



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**“Análisis metagenómico para la detección de bacterias
fitopatógenas en chile molido (*Capsicum* spp.) de diversas
regiones geográficas de México”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

Presenta

Ing. Mayra Paola Mena Navarro

Dirigido por:

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024

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



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

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

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

Bajo los siguientes términos:



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



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



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

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

Avisos:

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

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



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

“Análisis metagenómico para la detección de bacterias fitopatógenas en chile molido (*Capsicum* spp.) de diversas regiones geográficas de México”

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

Presenta

Ing. Mayra Paola Mena Navarro

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

**Dr. Juan Campos Guillén
Presidente**

**Dr. Miguel Angel Ramos López
Secretario**

**Dr. Victor Pérez Moreno
Vocal**

**Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Suplente**

**M. En C. Erika Beatriz Álvarez Hidalgo
Suplente**

**Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio, 2024
México**

Dedicatorias

A mis padres, cuya sabiduría, amor incondicional y apoyo incansable me han guiado a lo largo de este camino académico. Gracias por creer en mí incluso en los momentos en que yo misma dudaba.

A mis hermanas, por ser mis confidentes y mi fuente constante de inspiración. Su fuerza, alegría y amor han sido un pilar fundamental en mi vida. Gracias por siempre estar ahí, en las buenas y en las malas.

A mi novio, por ser mi roca y mi refugio. Tu paciencia, comprensión y palabras de aliento han sido fundamentales para la culminación de este proyecto.

A mis amigos, por su constante ánimo y por recordarme que siempre hay tiempo para una buena conversación y una risa, incluso en los momentos más estresantes.

A mis profesores y mentores, por compartir su conocimiento y por inspirarme a alcanzar nuevos horizontes. Sus enseñanzas han dejado una huella imborrable en mi vida profesional y personal.

Finalmente, a todos aquellos que, de una manera u otra, contribuyeron a que este sueño se hiciera realidad. Este logro es tanto mío como suyo.

Con gratitud y cariño.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación no habría sido posible sin la colaboración y apoyo de muchas personas y organizaciones. Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que, de alguna manera, contribuyeron a la realización de esta tesis.

En primer lugar, agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Juan Campos Guillen por su invaluable orientación, paciencia y dedicación. Sus comentarios constructivos y su conocimiento experto han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Agradezco también a mis profesores y compañeros del programa de maestría por sus enseñanzas y por los enriquecedores aportes que hicieron a mi trabajo. Su apoyo hizo de esta experiencia algo verdaderamente especial.

A mis padres Jairo y Mayra, por su amor incondicional y su constante aliento. Su confianza en mí me ha dado la fortaleza necesaria para superar los desafíos a lo largo de este proceso. A mis hermanas, Lis, Monse y Vale, por su amor incondicional y su apoyo constante. Sus palabras de ánimo y su fe en mí me han motivado a seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles.

A mi novio, Jesús, por su comprensión y apoyo emocional durante los momentos más difíciles. Gracias por estar siempre a mi lado y por siempre sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles. A mis amigos, por su paciencia, motivación y por los momentos de distracción que tanto necesitaba. Sus palabras de ánimo han sido esenciales para mantenerme enfocada y positiva.

En particular, agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Química y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Generalidades de chile (<i>Capsicum</i> spp.)	14
2.1.1. Importancia del chile a nivel mundial.	15
2.1.2. Importancia del chile en México	16
2.2. Proceso de deshidratación del chile	17
2.3. Calidad microbiológica.	19
2.4. Diversidad microbiológica en chile (<i>Capsicum</i> spp.)	21
2.5. Normas microbiológicas para chile molido.	23
2.6. Bacterias fitopatógenas.	24
2.6.1. Bacterias fitopatógenas de chile (<i>Capsicum</i> spp.)	25
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo general	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. METODOLOGÍA	29
4.1. Selección y descripción de muestras	29
4.2. Análisis del bacterioma	30
4.3. Determinación del contenido de bacterias mesófilas aerobias, bacterias esporuladas y Enterobacterias.	31
4.4. Aislamiento y capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en fruto de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.)	32
4.5. Secuenciación del genoma, identificación de genes y taxonomía.	34
4.6. Análisis estadístico.	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Selección y descripción de las muestras	35
5.2. Obtención de ADN	35

5.3. Análisis de la diversidad bacteriana en muestras de chile molido	38
5.4. Detección de genes de resistencia antibiótica (ARG).....	46
5.6. Aislamiento y capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en fruto	51
5.7. Evaluación de la capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en plantas.	52
5.8. Caracterización genómica de <i>Pectobacterium aroidearum</i> SM2	54
5.9. Caracterización genómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Ch1-39.....	60
5.10. Caracterización genómica de <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> Ch9-16.....	68
5.11. Caracterización genómica de <i>Mixta gaviniae</i> Ch1-5.....	75
<i>Discusión</i>	83
<i>Conclusiones</i>	93
<i>REFERENCIAS</i>	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras obtenidas de Chile molido de diferentes regiones geográficas de México.....	29
Tabla 2. Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias, Esporuladas y Enterobacterias.	37
Tabla 3. Características de las secuencias por muestra.	38
Tabla 4. Principales características del genoma de <i>P. aroidearum</i> SM2.	54
Tabla 5. Genes de resistencia antibiótica de <i>P. aroidearum</i> SM2 clasificados por su mecanismo AMR.....	58
Tabla 6. Genes de virulencia de <i>P. aroidearum</i> SM2 aislados en la plataforma Bv-BRC.	59
Tabla 7. Principales características del genoma de <i>K. pneumoniae</i> Ch1-39.	61
Tabla 8. Genes de resistencia antibiótica de <i>K. pneumoniae</i> Ch1-39 clasificados por su mecanismo AMR.....	65
Tabla 9. Genes relacionados con la virulencia en <i>K. pneumoniae</i> Ch1-39 predichos por VFDB.	66
Tabla 10. Principales características del genoma de <i>P. psychrotolerans</i> Ch9-16.	69
Tabla 11. Genes de resistencia antibiótica de <i>P. psychrotolerans</i> Ch9-16 clasificados por su mecanismo AMR.	73
Tabla 12. Genes relacionados con la virulencia en <i>P. psychrotolerans</i> Ch9-16 predichos por VFDB.....	73
Tabla 13. Principales características del genoma de <i>M. gaviniae</i> Ch1-5.	76
Tabla 14. Genes de resistencia antibiótica de <i>M. gaviniae</i> Ch1-5 clasificados por su mecanismo AMR.....	80
Tabla 15. Genes relacionados con la virulencia en <i>M. gaviniae</i> Ch1-5 identificados por VFDB.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de chiles pertenecientes a las especies <i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i>	15
Figura 2. Secado tradicional al aire. Se realiza en las llamadas "paseras".	18
Figura 3. Síntomas de enfermedades en <i>Capsicum</i> spp.	27
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de extracción de ADN.	36
Figura 5. Composición taxonómica en quince muestras de chile molido.	40
Figura 6. Composición taxonómica bacteriana en muestras de chile en polvo.	44
Figura 7. Gráficos de diversidad alfa y beta para visualizar la diferencia de composición bacteriana en muestras de chile molido.	45
Figura 8. Distribución de bacterias patógenas en muestras de chile en polvo.	46
Figura 9. Abundancia relativa de clases de resistencia a los antibióticos.	47
Figura 10. Heatmap de 15 muestras de chile molido de diferentes regiones geográficas de México.	50
Figura 11. Evaluación de capacidad infectiva de aislados bacterianos en jitomate y chile serrano.	52
Figura 12. Evaluación de la capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en plantas.	53
Figura 13. Mapa genómico circular e información de subsistemas para <i>P. aroidearum</i> SM2.	56
Figura 14. Recuento de subsistemas por categoría.	57
Figura 15. Análisis filogenético de <i>P. aroidearum</i> SM2.	60
Figura 16. Mapa genómico circular e información de subsistemas para <i>K. pneumoniae</i> Ch1-39.	63
Figura 17. Recuento de subsistemas por categoría.	64
Figura 18. Análisis filogenético de <i>K. pneumoniae</i> Ch1-39.	68
Figura 19. Mapa genómico circular e información de subsistemas para <i>P. psychrotolerans</i> Ch9-16.	71
Figura 20. Recuento de subsistemas por categoría.	72
Figura 21. Análisis filogenético de <i>P. psychrotolerans</i> Ch9-16.	75
Figura 22. Mapa genómico circular e información de subsistemas para <i>M. gaviniae</i> Ch1-5.	78
Figura 23. Recuento de subsistemas por categoría.	79
Figura 24. Análisis filogenético de <i>M. gaviniae</i> Ch1-5.	82

RESUMEN

El chile molido alberga una gran diversidad de bacterias, por tal motivo ha surgido un gran interés por investigar la presencia de bacterias patógenas que podrían propagarse a través de este producto, representando así un riesgo para la salud pública y el ambiente. La evaluación de la diversidad bacteriana, la detección de fitopatógenos e identificación de genes de resistencia antibiótica y virulencia es esencial para lograr un control efectivo. En este sentido, se evaluó la diversidad bacteriana en 15 muestras de chile molido de diferentes regiones geográficas de México, así como la detección de genes de resistencia antibiótica. Las familias bacterianas más representativas en las muestras fueron Bacillaceae y Enterobacteriaceae, en las cuales se detectaron 18 especies potencialmente asociadas a patógenos. En total, el perfil de resistoma del chile en polvo contenía 68 genes únicos, que conferían resistencia a los antibióticos distribuidos en 13 clases diferentes. Posteriormente, se aislaron 420 bacterias y se evaluó su capacidad infectiva en frutos y plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum*). Se seleccionaron cuatro aislados (SM2, Ch1-5, Ch1-39 y Ch9-16) que presentaron síntomas más pronunciados de infectividad, como podredumbre blanda y necrosis, los cuales, se secuenciaron e identificaron las siguientes especies: *Pectobacterium aroidearum* (SM2), *Mixta gaviniae* (Ch1-5), *Klebsiella pneumoniae* (Ch1-39) y *Pseudomonas psychrotolerans* (Ch9-16), las cuales han sido reportadas anteriormente como bacterias fitopatógenas. Este estudio demuestra la importancia de la detección de bacterias fitopatógenas y su análisis genético a través de la detección de genes de resistencia a antibióticos y virulencia, así mismo revela la necesidad de continuar monitoreando este producto para prevenir la dispersión de bacterias potencialmente patógenas y disminuir riesgos ambientales.

Palabras clave: Chile molido, *Capsicum* spp., Fitopatógenos, Genes de resistencia antibiótica, Genes de virulencia

ABSTRACT


Chili powder harbors a wide diversity of bacteria, which has led to a significant interest in investigating the presence of pathogenic bacteria that could spread through this product, thus posing a risk to public health and the environment. Evaluating bacterial diversity, detecting phytopathogens, and identifying antibiotic resistance and virulence genes are essential for effective control. In this regard, bacterial diversity was assessed in 15 samples of chili powder from different geographical regions of Mexico, along with the detection of antibiotic resistance genes. The most representative bacterial families in the samples were Bacillaceae and Enterobacteriaceae, in which 18 species potentially associated with pathogens were detected. In total, the resistome profile of chili powder contained 68 unique genes, conferring resistance to antibiotics distributed across 13 different classes. Subsequently, 420 bacteria were isolated and their infective capacity was evaluated in chili (*Capsicum annuum* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits and plants. Four isolates (SM2, Ch1-5, Ch1-39, and Ch9-16) that showed more pronounced symptoms of infectivity, such as soft rot and necrosis, were selected. The following species were sequenced and identified: *Pectobacterium aroidearum* (SM2), *Mixta gaviniae* (Ch1-5), *Klebsiella pneumoniae* (Ch1-39), and *Pseudomonas psychrotolerans* (Ch9-16), all of which have been previously reported as phytopathogenic bacteria. This study demonstrates the importance of detecting phytopathogenic bacteria and their genetic analysis through the detection of antibiotic resistance and virulence genes. It also highlights the need for ongoing monitoring of this product to prevent the spread of potentially pathogenic bacteria and to reduce environmental risks.

Keywords: Chili powder, *Capsicum* spp., Phytopathogens, Antibiotic resistance genes, Virulence genes

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual declaro y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes, positioned above the printed name.

Mayra Paola Mena Navarro

1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum* spp.) tiene una amplia distribución global y presenta una notable diversidad en formas, tamaños, colores y niveles de picor o pungencia. Se encuentra entre los productos más cultivados en el mundo, con una producción de 34.5 millones de toneladas (MT) de chile fresco y 3.9 MT de chile seco. México ocupa el segundo lugar en producción mundial de chile, gracias a su cultivo extendido por todo el país y a su gran variedad de especies, lo que representa tan solo para una variedad (*Capsicum annuum* var. Serrano) una producción de 34 mil 012 millones de pesos. Además de su presencia en la dieta cotidiana de los mexicanos, el cultivo del chile es crucial por su contribución al valor de la producción agrícola en las regiones involucradas, así como por los ingresos competitivos que genera para los productores.

Los productos derivados del chile son diversos, como el chile molido que por su gran variedad se utilizan no solo para consumo directo, sino también en la producción de colorantes, cosméticos, entre otros usos. La obtención del chile molido implica un proceso de deshidratación y molienda, lo que resulta en una amplia gama de variedades, similar a la diversidad de chiles frescos. Sin embargo, este proceso de elaboración puede exponer al chile molido a contaminación por diversos factores ambientales, lo que puede dar lugar a la presencia de una gran variedad de bacterias. Estas bacterias, debido a su capacidad metabólica y resistencia a distintos factores ambientales, pueden dispersarse a través del chile molido.

Los cultivos de chile enfrentan una seria amenaza debido a la presencia de fitopatógenos, organismos que causan enfermedades en las plantas y provocan pérdidas económicas considerables. Las bacterias fitopatógenas son particularmente problemáticas, ya que pueden atacar las plantas en todas las etapas de su ciclo de vida, desde la germinación hasta la postcosecha. Este constante asedio genera complicaciones en la siembra y el cultivo del chile, pues el control de estas bacterias implica un incremento en los costos de producción, lo cual

se traduce en pérdidas tanto económicas como biológicas para los agricultores. La necesidad de detectar y controlar eficazmente las bacterias fitopatógenas es urgente, ya que su presencia representa una seria amenaza para el desarrollo agrícola y económico, afectando no solo la producción de Chile, sino también la seguridad alimentaria y la estabilidad financiera de las comunidades agrícolas.

Las bacterias fitopatógenas tienen genes de virulencia y resistencia antibiótica que les confieren esta capacidad de causar daño a las plantas, por lo tanto, la detección de estos genes es esencial para el control eficaz de enfermedades en plantas. Identificar estos genes proporciona una base crucial para desarrollar estrategias de control precisas. La identificación de genes de virulencia permite comprender cómo los fitopatógenos causan daño a los frutos y plantas, facilitando así el desarrollo de estrategias de control específicas. Del mismo modo, la identificación de genes de resistencia antibiótica ayuda a anticipar y abordar problemas de resistencia a los fungicidas o antibióticos utilizados en la agricultura, permitiendo una planificación estratégica de manejo que minimizan el riesgo de desarrollo de resistencia. Con la detección de estos genes, es posible diseñar estrategias de manejo integrado de plagas que incluyan métodos biológicos y químicos para controlar la propagación de los fitopatógenos, así como implementar prácticas agrícolas más sostenibles y eficientes para prevenir la potenciación de resistencia y minimizar el uso de antibióticos. Además, al comprender los mecanismos moleculares de virulencia y resistencia, los agricultores pueden implementar medidas preventivas y de control que reduzcan las pérdidas económicas asociadas con enfermedades de plantas, y también permite un manejo más selectivo y sostenible de los fitopatógenos, reduciendo así la necesidad de productos químicos y disminuyendo el impacto ambiental asociado.

Por esta razón, los estándares internacionales para la detección de fitopatógenos se están volviendo cada vez más rigurosos, especialmente para productos como el Chile, que se comercializa tanto en su forma fresca como seca o molida. Sin embargo, en México, las condiciones socioeconómicas, las limitaciones

tecnológicas y la falta de apoyo gubernamental y financiero han llevado a que el chile molido no cumpla con los estándares internacionales de inocuidad. Esta situación se ve agravada por la escasa investigación en la detección de fitopatógenos en este tipo de productos. Diversos estudios han demostrado que el chile molido contiene una gran diversidad de bacterias, lo cual demuestra la importancia de realizar un estudio de su caracterización ya que se han encontrado diferencias entre las muestras analizadas procedentes de distintas regiones y que presumiblemente involucran diferentes factores ambientales, sin embargo, no evaluaron o existe poca información si alguna especie de estos grupos bacterianos tiene capacidad fitopatogénica.

En este estudio, se examinó la diversidad bacteriana en 15 muestras de chile molido de diferentes regiones de México. Las familias bacterianas más comunes en las muestras fueron Bacillaceae y Enterobacteriaceae, en las que se identificaron 18 especies posiblemente relacionadas con patógenos. El perfil de resistoma del chile en polvo incluyó un total de 68 genes únicos, que otorgan resistencia a los antibióticos pertenecientes a 13 clases diferentes. Entre las principales clases de genes de resistencia a los antibióticos con gran abundancia en casi todas las muestras se encontraban los relacionados con la resistencia a multifarmacos, tetraciclinas, betalactámicos, aminoglucósidos y fenicol. Posteriormente, se aislaron 420 bacterias y se evaluó su capacidad para infectar frutos y plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum*), en los cuales se encontró capacidad infectiva únicamente en fruto. Se seleccionaron cuatro aislados (SM2, Ch1-5, Ch1-39 y Ch9-16) que mostraron síntomas más evidentes de infectividad, como podredumbre blanda, necrosis y clorosis, en un periodo de tiempo más corto, de los cuales, se determinaron que pertenecen a los géneros *Pectobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Mixta*. Las especies identificadas mediante secuenciación fueron: *Pectobacterium aroidearum* (SM2), *Mixta gaviniae* (Ch1-5), *Klebsiella pneumoniae* (Ch1-39) y *Pseudomonas psychrotolerans* (Ch9-16), todas previamente reportadas como bacterias fitopatógenas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de chile (*Capsicum* spp.).

El género *Capsicum* spp. por su nombre o conocido como chile, está ampliamente distribuido en todo el mundo, presentando una gran diversidad de formas, tamaños, colores y niveles de picor o pungencia, como se muestra en la Figura 1 (Laborde & Pozo, 1982). Perteneciente a la familia de las Solanáceas, del cual se tiene registro de al menos 31 especies; entre las más importantes económicamente son: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*. Los chiles son clasificados en dos grupos: Frutas largas y carnosas que pertenecen a la variedad de *Capsicum annuum* y Frutas pequeñas que pertenecen a la variedad de *Capsicum minimum*. (Aguilar-Rincón et al., 2010).

El *Capsicum* está compuesto principalmente por agua, con un promedio del 74.3%, 2.3% de proteínas y 15.8% de carbohidratos; además, contiene vitaminas y minerales (Montes et al., 2004). Su cultivo requiere temperaturas templadas y cálidas, por lo cual, bajo condiciones adecuadas, la planta mide entre 30 y 80 cm de altura y el fruto puede llegar a presentar diferentes características como; el color rojo, anaranjado, verde, blanco o purpúreo, de acuerdo con el grado de madurez y dulce o picante, según el estímulo gustativo que provoca. Debido a la gran cantidad de semillas y venas, donde se concentra la capsaicina, la sustancia responsable del picor (SADER, 2021). Entre estas especies, *C. annuum* destaca por su amplia diversidad de variedades, que se han adaptado a diversos climas y tipos de suelo, facilitando su distribución de manera exitosa en muchos países (Baenas et al., 2019).



Figura 1. Diferentes tipos de chiles pertenecientes a las especies *C. annuum* y *C. chinense*.
(Tripodi & Kumar, 2019)

2.1.1. Importancia del chile a nivel mundial.

El cultivo del chile (*Capsicum* spp.) se dispersó por gran parte del mundo durante la época colonial, convirtiéndose con el tiempo en uno de los elementos más importantes de la cocina global. Hoy en día, existe una amplia diversidad de chiles, que han pasado a ser parte integral de las costumbres y tradiciones de diversas regiones. Por ejemplo, en el sureste asiático, el cultivo de chiles picantes y muy picantes es distintivo. La paprika, una variante del chile, es considerada el ingrediente más característico de la cocina húngara, especialmente en Szeged, al sur del país. Asimismo, en la cocina española, el chile confiere una identidad regional, con dos denominaciones reconocidas: “Pimentón de la Vera” en Cáceres y “Pimentón de Murcia” en Murcia (Aguilar-Rincón et al., 2010).

Dentro de las especies cultivadas, *Capsicum annuum* es la más ampliamente conocida y de mayor importancia económica, con una distribución global (Pickersgill

B., 1969). Su producción alcanza los 34.5 millones de toneladas (MT) de chile fresco y 3.9 MT de chile seco. Los principales productores de chile fresco son China (17.5 MT), México (2.7 MT), Indonesia (2.0 MT) y España (1.1 MT), mientras que India es el mayor productor de chiles secos (1.4 MT) (FAOSTAT, 2022).

El chile se utiliza en una variedad de productos industriales, como oleorresinas y otros extractos enriquecidos. Uno de los productos más importantes es el chile molido o chile en polvo, uno de estos productos conocido como paprika, del cual el 70% de su producción se usa como condimento en productos cárnicos, sopas, salsas y aperitivos. Dentro de sus utilidades también se encuentra en la fabricación de colorantes, maquillaje y productos de higiene personal. La oferta mundial total de chile en polvo es de aproximadamente 60,000 toneladas por año (Buckenhüskes, 2003).

2.1.2. Importancia del chile en México.

México es el país que presenta la mayor diversidad de formas cultivadas y silvestres de *Capsicum* spp., distribuidas en todo el territorio. Esta diversidad se ha descrito basándose en la clasificación comercial de los frutos, agrupados en diversos tipos de chile. Entre las más de 100 variedades disponibles, se clasifican en 25 grupos de chiles verdes y 10 de chiles secos, destacando variedades como el jalapeño, poblano y serrano, así como los considerados dulces, como el morrón (SADER., 2021).

En el 2020 la producción de chile verde aumentó un 2.7%, con un total de tres millones 324 mil 260 toneladas, consolidando a México como el segundo productor mundial y aumentando su aceptación en los mercados internacionales. Según cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), el valor de la producción en 2020 fue de 34 mil 012 millones de pesos, un incremento del 3.8% respecto a los 32 mil 762 millones de pesos del año anterior (SADER., 2021).

Además del impacto que representa el consumo diario del mexicano, el cultivo es importante por el valor que aporta a la producción agrícola de las regiones involucradas, generando ingresos competitivos para los productores y abarcando

aproximadamente 150 jornales por hectárea en zonas de riego. La creación de empleos refleja un impacto social positivo que trasciende (SIAP, 2010).

En el 2020 los estados principales de producción de chile verde fueron los siguientes; Chihuahua, en primer lugar, que cosechó 723 mil toneladas que generaron cinco mil 011 millones de pesos, lo que implicó un incremento de 18.5 %, respecto de 2019. También destaca Sinaloa, en segundo lugar, con 648 mil 222 toneladas; En tercer lugar, a nivel nacional se encuentra Zacatecas, con una producción de 458 mil 943 toneladas; y por último entre los estados mayor producción San Luis Potosí con 327 mil 124; Sonora, produciendo 223 mil 432 y Jalisco, con una producción de 189 mil 611 toneladas (SADER., 2021).

Pese a que México ocupa el segundo lugar a nivel mundial como productor de chile, importa alrededor de 30 mil toneladas, distribuidas por 41 países, de los cuales China actúa como el mayor proveedor importando una cantidad de 26 mil toneladas (SIAP, 2010).

2.2. Proceso de deshidratación del chile.

Primero, se obtiene el chile fresco, producido mediante un proceso que consta de varias etapas, las cuales se mencionan a continuación: pre-cosecha, cosecha, post-cosecha y venta al consumidor (Molina-Loya, 2012). Una vez obtenido el chile fresco, pasa al proceso de deshidratación el cual se puede realizar por diferentes métodos como lo son el secado tradicional en deshidratadoras, en terrenos con pendientes, hornos artesanales, etc. El secado tradicional de los frutos se realiza construyendo las llamadas “paseras” donde se tienden sobre paja los chiles maduros (Figura 2). Las paseras pueden ser de dos tipos, camas largas y angostas a las que se deja cierto declive para evitar la acumulación de humedad, o en micro túneles de plástico. Algunos productores realizan el secado en instalaciones llamadas deshidratadoras, donde utilizan calor generado con gas o combustóleo. (Aguilar-Rincón et al., 2010)

Solo por mencionar unos ejemplos; el secado del chile huacle se realiza en terrenos con pendientes mayores a 5%, se colocan los chiles maduros sobre camas de

piedra dejándolos a la acción directa de los rayos solares; para el chile pasilla el deshidratado del fruto es por medio de ahumado con leña de encino en hornos artesanales (Aguilar-Rincón et al., 2010). Posterior al deshidratado para el caso de chile molido, éste pasa por el proceso de molienda, el cual consiste en los siguientes pasos; Los chiles secos son triturados de manera preliminar para reducir su tamaño y facilitar el proceso de molienda. Esto se puede hacer con trituradores o molinos de martillos. Después, los chiles triturados son sometidos a un proceso de molienda fina utilizando molinos industriales. Estos molinos pueden ser de varios tipos, como molinos de rodillos, de piedras o de martillos, dependiendo de la finura deseada y del tipo de chile. Posteriormente, el chile molido es tamizado para asegurar una textura uniforme. Los tamices industriales separan las partículas de tamaño no deseado, que pueden ser recirculadas para una molienda adicional. Finalmente, En algunos casos, el chile molido puede ser mezclado con otros ingredientes, como sal, comino u otros tipos de chiles, para crear mezclas específicas de especias (Jyothirmayi et al., 2008).



