabilidad. Esta variabilidad depende en gran parte de las condiciones ambientales así, como del hospedero del cual se aísle el microorganismo. De tal modo que las bacterias se caracterizan por mostrar una gran plasticidad fenotípica y metabólica. Además, la presencia de plásmidos (moléculas del DNA distintas al cromosoma bacteriano), aporta información genética adicional, aunque no esencial para la vida de diversas bacterias que los albergan. Los plásmidos, les confieren nuevas propiedades fenotípicas y en algunos casos,

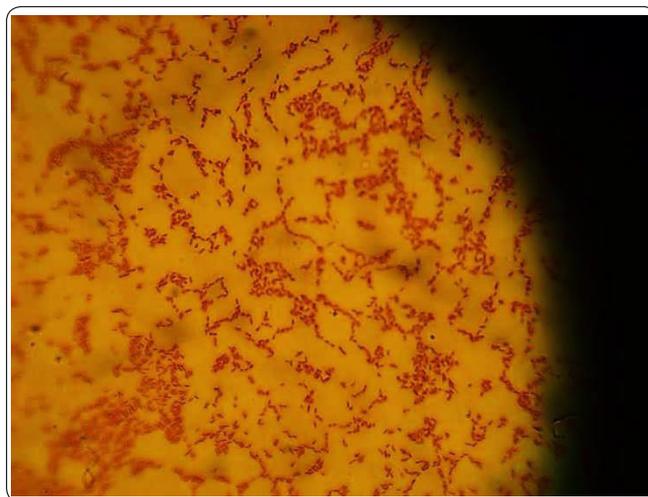


Figura 1. Bacilos Gram negativos del aislado ET1 (*Pantoea vagans*) de flores de Dalia. Aumento 100 X.

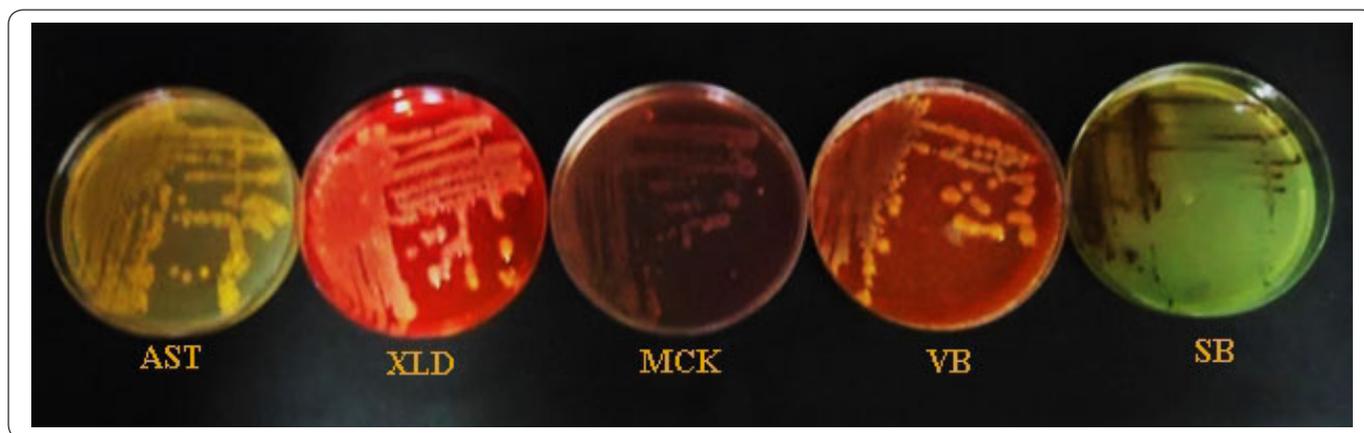


Figura 2. Crecimiento del aislado ET1 (*Pantoea vagans*) en diferentes medios de cultivo. Gelosa soya tripticaseína (AST), agar XLD, gelosa Mac Conkey (MCK), gelosa Verde Brillante (VB) y gelosa Sulfito de Bismuto (SB).