Figura 2. Secado tradicional al aire. Se realiza en las llamadas "paseras" (Aguilar Rincón et al., 2010).

2.3. Calidad microbiológica.

Los vegetales y frutas pueden llegar a contaminarse con una gran diversidad de microorganismos, incluidos patógenos humanos y fitopatógenos, en cualquier etapa de la cadena de producción. Sin medidas de control adicional para reducir la contaminación, los patógenos pueden permanecer durante largos periodos (León et al., 2009).

En el caso específico de chile molido, para obtener las diversas variedades que ofrece nuestro país y el resto del mundo, el proceso de producción presenta una alta exposición a la contaminación. Organismos comensales, presentes originalmente en las plantas, pueden sobrevivir al proceso de secado y contribuir al aumento de enfermedades transmitidas por los alimentos (Hashem & Alamri, 2010). Además, el chile molido está expuesto a diversos contaminantes ambientales durante el procesamiento, como aguas residuales, suciedad, polvo, excrementos humanos y animales (Banerjee & Sarkar, 2003). La contaminación puede ocurrir debido al mal manejo durante el almacenamiento, distribución y procesamiento; estos factores contribuyen a la contaminación microbiana, y si los alimentos se consumen sin tratamiento, pueden ser potencialmente riesgosos (Hashem & Alamri, 2010).

En México las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Manejo (BPM), son sistemas que minimizan el riesgo de contaminación en el campo. Estas prácticas tienen como objetivo prevenir la contaminación de productos hortofrutícolas con microorganismos patógenos, sustancias tóxicas y materiales extraños, durante el crecimiento, cosecha, selección, embalaje, almacenado y transporte. Estos sistemas apoyan a los agricultores en la producción de alimentos inocuos, independientemente del país. A pesar de, la aplicación de estas recomendaciones, existen múltiples riesgos que pueden causar la contaminación de los alimentos. (SAGARPA, 2018).

Con el paso de los años, se ha detectado un aumento en el número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas. La información reportada

evidencia que es un problema que esta tomando mayor importancia. Los riesgos biológicos asociados a los productos hortícolas están asociados con malas prácticas de producción, algunos ejemplos de ello son: el uso de agua de riego contaminada, emplear desechos biológicos sólidos como fertilizante sin tratamiento o con un mal tratamiento, la existencia de animales en las áreas de cultivo, la cercanía a zonas de concentración de aguas de uso doméstico o sólidos orgánicos y una mala higiene de las instalaciones, entre otros (Puig-Peña et al., 2013).

Otro factor que aporta a la presencia de patógenos es la concentración de estos en suelo contaminado donde crece la hortaliza, aumenta la probabilidad de que el vegetal se encuentre contaminado en la etapa de cosecha. Del mismo modo, altas concentraciones de patógenos en el agua de riego resultarán en altas cargas de contaminación en el suelo, y, por ende, en la planta y vegetal (Doyle & Erickson, 2008). Los microorganismos patógenos pueden estar presentes de forma natural en el suelo, como *Listeria* spp., o ser incorporados mediante la adición de materia orgánica como fertilizante; estos pueden contaminar los cultivos directamente durante la lluvia o el riego (Nicholson et al., 2005).

Además, la calidad del agua en contacto con productos frescos determina el potencial de contaminación de patógenos. La fuente del agua de riego, su distribución y el tipo de riego utilizado son factores importantes que influyen en la contaminación de frutas y vegetales frescos (FDA, 2008). El estudio de Steele & Odumeru, (2004) demostró que el riesgo de transmisión de enfermedades por la presencia de microorganismos patógenos en el agua de riego depende del nivel de contaminación. El riesgo de contaminación de los vegetales vía agua de riego ha aumentado en el mundo, por el uso de agua residual no tratada, el cual, el uso de dicha agua ha aumentado en aproximadamente un 10% en los cultivos (UNESCO, 2003).

En México se elaboró un estudio en Yucatán, donde se evaluó la calidad microbiológica del fruto de chile habanero, en el cual se compararon dos sistemas de cultivo, el primero fue cultivado por el sistema tradicional y el segundo fue el cultivado por el sistema de hidroponía, ambos bajo condiciones de invernadero.

Donde, la calidad microbiológica del chile habanero fue mejor en el sistema hidropónico, donde se reportó una cantidad de mesófilos aerobios de 2.1×10^5 (UFC/g), mientras que el chile habanero cultivado en campo a cielo abierto, reportó una cantidad de mesófilos aerobios de 1.5×10^7 (UFC/g) (Lugo-Jiménez et al., 2010).

Los mesófilos aerobios son un tipo de microorganismos, específicamente bacterias, que crecen y se desarrollan mejor en condiciones moderadas de temperatura y en presencia de oxígeno. Estos microorganismos se encuentran comúnmente en una variedad de ambientes, incluyendo el suelo, el agua, el aire y dentro del cuerpo humano (en la piel, el tracto gastrointestinal, etc.). También son prevalentes en alimentos y pueden ser indicadores de calidad y seguridad alimentaria. En el contexto de la industria alimentaria, la presencia y el conteo de mesófilos aerobios se utilizan como un indicador general de la carga microbiana y las condiciones higiénicas de los alimentos. Un alto conteo de mesófilos aerobios puede sugerir la presencia de microorganismos patógenos potenciales o una falta de higiene en el procesamiento y manejo de los alimentos (Smith et al., 1946).

2.4. Diversidad microbiológica en chile (*Capsicum* spp.).

El estudio de diversidad bacteriana y taxonómico es importante para diversas áreas que constituyen la sociedad hoy en día y aportan al desarrollo humano como las áreas de: médica, alimenticia, energética, ecológica, entre otras. Esto se debe a que las bacterias forman gran parte de la biomasa existente en el planeta y que con el paso de los años se han adaptado de una manera impresionante a todos los ambientes, desde el fondo del mar hasta el interior del cuerpo humano (Torres-Moreno, 2016).

En China, se elaboró un estudio de caracterización de la diversidad microbiológica en chile (*Capsicum annuum* L.) cultivados con agua de irrigación y agua de grifo, detectaron *Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Delftia* sp., *Lactobacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Beddlovibrio* sp., *Brevundimonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Erwinia* sp., *norank Rhodospirillaceae* sp., *Providencia* sp.,

Sphingomonas sp., *Klebsiella* sp., *Massilia* sp. y *Brochothrix* sp., en el cual se concluyó que los chiles regados con agua de irrigación contenían 91.38% de abundancia relativa de protobacterias a comparación con los chiles regados con agua de grifo que contenían 68.69% de abundancia relativa de protobacterias (Cui et al., 2020).

Un estudio realizado en municipios pertenecientes al estado de Nuevo León, se investigaron dos granjas productoras de chile jalapeño (*Capsicum annum* L.), el experimento consistió en la toma de un total de 84 muestras de producto, agua de riego utilizado para la producción del producto, suelo donde se cultiva el producto y manos de trabajadores que recolectan el producto, las cuales, se analizaron como indicadores de microorganismos; reportando resultados bajos en el producto. Otro dato importante ha resaltar es que se encontró que no hay variación en el perfil microbiológico del chile jalapeño en las diferentes granjas muestreadas de diferentes municipios que se dedican a la agricultura en el estado de Nuevo León, por lo cual, se concluyó que es necesario realizar estudios donde se concideren más variables para determinar si la contaminación sucede durante su crecimiento y cosecha o durante la manipulación en el punto de venta (Molina-Loya, 2012).

Se realizó un estudio para la identificación de diversidad microbiológica del chile Chilhuacle Negro (*Capsicum annum*) en el cual se detectaron diversos miembros de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. En esta investigación se evaluó la diferencia de la diversidad microbiológica entre chiles frescos y los chiles secos y se observó que en los chiles secos había presencia de hongos que no se habían detectado en los chiles frescos, lo que sugiere que estos hongos patógenos se transmitieron a la fruta a través de las corrientes de aire (Fajardo-Rebollar et al., 2021).

Existen reportes en los cuales se identificó *Bacillus cereus* s.l. en una concentración $<10^4$ ufc/g en chile rojo en polvo de la India (Banerjee & Sarkar, 2003), en pimentón y pimienta (<80 ufc/g) en Alemania (Frentzel et al., 2018a), y en chile en polvo y pimentón orgánico (<23 ufc/g) en los EE. UU. (Hariram & Labbe, 2015). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha señalado que se han publicado

algunos informes de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos causados por diversos aislamientos de *B. cereus*. asociado con concentraciones bacterianas superiores a 10^5 ufc/g de alimento, pero en algunos informes, concentraciones de 10^3 ufc/g estuvieron involucradas en brotes (EFSA, 2016).

En un estudio realizado en muestras de chile en polvo en México, se aislaron cepas de *B. cereus s.l.* que representan un riesgo potencial para la salud por su resistencia a antibióticos y su producción de toxinas biológicas. Además, el chile en molido tiene una vida útil y la capacidad de formación de esporas de *B. cereus s.l.* permite que persista por mucho tiempo. Todas estas consideraciones parecen apoyar el desarrollo de programas de seguimiento de la calidad microbiana para evaluar la distribución de microorganismos en condimentos, como el chile molido, y el riesgo potencial para la salud pública (Celestino-Hernández et al., 2021).

2.5. Normas microbiológicas para chile molido.

Las normas desempeñan un papel fundamental en la producción de chile y otros alimentos, garantizando no solo la calidad y seguridad de los productos, sino también la eficiencia y sostenibilidad del proceso productivo. En un mundo globalizado donde los mercados demandan altos estándares y los consumidores son cada vez más conscientes de los aspectos sanitarios y éticos de los alimentos que consumen, la implementación de normas rigurosas se vuelve indispensable. A nivel internacional, se encuentra el Manual analítico bacteriológico (MAB), (2023) de la FDA; presenta los procedimientos de laboratorio preferidos por la agencia para los análisis microbiológicos de alimentos y cosméticos. De acuerdo a la comisión Internacional en Microbiología las especificaciones para alimentos (ICMSF) establecen los siguientes límites máximos permisibles: bacterias mesófilas aerobias (TAMB) 10^6 UFC/g, levaduras y mohos 10^4 UFC/g, coliformes 10^4 UFC/g. y *E. coli* 10^3 CFU/g. Mientras que, en Alemania los requerimientos los valores estándar para TAMB 10^5 UFC/g, *B. cereus* 10^4 UFC/g, *S. aureus* 10^2 UFC/g, *E. coli* debe de estar ausente y para *Salmonella* debe ser cero en 25 gramos de muestra (DGHM, 2011).

La detección y cuantificación de *B. cereus* en alimentos por los laboratorios de control de calidad se realiza con pruebas fenotípicas y se llevan a cabo de acuerdo

a las Normas Internacionales ISO 7932:2004 e ISO 21871:2006 (Martínez-Blanch, 2008). Estas normas establecen realizar el recuento en placa utilizando agares diferenciales para *B. cereus* como el agar Polimixina–Yema de huevo–Manitol (MYP) y el agar Polimixina–Yema de huevo–Manitol– Azul de bromotimol (PEMBA), además de la valoración de la producción de β –hemólisis en agar sangre de carnero (ISO 7932:2004).

En México existen Normas Oficiales Mexicanas (NOM) específicas para la producción y comercialización de chile. Las NOM son regulaciones técnicas obligatorias emitidas por el gobierno mexicano a través de diversas secretarías, y están diseñadas para garantizar la calidad, seguridad y sanidad de productos y servicios. La NOM-189-SSA1/SCFI-2002: Productos y servicios. Especificaciones y métodos de prueba de chiles secos. Esta norma establece los requisitos y métodos de prueba que deben cumplir los chiles secos para garantizar su calidad e inocuidad. La NOM-002-SAG/FITO-2015: Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la producción y movilización de material propagativo de chile (*Capsicum* spp.). Esta norma tiene como objetivo prevenir la propagación de plagas y enfermedades en los cultivos de chile; y la NOM-003-SAGARPA-2016: Especificaciones fitosanitarias para la importación de productos vegetales. Aunque no es específica para el chile, esta norma incluye regulaciones que afectan la importación de chiles frescos y secos, garantizando que estén libres de plagas y enfermedades.

2.6. Bacterias fitopatógenas.

Los fitopatógenos como virus, bacterias y hongos, representan un gran problema para la producción de hortalizas ya que atacan antes, durante y después de su cosecha, esto trae consigo problemas para su siembra de hortalizas, pues implica un aumento en los costos de producción para controlarlos y pérdidas económicas y biológicas (Navarrete-Maya et al., 2014), lo cual se traduce en pérdidas de más de mil millones de dólares en todo el mundo cada año en la cadena de producción de alimentos (Kannan et al., 2015).

Las bacterias fitopatógenas son microorganismos responsables de enfermedades en plantas. Mayormente aerobias, algunas son anaerobias facultativas. Su crecimiento esta condicionado por factores como nutrientes, temperatura, humedad y pH. Estos microorganismos provocan diversos síntomas como marchitez, pudriciones blandas y manchas en varios órganos vegetales (Navarrete-Maya et al., 2014). Se conocen alrededor de 150 especies de bacterias que afectan las plantas (Kannan et al., 2015). Entre los cinco géneros más relevantes como agentes infecciosos en cultivos se encuentran: *Corynebacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp. y *Xanthomonas* sp. (Navarrete-Maya et al., 2014).

2.6.1. Bacterias fitopatógenas de chile (*Capsicum* spp.).

En semilla de chile se ha encontrado *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Navarrete-Maya et al., 2014), que es a través de esta su mayor fuente de transmisión y que es causante de las lesiones en frutos y hojas. En plantas de chile *Capsicum annuum* L. reportado por Robles-Hernández et al., (2019) se identificó *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* como principal causante de la enfermedad de la peca o mancha bacteriana (PMB) (Figura 3), la cual es una de las enfermedades más devastadoras del cultivo del chile. También en plantas de chile se identificó *Enterobacter cloacae* la cual se ha detectado como una bacteria fitopatógena emergente, ya que anteriormente se conocía únicamente como patógeno para humanos; los principales síntomas causado por esta bacteria son hojas marchitas que se vuelven de color marrón oscuro y plantas deshojadas en la última etapa de la infección (García-González et al., 2018).

En el estudio realizado en chile en polvo acerca de la diversidad bacteriana por Hernández Gómez et al., (2022) se puede resaltar la presencia de *Kosakonia cowanii*, en la cual existen reportes de ser una bacteria fitopatógena como es el caso de Pachulí donde se le relaciona como causante de Marchitez bacteriana (Zhang et al., 2022) y en la planta de soya se identificó a *K. cowanii* como fitopatógeno (Krawczyk & Borodynko-Filas, 2020).

Una de las claves para entender cómo estos organismos causan enfermedades radica en el estudio de sus genes de virulencia y resistencia. Los genes de virulencia son aquellos que permiten a los patógenos superar las defensas de las plantas, facilitando la colonización y el establecimiento de la enfermedad. Estos genes codifican diversas proteínas y factores, como toxinas, enzimas degradativas, sistemas de secreción y moléculas efectores que interfieren con las funciones celulares normales de la planta. Por ejemplo, las bacterias fitopatógenas pueden poseer sistemas de secreción tipo III que inyectan efectores directamente en las células vegetales, manipulando sus procesos metabólicos y de defensa (He et al., 2021; Huang et al., 2019; Xu et al., 2021). Por otro lado, los genes de resistencia en fitopatógenos se refieren a aquellos que proporcionan al organismo la capacidad de resistir o neutralizar los mecanismos de defensa de la planta o los tratamientos fitosanitarios aplicados por el ser humano. Estos genes pueden conferir resistencia a fungicidas, bactericidas y otros agentes de control, haciendo que el manejo de las enfermedades sea más desafiante. La resistencia puede surgir a través de mutaciones genéticas, adquisición de genes por transferencia horizontal, o mediante la selección natural de cepas más adaptadas a las condiciones adversas (Sundin & Wang, 2018).

Por lo tanto el objetivo del trabajo es caracterizar la diversidad bacteriana de diferentes muestras de chile molido obtenidas de diversas regiones geográficas de México poniendo atención especial en el aislamiento y evaluación de enterobacterias para determinar su capacidad infectiva como potenciales fitopatógenos, debido a su importancia para poder proponer estrategias adecuadas para erradicar su dispersión y control correcto para así poder disminuir el impacto negativo que tienen estos fitópatógenos en la agricultura y comercialización (Kannan et al., 2015; Navarrete Maya et al., 2014).

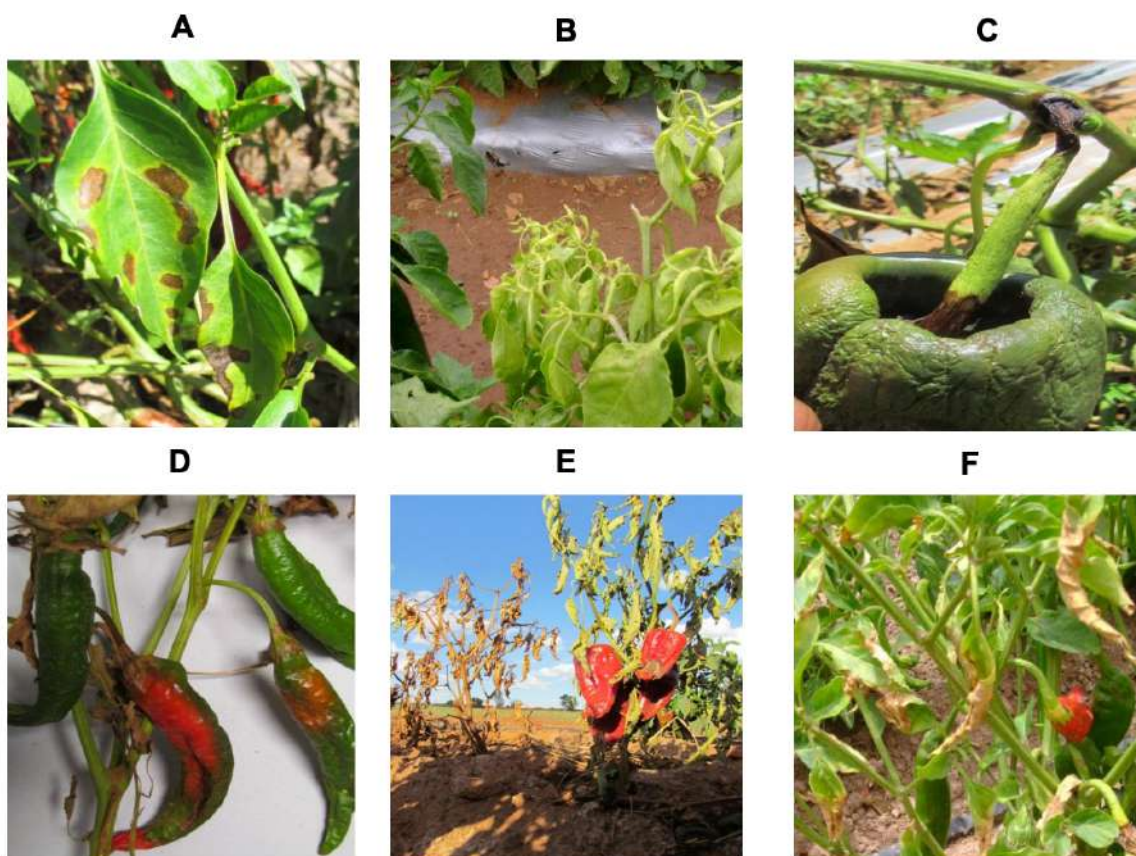


Figura 3. Síntomas de enfermedades en *Capsicum* spp. **A)** Hojas de chile mostrando lesiones de color café y bordes irregulares típicas de mancha bacteriana. **B)** Planta de chile mostrando follaje clorótico. **C)** Fruto de chile mostrando una lesión café en el pedúnculo, característica en plantas infectadas por patógenos del suelo. **D)** Planta de chile afectada por pudrición de la raíz mostrando frutos con maduración adelantada e irregular. **E)** Plantas de chile mostrando síntomas severos (follaje colgante, necrosado, sin botones o flores) de pudrición de la raíz. **F)** Planta de chile con lesiones de color café – marrón en el borde y ápice de las hojas (INIFAP, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la diversidad bacteriana y detectar bacterias fitopatógenas en chile molido (*Capsicum* spp.) de diversas regiones geográficas de México.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar la diversidad bacteriana presentes en muestras de chile molido a través de un análisis metagenómico.
- Evaluar cepas bacterianas con capacidad infectiva en fruto y plantas de chile (*Capsicum annum* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum*).
- Detectar genes de virulencia en aislados bacterianos que presenten capacidad infectiva en frutos y plantas de chile (*Capsicum annum* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum*).

4. METODOLOGÍA

4.1. Selección y descripción de muestras

Se obtuvieron 20 muestras (tabla 1) de chile en polvo obtenidos a partir de diferentes variedades del género *Capsicum* spp. de diferentes regiones geográficas de México, donde 6 muestras pertenecen al estado de Aguascalientes, 6 muestras al estado de Zacatecas, 3 muestras al estado de San Luis Potosí, 3 muestras al estado de Yucatán, 1 al estado de Jalisco y 1 al estado de Querétaro.

Tabla 1. Muestras obtenidas de chile molido de diferentes regiones geográficas de México.

ID	Géneros	Región geográfica
CH1	<i>Capsicum annuum</i> 'Guajillo'	San Luis Potosí
CH2	<i>Capsicum annuum</i> 'Mirasol'	Zacatecas, Zac.
CH3	<i>Capsicum annuum</i> 'Guajillo'	Fresnillo, Zac.
CH4	<i>Capsicum annuum</i> 'De Árbol'	San Luis Potosí
CH5	<i>Capsicum annuum</i> 'Mirasol'	Zacatecas, Zac.
CH6	<i>Capsicum annuum</i> L. 'Xkat ik'	Yucatán
CH7	<i>Capsicum annuum</i> 'Guajillo'	Jalisco
CH8	<i>Capsicum annuum</i> 'Jalapeño'	Fresnillo, Zac.
CH9	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> 'Poblano'	Fresnillo, Zac.
CH10	<i>Capsicum annuum</i> 'Morita'	Fresnillo, Zac.
CH11	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>annuum</i> .	San Luis Potosí
CH12	<i>Capsicum annuum</i> 'De Árbol'	Yucatán
CH13	<i>Capsicum chinense</i>	Yucatán
CH14	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> 'Poblano'	Aguascalientes

CH15	<i>Capsicum annuum</i> 'De Árbol'	Querétaro
CH16	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> 'Poblano'	Aguascalientes
CH17	<i>Capsicum annuum</i> 'De Árbol'	Aguascalientes
CH18	<i>Capsicum annuum</i> 'De Árbol'	Aguascalientes
CH19	<i>Capsicum annuum</i> 'Guajillo'	Aguascalientes
CH20	<i>Capsicum annuum</i> 'Guajillo'	Aguascalientes

4.2. Análisis del bacterioma.

Todas las muestras de chile molido fueron procesadas a través del protocolo del kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA de marca Zymo Research para la extracción del DNA directo de la muestra o a partir de colonias bacterianas obtenidas en medios nutritivos para aumentar la probabilidad de tener mayor diversidad bacteriana.

El ADN obtenido del protocolo de extracción se analizó su presencia y calidad, colocando 3 µL de ADN de cada muestra en un gel de agarosa al 1%, con electroforesis a 80 Volts durante 40 minutos y se reveló el resultado con luz UV. Confirmada la presencia de ADN se realizó la secuenciación del ADN genómico con Shotgun Metagenomic Sequencing Service (Zymo Research, Irvine, CA) bajo el formato de secuencias en pares (paired-end). La calidad de las secuencias se verificó con el programa FastQC. A través de la plataforma en línea BV-BRC se determinó la diversidad taxonómica con la herramienta “Taxonomic Classification” para identificar la composición microbiana de las muestras metagenómicas. Este servicio utiliza Kraken 2 (J. Lu & Salzberg, 2020), Kraken utiliza consultas de base de datos de coincidencia exacta de k-mers, en lugar de una alineación inexacta de secuencias. Las secuencias se clasifican consultando la base de datos para cada k-mer en una secuencia, y luego utilizando el conjunto resultante de taxones del ancestro común más bajo (LCA) para determinar una etiqueta apropiada para la secuencia.

Los archivos de lectura generados (fastq) se cargaron en la plataforma CZ-ID (<https://czid.org/>, consultada en septiembre de 2023), que realiza canales de bases de datos de composición microbiana y resistencia a los antimicrobianos para detectar y cuantificar patógenos bacterianos (Kalantar et al., 2020). Para cada muestra de chile en polvo, se determinó una composición microbiana significativa a partir de lecturas únicas por millón (rPM) que se asignaron a taxones microbianos específicos con los filtros de umbral de la siguiente manera: puntuación Z de nucleótidos (NT) ≥ 1 (calculada a partir del fondo normalizado en masa modelo creado), NT rPM ≥ 10 (mínimo de al menos 10 lecturas de un mapeo por 1 millón de lecturas a taxones específicos), proteína no redundante (NR) rPM ≥ 5 (lecturas de proteínas por millón de mapeo a taxones específicos) y promedio Alineamiento NT ≥ 50 pares de bases (mapeo de alineación de lectura de nucleótidos promedio para taxones específicos).

Para el análisis de genes de virulencia y resistencia se realizó con ayuda de la plataforma en línea BV-BRC con la herramienta “Metagenomic Read Mapping”, el cual se realizó con el servicio de mapeo de lecturas metagenómicas utiliza KMA (alineación k-mer (Clausen et al., 2018)) para alinear las lecturas con genes de resistencia a antibióticos o factores de virulencia. KMA mapea las lecturas sin procesar directamente en estas bases de datos y utiliza el algoritmo de k-mer para acelerar el mapeo y el algoritmo de Needleman-Wunsch para alinear con precisión las extensiones de las salidas de k-mer.

4.3. Determinación del contenido de bacterias mesófilas aerobias, bacterias esporuladas y Enterobacterias.

La calidad microbiológica del chile molido se determinó a través del contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), bacterias mesófilas esporuladas (BME) y enterobacterias, siguiendo la metodología descrita en las normas oficiales mexicanas para análisis de los grupos microbianos mencionados (NOM-092; NOM-111; NOM-113).

El cual consiste en: Se pesó 1 gramo de muestra, se adicionó 9 mL de diluyente de peptona (DP); la muestra se homogenizó manualmente durante 1 minuto. A partir

de esta suspensión se preparó diluciones decimales en DP para los recuentos de BMA, BME y enterobacterias por la técnica de vaciado en placa. Las placas de cada grupo microbiano se incubaron en las condiciones de tiempo y temperatura recomendadas en técnicas oficiales (NOM-092; NOM-113; NOM-111). Se realizó el recuento de colonias desarrolladas en cada placa de cada grupo microbiano y el cómputo de resultados en UFC/g de chile molido.

Para el tratamiento de germinación de esporas. En condiciones asépticas, se pesó 1 g de cada muestra y se adicionó 9 mL de DP, se homogenizó durante 1 minuto manualmente y a partir de esta suspensión se prepararon diluciones decimales en DP. El tratamiento de germinación de esporas se realizó introduciendo los frascos inoculados en un baño con agua (en agitación) a 80° C durante 10 min. Al término del tiempo, los frascos fueron transferidos a otro baño con agua a 45°C para detener el tratamiento. El contenido de cada frasco se vació y distribuyó homogéneamente en placas estériles, respectivamente. Cuando el agar se solidificó, las placas se incubaron a 35°C por 48-72 hr.

4.4. Aislamiento y capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en fruto de chile (*Capsicum annum* L).

Se preparó 1 g de muestra de chile molido en 9 mL de peptona y se sembró en agar MacConkey, el cual es un medio de cultivo selectivo para los grupos bacterianos de interés; cada fenotipo de las colonias desarrolladas se transfirió a nuevas placas de agar selectivo y se incubaron a 37°C. Se aislaron 420 colonias y se seleccionaron frutos de chile serrano que no presenten lesiones, posteriormente se desinfectaron (hipoclorito de sodio al 10% durante 1 min, después en etanol al 70% durante 1 min) y se lavaron minuciosamente en agua destilada estéril; a partir de las colonias aisladas, se preparó una suspensión de 1×10^8 CFU.mL⁻¹ en 50 µL de peptona al 0.1% y se inoculó 10 µL en frutos de *Capsicum annum* L., el cual, se realizó por triplicado. Se incubarán por 5 días, en recipientes a temperatura ambiente, posteriormente se observó para la detección en los chiles de tejido infectado, los síntomas a identificar fueron clorosis, manchas marrones o necrosis (Pérez-Moreno

et al., 2016), se descartaron los aislados bacterianos que no presentaron alguna actividad infectiva, de los cuales, se seleccionaron 25.

Los aislados seleccionados se prepararon en una solución de peptona al 0.1% y se inocularon 5 µL en hojas de plantulas de *Capsicum annuum* L. de 30 a 45 días y se mantuvieron en invernadero (Beneduzi et al., 2008), con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 24°C (Bach et al., 2016), el cual, se realizó por triplicado, se incubaron y se monitorearon para detectar alguna lesión en la planta. Los síntomas a identificar fueron clorosis, manchas marrones o necrosis (Pérez-Moreno et al., 2016). Para evaluar el porcentaje de infección se utilizaría la ecuación $MED\% = \frac{AD}{AS} \times 100$, donde AD es el área total dañada y AS es el cálculo total del área de la hoja, los cuales se calcularán por medio de procesamiento de imágenes digitales (AID), con ayuda del programa ImageJ 1.48r (Sauceda-Acosta et al., 2015). Se hará la selección de los aislados que presenten capacidad infectiva para su posterior identificación a través de métodos genómicos. Adicionalmente, se calculó para cada cepa que mostró capacidad infectiva la cantidad mínima de células infectivas con respecto a concentraciones de 1×10^1 a 1×10^8 CFU.mL⁻¹.

Debido a que no se observó ninguna sintomatología de infección en las plantas se volvió a evaluar la capacidad infectiva de los 25 aislados previamente seleccionados, inoculando frutos de chile y jitomate ya que pertenecen a la familia de las *Solanaceae* desinfectados como se indica anteriormente, se preparó una suspensión de 1×10^8 CFU.mL⁻¹ de bacteria en 50 µL de peptona al 0.1% y se inoculó 10 µL, por triplicado con tres repeticiones, se incubaron en recipientes a temperatura ambiente, posteriormente se observó durante 48h para la detección en los chiles y jitomates de tejido infectado, los síntomas a identificar serán clorosis, manchas marrones o necrosis (Pérez-Moreno et al., 2016), seleccionando los aislados que presentaron capacidad infectiva durante las primeras 48 horas, donde se seleccionaron 4 aislados, SM2, Ch9-16, Ch1-39 y Ch1-5.

4.5. Secuenciación del genoma, identificación de genes y taxonomía.

Se seleccionaron las cepas de interés que demostraron mayor porcentaje de severidad, las cuales fueron: SM2, Ch9-16, Ch1-39 y Ch1-5. El ADN genómico de las cepas de interés se extrajo con el kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA de marca Zymo Research de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se procesó y analizó con el Servicio de Secuenciación Metagenómica Shotgun (Zymo Research, Irvine, CA). Las bibliotecas de secuenciación se prepararon con Illumina® DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) y la biblioteca final se secuenció en la plataforma NovaSeq® (Illumina, San Diego, CA). El análisis de bioinformática se realizó utilizando las tuberías en el Centro de recursos de bioinformática bacteriana y viral (BV-BRC) y se envió al servicio integral de análisis del genoma en PATRIC (Davis et al., 2016). El genoma se anotó utilizando el kit de herramientas RAST (RASTtk) (Brettin et al., 2015). El mapa del genoma circular se dibujó usando Proksee (Grant et al., 2023). La referencia más cercana y los genomas representativos fueron identificados por Mash/MinHash (Ondov et al., 2016). Las familias de proteínas globales PATRIC (PGFams) (Davis et al., 2016) se seleccionaron de estos genomas para determinar el análisis filogenético. Las secuencias de proteínas de estas familias se alinearon con MUSCLE (Edgar, 2004), y los nucleótidos de cada una de esas secuencias se asignaron a la alineación de proteínas. El conjunto de alineaciones de aminoácidos y nucleótidos se enlazaron en una matriz de datos, y se utilizó RaxML (Stamatakis, 2014) para analizar esta matriz, con un arranque rápido para generar los valores de soporte en el árbol. Se incluyeron evaluaciones bioinformáticas a través de la plataforma en línea BV-BRC para la identificación de genes y taxonomía.

4.6. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Minitab 21.1.1 (2022 Minitab, LLC. All rights reserved). Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) y para su comparación, se usó la prueba de diferencia significativa de Tukey a un nivel de significancia del 95%.

5.RESULTADOS

5.1. Selección y descripción de las muestras

Con el interés de caracterizar la diversidad bacteriana en muestras de chile molido de diferentes regiones geográficas de México, de acuerdo a la disponibilidad, se obtuvieron 20 muestras (Tabla1), perteneciendo a dos diferentes variedades del género *Capsicum* spp., 1 a *Capsicum chinense* y 19 a *Capsicum annuum*, donde 6 muestras pertenecen al estado de Aguascalientes, 6 muestras al estado de Zacatecas, 3 muestras al estado de San Luis Potosí, 3 muestras al estado de Yucatán, 1 al estado de Jalisco y 1 al estado de Querétaro.

5.2. Obtención de ADN

Para conocer la diversidad de bacterias presentes en las muestras de chile molido, se realizó la extracción de ADN, usando el protocolo del kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA de marca Zymo Research directamente de las muestras de chile molido. En la figura 4(A) se visualizan los resultados de la extracción de ADN de siete muestras, en la cual, se destaca las muestras CH1, CH2 y CH6 que mostraron una degradación evidente en el gel de agarosa. En cambio, las muestras CH5, CH7 y CH4 se observaron muy diluidas y en la muestra CH3, no se logró extraer el ADN.

Debido a que no se obtuvieron bandas definidas, se decidió no continuar con las extracciones restantes de las muestras y se optó por emplear otra metodología. El siguiente paso a seguir, fue sembrar las muestras de chile molido en agar nutritivo Triptona-Soja (TSA) y hacer la extracción de las colonias bacterianas de acuerdo a la metodología mencionada por Hernández Gómez et al., (2022). De las colonias bacterianas obtenidas en medios nutritivos, como se reporta en la Tabla 2, además se determinó el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), clasificadas en tres grupos: bacterias mesófilas aerobias (BMA), bacterias esporuladas (BME) y Enterobacterias, las cuales nos permitieron evaluar su calidad microbiológica.

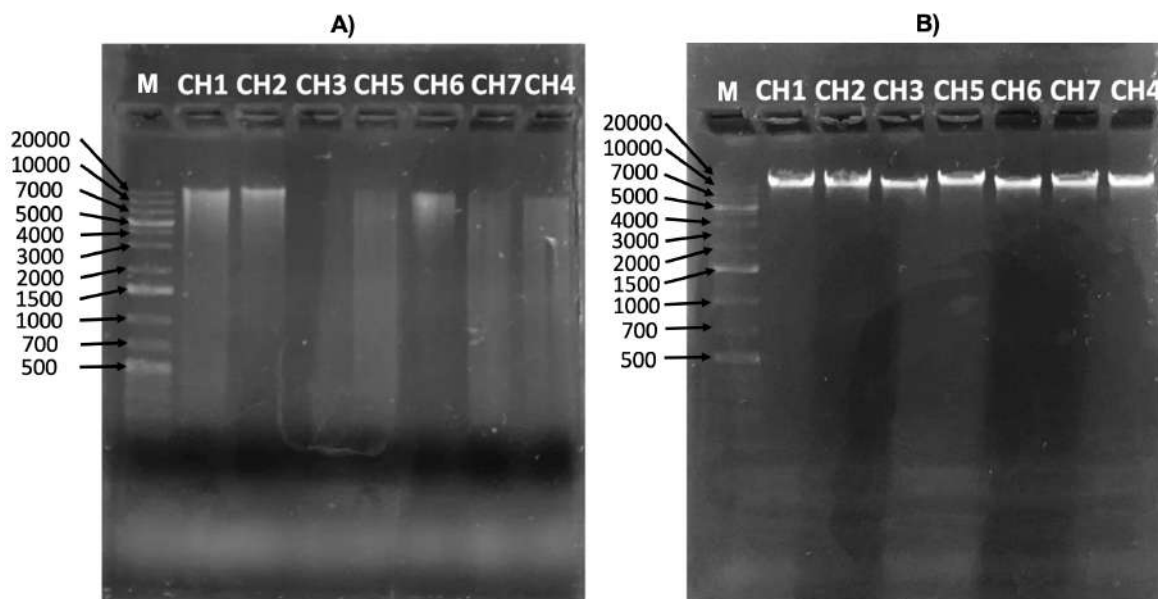


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de extracción de ADN. A) Electroforesis en gel de agarosa de extracción de ADN directamente de las muestras de chile molido. B) Electroforesis en gel de agarosa de extracción de ADN de colonias bacterianas. En ambos geles, M corresponde al marcador de 1 kb (Thermo Scientific).

La cuenta de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) oscilaron de 6×10^3 a 7×10^8 UFC/g (tabla 2). Las muestras CH1-CH13 y CH15 se encuentran por encima de los límites máximos permitidos de acuerdo a la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), la cual indica la cantidad de BMA permitida en muestras de alimentos correspondiente a $< 10^5$ UFC/g; seis muestras de chile en polvo (CH2, CH3, CH5, CH7, CH8 y CH15) tuvieron una calidad marginal (10^5 - 10^6 UFC/g), mientras que ocho muestras de chile en polvo (CH1, CH4, CH6, CH9, CH10, CH11, CH12 y CH13) con valores superiores a 10^6 UFC/g indican calidad inaceptable y solo una muestra de chile en polvo (CH14), tuvo valores de $\leq 10^3$ UFC/g que se interpreta como calidad aceptable.

Los resultados para los recuentos de BME oscilaron entre 4.3×10^3 y 2×10^9 UFC/g. Aunque este grupo bacteriano no se considera dentro de los criterios de calidad microbiológica para las especias, se debe considerar el monitoreo de *B. cereus* como miembro de este grupo por sus características de toxicidad. Un grupo bacteriano importante como indicador de calidad higiénica es el de la familia

Enterobacteriaceae. De acuerdo a los resultados cinco muestras de chile en polvo (CH1, CH2, CH3, CH4 y CH7) superaron los criterios microbiológicos del ICMSF ($\leq 10^4$ UFC/g), mientras que diez muestras de chile en polvo (CH5, CH6, CH8, CH9, CH10, CH11, CH12, CH13, CH14 y CH15) con valores $\leq 10^4$ UFC/g mostraron criterios de calidad aceptables para este grupo de microorganismos (Tabla 2).

Tabla 2. Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias, Esporuladas y Enterobacterias.

ID	Cuenta de (BMA) UFC/g	Cuenta de (BME) UFC/g	Enterobacterias UFC/g
CH1	2.3×10^7	2.2×10^7	1.1×10^6
CH2	1.2×10^6	3.5×10^5	1.2×10^5
CH3	6.1×10^6	2.9×10^6	5.1×10^5
CH4	2.1×10^7	3×10^7	2.3×10^6
CH5	5.8×10^6	3.2×10^7	2.1×10^4
CH6	1×10^7	5.1×10^8	51×10
CH7	4.9×10^7	4.7×10^7	4.3×10^5
CH8	1.7×10^5	1.9×10^6	<100
CH9	1×10^7	1.2×10^7	<100
CH10	2×10^7	1.4×10^7	<100
CH11	7×10^8	1.2×10^7	<100
CH12	4.4×10^7	2×10^9	<100
CH13	3.8×10^7	3.3×10^7	7.4×10^4

CH14	6×10^3	1.7×10^4	<100
CH15	1×10^6	4.3×10^3	4.8×10^3
CH16	<100	<100	<100
CH17	<100	<100	<100
CH18	<100	<100	<100
CH19	<100	<100	<100
CH20	<100	<100	<100

Debido a los datos obtenidos en el conteo de BMA (tabla 2), las muestras CH16 a CH20, presentaron cantidades muy bajas, por lo tanto, no fue posible realizar la extracción de ADN a través de las colonias bacterianas de estas muestras. Por otra parte, se realizó la extracción de las muestras CH1 a CH15 con el protocolo del kit comercial ZR Fungal/Bacterial ADN de marca Zymo Research. En la figura 4(B) se observa la electroforesis de la extracción de ADN de las colonias bacterianas provenientes de siete muestras donde se confirma la presencia de ADN. Por lo tanto, se mandó a secuenciar la extracción de ADN de 15 muestras (CH1-CH15) al servicio de Zymo Research, Irvine, CA.

5.3. Análisis de la diversidad bacteriana en muestras de chile molido

Los resultados de las lecturas de secuenciación se observan en la Tabla 3. Todas las secuencias tuvieron una longitud de secuencia de 151 y el porcentaje de G+C estuvo dentro del rango de 45 a 54%.

Tabla 3. Características de las secuencias por muestra.

Muestra	Nombre de la secuencia	Total de secuencias	Longitud de la secuencia	%GC
CH1	zr9271_1_R1.fastq.gz	13297016	151	46

	zr9271_1_R2.fastq.gz	13297016	151	47
CH2	zr10264_8_R1.fastq.gz	10000000	151	51
	zr10264_8_R2.fastq.gz	10000000	151	51
CH3	zr10264_1_R1.fastq.gz	10000000	151	48
	zr10264_1_R2.fastq.gz	10000000	151	48
CH4	zr9271_2_R1.fastq.gz	17949175	151	46
	zr9271_2_R2.fastq.gz	17949175	151	46
CH5	zr9271_4_R1.fastq.gz	10567038	151	44
	zr9271_4_R2.fastq.gz	10567038	151	45
CH6	zr10264_6_R1.fastq.gz	10000000	151	44
	zr10264_6_R2.fastq.gz	10000000	151	44
CH7	zr10264_2_R1.fastq.gz	10000000	151	45
	zr10264_2_R2.fastq.gz	10000000	151	46
CH8	zr9271_5_R1.fastq.gz	11779351	151	44
	zr9271_5_R2.fastq.gz	11779351	151	45
CH9	zr9271_6_R1.fastq.gz	11548642	151	45
	zr9271_6_R2.fastq.gz	11548642	151	45
CH10	zr9271_7_R1.fastq.gz	12274033	151	45
	zr9271_7_R2.fastq.gz	12274033	151	45
CH11	zr9271_3_R1.fastq.gz	10606188	151	45
	zr9271_3_R2.fastq.gz	10606188	151	45
CH12	zr10264_5_R1.fastq.gz	10000000	151	44
	zr10264_5_R2.fastq.gz	10000000	151	45
CH13	zr10264_4_R1.fastq.gz	10000000	151	45
	zr10264_4_R2.fastq.gz	10000000	151	45
CH14	zr10264_3_R1.fastq.gz	10000000	151	45
	zr10264_3_R2.fastq.gz	10000000	151	45
CH15	zr10264_7_R1.fastq.gz	10000000	151	54
	zr10264_7_R2.fastq.gz	10000000	151	54

Usando la metodología de software Zymo Research, BV-BRC y CZID, obtuvimos la diversidad bacteriana existente en cada muestra (Figura 5). La familia más representativa fue Bacillaceae, la cual representa más del 90% de abundancia relativa, a excepción de las muestras CH2 y CH15 donde la familia mas representativa fue Enterobacteriaceae con abundancias relativas de 47.34% y 96.23% respectivamente. Dentro del análisis se identificaron tres familias de bacterias fitopatógenas: Enterobacteriaceae, Erwiniaceae y Xanthomonadaceae.

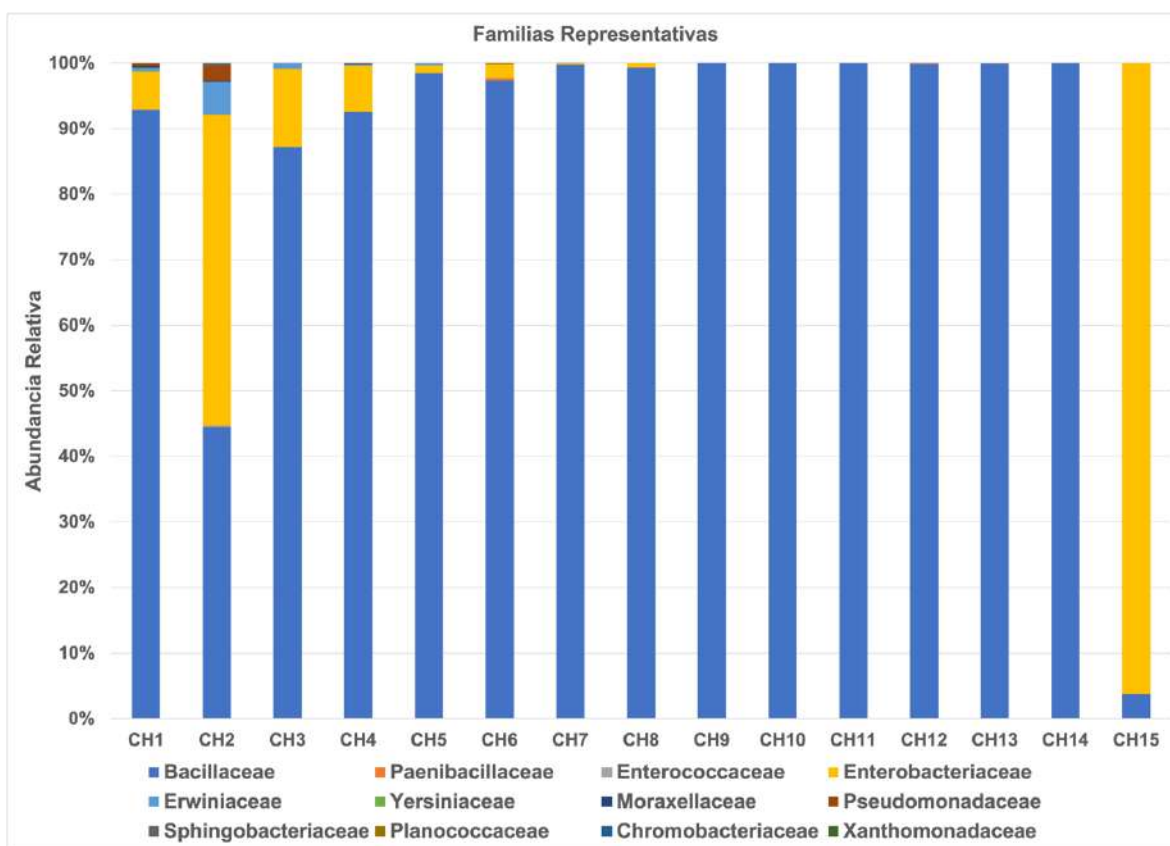


Figura 5. Composición taxonómica en quince muestras de chile molido. El gráfico de barras representa la abundancia relativa de familias bacterianas representativas en porcentaje indicado por diferentes colores.

En la muestra CH1 los géneros más abundantes fueron: *Bacillus*, *Kosakonia* y *Cronobacter* con un porcentaje de abundancia relativa de 92.86%, 3.09% y 1.78% respectivamente, mientras que las especies más abundantes fueron las siguientes: *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. safensis* y *K. cowanii* con un porcentaje de abundancia relativa de 41.29%, 27.73%, 13.27%, 8.09% y 3.09% respectivamente. Para CH2, los géneros más abundantes fueron: *Bacillus*,

Kosakonia y *Siccibacter* con un porcentaje de abundancia relativa de 44.50%, 25.58% y 10.92% respectivamente, mientras que las especies más abundantes detectadas fueron: *K. cowanii*, *B. halotolerans*, *S. turicensis*, *B. subtilis* y *B. safensis* con un porcentaje de abundancia relativa de 25.58%, 24.94%, 8.72%, 7.44% y 4.35% simultáneamente. En la muestra CH3, entre los géneros más abundantes fueron los siguientes; *Bacillus*, *Enterobacter* y *Kosakonia* con un porcentaje de abundancia relativa de 87.03%, 6.17% y 2.41% respectivamente, mientras que las especies más abundantes fueron: *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. halotolerans* y *E. hormaechei* con un porcentaje de abundancia relativa de 32.42%, 27.18%, 14.86%, 5.87% y 2.98% simultáneamente. Con respecto a CH4, los géneros más abundantes son los siguientes: *Bacillus* (92.54%), *Enterobacter* (3.01%) y *Kosakonia* (2.97%), mientras que las especies más abundantes detectadas son: *B. velezensis* (31.47%), *B. halotolerans* (30.50%), *B. subtilis* (22.47%), *B. safensis* (7.22%) y *K. cowanii* (2.97%).