AISLADOS BACTERIANOS DE <i>Dahlia</i> sp.			
Medio de cultivo	Aislado ET1	<i>E. coli</i> *	<i>Salmonella</i> spp. *
Soya Trypticaseína	Colonias amarillas, circulares, rugosas, convexas, mucoides y húmedas.	-	-
Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)	Colonias circulares, amarillas, con halo transparente, convexas, mucoides, superficie lisa, brillante y húmeda.	Colonias grandes, amarillas con o sin precipitado de bilis.	Colonias de color rojo con el centro negro debido a la producción de H ₂ S.
Mac Conkey	Colonias rosas brillantes, convexas con bordes irregulares, superficie lisa y consistencia mucoide.	Colonias de color rosa a rojo con precipitado de sales biliares que rodea a las colonias	Colonias incoloras
Verde Brillante	Colonias grandes, circulares, convexas, amarillas con un pequeño halo amarillo consistencia mucoide, superficie lisa y brillante. Fermentadoras de la lactosa.	Amarillo-verdosas sobre fondo amarillento Crecimiento entre nulo y moderado, colonias entre amarillas y amarillas verdosas, halo amarillo	Colonias pequeñas, incoloras, rosadas o fucsias, transparentes u opacas, sobre el medio coloreado de rosado a rojo
Sulfito de Bismuto	Colonias negras circulares convexas con brillo metálico y superficie rugosa	Crecimiento inhibido o colonias verdes	Colonias marrones o negras, algunas veces con brillo metálico alrededor de las colonias. Algunas cepas producen colonias verdes con poco o ningún oscurecimiento.

*Manual of Clinical Microbiology. (1991). 5a Edición, American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Tabla I. Características morfológicas en medios de cultivo selectivos y diferenciales del aislado ET1 de flores de *Dahlia* sp. y características típicas de los microorganismos en los medios de cultivo utilizados.