En la muestra CH5, el género más abundante fue *Bacillus* con un porcentaje de abundancia relativa de 98.27%, mientras que las especies más abundantes fueron *B. subtilis* (29.08%), *B. safensis* (26.16%), *B. halotolerans* (25.13%) y *B. velezensis* (16.54%). Para CH6, los géneros más abundantes fueron *Bacillus* y *Enterobacter* con un porcentaje de abundancia relativa de 97.28% y 2.09% simultáneamente; en el caso de las especies, los más abundantes son: *B. subtilis* (36.46%), *B. safensis* (24.74%), *B. sonorensis* (9.51%), *B. licheniformis* (8.63%) y *B. aryabhattai* (7.22%). En referencia a la muestra CH7, el género más abundante fue *Bacillus* con un porcentaje de abundancia relativa de 99.69%, a nivel especie, las más representativas incluyeron a: *B. subtilis* (75.02%), *B. velezensis* (17.29%), *B. safensis* (3.84%) y *B. halotolerans* (1.58%). Para CH8, el género más abundante también fue *Bacillus* con un porcentaje de abundancia relativa de 99.32%, mientras que las especies más abundantes fueron *B. subtilis* (43.22%), *B. halotolerans* (28.35%), *B. velezensis* (16.65%), *B. safensis* (9.04%) y *B. licheniformis* (1.94%).

En la muestra CH9 el género más abundante fue *Bacillus* con un porcentaje de abundancia relativa de 99.96%, mientras que las especies más abundantes fueron

B. subtilis (63.37%), *B. halotolerans* (16.18%), *B. velezensis* (14.93%), *B. safensis* (3.25%) y *B. licheniformis* (1.75%). Para CH10, el género de mayor abundancia es: *Bacillus* con un porcentaje de abundancia relativa de 100%, mientras que las especies más abundantes son las siguientes: *B. subtilis* (75.25%), *B. velezensis* (13.79%), *B. halotolerans* (9.17%) y *B. safensis* (1.34%). Con respecto a la muestra CH11, *Bacillus* fue el género más abundante con 100% de abundancia relativa, entre las especies de mayor porcentaje abarcan: *B. subtilis* (63.04%), *B. velezensis* (30.35%) y *B. halotolerans* (5.65%). En relación a la muestra CH12, con 99.81% de abundancia relativa *Bacillus* es el género más abundante, a nivel especie, las mas representativas son: *B. subtilis* (78.59%), *B. velezensis* (4.95%), *B. safensis* (4.25%), *B. licheniformis* (4.22%) y *B. halotolerans* (3.26%).

En la muestra CH13, el género de mayor porcentaje de abundancia relativa fue *Bacillus* (99.96%), mientras que las especies más abundantes se en listan a continuación: *B. halotolerans* (67.91%), *B. subtilis* (16.75%), *B. safensis* (4.30%), *B. licheniformis* (3.63%) y *B. paralicheniformis* (3.50%). En la muestra CH14, el género más abundante fue *Bacillus* con un porcentaje de abundancia relativa de 100%, mientras que las especies más abundantes fueron: *B. velezensis* (77.76%), *B. subtilis* (12.32%), *B. murimartini* (5.65%) y *B. cereus* (3.81%). En la muestra CH15 los géneros más abundantes fueron *Enterobacter*, *Bacillus* y *Klebsiella* con un porcentaje de abundancia relativa de 89.15%, 3.77% y 3.07% respectivamente, mientras que las especies más abundantes fueron *E. cloacae* (67.40%), *E. hormaechei* (21.74%), *K. michiganensis* (3.07%) y *B. safensis* (1.43%). Se identificaron bacterias potencialmente fitopatógenas en un 93.33% de las muestras secuenciadas del género *Kosakonia*, *Erwinia* y *Enterobacter*, fitopatógenos comunes en *Capsicum* spp.

Los géneros bacterianos detectados en muestras de chile molido se muestran en la Figura 6. Las especies bacterianas detectadas con mayor frecuencia se encontraron dentro de la familia Bacillaceae en casi todas las muestras de chile en polvo, estas fueron; *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. safensis*, *B. halotolerans*, *B. mojavenensis*, *B. spizizenii*, *B. inaquosorum*, *B. paralicheniformis*, *B. licheniformis*,

B. altitudinis, *B. haynesii*, *B. sonorensis* y algunos miembros del grupo *B. cereus*. De acuerdo con las muestras de chile molido que presentaron secuencias acertadas para la familia Enterobacteriaceae, las especies bacterianas estuvieron representadas por *E. hormaechei*, *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. roggenkampii*, *E. bugandensis*, *E. cancerogenus*, *Pseudoscherichia vulneris*, *K. cowanii*, *Klebsiella* sp., *Cronobacter sakazakii* y *C. dublinensis*. Mientras que la familia Erwiniaceae estuvo representada por *Pantoea agglomerans*.

El análisis de diversidad alfa (índice de diversidad de Shannon) se realizó para analizar la distribución de la diversidad de la comunidad bacteriana presente en todas las muestras de chile en polvo, los resultados se trazaron de bajo a alto índice de diversidad de Shannon (Figura 7A), donde se detalló la muestra de CH14 (con el índice más bajo) y la muestra CH2 (con el índice más alto). El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las diferencias de Bray-Curtis se realizó para expresar las diferencias entre la comunidad bacteriana de las muestras de chile en polvo (Figura 7B).

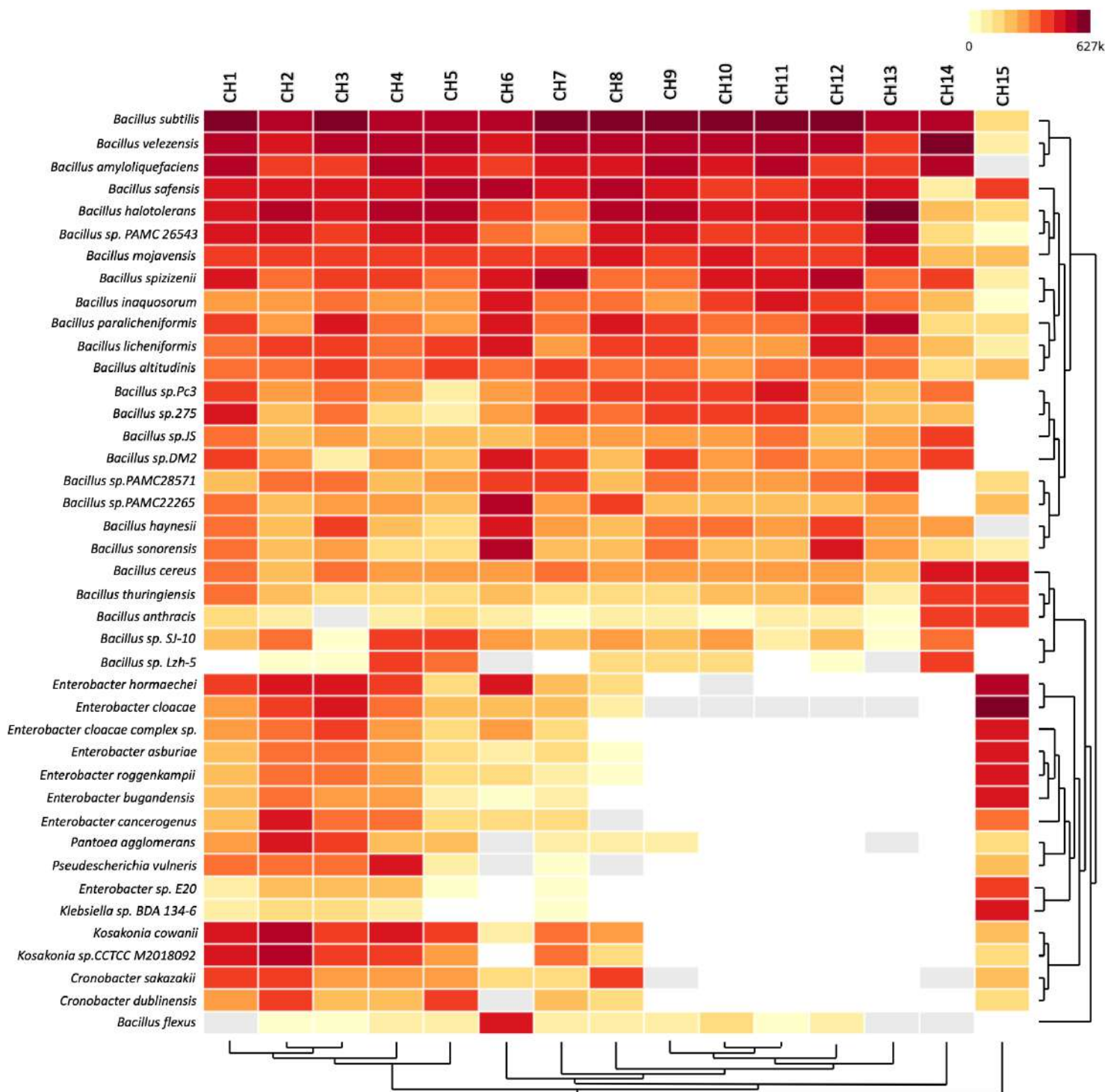


Figura 6. Composición taxonómica bacteriana en muestras de Chile en polvo. Se determinó una composición bacteriana significativa a partir de lecturas únicas por millón (rPM) que se asignaron a taxones microbianos específicos utilizando la plataforma CZ-ID.

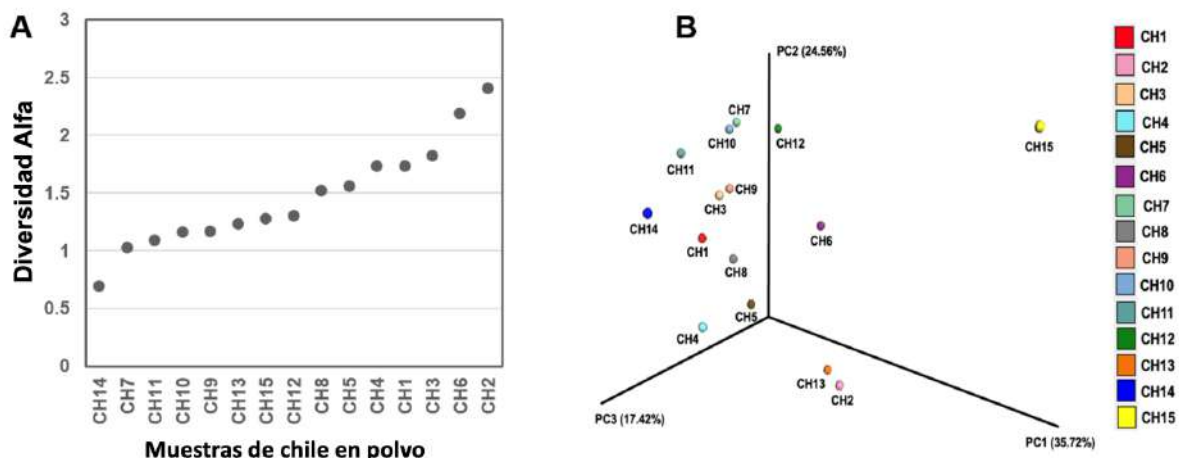


Figura 7. Gráficos de diversidad alfa y beta para visualizar la diferencia de composición bacteriana en muestras de chile molido. (A) Comparaciones de diversidad alfa basadas en el índice de diversidad de Shannon y (B) Gráfico PCoA de la medida de diversidad beta con la disimilitud de Bray-Curtis.

En la figura 8, de acuerdo con la distribución de bacterias patógenas en muestras de chile molido utilizando la plataforma CZ-ID, se observaron tres grupos principales de muestras. El primer grupo, está conformado por las muestras CH1, CH2, CH3, CH4 y CH15, cuyas secuencias de lectura (rPM) mostraron aciertos con algunas especies patógenas, tales como; *B. licheniformis*, *B. cereus*, *S. enterica*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *K. aerogenes*, *K. oxitoca*, *S. marcescens*, *C. turicensis*, *C. sakazakii*, *E. gallinarum*, *P. putida*, *A. baumannii* y *B. anthracis*. El segundo grupo, se formó por CH5, CH6, CH7 y CH8, el cual presentó bacterias patógenas, tales como; *B. licheniformis*, *B. cereus*, *S. enterica*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *K. aerogenes*, *K. oxitoca*, *S. marcescens*, *C. turicensis*, *C. sakazakii*, *E. gallinarum*, *B. brevis*, *P. kudriavzevii* y *B. anthracis*. El tercer grupo se conformó por CH9, CH10, CH11, CH12, CH13 y CH14, entre las bacterias patógenas fueron principalmente *B. licheniformis*, *B. cereus*, *S. enterica* y *B. anthracis*.

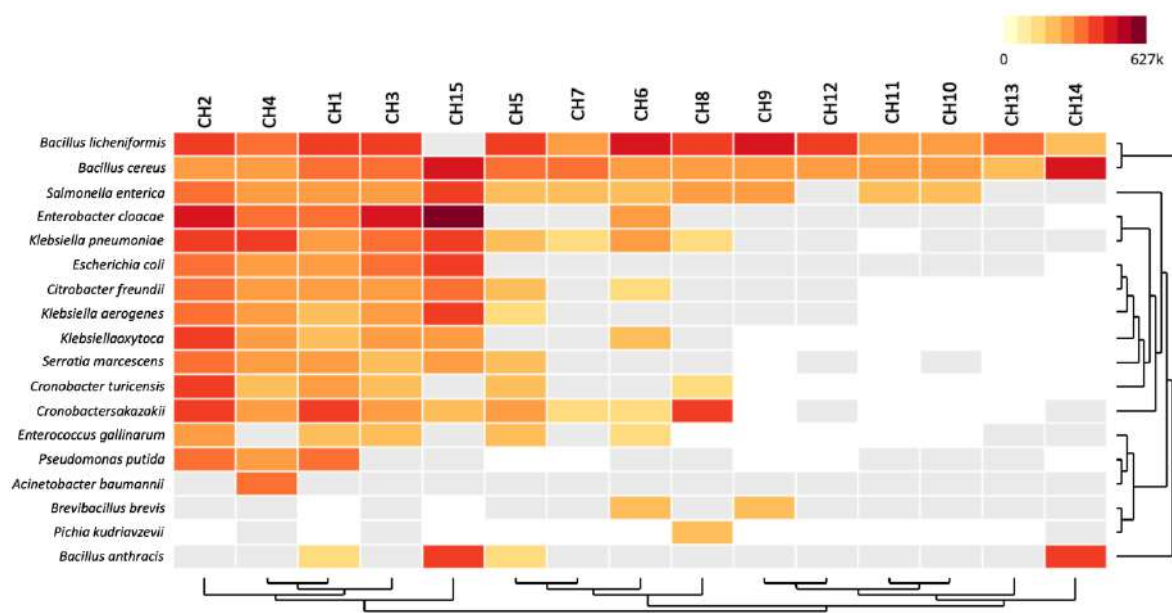


Figura 8. Distribución de bacterias patógenas en muestras de chile en polvo. Se determinó la composición significativa de taxones bacterianos a partir de lecturas únicas por millón (rPM) utilizando la plataforma CZ-ID.

5.4. Detección de genes de resistencia antibiótica (ARG)

Con el objetivo de conocer el perfil del resistoma se realizó un análisis de prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG). En total, los perfiles de resistoma del chile molido contienen 68 genes únicos, que confieren resistencia a los antibióticos en 13 clases diferentes (Figura 9-10). Entre las principales clases de resistencia distribuidas en casi todas las muestras se encuentran multifármacos (100%), tetraciclina (100%), beta-lactamasas (100%), aminoglucósidos (100%) y fenicol (93,33%). Las muestras de chile molido con alta abundancia relativa de clases de resistencia fueron; La muestra CH15 con 12 clases, donde aminoglucósido (33.14%), multifármaco (21.10%), tetraciclina (13.45%) y ácido fosfónico (9.64%) mostraron una alta abundancia relativa, mientras que la muestra CH2 con 8 clases, donde beta-lactamasas (34.91%), multifármaco (29.26%), glicopéptido (12.79%), fenicol (7.29%) y aminoglucósido (6.69%) mostraron una abundancia relativa alta.

La muestra CH3, presentan también 8 clases de resistencia, donde multifármacos (45.47%), ácido fosfónico (22.61%), beta-lactamasas (19.28%), mostraron una alta abundancia relativa. La muestra CH6 presentó 8 clases de resistencia también,

siendo fenicol (48.29%) y multifármacos (44.40%) las más abundantes. El resto de las muestras de chile en polvo presentan entre 4 y 7 clases de resistencia, donde la alta abundancia relativa de clases de resistencia se distribuyó dentro de las clases de multidrogas, fenicol, beta-lactamasas, aminoglucósidos y tetraciclina (Figura 9).

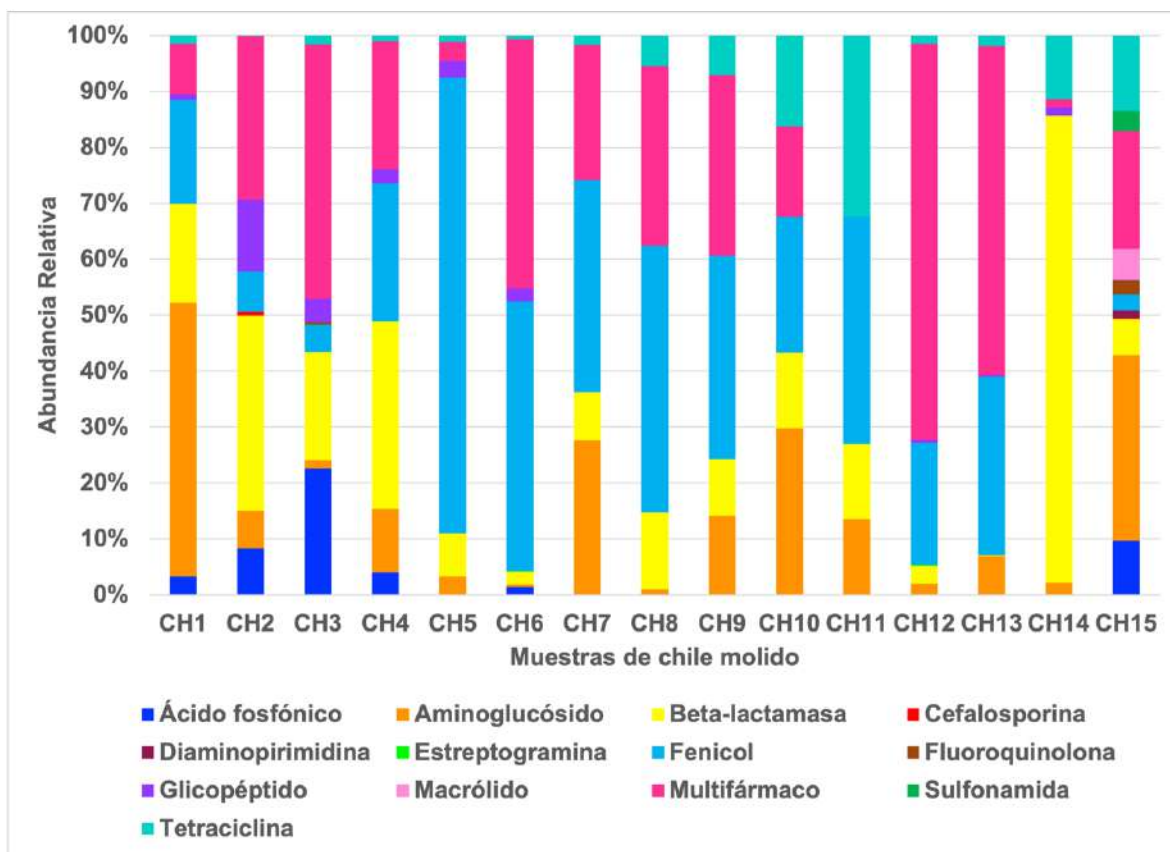


Figura 9. Abundancia relativa de clases de resistencia a los antibióticos. En total, 13 clases de resistencia están indicadas mediante colores gráficos en 15 muestras de chile molido.

La figura 10 muestra la distribución de ARG entre muestras de chile molido. Entre los ARG representados en la clase de resistencia al fenicol y asociado con géneros de bacterias, como *Bacillus* y *Escherichia*, se encuentra cloranfenicol acetiltransferasa (*cat86*, *catA10*, *catBx*), una enzima que cataliza la acetilación dependiente de acetil-CoA del cloranfenicol provocando su inactivación. La clase de resistencia a los aminoglucósidos asociado con géneros de bacterias, como *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Erwinia* y *Xanthomonas*, está representada por

enzimas modificadoras de aminoglucósidos, tales como; aminoglucósidos nucleotidiltransferasas (*aadA4-5*, *aadE-K*, *ant4-Ib*, *ant6-Ia*), aminoglucósidos N-acetiltransferasas (*aac3-I*, *aac3-Ib*, *aac3-IIa*), aminoglucósidos fosfotransferasas (*aph3''Ia*, *strA* y *strB*).

El sistema de bomba de eflujo dependiente de energía para la resistencia de la clase tetraciclina asociado con géneros de bacterias como *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Escherichia* y *Acinetobacter*, está representado por *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetK*, *tetL* y *tetQ*. La clase de resistencia a los macrólidos asociado con géneros de bacterias como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella* y *Serratia*, está representada por los genes determinantes de resistencia *ermD* y *erm34*, que codifican la rRNA metiltransferasa, que metila un residuo específico en el rRNA 23S, confiriendo resistencia a los macrólidos-lincosamida-estreptogramina B. Además, se han identificado genes que codifican bombas de eflujo de macrólidos como; *msrC* y la inactivación de macrólidos representados por el gen *mphA* que codifica una macrólida 2'-fosfotransferasas y *tlrC*, que codifica una subfamilia F de ABC ATPasa.

La clase de ácido de resistencia fosfónica está representada por la enzima fosfomicina tiol transferasa (FosA2) y asociado con el género *Enterobacter*. También está presente una bomba de eflujo de múltiples fármacos codificada por los genes *oqxA* y *oqxB* y asociado a géneros de bacterias como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella*, que confieren resistencia a múltiples agentes, como olaquinox, mequinox, cloranfenicol, florfenicol, trimetoprima, ciprofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, tigeciclina y biocidas. La resistencia a los glicopéptidos, como la vancomicina, está representada por los grupos de genes *van* (*vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* y *vanXY*) y asociado con géneros de bacterias como *Enterococcus* y *Klebsiella*, que producen resistencia al alterar el objetivo del peptidoglicano.

La resistencia a los betalactámicos y distribuido en miembros de las familias Enterobacteriaceae y Bacillaceae, está ampliamente representada por genes que codifican clases de betalactamasas, como; *ctx-m-1*, *ctx-m-2*, *ctx-m-8*, *bla*, *blc*, *shv-okp-len*, *mbi*, *ampC*, *ampH*, *act-mir*, *dha*, *adc lap*, *oxy*, *tem-1D*, *oxa-23*, *oxa-51* y *oxa-237*. Proteínas fijadoras de penicilina (PBP), como *mrdA*, cuyas alteraciones de secuencia se han relacionado con resistencia a betalactámicos. La clase de resistencia a las diaminopirimidinas, representada por *dfrA7* y asociada con *A. baumannii*, una enzima dihidrofolato reductasa fundamental para la síntesis de purinas y timidilato. La clase de resistencia a la estreptogramina está representada por *vgbA* y asociado con *S. aureus*, una enzima liasa.

La *cfrA* detectada es una metiltransferasa de ARN ribosomal 23S asociado con géneros de bacterias como *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Staphylococcus*, confiere resistencia a algunas clases de antibióticos, incluidas estreptograminas, cloranfenicoles, florfenicoles, linezolidas y clindamicina. La clase de resistencia a las fluoroquinolonas detectada asociado con miembros de la familia Enterobacteriaceae como *Escherichia* y *Klebsiella*, está representada por las proteínas repetidas pentapeptídicas (*qnrB* y *qnr-S*) que reducen la susceptibilidad a las quinolonas protegiendo el complejo de enzimas ADN-ADN girasa o ADN-topoisomerasa IV. La clase de resistencia a las sulfonamidas se produce principalmente mediante la adquisición de un gen alternativo que codifica la dihidropteroato sintasa (DHPS) implicado en la biosíntesis de nucleótidos y está representado por *SulII* y asociado con el género *Acinetobacter* en nuestros resultados.

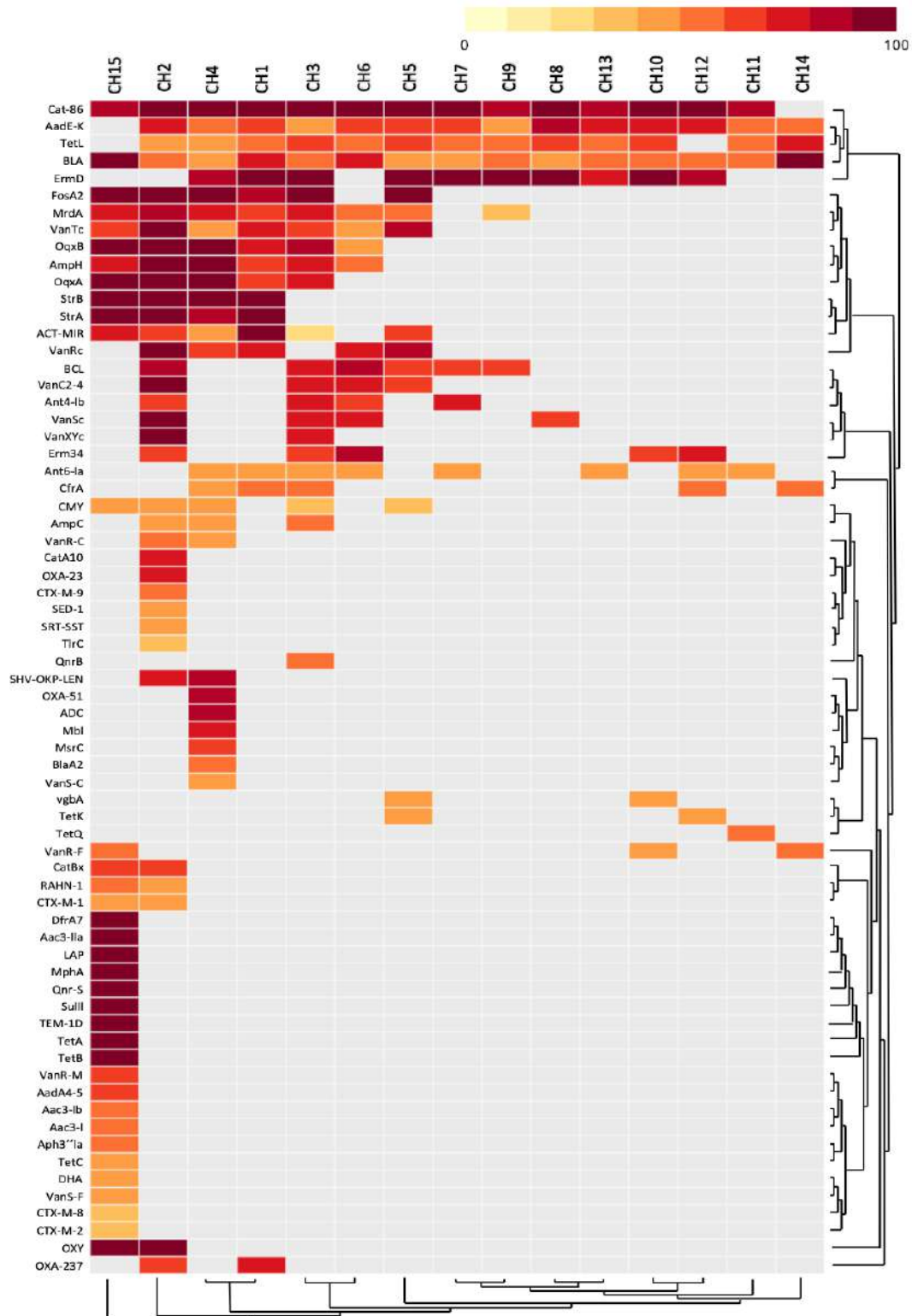


Figura 10. Heatmap de 15 muestras de chile molido de diferentes regiones geográficas de México. Se representan los genes de resistencia antibiótica detectados en las muestras.

5.6. Aislamiento y capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en fruto

En base en el resultado de análisis taxonómico, se detectaron bacterias fitopatógenas. Con el objetivo de aislar patógenos oportunistas, de acuerdo a la tabla 2 se aislaron *Enterobacterias*, lo cual, consistió en sembrar en medio selectivo MacConkey agar, de las cuales se resembraron de manera individual de acuerdo a su morfología 420 aislados.

El escrutinio de estos aislados se realizó evaluando en frutos de chile serrano, inoculando 10 μ L de la cepa diluida en DP, observando si presentaban alguna infección como clorosis, necrosis y podredumbre blanda, se monitoreó durante 5 días. De este escrutinio se seleccionaron las colonias que presentaron algún tipo de infección que fue un total de 25. El siguiente paso fue probar la habilidad infectiva de estos nuevamente en chiles serranos y jitomates, ya que pertenecen a la misma familia de Solanaceas, para conocer si presentaban capacidad infectiva en otros frutos. Se evaluó la presencia de alguna infección, durante 48 horas (Figura 11) y finalmente, fueron elegidos un total de 4 aislados bacterianos que presentaron mayor infectividad como es podredumbre blanda y necrosis en un tiempo menor; los cuales fueron: SM2, Ch1-5, Ch1-39 y Ch9-16.

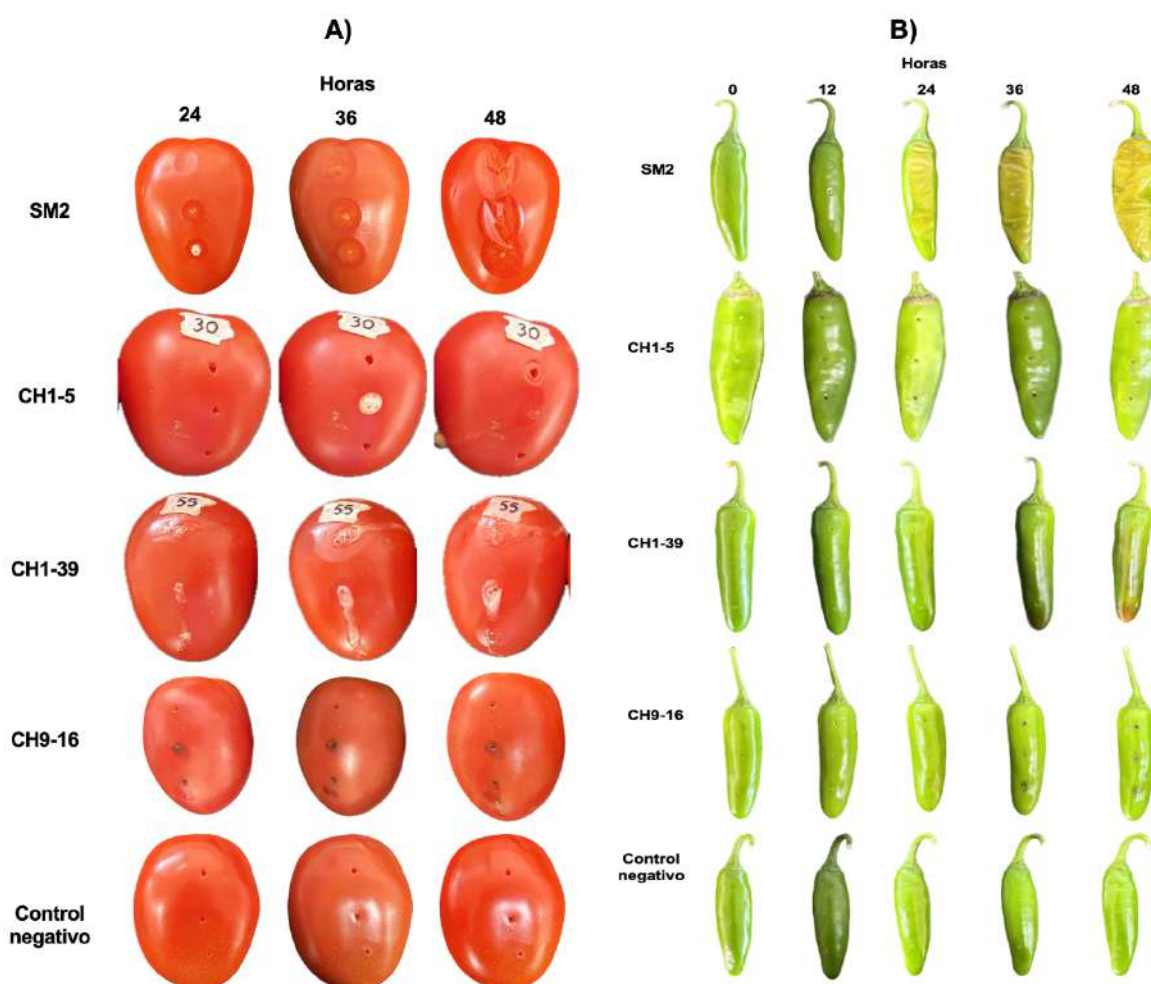


Figura 11. Evaluación de capacidad infectiva de aislados bacterianos en jitomate y chile serrano. A) Aislados bacterianos en jitomate durante 48 h. B) Aislados bacterianos en chile serrano durante 48 h.

5.7. Evaluación de la capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en plantas.

Se realizaron las pruebas de infección *in vivo* en plantas de chile poblano (*Capsicum annuum* var. *annuum* 'Poblano'), con 2 meses de edad, en las cuales, se infectaron 10 hojas por planta, se marcó cada hoja inoculada con etiquetas para su monitoreo, probando 25 aislados, un aislado por planta por duplicado con su control negativo, de los cuales se monitorearon durante 15 días, evaluando la presencia de

podredumbre blanda, necrosis o cloriosis, en los cuales no se observó ningún síntoma de infección (Figura 12).

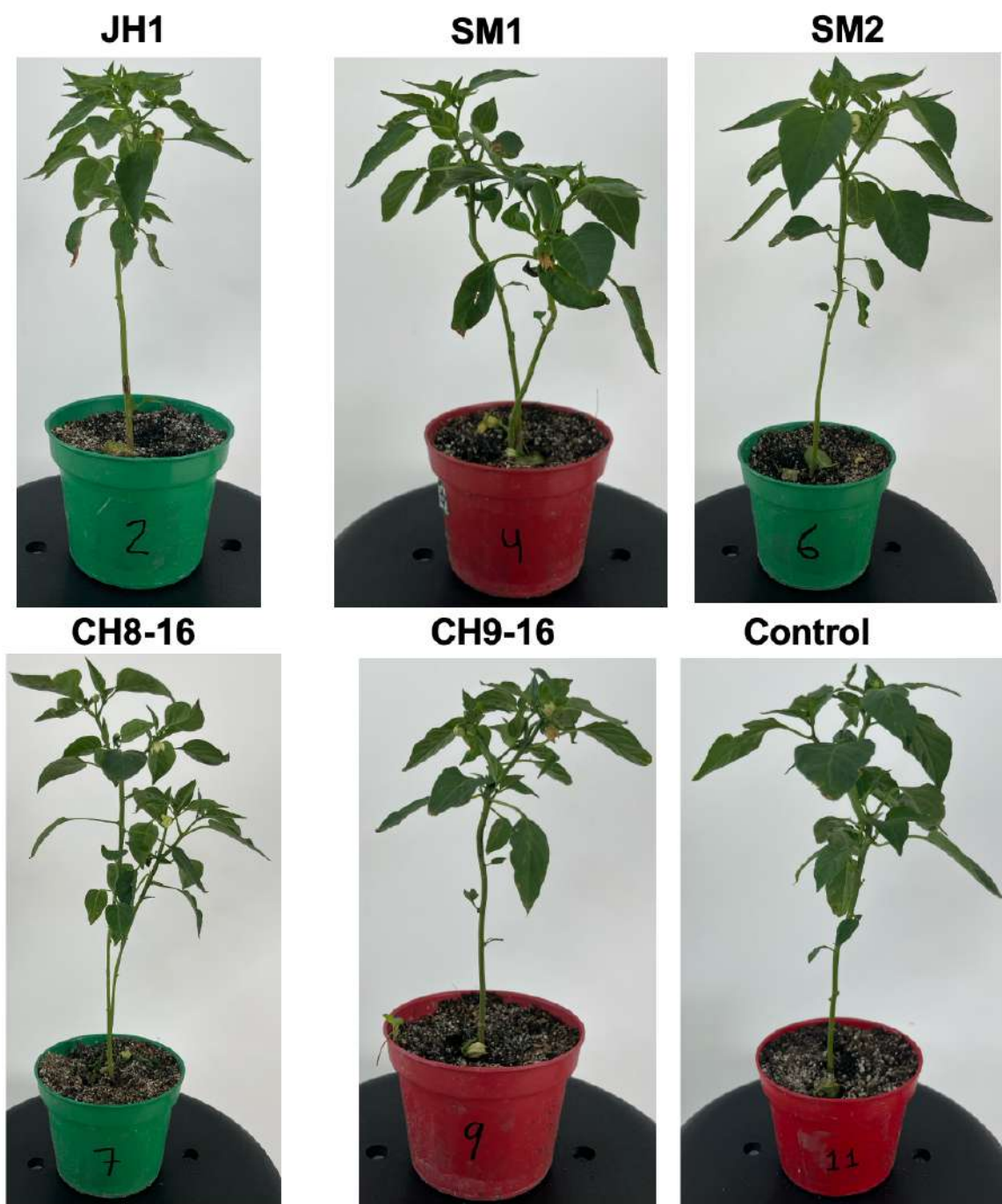


Figura 12. Evaluación de la capacidad infectiva de bacterias fitopatógenas en plantas. Plantas de chile poblano (*Capsicum annuum* var. *annuum* 'Poblano') inoculadas en las hojas en cada planta con una cepa diferente como se indica en la imagen.

5.8. Caracterización genómica de *Pectobacterium aroidearum* SM2

El genoma de la bacteria *P. aroidearum* SM2 fue enviado al Servicio de Análisis Integral del Genoma de PATRIC. Según el análisis completo del genoma de *P. aroidearum* SM2, contiene 86 contigs con una longitud estimada de 5.037.920 pb y un contenido promedio de guanina-citosina del 51,46%. La longitud denominada N50, que se define como la longitud más corta de la secuencia en el 50% del genoma, es de 188.251 pb. Además, el genoma fue anotado con la ayuda de la herramienta RAST (anotación rápida usando tecnología de subsistema) y mediante la cual se le asignó un número identificador de genoma único, 122277.299. Según los datos proporcionados por RASTtk, el genoma contiene 4, 925 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 69 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 4 genes ribosómicos (ARNr). Adicionalmente, se encontró que el genoma de *P. aroidearum* SM2 contiene genes específicos (Tabla 5), tales como; factores de virulencia (Victors, VFDB), genes de resistencia a antibióticos (PATRIC, CARD, NDARO), transportadores (TCDB), genes diana de fármacos (DrugBank) que fueron identificados en diferentes bases de datos.

Tabla 4. Principales características del genoma de *P. aroidearum* SM2.

Características	Fuente	Cromosoma
Longitud del genoma	PATRIC	5,037,920 bp
Número de contigs	PATRIC	86
Número de proteínas caracterizadas	PATRIC	3,806
Número de proteínas putativas/hipotéticas	PATRIC	1,119
Número de genes de ARNr	PATRIC	4
Número de genes de ARNt	PATRIC	69
Número de proteínas con anotación de ruta	KEGG	789

G + C %	PATRIC	51.46%
Tamaño contig N50 (pb)	PATRIC	188,251 bp
Factores de virulencia	Victors	81
Factores de virulencia	VFDB	17
Factores de virulencia	PATRIC_VF	49
Genes de transporte	TCDB	182
Objetivo de antibióticos	DrugBank	154
Objetivo de antibióticos	TTD	31
Resistencia antibiótica	PATRIC	42
Resistencia antibiótica	CARD	19

Mediante la herramienta PATRIC se obtuvo una anotación de las proteínas que componen los subsistemas únicos para cada uno de los genomas de las cepas identificadas. Estas proteínas están especializadas en diversos procesos biológicos a nivel molecular y celular (Figura 13).

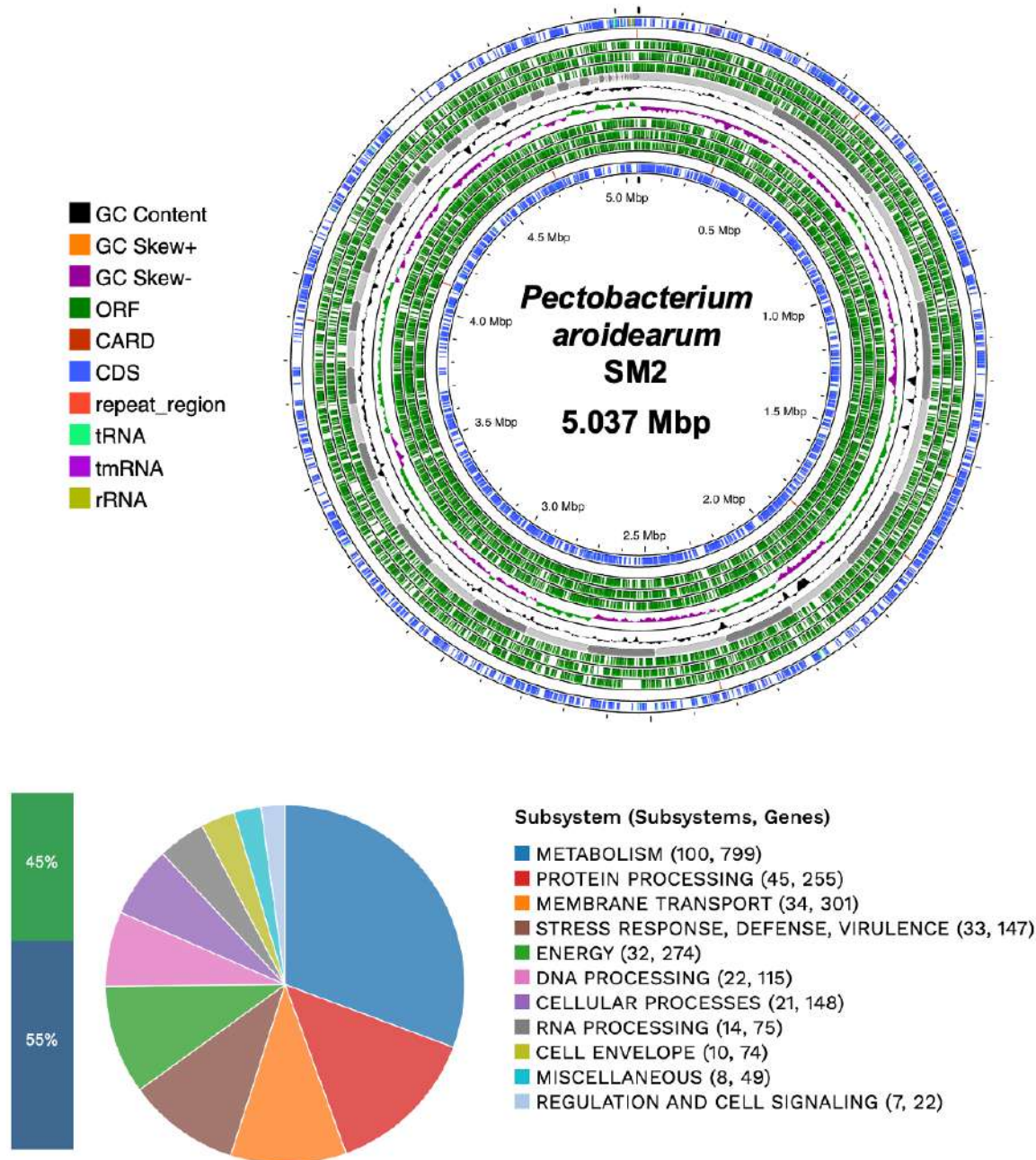


Figura 13. Mapa genómico circular e información de subsistemas para *P. aroidearum* SM2. Desde el exterior hacia el centro están los contigs del conjunto, CDS en la cadena frontal, CDS en la cadena inversa, genes de ARN, CDS con homología con genes conocidos de resistencia a antibióticos, CDS con homología con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC.

Para la distribución de subsistemas por categoría de *P. aroidearum* SM2 se utilizó la herramienta RAST con la cual se descubrió que el 45% de ellos contienen un total

de 2269 genes (2269 son no hipotéticos y 0 hipotéticos) y esos no eran subsistemas agrupados (55%), 2829 genes (1707 no hipotéticos y 1122 hipotéticos) (Figura 14).

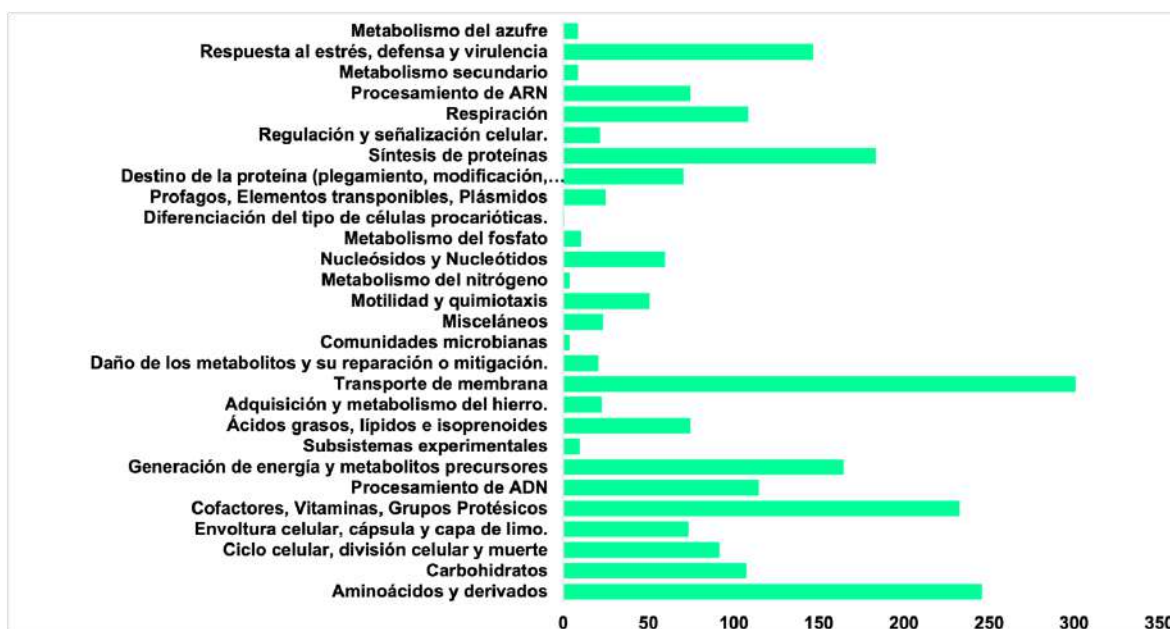


Figura 14. Recuento de subsistemas por categoría. Anotación de los diversos procesos metabólicos primordiales de la cepa SM2 de *P. aroidearum*.

De acuerdo a el análisis del genoma de la cepa bacteriana *P. aroidearum* SM2, los genes que predicen la resistencia a los antibióticos se agruparon en seis mecanismos de acción diversos (Tabla 5). Algunos de los genes que se pueden destacar: el gen *dxr* que proporciona resistencia al antibiótico fosmidomicina, también se ha encontrado en *Escherichia coli*, los genes *folA* y *dfr*, han sido descritos en otras bacterias como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* y se ha demostrado que dan resistencia a trimetoprima, brodimoprim, tetroxoprim e iclaprim. Por otro lado, se encontró que contiene dos genes que codifican las subunidades A y B de las ADN girasas (*gyrA*, *gyrB*) cuyas mutaciones confieren resistencia a la clase de antibióticos fluoroquinolonas y que han sido ampliamente estudiados. Además, se identificó el gen *kasA*, que codifica el producto 3-oxoacil-[acil-proteína-portadora] sintasa, KASII (EC 2.3.1.179), cuyo producto es responsable de la biosíntesis de ácidos micólicos. Y finalmente, los factores de elongación G y Tu, que están codificados por los genes *ef-g* y *ef-tu*, son importantes ya que participan en la elongación y el reciclaje dentro del ribosoma y catalizan la unión del aminoacil tRNA

al propio ribosoma. Sin embargo, el genotipo debe probarse con un fenotipo AMR. En este sentido, como una primera aproximación, el análisis fenotipo AMR mostró resistencia a Eritromicina, mientras que mostró sensibilidad a los siguientes antibióticos; Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ciprofloxacina, Clindamicina, Dicloxacilina, Gentamicina, Penicilina, Tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprima, Vancomicina, Amikacina, Carbenicilina, Cloranfenicol, Netilmicina y Nitrofurantoína.

Tabla 5. Genes de resistencia antibiótica de *P. aroidearum* SM2 clasificados por su mecanismo AMR.

Mecanismos AMR	Genes
Enzima de activación de antibióticos	<i>katG</i>
Objetivo de antibióticos en especies susceptibles.	<i>alr, ddl, dxr, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, murA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p</i>
Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos	<i>AcrAB-TolC, AcrAD-TolC, AcrZ, EmrAB-TolC, MacA, MacB, MdtABC-TolC, TolC/OpmH</i>
Gen que confiere resistencia por ausencia	<i>gidB</i>
Proteína que altera la carga de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos	<i>GdpD, PgsA</i>
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos.	<i>AcrAB-TolC, EmrAB-TolC, H-NS, OxyR</i>

Se identificaron genes de virulencia usando Victors, PATRIC y VFDB, que son bases de datos importantes para predecir la patogenicidad. En la base de datos Victors detectamos un total de 81 genes de virulencia, en la base de datos PATRIC obtuvimos un total de 49 genes de virulencia y en la base de datos VFDB detectamos un total de 17 genes de virulencia. Además, buscamos los genes relevantes que codifican enzimas degradantes de la pared celular de las plantas (PCDEWs), toxinas y sistemas de secreción para *P. aroidearum* SM2 (Tabla 6). No encontramos genes relacionados con toxinas, encontramos 12 genes que codificaban PCDEWs de los cuales el 100% son pectinasas. También, identificamos 139 genes involucrados en siete tipos de sistemas de secreción: 22 genes en el tipo I (T1SS), 22 en el tipo II (T2SS), 40 en el tipo III (T3SS), 19 en el tipo IV (T4SS),

ninguno en el tipo V (T5SS), 20 genes en el tipo VI (T6SS) sistemas de secreción y 16 genes de motilidad de invasión.