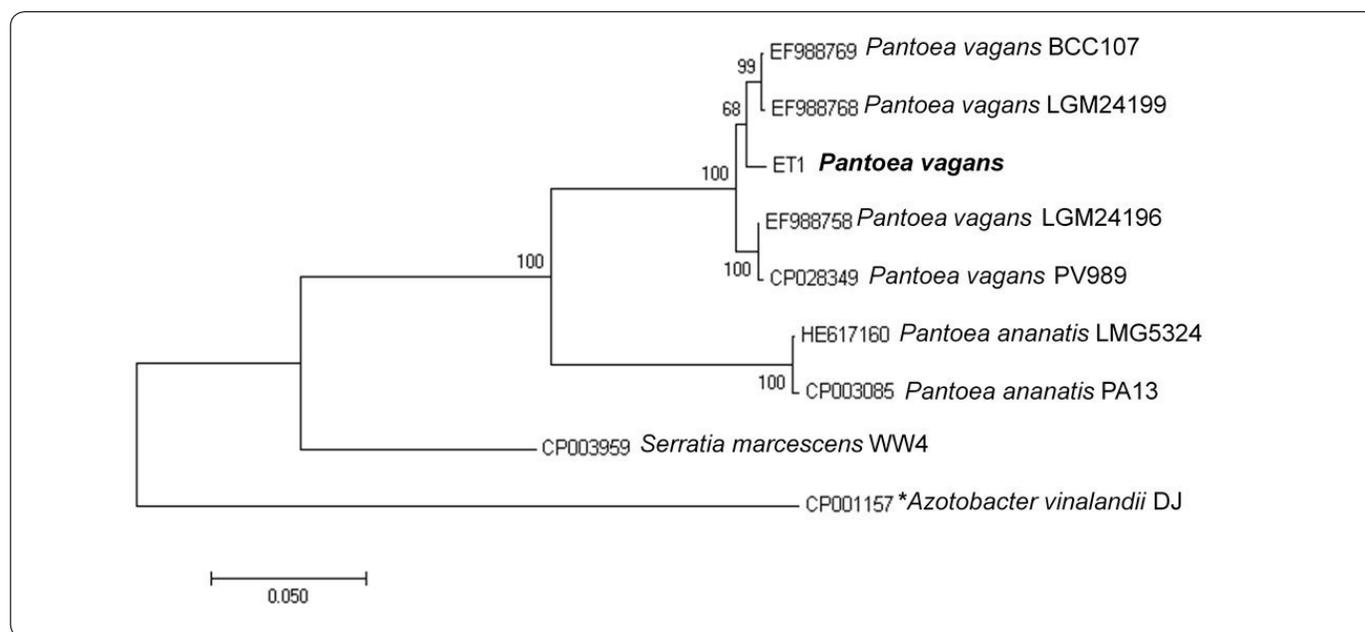


Figura 3. Árbol filogenético utilizando la secuencia del gen DNA girasa (*gyrB*) de secuencias bacterianas obtenidas de la base de datos *Gen Bank* y de la bacteria aislada (*P. vagans*, ET1) de flores de *Dahlia* sp. La bacteria *Azotobacter vinelandii* DJ (*) se incluyó como clado externo. El árbol fue construido usando el método *Neighbor-Join*. El número en los nodos indica el valor del porcentaje *bootstrap* basado en 1,000 réplicas. La escala bajo el árbol filogenético indica el número de sustituciones por posición de los nucleótidos.

son útiles a las bacterias para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes. Éstos pueden o no estar presentes en la célula bacteriana y por tanto son en parte responsables de la inestabilidad fenotípica. Tomando en cuenta la amplia diversidad fenotípica y genotípica que presentan las bacterias, es necesario realizar la identificación no sólo cultural y bioquímica, sino que también se debe recurrir a métodos

moleculares (basados en la secuenciación genética) que hagan más robusta la identificación de este tipo de microorganismos.

Por otro lado, respecto al microorganismo aislado e identificado en este trabajo, *P. vagans*, pertenece a la Clase de las Proteobacterias Gamma (γ). Anteriormente, se consideraba dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo,

Prueba bioquímica	RESULTADOS		
	Aislado ET1	<i>E. coli</i> *	<i>Salmonella spp.</i> *
Arabinosa	Positivo	Variable	Positivo
Manosa	Positivo	Positivo	Positivo
Sacarosa	Negativo	Negativo	Negativo
Melibiosa	Positivo	Positivo	Positivo
Ramnosa	Positivo	Positivo	Positivo
Sorbitol	Negativo	Positivo	Positivo
Manitol	Positivo	Positivo	Positivo
Adonitol	Negativo	Negativo	Negativo
Galactosa	Positivo	Positivo	Positivo
Inositol	Negativo	Negativo	Negativo
p-n-p-fosfato	Positivo	Variable	Negativo
p-n-p α - β -glucósido	Positivo	Negativo	Negativo
p-n-p- β -galactósido	Positivo	Positivo	Negativo
Prolinenitroanilide	Negativo	Negativo	Negativo
p-n-p bis-fosfato	Positivo	Variable	Positivo
Prueba Bioquímica	Aislados de Flores de Dalia	<i>E. coli</i> *	<i>Salmonella spp.</i> *
p-n-p-xilósido	Negativo	Negativo	Negativo
p-n-p- α -arabinósido	Positivo	(Negativo) ^p	Negativo
p-n-p-fosforilcolina	Negativo	Negativo	Negativo
p-n-p- β -glucurónido	Negativo	Positivo	Positivo
p-n-p-N-acetil glucosaminida	Positivo	Negativo	Negativo
γ -L-glutamil p-nitroanilida	Positivo	Negativo	Positivo
Esculina	Positivo	Negativo	Negativo
p-nitro-DL-fenilalanina	Positivo	Negativo	Negativo
Urea	Negativo	Negativo	Negativo
Glicina	Negativo	Negativo	Negativo
Citrato	Positivo	Negativo	Positivo
Ácido Malónico	Positivo	Negativo	Negativo
Cloruro trifeniltetrazolium	Positivo	(Positivo) ^p	Positivo
Arginina	Positivo	Variable	Positivo
Lisina	Positivo	Positivo	Positivo

*Manual of Clinical Microbiology. (1991). 5a Edición, American Society for Microbiology, Washington, D. C. ^pResultado más común.

Tabla II. Pruebas bioquímicas para la identificación del aislado ET1 de *Dahlia*.

recientemente, ha sido propuesta como un grupo separado del clado *Klebsiella*, en el clado *Erwinia-Pantoea* y dentro de un orden nuevo denominado *Enterobacterales* (Adeolu et al., 2016; Alnajjar & Gupta, 2017).