Tabla 6. Genes de virulencia de *P. aroidearum* SM2 aislados en la plataforma Bv-BRC.

Tipo		Número	Gen
PCDEWs	Pectinasas	12	<i>kgdM, exuT, uxaA, kdgF, ogl, pnl, exuR, pemA, pelW, pehX, pehT, pelX</i>
	Celulasas	0	
	Proteinasas	0	
	T1SS	22	<i>lapE, tonB, hlyA, tolC, hlyC, hlyB, hlyD, cyaB, cyaD, cyaE, hasE, lapC, prtE/aprE, lapD, prtD/aprD, lapB, lapG, tdfF, tdfG, tdfH, prtF/AprF, Inh/omp19</i>
Sistema de secreción	T2SS	22	<i>gspD, gspE, gspK, gspM, gspN, tadB, gspC, gspl, tadZ/cpaE, cpaD, flp/tadC, RcpC/CpaB, gspF, gspJ, gspL, gspB, gspG, gspH, tadD, cpaF, rcpA/cpaC, tadV/cpaA</i>
	T3SS	40	<i>yscN, mxiB, hroN, escN, hroT, yscR, hroR, escR, hrpQ, lcrE, yopN, yop4b, yscJ, hrcJ, escJ, pscJ, hrpW, yscQ, yscL, yscC, mixD, hrcC, invG, yscO, hrpB, hrpG, avrE1, hrcT, epaR1, escT, yscS, hrpV, yscU, lcrD, hrcV, escV, ssaV, yopN, icrE, hrpD</i>
	T4SS	19	<i>aroB, virB11, virD4, virB4, virB8, virB10, virB6, pilD, virB2, virB5, vir9, virB1, pilC, pilB, ppdD, pilM, pilN, pilP, pilQ</i>
	T5SS	0	
	T6SS	20	<i>paar, hcp, vgrG, tssl, rhaS, vasL, vasH, tssG, tssB, icmH, tssF, tssE, vasI, tssH, tssJ, tssA, tssK, tssM, tagH, tssC</i>
	Motilidad de invasión	16	<i>fliN, fliA, cheR, fliM, flhD, flgC, flgG, fliP, fliG, fliS, flgH, flhC, cheW, cheY, flgB, fliQ</i>

En base al árbol filogenético (Figura 15) la bacteria patógena analizada coincide con *P. aroidearum* strain KC20 la cual fue extraída de la hortaliza de col china (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), cabe mencionar que, de las 30 muestras consideradas en las pudriciones de estas especies, 29 aislados fueron del patógeno común de la col china *P. carotovorum*, de manera similar, según el árbol obtenido, la muestra de *P. aroidearum* L6 se aisló de la pudrición blanda de muestras de *S. podophyllum* en un

vivero de plantas en el campus de Haidian de la Universidad de Hainan, Haikou. Provincia de Hainan, China. De manera similar, se aisló *Pectobacterium aroidearum* strain MY11 de un tubérculo (*Amorphophallus konjac*) de la provincia de Sichuan, China, por lo que hasta el momento no se ha reportado el patógeno en Chile (*Capsicum annuum* L.).

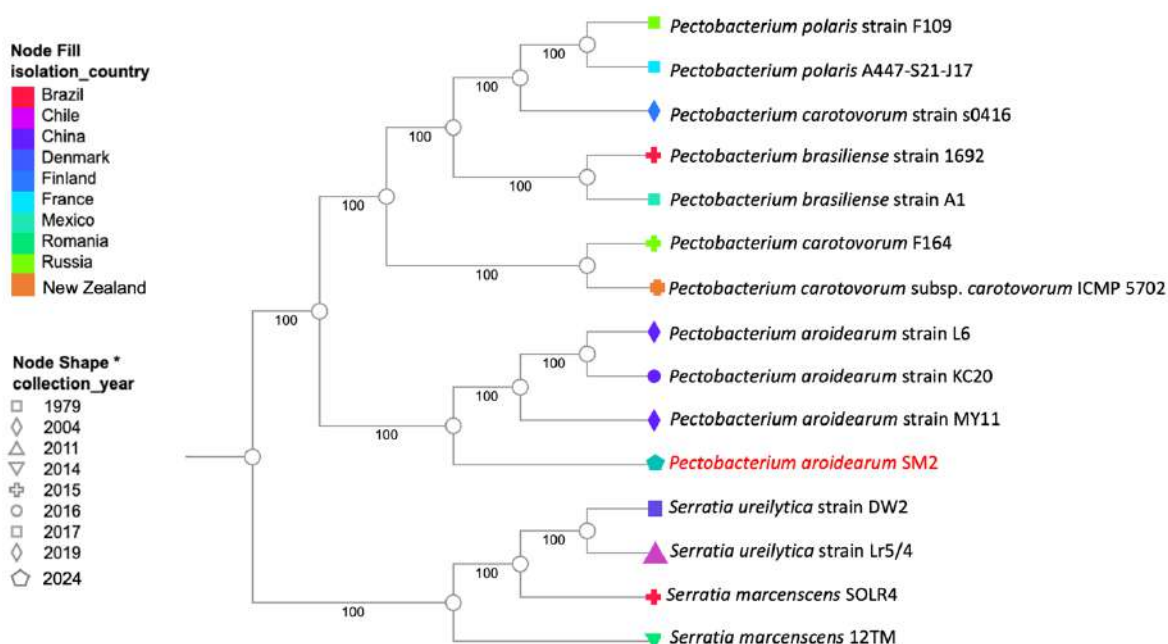


Figura 15. Análisis filogenético de de *P. aroidearum* SM2. El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *P. polaris* strain F109, *P. polaris* A447-S21-J17, *P. carotovorum* strain s0416, *P. brasiliense* strain 1692, *P. brasiliense* strain A1, *P. carotovorum* F164, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. aroidearum* strain L6, *P. aroidearum* strain KC20, *P. aroidearum* strain MY11 y como grupo externo *S. ureilytica* DW2, *S. ureilytica* strain Lr5/4, *S. marcescens* SOLR4 y *S. marcescens* 12TM. La forma del nodo representa el año de recolección. El nodo se llena y ella representa el país del que se obtuvieron los aislados, incluidos México, Brasil, Chile, China, Dinamarca, Finlandia, Francia, Rumania, Rusia y Nueva Zelanda.

5.9. Caracterización genómica de *Klebsiella pneumoniae* Ch1-39

El genoma de la bacteria *K. pneumoniae* Ch1-39 fue enviado al Servicio de Análisis Integral del Genoma de PATRIC. Según el análisis completo del genoma de *K.*

pneumoniae Ch1-39, contiene 72 contigs con una longitud estimada de 5, 410, 125 pb y un contenido promedio de guanina-citosina del 57.22%. La longitud denominada N50, que se define como la longitud más corta de la secuencia en el 50% del genoma, es de 347,819 pb. Además, el genoma fue anotado con la ayuda de la herramienta RAST (anotación rápida usando tecnología de subsistema) y mediante la cual se le asignó un número identificador de genoma único, 573.64458. Según los datos proporcionados por RASTtk, el genoma contiene 4, 857 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 6 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 76 genes ribosómicos (ARNr). Adicionalmente, se encontró que el genoma de *K. pneumoniae* contiene genes específicos (Tabla 7), tales como; factores de virulencia (Victors, VFDB), genes de resistencia a antibióticos (PATRIC, CARD, NDARO), transportadores (TCDB), genes diana de fármacos (DrugBank) que fueron identificados en diferentes bases de datos.

Tabla 7. Principales características del genoma de *K. pneumoniae* Ch1-39.

Características	Fuente	Cromosoma
Longitud del genoma	PATRIC	5,410,125 bp
Número de contigs	PATRIC	72
Número de proteínas caracterizadas	PATRIC	5,361
Número de proteínas putativas/hipotéticas	PATRIC	727
Número de genes de ARNr	PATRIC	6
Número de genes de ARNt	PATRIC	76
Número de proteínas con anotación de ruta	KEGG	1,039
G + C %	PATRIC	57.22%

Tamaño contig N50 (pb)	PATRIC	347,819 bp
Factores de virulencia	Victors	146
Factores de virulencia	VFDB	20
Genes de transporte	TCDB	585
Objetivo de antibióticos	DrugBank	311
Resistencia antibiótica	PATRIC	60
Resistencia antibiótica	CARD	58
Resistencia antibiótica	NDARO	4

Además, se describe la distribución de los subsistemas que representan los principales procesos biológicos y metabólicos a nivel interno de la bacteria (Figura 16).

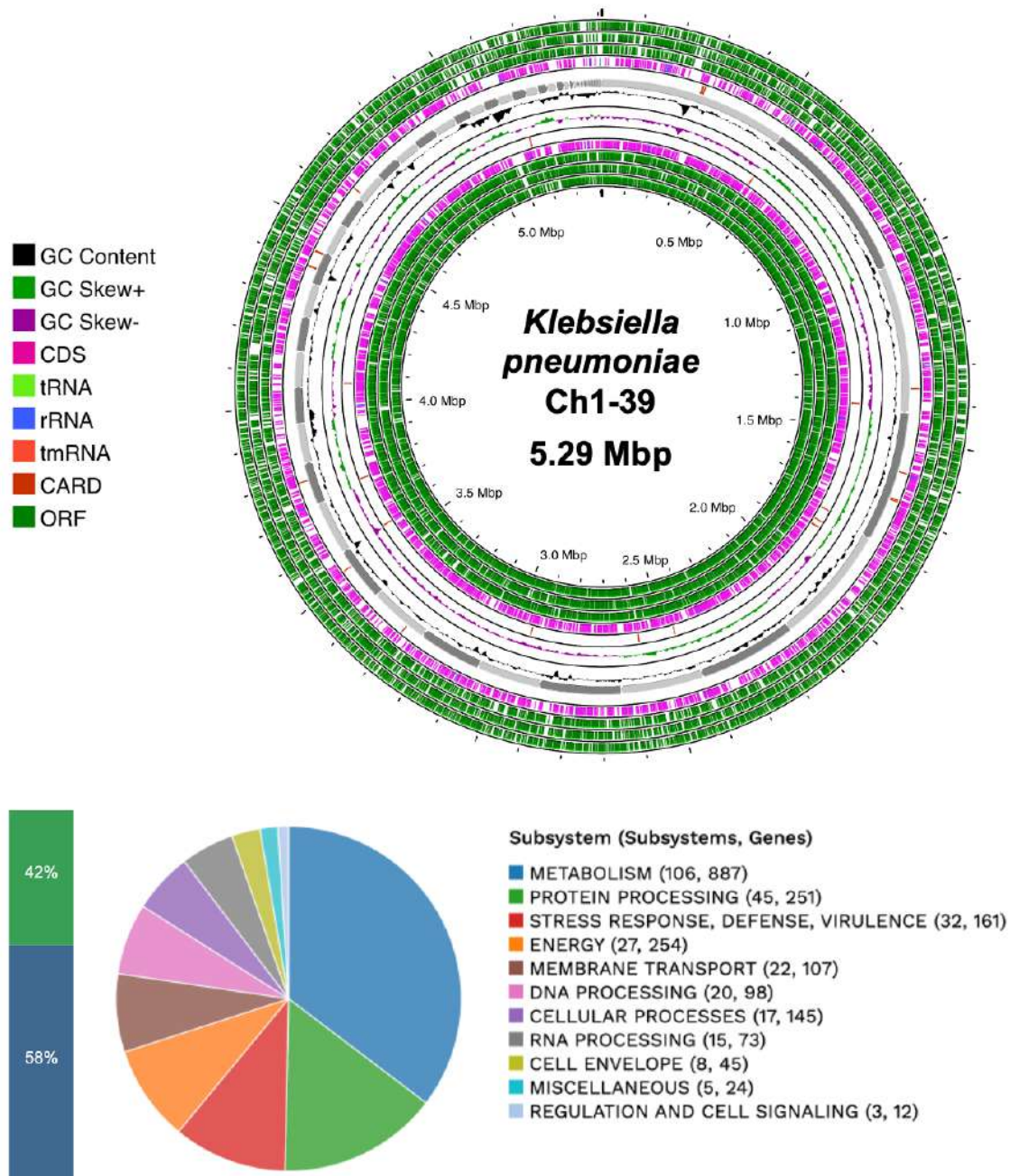


Figura 16. Mapa genómico circular e información de subsistemas para *K. pneumoniae* Ch1-39. Desde el exterior hacia el centro están los contigs del conjunto, CDS en la cadena frontal, CDS en la cadena inversa, genes de ARN, CDS con homología con genes conocidos de resistencia a antibióticos, CDS con homología con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC.

Para la distribución de subsistemas por categoría de *K. pneumoniae* Ch1-39 se utilizó la herramienta RAST con la cual se descubrió que el 42% de ellos contienen un total de 2057 genes (2054 son no hipotéticos y 3 hipotéticos) y esos no eran

subsistemas agrupados (58%), 2881 genes (1515 no hipotéticos y 1366 hipotéticos) (Figura 17).

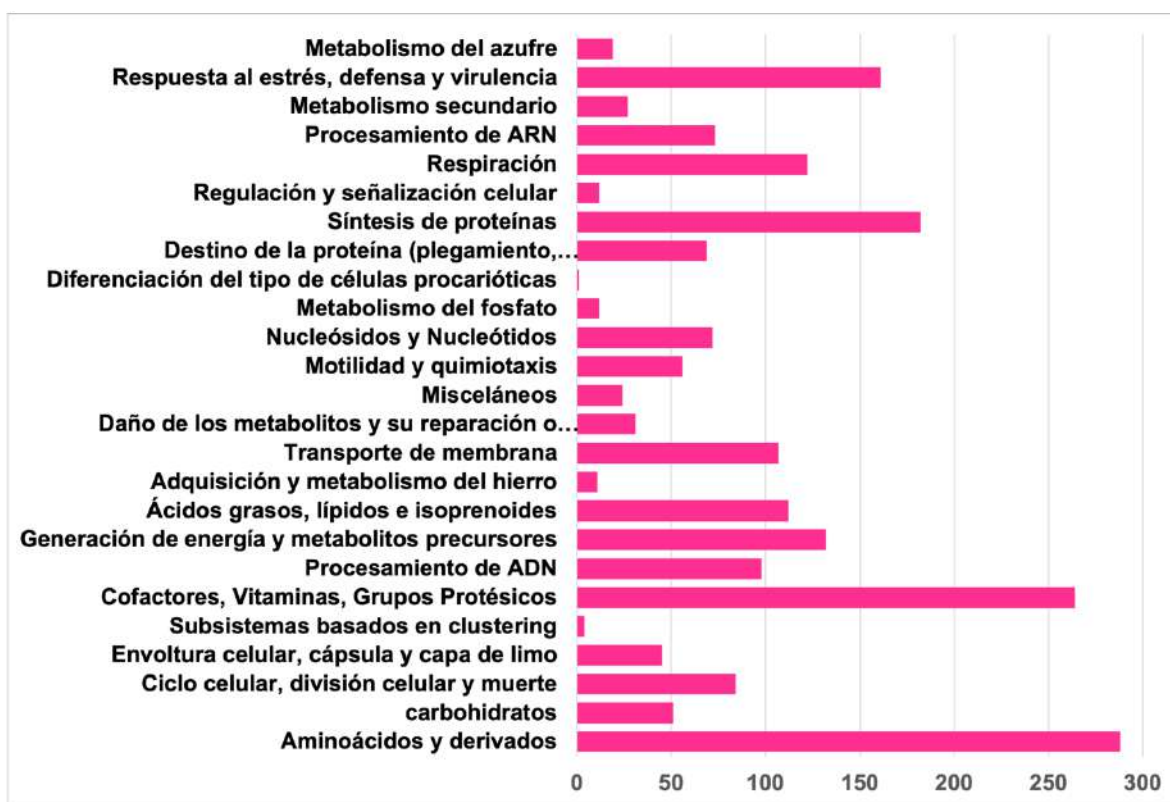


Figura 17. Recuento de subsistemas por categoría. Anotación de los diversos procesos metabólicos primordiales de la cepa *K. pneumoniae* Ch1-39.

De acuerdo al análisis del genoma de la cepa bacteriana *K. pneumoniae* Ch1-39, los 49 genes únicos que predicen la resistencia a los antibióticos se agruparon en diez mecanismos de acción diversos (Tabla 8). Algunos de los genes que se pueden destacar: son los genes de la familia SHV que confieren resistencia a β -Lactamasas como carbapenem, penam, cefalosporina que se han identificado en *Klebsiella pneumoniae*, la resistencia a la clase de antibiótico aminocumarínico esta representado por los genes *gyrB* y *mdtABC-TolC* el cual se ha reportado en *E. coli* y *Salmonella*. La clase de resistencia a los aminoglucósidos asociado con géneros de bacterias, como *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Erwinia* y *Xanthomonas*, está representada por los genes *acrAD-TolC* y *gidB*. Las clases de cefamicina, cefalosporina estan representados por el gen *acrEF-TolC* y está asociado a *E. coli*.

La clase de resistencia diaminopirimidina esta asociada a las especies *Aeromonas cavia*, *Aeromonas veronii*, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella pneumoniae*, está representado por los genes *folA* y *dfr*. La clase de fluoroquinolona esta asociada a los géneros de bacterias de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Serratia*, representado por los genes *gyrA*, *emrAB-TolC* y *emrAB-TolC*. La clase de macrólido asociado a la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, representado por los genes *macA*, *macB* y *h-NS*. La clase de antibiótico peptídico representado por los genes *bcrC*, *gdpDn* y *pgsA* esta asociada a las especies de bacterias de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La clase de resistencia a la tetraciclina asociada a los géneros de bacterias como *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Leclercia*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, estan representados por los genes *marR*, *marA* y *acrAB-TolC*. Sin embargo, el genotipo debe probarse con un fenotipo AMR. En este sentido, como una primera aproximación, el análisis fenotipo AMR mostró resistencia a Ampicilina, Clindamicina, Dicloxacilina, Eritromicina, Penicilina, Vancomicina, Carbenicilina, mientras que mostró sensibilidad a Cefalotina, Cefotaxima, Ciprofloxacino, Gentamicina, Tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Amikacina, Cloranfenicol, Netilmicina, Nitrofurantonia y Norfloxacino.

Tabla 8. Genes de resistencia antibiótica de *K. pneumoniae* Ch1-39 clasificados por su mecanismo AMR.

Mecanismos AMR	Genes
Enzima de activación de antibióticos	<i>katG</i>
Enzima de inactivación de antibióticos	<i>shv family</i>
Grupo de genes de resistencia a los antibióticos, casete u operón	<i>marA</i> , <i>marB</i> , <i>marR</i>
Objetivo de antibióticos en especies susceptibles	<i>alr</i> , <i>ddl</i> , <i>dxr</i> , <i>ef-G</i> , <i>ef-Tu</i> , <i>folA</i> , <i>dfr</i> , <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , <i>iso-tRNA</i> , <i>kasA</i> , <i>murA</i> , <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>s10p</i> , <i>s12p</i>
Proteína de protección del objetivo antibiótico	<i>bcrC</i>

Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos	<i>acrAB-TolC, acrAD-TolC, acrEF-TolC, acrZ, emrAB-TolC, emrD, macA, macB, mdfA/Cmr, mdtABC-TolC, mdtL, mdtM, sugE, tolC/OpmH</i>
Gen que confiere resistencia por ausencia	<i>gidB</i>
Proteína que altera la carga de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos	<i>gdpD, pgsA</i>
Proteína que modula la permeabilidad al antibiótico	<i>occD6/OprQ, oprB</i>
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos.	<i>acrAB-TolC, emrAB-TolC, h-NS, oxyR</i>

De acuerdo a la base de datos de referencia para factores de virulencia bacteriana (VDFB), los genes relacionados con la virulencia se clasifican principalmente como factores de adherencia, invasión y virulencia (Tabla 9).

Tabla 9. Genes relacionados con la virulencia en *K. pneumoniae* Ch1-39 predichos por VFDB.

Gen	Producto	Mecanismo de acción
<i>fimC</i>	Proteína acompañante FimC	Adherencia, Invasión
<i>ykgK/ecpR</i>	Regulador transcripcional EcpR	
<i>fimE</i>	Proteína reguladora de fimbrias tipo 1 FimE	
<i>yagY/ecpB</i>	Subunidad auxiliar fimbrial CFA/I	
<i>yagX/ecpC</i>	Proteína usher de la subunidad C fimbrial CFA/I	Factor de virulencia
<i>entS</i>	Exportador de enterobactina EntS	
<i>kdsA</i>	2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosonato-8-fosfato sintasa (EC 2.5.1.55)	
<i>fimH</i>	Proteína FimH (regula la longitud y la adhesión de las fimbrias tipo 1 y media la unión de manosa)	
<i>yagW/ecpD</i>	Adhesina fimbrial menor CFA/I	
<i>yagV/ecpE</i>	chaperona fimbrial CFA/I	
<i>fepG</i>	Proteína permeasa del sistema de transporte de enterobactina férrica FepG (TC 3.A.1.14.2)	
<i>fepD</i>	Proteína permeasa del sistema de transporte de enterobactina férrica FepD (TC 3.A.1.14.2)	
<i>fimB</i>	Proteína reguladora de fimbrias tipo 1 FimB	
<i>fepC</i>	Proteína de unión a ATP de transporte de enterobactina férrica FepC (TC 3.A.1.14.2)	

<i>fepB</i>	Proteína periplásmica de unión a enterobactina férrica FepB (TC 3.A.1.14.2)
<i>fimA</i>	Proteína fimbrial tipo 1, cadena A
<i>yagZ/ecpA</i>	Subunidad fimbrial mayor CFA/I
<i>entE</i>	2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa (EC 2.7.7.58) [enterobactina] sideróforo @ 2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa (EC 2.7.7.58) de biosíntesis de sideróforo
<i>entB</i>	Isocorismatasa (EC 3.3.2.1) [enterobactina] sideróforo/dominio portador apo-arilo de EntB @ Isocorismatasa (EC 3.3.2.1) de la biosíntesis de sideróforo
<i>entA</i>	2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa (EC 1.3.1.28) [enterobactina] sideróforo @ 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa (EC 1.3.1.28) de biosíntesis de sideróforo

El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *K. pneumoniae* MJH599, *K. pneumoniae* KPHDC1, *K. pneumoniae* IR5017, *K. pneumoniae* strain E5, *K. pneumoniae* strain 5422, *K. pneumoniae* 9459, *K. pneumoniae* strain CCI2, *K. pneumoniae* LR53-19KP, *K. pneumoniae* 61575_sr, *K. pneumoniae* KP24, *K. pneumoniae* strain ST15-OXA48, *K. pneumoniae* UPMP 1783, *K. pneumoniae* DS-1, *K. pneumoniae* strain CVUAS 5452.2, *K. pneumoniae* 14652, *K. pneumoniae* 14660, *K. pneumoniae* strain 06 (Figura 18). Las cepas más cercanas a la cepa Ch1-39 tienen orígenes ambientales, LR53-19KP es aislada del río Lerma en México (Tapia-Arreola et al., 2022), la cepa CCI2 fue aislada de del suelo foliar, que se recolectó en Japón (Akita et al., 2021).

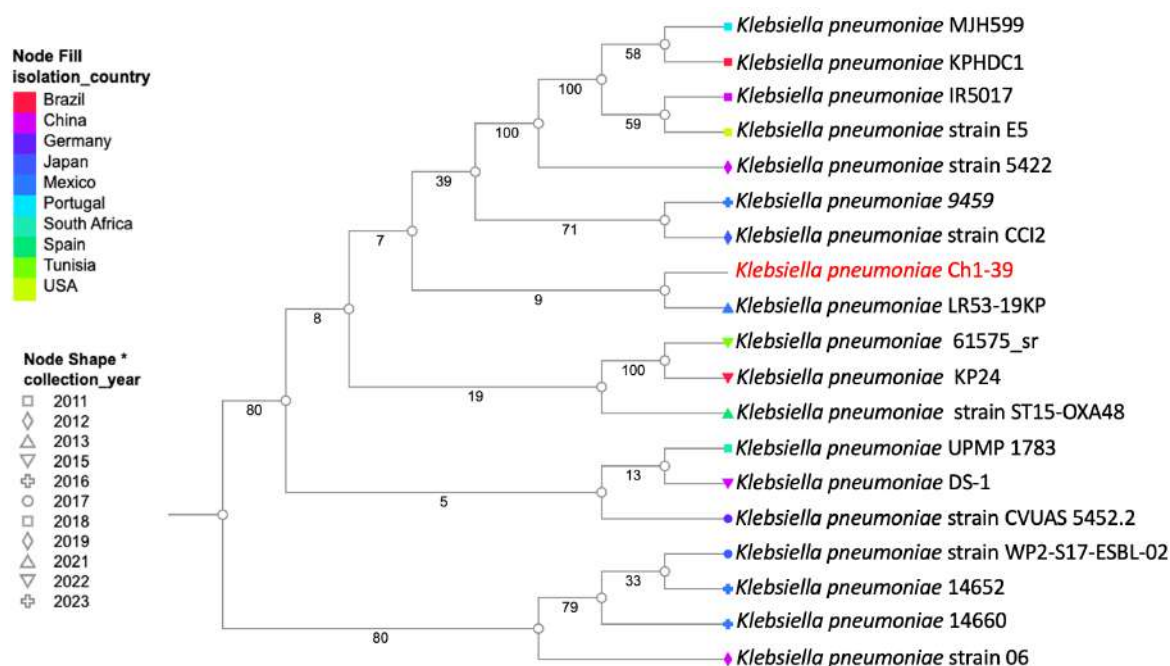


Figura 18. Análisis filogenético de de *K. pneumoniae* Ch1-39. El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *K. pneumoniae* MJH599, *K. pneumoniae* KPHDC1, *K. pneumoniae* IR5017, *K. pneumoniae* strain E5, *K. pneumoniae* strain 5422, *K. pneumoniae* 9459, *K. pneumoniae* strain CCI2, *K. pneumoniae* LR53-19KP, *K. pneumoniae* 61575_sr, *K. pneumoniae* KP24, *K. pneumoniae* strain ST15-OXA48, *K. pneumoniae* UPMP 1783, *K. pneumoniae* DS-1, *K. pneumoniae* strain CVUAS 5452.2, *K. pneumoniae* 14652, *K. pneumoniae* 14660, *K. pneumoniae* strain 06. La forma del nodo representa el año de recolección. El nodo se llena y ella representa el país del que se obtuvieron los aislados, incluidos Brasil, China, Alemania, Japón, México, Portugal, Sudafrica, España, Tunisia y Estados Unidos de America.

5.10. Caracterización genómica de *Pseudomonas psychrotolerans* Ch9-16

El genoma de la bacteria *P. psychrotolerans* Ch9-16 fue enviado al Servicio de Análisis Integral del Genoma de PATRIC. Según el análisis completo del genoma de *P. psychrotolerans* Ch9-16, contiene 18 contigs con una longitud estimada de 5,292,684 bp y un contenido promedio de guanina-citosina del 65.19%. La longitud denominada N50, que se define como la longitud más corta de la secuencia en el 50% del genoma, es de 516.804 pb. Además, el genoma fue anotado con la ayuda de la herramienta RAST (anotación rápida usando tecnología de subsistema) y mediante la cual se le asignó un número identificador de genoma único, 237610.49. Según los datos proporcionados por RASTtk, el genoma contiene 4,854 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 59 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 3

genes ribosómicos (ARNr). Adicionalmente, se encontró que el genoma de *P. psychrotolerans* contiene genes específicos (Tabla 10), tales como; factores de virulencia (Victors, VFDB), genes de resistencia a antibióticos (PATRIC, CARD, NDARO), transportadores (TCDB), genes diana de fármacos (DrugBank) que fueron identificados en diferentes bases de datos.

Tabla 10. Principales características del genoma de *P. psychrotolerans* Ch9-16.

Características	Fuente	Cromosoma
Longitud del genoma	PATRIC	5,292,684 bp
Número de contigs	PATRIC	18
Número de proteínas caracterizadas	PATRIC	3,695
Número de proteínas putativas/hipotéticas	PATRIC	1,159
Número de genes de ARNr	PATRIC	3
Número de genes de ARNt	PATRIC	59
Número de proteínas con anotación de ruta	KEGG	878
G + C %	PATRIC	65.19%
Tamaño contig N50 (pb)	PATRIC	516,804
Factores de virulencia	Victors	17
Factores de virulencia	VFDB	20
Factores de virulencia	PATRIC_VF	1
Genes de transporte	TCDB	30

Objetivo de antibióticos	DrugBank	15
Objetivo de antibióticos	TTD	4
Resistencia antibiótica	PATRIC	50
Resistencia antibiótica	CARD	4

Además, se describe la distribución de los subsistemas que representan los principales procesos biológicos y metabólicos a nivel interno de la bacteria (Figura 19).

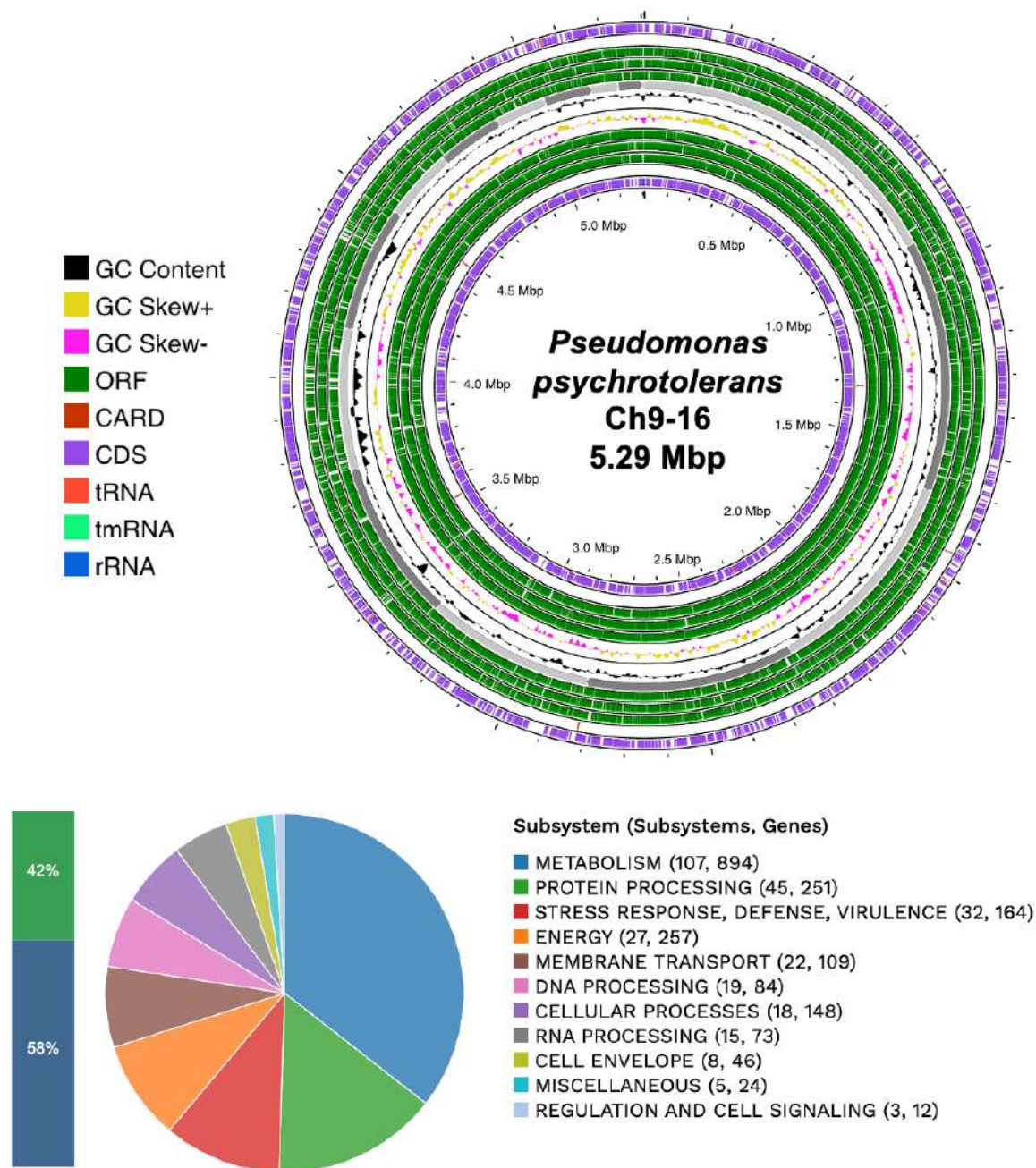


Figura 19. Mapa genómico circular e información de subsistemas para *P. psychrotolerans* Ch9-16. Desde el exterior hacia el centro están los contigs del conjunto, CDS en la cadena frontal, CDS en la cadena inversa, genes de ARN, CDS con homología con genes conocidos de resistencia a antibióticos, CDS con homología con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC.

Para la distribución de subsistemas por categoría de *P. psychrotolerans* Ch9-16 se utilizó la herramienta RAST con la cual se descubrió que el 42% de ellos contienen un total de 2062 genes (2059 son no hipotéticos y 3 hipotéticos) y esos no eran

subsistemas agrupados 58%, 2881 genes (1697 no hipotéticos y 1157 hipotéticos) (Figura 20).

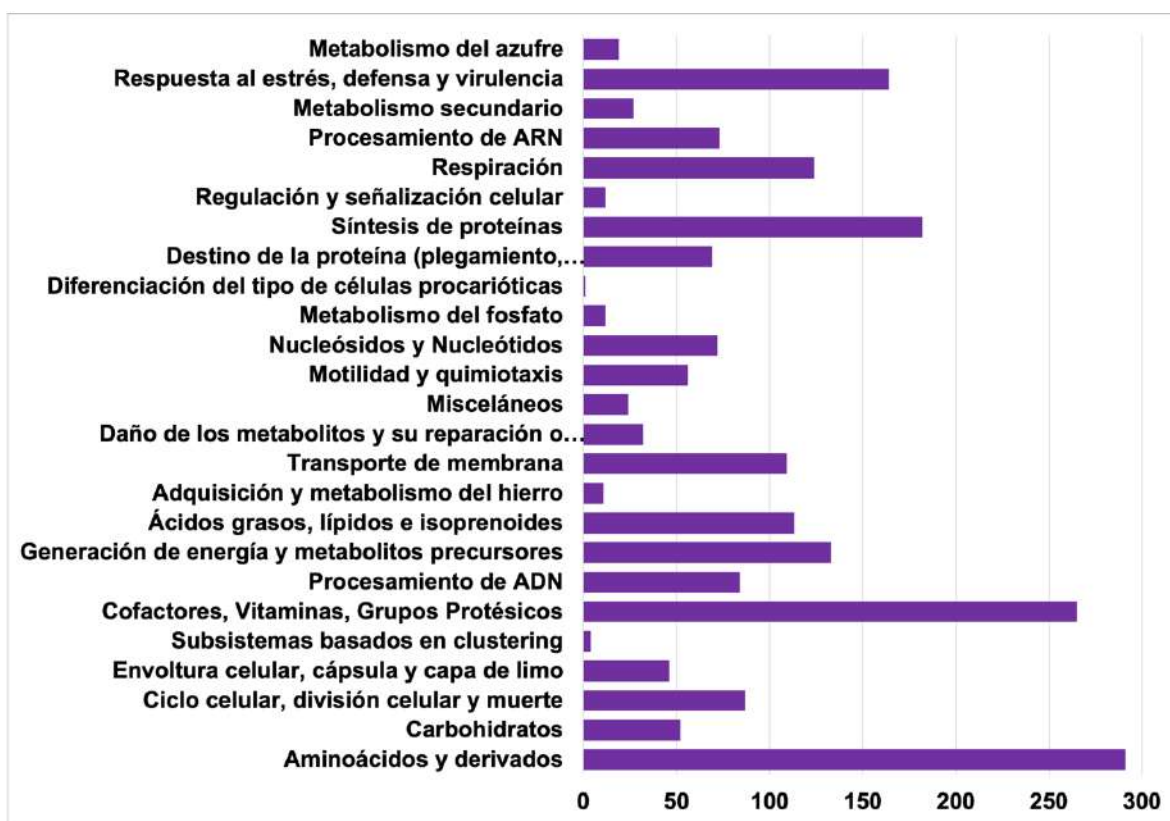


Figura 20. Recuento de subsistemas por categoría. Anotación de los diversos procesos metabólicos primordiales de la cepa *P. psychrotolerans* Ch9-16.

Se detectaron 41 genes de unicos de resistencia antibiótica, los cuales confieren ocho mecanismos AMR (Tabla 11), los cuales son enzimas de activación de antibióticos representado por el gen *katG*, enzima de inactivación de antibióticos por los genes de la familia PDC, objetivo de antibióticos en especies susceptibles representado por los genes *alr*, *ddl*, *dxr*, *ef-G*, *ef-Tu*, *folA*, *dfr*, *folP*, *gyrA*, *gyrB*, *inhA*, *fabI*, *iso-tRNA*, *kasA*, *murA*, *rho*, *rpoB*, *rpoC*, *s10p* y *s12p*, bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos representado por los genes *emrAB-OMF*, *emrAB-TolC*, *mdtABC-OMF*, *mdtABC-TolC*, *mexAB-OprM*, *mexEF-OprN*, *mexEF-oprN system* y *triABC-OpmH*, gen que confiere resistencia por ausencia el cual esta representado por el gen *gidB*, proteína que altera la carga de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos representado por los genes *gdpD* y *pgsA*, proteína que modula la permeabilidad al antibiótico representado por los genes

occD1/OprD, *occD3/OpdP*, *occD7/OpdB*, *occK11/OpdR*, *oprB*, *oprD family* y *oprF* y regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos representado por el gen *oxyR*.

Tabla 11. Genes de resistencia antibiótica de *P. psychrotolerans* Ch9-16 clasificados por su mecanismo AMR.

Mecanismo AMR	Gen
Enzima de activación de antibióticos	<i>katG</i>
Enzima de inactivación de antibióticos	<i>PDC family</i>
Objetivo de antibióticos en especies susceptibles	<i>alr</i> , <i>ddl</i> , <i>dxr</i> , <i>ef-G</i> , <i>ef-Tu</i> , <i>folA</i> , <i>dfr</i> , <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , <i>iso-tRNA</i> , <i>kasA</i> , <i>murA</i> , <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>s10p</i> , <i>s12p</i>
Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos	<i>emrAB-OMF</i> , <i>emrAB-TolC</i> , <i>mdtABC-omf</i> , <i>mdtABC-TolC</i> , <i>mexAB-OprM</i> , <i>mexEF-OprN</i> , <i>mexEF-OprN system</i> , <i>triABC-opmH</i>
Gen que confiere resistencia por ausencia	<i>gidB</i>
Proteína que altera la carga de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos	<i>gdpD</i> , <i>pgsA</i>
Proteína que modula la permeabilidad al antibiótico.	<i>occD1/OprD</i> , <i>occD3/OpdP</i> , <i>occD7/OpdB</i> , <i>occK11/OpdR</i> , <i>oprB</i> , <i>oprD family</i> , <i>oprF</i>
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos.	<i>oxyR</i>

De acuerdo, la base de datos de referencia para factores de virulencia bacteriana (VDFB), los genes relacionados con la virulencia se clasifican principalmente como factores de adherencia, endotoxinas, motilidad, motilidad espasmódica, antifagocitosis, resistencia sérica. (Tabla 12).

Tabla 12. Genes relacionados con la virulencia en *P. psychrotolerans* Ch9-16 predichos por VFDB.

Gen	Producto	Clasificación
-----	----------	---------------

<i>waaG</i>	UDP-glucosa:(heptosil)LPS alfa1,3-glucosiltransferasa WaaG	Adherencia,
<i>waaF</i>	ADP-heptosa--lipooligosacárido heptosiltransferasa II	Endotoxina
<i>flil</i>	ATP sintasa Flil específica de flagelo	
<i>fliG</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliG	
<i>flhA</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA	
<i>fliM</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliM	
<i>flgG</i>	Proteína de bastones del cuerpo basal flagelar FlgG	Adherencia, Motilidad
<i>fliP</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlipP	
<i>fliN</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliN	
<i>fleN</i>	Regulador de síntesis flagelar FleN	
<i>motA</i>	Proteína de rotación del motor flagelar MotA	
<i>pilH</i>	Proteína de motilidad espasmódica PilH	
<i>pilT</i>	Proteína de motilidad espasmódica PilT	
<i>pilG</i>	proteína de motilidad espasmódica PilG	Adherencia, Motilidad
<i>pilU</i>	Conjunto de pilus tipo IV Componente ATPasa PilU	espasmódica.
<i>pilM</i>	Proteína de biogénesis del pilus tipo IV PilM	
<i>algB</i>	Regulador de respuesta del sistema de dos componentes de biosíntesis de alginato AlgB	
<i>algU</i>	Factor sigma de ARN polimerasa RpoE	Antifagocitosis,
<i>algR</i>	Regulador de respuesta del sistema de dos componentes de biosíntesis de alginato AlgR	Resistencia sérica
<i>algC</i>	Fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) @ Fosfomanomutasa (EC 5.4.2.8)	

Análisis filogenético de *P. psychrotolerans* Ch9-16. El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *P. oryzae* strain RIT370, *P. oryzae* strain ChiGjej1B1-13418, *P. psychrotolerans* strain 97C1, *P.*

psychrotolerans strain 10^a6, *P. oryzae* RIT-PI-U, *P. psychrotolerans* YY7, *P. psychrotolerans* 1545, *P. psychrotolerans* SORGH_AS201, *P. stutzeri* IOP_25, *P. toyotomiensis* strain SM2, *P. toyotomiensis* strain 718, *P. chengduensis* BC1815, *P. chengduensis* WD211 y como grupo externo *S. frequens* L27 y *S. stutzeri* SB-1 (Figura 21). La cepa más cercana a la cepa Ch9-16 es la cepa YY7 aislada de una planta (Tian et al., 2023) y se reporta como una bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPMs).

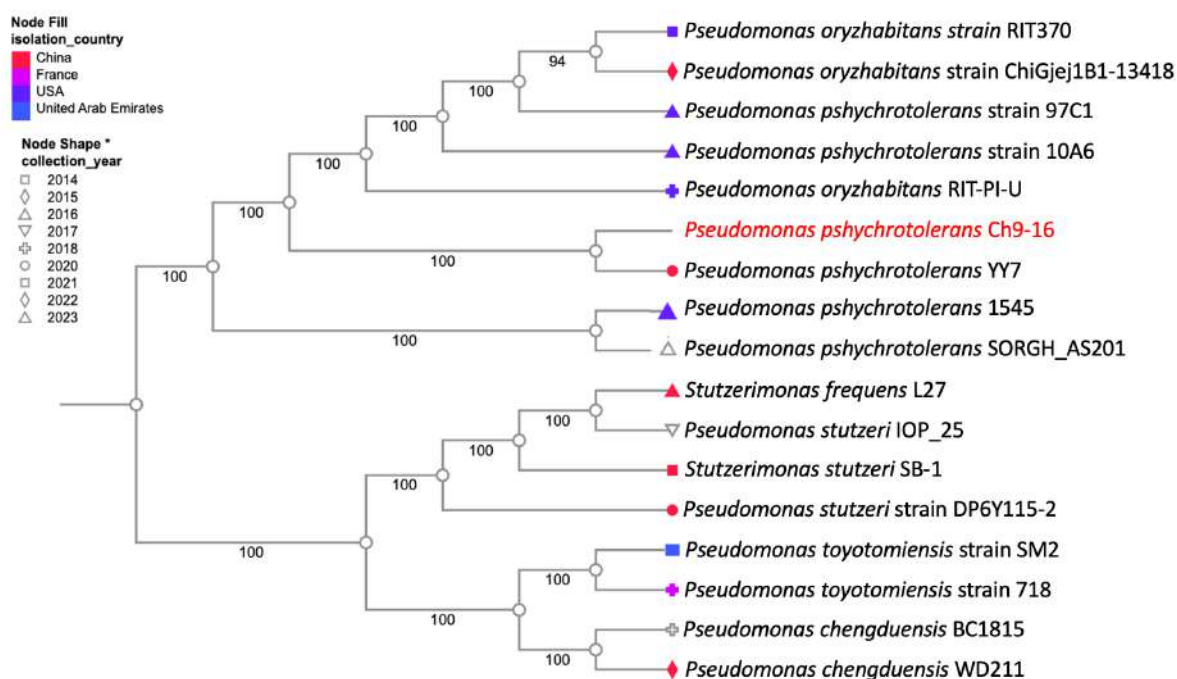


Figura 21. Análisis filogenético de *P. psychrotolerans* Ch9-16. El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *P. oryzae* strain RIT370, *P. oryzae* strain ChiGjej1B1-13418, *P. pshychrotolerans* strain 97C1, *P. psychrotolerans* strain 10A6, *P. oryzae* RIT-PI-U, *P. psychrotolerans* YY7, *P. psychrotolerans* 1545, *P. psychrotolerans* SORGH_AS201, *P. stutzeri* IOP_25, *P. toyotomiensis* strain SM2, *P. toyotomiensis* strain 718, *P. chengduensis* BC1815, *P. chengduensis* WD211 y como grupo externo *S. frequens* L27 y *S. stutzeri* SB-1. La forma del nodo representa el año de recolección. El nodo se llena y ella representa el país del que se obtuvieron los aislados, incluyen; China, Francia, Estados Unidos de America y Emiratos Arabes Unidos.

5.11. Caracterización genómica de *Mixta gaviniae* Ch1-5

El genoma de la bacteria *M. gaviniae* Ch1-5 fue enviado al Servicio de Análisis Integral del Genoma de PATRIC. Según el análisis completo del genoma de *M.*

gaviniae Ch1-5, contiene 26 contigs con una longitud estimada de 4,464,310 pb y un contenido promedio de guanina-citosina del 58.13%. La longitud denominada N50, que se define como la longitud más corta de la secuencia en el 50% del genoma, es de 484,279 pb. Además, el genoma fue anotado con la ayuda de la herramienta RAST (anotación rápida usando tecnología de subsistema) y mediante la cual se le asignó un número identificador de genoma único, 665914.8. Según los datos proporcionados por RASTtk, el genoma contiene 4,332 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 7 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 4 genes ribosómicos (ARNr). Adicionalmente, se encontró que el genoma de *M. gaviniae* contiene genes específicos (Tabla 13), tales como; factores de virulencia (Victors, VFDB), genes de resistencia a antibióticos (PATRIC, CARD, NDARO), transportadores (TCDB), genes diana de fármacos (DrugBank) que fueron identificados en diferentes bases de datos.

Tabla 13. Principales características del genoma de *M. gaviniae* Ch1-5.

Características	Fuente	Cromosoma
Longitud del genoma	PATRIC	4,464,310 bp
Número de contigs	PATRIC	26
Número de proteínas caracterizadas	PATRIC	4,332
Número de proteínas putativas/hipotéticas	PATRIC	1,008
Número de genes de ARNr	PATRIC	4
Número de genes de ARNt	PATRIC	7
Número de proteínas con anotación de ruta	KEGG	798
G + C %	PATRIC	58.13%

Tamaño contig N50 (pb)	PATRIC	484,279bp
Factores de virulencia	Victors	89
Factores de virulencia	VFDB	16
Factores de virulencia	PATRIC_VF	60
Genes de transporte	TCDB	232
Objetivo de antibióticos	DrugBank	170
Objetivo de antibióticos	TTD	40
Resistencia antibiótica	PATRIC	45
Resistencia antibiótica	CARD	27

Además, se describe la distribución de los subsistemas que representan los principales procesos biológicos y metabólicos a nivel interno de la bacteria (Figura 22).