P. vagans, es aislada de diversas áreas geográficas y fuentes ecológicas como plantas, semillas, agua, humanos y suelo (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger & Winn, 1997). *Pantoea vagans* (syn. *Pantoea agglomerans*, *Erwinia herbicola*) (Leonila et al., 2017) es una bacteria epífita común en plantas. La cepa C9-1, aislada de manzana *Malus domestica* 'Jonathan' (Michigan) (Ishimaru, Klos & Brubaker, 1988) está registrada como *Blight Ban C9-1* (Nufarms America Inc., Burr Ridge, IL), para biocontrol del fuego bacteriano causado por la enterobacteria *Erwinia amylovora*. Sin embargo, a pesar de no ser una bacteria patógena como tal, algunos aislados han sido señalados como patógenos tumorigénicos (Grimont & Grimont, 2005; Weinthal et al., 2007). Como un patógeno oportunista en humanos, *P. agglomerans* puede ocurrir esporádicamente o en brotes. A principios de los años 1970, fue implicada en un brote de septicemia significativo en EE. UU. y Canadá, causado por cierres contaminados en las botellas de líquidos de infusión, donde 25 hospitales estuvieron involucrados, con 378 casos señalados (Maki et al., 1976). Koo y colaboradores (2006), en un estudio señalaron un total de 22 aislados de cepas de *Pantoea*, como agentes inusuales y causantes de infecciones clínicas. Las cepas fueron aisladas de cultivos sanguíneos de 9 pacientes, y un aislamiento del oído de un paciente, en el plazo de un mes en un hospital de tercer nivel. Considerando esta información, este hallazgo es de suma importancia debido a que las flores de *Dalia* se pueden consumir. Se sugiere monitorear la presencia de este microorganismo y eliminarlo, ya que puede representar un factor de riesgo para la salud humana.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos el microorganismo aislado de flores de *Dalia* fue *Pantoea vagans* (Número de acceso CP002206). Con la consulta a la literatura realizada, este es el primer informe del aislamiento de *P. vagans* de flores de *Dalia* con fines de florifagia. Es importante que, en la floricultura, los productores que las cultivan con fines alimenticios sigan las buenas prácticas de higiene para garantizar la inocuidad microbiológica de sus productos. Debido a que la flor de *Dalia* está destinada al consumo como alimento, es necesario buscar alternativas de compuestos antimicrobianos contra *P. vagans* para que éstas sean inocuas para el consumidor o bien no causen problemas de sanidad vegetal en la flor.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número de registro de 46565 y el

Instituto Politécnico Nacional (IPN) por medio del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) número de proyecto SIP: 20131176.

REFERENCIAS

- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S. & Gupta, S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacterales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**, 5575-5599. <https://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I. & Sant' Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, **73**, 177-208. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>.
- Alnajjar, S. & Gupta, R. S. (2017). Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infection Genetics and Evolution*, **54**, 108 -127. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.024>.
- Anan'ina, N. A., Andreeva, O. A., Mycots, L. P. & Oganessian, E. T. (2009). Standardization of inulin extracted from *Dahlia* single tubers and some physicochemical properties of inulin. *Pharmacology Chemistry Journal*, **43**, 157-159. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0261-8>.
- Balows, A. (1991). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P. & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, **12**, 2385-2397. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x.
- Bye, R. & Linares, E. (2008). La *dalia*, flor nacional de México. CONABIO. *Biodiversitas*, **76**, 13-15.
- Diario Oficial de la Federación de México (DOF), (1999). Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Secretaría de salud. Segunda Edición; México, D. F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rcsps.html>.
- Díaz-López, K. A. (2017). Usos gastronómicos de la planta *Dalia* (*Dahlia* spp.). Tesis de Licenciatura en Gastronomía. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. (pp. 1-97).
- Gibson, G. R. & Beatty, E. R. (1995). Selective fermentation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, **108**, 975-982.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept

- of prebiotics. *Journal of Nutrition*, **125**, 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.
- Grimont, P.A.D. & Grimont, F. (2005). Genus *Pantoea*. En: Brenner D. J., Krieg, N. R., Staley J. T. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria*. (pp. 713–720) Nueva York: Springer- Verlag.
- Guentzel, M. N. (1996). *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*, and *Proteus*. En: Baron, S. (Ed). *Medical Microbiology*. EE. UU: Churchill Livingstone.
- Huebner, J., Wehling, R. L. & Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, **17**, 770-775. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006>.
- Ishimaru, C. A., Klos, E. J. & Brubaker, R. R. (1988). Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, **78**, 746–750. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n06_746.PDF.
- Jiménez-Mariña, L. (2015). El cultivo de la Dalia. *Cultivos Tropicales*, **36**, 107-115. <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193237111014.pdf>.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. & Winn, W. C. (1997). The Enterobacteriaceae. En: Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. (Ed.). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. (171-252) Filadelfia: Lippincott-Raven.
- Koo, H.-S., Kim, J.-S., Eom, J.-S., You, J.-Y., Park, J.-Y., Kim, H.-S., Song, W., Cho, H.C. & Lee, K. M. (2006). Pseudo outbreak of *Pantoea* species bacteremia associated with contaminated cotton pledgets. *American Journal of Infection Control*, **34**, 443-446. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.07.001>.
- Lara-Cortés, E., Martín-Belloso, O., Osorio-Díaz, P., Barrera-Necha, L. L., Sánchez-López, J. A. & Bautista-Baños, S. (2014). Actividad antioxidante, composición nutrimental y funcional de flores comestibles de Dalia. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **20**, 101-116.
- Leonila, M. L. A., Vilar, J. C., Barbosa da Silveira, A., Gomes de Almeida, F. C., de Lima e Silva, T. A. & de Campos-Takaki, G. M. (2017). Isolation, Identification, Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of *Pantoea agglomerans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **6**, 4152-4163. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.611.487>.
- López, V. L., Romero, R. J. & Ureta, V.F. (2001). Tratamientos de desinfección de lechugas (*Lactuca sativa*) y frutillas (*Fragaria chiloensis*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **51**, 376-381.
- Marchetti, R., Casadei, M. A. & Guerzoni, M. E. (1992). Microbial population dynamics in ready-to-use vegetables salads. *Italian Journal of Food Science*, **2**, 97–108.
- Maki, D. G., Rhame, F. S., Mackel, D.C. & Bennett, J. V. (1976). Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products. Epidemiologic and clinical features. *The American Journal of Medicine*, **60**, 471–485.
- Membre, J. M., Goubet, D. & Kubaczka, M. (1995). Influence of salad constituents on growth of *Pseudomonas marginalis*: a predictive microbiology approach. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 603–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb00943.x>.
- Mera Ovando, L. M. & Boettler, R. B. (2006). La *Dahlia* una belleza originaria de México. *Revista Digital Universitaria*, **7**, 1-11. [On-line] <http://www.revista.unam.mx/vol.7/num11/art90/int90.htm>.
- Miceli, A. & Settanni, L. (2019). Influence of agronomic practices and pre-harvest conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables. *Annals of Microbiology*, **69**, 185-199.
- Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. 1994; México, D. F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>.
- Pachón-Cubillos, D. A. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y Testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de Biología Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio-Meta. Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, D.C. (pp. 1-115). <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis198.pdf>.
- Puerta-García, A. & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, **10**, 3426-3431. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf.
- Santana Legorreta, S., Villanueva-Carvajal, A., Morales-Rosales, E. J., Laguna-Cerda, A. & Domínguez-López, A. (2016). Extracción y evaluación de inulina a partir de dalias silvestres mexicanas (*Dahlia coccinea* Cav.). *Revista Internacional de Botánica Experimental*, **85**, 63-70. [On-line].
- Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D. & Bottger, E. C. (1996). Two laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 296-303. [On-line] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228786/pdf/340296.pdf>.
- Toledo Hernández, E. (2013). Identificación, caracterización y evaluación de *Rizobacterias* para el control de hongos fitopatógenos de semillas de *Jatropha curcas* L. Tesis de maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos- Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México. (pp. 1-106)
- Weinthal, D. M., Barash, I., Panijel, M., Valinsky, L., Gaba, V. & Manulis- Sasson, S. (2007). Distribution and replication of the pathogenicity plasmid pPATH in diverse populations of the gall-forming bacterium *Pantoea agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 7552–7561. DOI: 10.1128/AEM.01511-07.