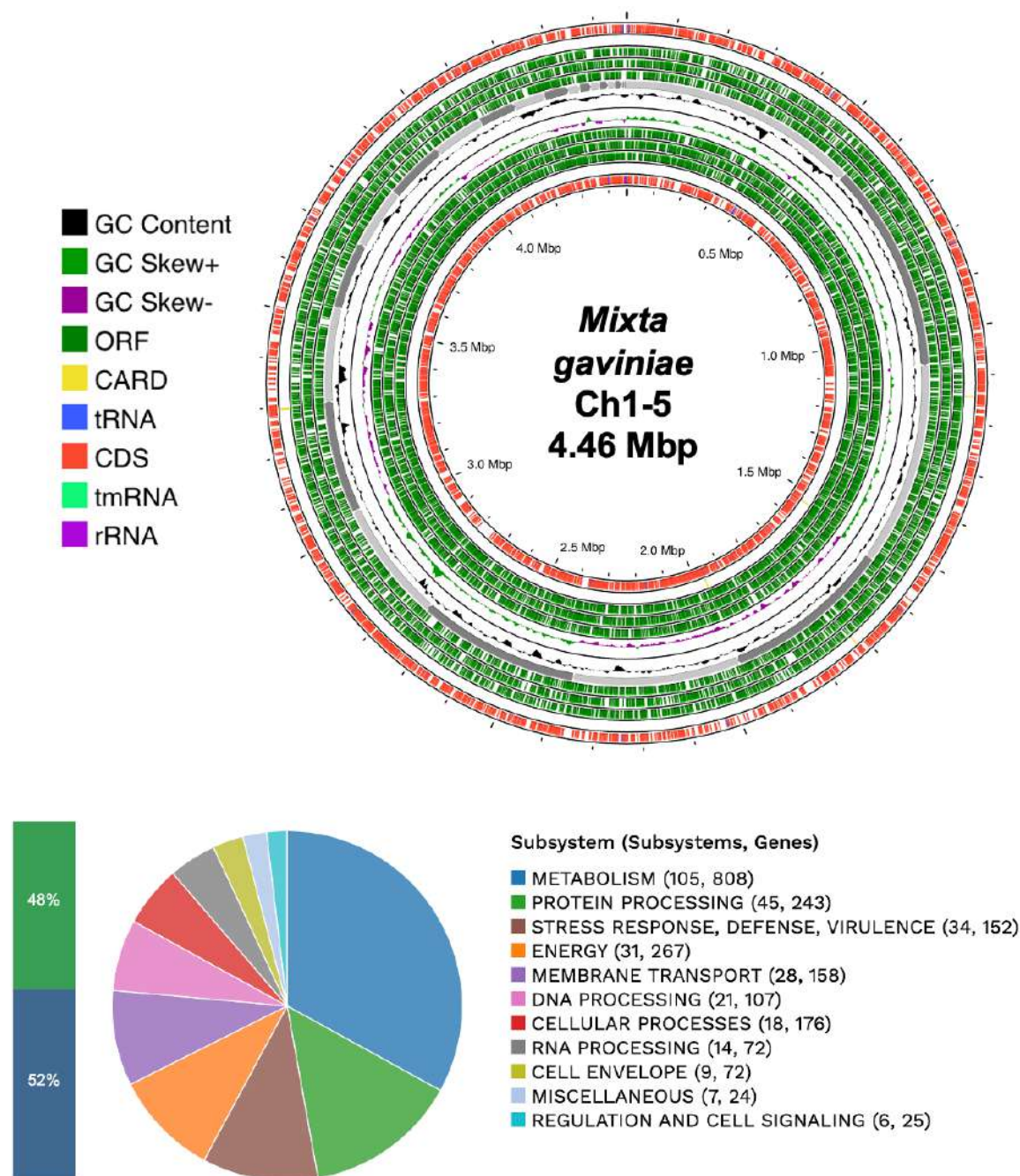


Figura 22. Mapa genómico circular e información de subsistemas para *M. gaviniae* Ch1-5. Desde el exterior hacia el centro están los contigs del conjunto, CDS en la cadena frontal, CDS en la cadena inversa, genes de ARN, CDS con homología con genes conocidos de resistencia a antibióticos, CDS con homología con factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC.

Para la distribución de subsistemas por categoría de *M. gaviniae* Ch1-5 se utilizó la herramienta RAST con la cual se descubrió que el 48% de ellos contienen un total

de 2104 genes (2104 son no hipotéticos y 0 hipotéticos) y esos no eran subsistemas agrupados (52%), 2303 genes (1294 no hipotéticos y 1099 hipotéticos) (Figura 23).

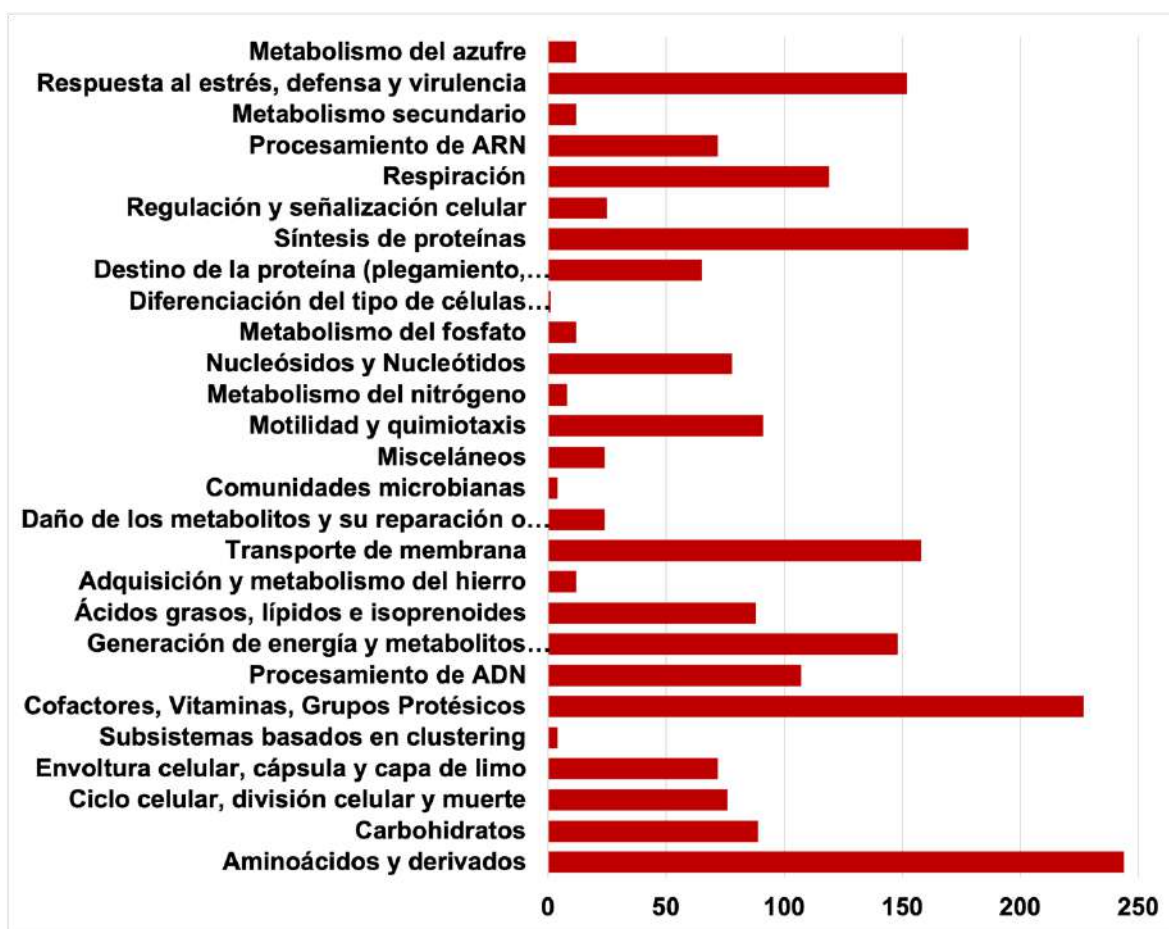


Figura 23. Recuento de subsistemas por categoría. Anotación de los diversos procesos metabólicos primordiales de la cepa *M. gaviniae* Ch1-5.

Se detectaron 37 genes de únicos de resistencia antibiótica, los cuales confieren seis mecanismos AMR (Tabla 14), de los cuales el mecanismo de Objetivo antibiótico en especies susceptibles está representado por los genes *alr*, *ddl*, *ef-G*, *ef-Tu*, *folA*, *dfr*, *folP*, *gyrA*, *gyrB*, *inhA*, *fabI*, *iso-tRNA*, *kasA*, *murA*, *rho*, *rpoB*, *rpoC*, *s10p* y *s12p*. El mecanismo de proteína de protección del objetivo antibiótico esta representado por el gen *bcrC*. El mecanismo de bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos esta representado por los genes *acrAB-tolC*, *acrAD-tolC*, *acrZ*, *emrAB-tolC*, *macA*, *macB*, *mdfA/cmr*, *mdtABC-tolC* y *tolC/opmH*. El mecanismo de Gen que confiere resistencia por ausencia esta representado por el gen *gidB*. El mecanismo de proteína que altera la carga de la pared celular y confiere

resistencia a los antibióticos esta representado por los genes *gdpD* y *pgsA*. El mecanismo de regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos esta representado por los genes *acrAB-tolC*, *emrAB-tolC*, *H-NS* y *oxyR*.

Tabla 14. Genes de resistencia antibiótica de *M. gaviniae* Ch1-5 clasificados por su mecanismo AMR.

Mecanismo AMR	Gen
Objetivo antibiótico en especies susceptibles	<i>alr</i> , <i>ddl</i> , <i>dxr</i> , <i>ef-G</i> , <i>ef-Tu</i> , <i>folA</i> , <i>dfr</i> , <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , <i>iso-tRNA</i> , <i>kasA</i> , <i>murA</i> , <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>s10p</i> , <i>s12p</i>
Proteína de protección del objetivo antibiótico	<i>bcrC</i>
Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos	<i>acrAB-tolC</i> , <i>acrAD-tolC</i> , <i>acrZ</i> , <i>emrAB-tolC</i> , <i>macA</i> , <i>macB</i> , <i>mdfA/cmr</i> , <i>mdtABC-tolC</i> , <i>tolC/opmH</i>
Gen que confiere resistencia por ausencia	<i>gidB</i>
Proteína que altera la carga de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos	<i>gdpD</i> , <i>pgsA</i>
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos.	<i>acrAB-tolC</i> , <i>emrAB-tolC</i> , <i>h-NS</i> , <i>oxyR</i>

De acuerdo, la base de datos de referencia para factores de virulencia bacteriana (VDFB), los genes relacionados con la virulencia se clasifican principalmente como factores de adherencia, motilidad, endotoxinas, quimiotaxis, regulación y sistemas de detección de quórum (Tabla 15).

Tabla 15. Genes relacionados con la virulencia en *M. gaviniae* Ch1-5 identificados por VFDB.

Gen	Producto	Clasificación
<i>motA</i>	Proteína de rotación del motor flagelar MotA	Adherencia, Motilidad
<i>gtrB</i>	Bactoprenol glucosil transferasa	Endotoxina

<i>cheY</i>	Regulador de quimiotaxis: transmite señales de quimiorreceptores a los componentes del motor flagelar CheY	
<i>cheB</i>	Regulador de la respuesta a la quimiotaxis proteína-glutamato metilesterasa CheB (EC 3.1.1.61)	
<i>cheW</i>	Regulador positivo de la actividad de la proteína CheA (CheW)	Motilidad, Quimiotaxis
<i>kdsA</i>	2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosonato-8-fosfato sintasa (EC 2.5.1.55)	Regulación
<i>luxS</i>	S-ribosilhomocisteína liasa (EC 4.4.1.21) @ Proteína de producción de autoinductor-2 LuxS	Regulación, sistema de detección de quórum
<i>fliM</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliM	
<i>flhD</i>	Activador transcripcional flagelar FlhD	
<i>fliA</i>	Factor sigma de ARN polimerasa para el operón flagelar	
<i>fliG</i>	Proteína de interruptor motor flagelar FliG	
<i>fliC</i>	Flagelina FliC	Sistema de secreción, invasión, motilidad.
<i>fliP</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlipP	
<i>flhC</i>	Activador transcripcional flagelar FlhC	

Análisis filogenético de *M. gaviniae* Ch1-5. El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *M. calida* CTOTU47345, *M. calida* CTOTU50665, *M. calida* N5_2018_008G1_dasN5_2028_008G1_concoct_18, *M. calida* N5_2018_015G1_dasN5_281_015G1_abawaca.4, *P. gaviniae* strain LMG 25382, *P. gaviniae* strain DSM22758, *E. bacterium* tyr_p5L, *E. bacterium* BAC15a-03b BAC15a-03bT, *P. personii* CTOTU50484, *P. personii* CTOTU50495, *Pantoea* sp. MAG-1F-S5P, *Pantoea* sp. Mb-10, *Pantoea* sp. DY-5, *D. gerundensis* CTOTU46774 (Figura 24). *M. gaviniae* Ch1-5 mostró similitud a *Pantoea gaviniae* LMG 25382T y *Pantoea gaviniae* DSM 22758 las cuales fueron aisladas de una

fórmula infantil en Suiza (Popp et al., 2010), (Stevens et al., 2018).

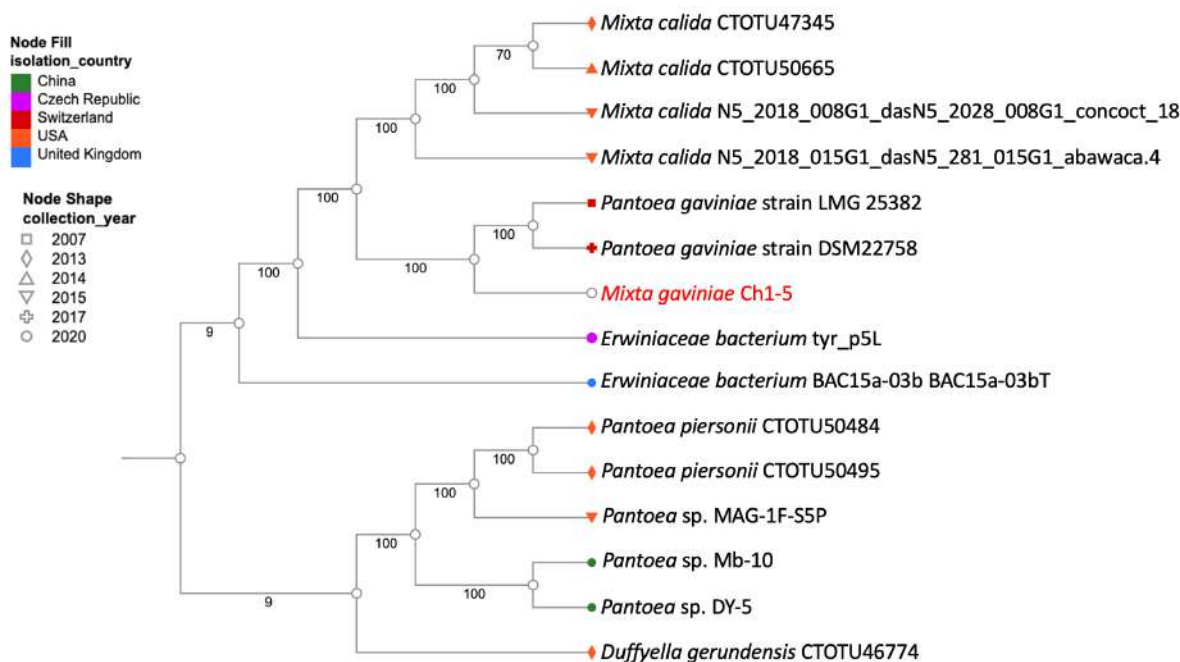


Figura 24. Análisis filogenético de de *M. gaviniae* Ch1-5. El análisis filogenético se realizó en BV-BRC. Se incluyeron las siguientes cepas: *M. calida* CTOTU47345, *M. calida* CTOTU50665, *M. calida* N5_2018_008G1_dasN5_2028_008G1_concoct_18, *M. calida* N5_2018_015G1_dasN5_281_015G1_abawaca.4, *P. gaviniae* strain LMG 25382, *P. gaviniae* strain DSM22758, *E. bacterium* tyr_p5L, *E. bacterium* BAC15a-03b BAC15a-03bT, *P. piersonii* CTOTU50484, *P. piersonii* CTOTU50495, *Pantoea* sp. MAG-1F-S5P, *Pantoea* sp. Mb-10, *Pantoea* sp. DY-5 y como grupo externo *D. gerundensis* CTOTU46774. La forma del nodo representa el año de recolección. El nodo se llena y ella representa el país del que se obtuvieron los aislados, incluidos China, Republica Checa, Suiza, EUA y Reino Unido.

Discusión

Los resultados de este estudio muestran que, con base en el análisis de la densidad bacteriana, el chile molido obtenido de diferentes regiones geográficas podría tener una calidad microbiológica limitada según los criterios del ICMSF, donde valores de $\leq 10^5$ UFC/g indican una calidad aceptable, debido a que, para la cantidad de BMA las muestras variaron de 6×10^3 a 7×10^8 UFC/g (tabla 2). Los resultados para los recuentos de BME oscilaron entre 4.3×10^3 y 2×10^9 UFC/g (tabla 2). Aunque este grupo bacteriano no se considera dentro de los criterios de calidad microbiológica para las especias, se debe considerar el monitoreo de *B. cereus* como miembro de este grupo por sus características de toxicidad (Granum & Lund, 1997); cifras elevadas de BMA y esporulados ponen de manifiesto la exposición a fuentes de contaminación. Otro grupo bacteriano importante a considerar como indicador de calidad higiénica es el de la familia Enterobacteriaceae, debido a que son un grupo de bacterias que exhiben características cosmopolitas a causa de su capacidad para habitar una amplia variedad de entornos en todo el mundo. Estas bacterias son conocidas por su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, lo que les permite prosperar en una diversidad de hábitats, incluidos suelos, aguas, plantas, animales e incluso dentro del tracto digestivo humano. Su distribución global y su capacidad para colonizar una amplia gama de nichos ecológicos las convierten en especies cosmopolitas, lo que las hace relevantes tanto en la salud humana como en la ecología microbiana (Farmer III et al., 2010), de acuerdo a los resultados cinco muestras de chile molido (CH1, CH2, CH3, CH4 y CH7) superaron los criterios microbiológicos del ICMSF ($\leq 10^4$ UFC/g) que oscilaron entre los 2.1×10^4 y 2.3×10^6 UFC/g (tabla 2).

Según los resultados, los análisis de PCA y el índice de diversidad de Shannon mostraron diferencias en la composición de la comunidad bacteriana en el chile molido, probablemente porque las muestras de chile molido fueron recolectadas de diferentes regiones geográficas, y de una variedad específica de planta de *Capsicum* spp. dentro de cada región geográfica. Así, la familia Bacillaceae es uno de los principales grupos taxonómicos que está presente en el 100% de las

muestras de chile molido, con una abundancia relativa alta. Varias especies bacterianas beneficiosas estaban presentes en este grupo bacteriano, como el complejo de especies *B. subtilis* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*), al que se le ha reconocido que tiene diversas funciones ecológicas y algunos miembros tienen gran importancia y aplicación como promotores del crecimiento vegetal, agentes de biocontrol, agentes probióticos y de biorremediación, y en la industria por su capacidad para producir importantes enzimas y antibióticos (Caulier et al., 2019; Iqbal et al., 2023; Ngaliyat et al., 2021; Su et al., 2020). Además, en el grupo operativo *B. amyloliquefaciens*, que comprende especies bacterianas detectadas en muestras de chile molido, estaban *B. amyloliquefaciens* del suelo y *B. velezensis* asociado a plantas (Iqbal et al., 2023). Algunos miembros del grupo *B. pumilus* detectados fueron *B. safensis* y *B. altitudinis*. Otras especies detectadas fueron *B. mojavensis* y *B. sonorensis*, que son parientes cercanos del clado *B. subtilis* (Iqbal et al., 2023). Por lo tanto, estos hallazgos revelan que el chile molido posee una alta carga bacteriana de especies benéficas con usos potenciales en biotecnología, que aún están por explorar.

Por otro lado, en la familia Bacillaceae y como potencial factor de riesgo para la salud, en casi todas las muestras de chile molido se detectaron dos especies bacterianas relacionadas con patógenos, *B. licheniformis* y *B. cereus* (Figura 4). En el caso de *B. licheniformis*, se han informado varias cepas asociadas a patógenos humanos oportunistas que causan infecciones graves como bacteriemia, peritonitis, intoxicación alimentaria e infecciones oculares (Haydushka et al., 2012). Sin embargo, se necesitan más estudios para entender la carga bacteriana y la capacidad de infección de esta especie bacteriana que está vinculada con patógenos y que fue detectada en las muestras de chile molido. De acuerdo con otros informes, se han detectado y aislado cepas toxigénicas de *B. cereus* como parte de la diversidad microbiana en diferentes especies, incluido el chile molido (Celestino Hernández et al., 2021; Frentzel et al., 2018b; Hariram & Labbé, 2015; Hernández Gómez et al., 2022). Según nuestros resultados, todas las muestras de chile molido presentaron coincidencias de secuencia para esta especie bacteriana relacionada con patógenos (Figura 4). Aunque la cuantificación de *B. cereus* no fue

detectada mediante el enfoque dependiente del cultivo utilizado en este trabajo, sus capacidades de producción de toxinas sugieren la necesidad de implementar y desarrollar un programa de monitoreo, porque los brotes transmitidos por alimentos se han asociado con una carga de *B. cereus* superior a 10^5 CFU/g de alimento (Allende et al., 2016).

Otra de las familias mas representativa fue Enterobacteriaceae con abundancias de 47.34% y 96.23% para las muestras CH2 y CH15 respectivamente (Figuras 1 y 2). Según la distribución bacteriana adicional relacionada con patógenos (Figura 4), el 80% de las muestras de chile en molido podrían presentar un problema de salud pública. Por lo general, las autoridades sanitarias consideran a los miembros del grupo Enterobacteriaceae como indicadores de higiene por su capacidad de propagarse en diversos nichos ecológicos. De acuerdo con la carga bacteriana, en particular con el grupo Enterobacteriaceae (Tabla 1), la detección metagenómica de miembros de la familia Enterobacteriaceae relacionados con patógenos en las muestras de chile molido representa un hallazgo importante. Sin embargo, se necesitan más pruebas de capacidad de infección para comprender sus riesgos potenciales para los consumidores. Además, los mecanismos utilizados por el microorganismo patógeno para invadir al huésped y causar daño es un proceso progresivo muy extenso en el que están involucrados diversos factores fisiológicos. Por tanto, la aplicación de la metagenómica para interpretar la comunidad bacteriana y prevenir posibles riesgos para la salud es un primer paso de gran importancia para poder entender su propagación y proponer las mejores formas de evitarlo en el chile molido. Considerando que las bacterias patógenas pueden propagarse a través del chile molido, y de acuerdo a los géneros bacterianos detectados y para realzar su importancia, hay que considerar que *E. coli* es un organismo comensal presente en la microbiota del tracto intestinal del ser humano y animales. Varias cepas han adquirido mecanismos de virulencia como colonizadores provocando diarrea y otras enfermedades intestinales (Janda & Abbott, 2021). *S. enterica* suele causar gastroenteritis y está relacionada con el consumo de alimentos contaminados (Alvarez et al., 2023), y un importante brote de salmonelosis humana en Alemania se asoció con patatas fritas con pimentón en

polvo (Lehmacher et al., 1995). *E. cloacae* es un patógeno común que puede causar neumonía, infecciones del tracto urinario y septicemia (Annavajhala et al., 2019). *Klebsiella spp.* se encuentran entre los patógenos oportunistas importantes que se han convertido en un problema de salud pública porque son un colonizador prevalente en los microbiomas humanos y animales. Según algunos informes, el 0,3% de todas las infecciones por Gram negativos están representadas por este microorganismo bacteriano, causando infecciones del tracto urinario, cistitis, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas, endocarditis y septicemia (Effah et al., 2020; Navon-Venezia et al., 2017). *C. freundii* es un microorganismo que se propaga en diversos ambientes, como el agua, el suelo, los alimentos y partes de la microbiota intestinal de animales y humanos. Varias especies relacionadas tienen la capacidad de causar infecciones asociadas a la atención médica, algunas afectan el tracto urinario, el hígado, el tracto biliar, el peritoneo, los intestinos, el tracto respiratorio, el endocardio, los tejidos blandos, las meninges y el torrente sanguíneo (Liu et al., 2018). *S. marcescens*, un microorganismo oportunista con capacidad de propagarse fácilmente en el medio ambiente y causar brotes, es relevante porque está asociado con infecciones que incluyen las del tracto respiratorio, el torrente sanguíneo, el sistema nervioso central, el tracto urinario y la endocarditis (Fernández et al., 2020). Otra especie bacteriana oportunista relacionada con patógenos detectada en el chile molido fue *Cronobacter spp.*, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y causa infecciones como septicemia, neumonía, meningitis y enterocolitis necrotizante (Y. Lu et al., 2019). *E. gallinarum* causa una pequeña fracción de las infecciones asociadas a la atención sanitaria; sin embargo, se considera un microorganismo de baja virulencia que se asocia principalmente con infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario y de heridas quirúrgicas (Monticelli et al., 2018). *P. putida* se ha convertido recientemente en un problema de salud pública debido a su capacidad de propagar mecanismos de resistencia a los antibióticos; aunque se considera de baja patogenicidad, puede provocar infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Tan et al., 2019). *A. baumannii* es un patógeno asociado a la atención sanitaria con alta virulencia y resistencia a múltiples fármacos, que se considera un importante problema de salud

pública porque puede causar la muerte a través de sus mecanismos de infección. Las infecciones asociadas con esta especie bacteriana incluyen piel y tejidos blandos, infecciones de heridas, bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, meningitis y neumonía (Ibrahim et al., 2021).

Además de la detección de especies bacterianas relacionadas con patógenos, los resultados muestran que el chile molido puede proporcionar una enorme reserva de genes de resistencia antibiótica y puede ser una ruta potencial de transmisión ambiental de bacterias resistentes a los antibióticos. En total, en las 15 muestras de chile molido analizadas se detectaron 68 ARG asociados, que confieren resistencia bacteriana al menos 13 clases diferentes de antibióticos (Figuras 5 y 6). Estudios previos de chile molido de diferentes regiones geográficas demostraron mediante pruebas de PCR y secuenciación una alta prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido (ES-BL) y metalo- β -lactamasas (MBL) en miembros de las familias Enterobacteriaceae y Bacillaceae (Celestino Hernández et al., 2021; Hernández Gómez et al., 2022). Además, en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Hernández Gómez et al., 2022), *B. cereus* aislado de chile molido mexicano mostró resistencia a penicilina G, ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cefotaxima, dicloxacilina, amoxicilina/ácido clavulánico y trimetoprim-sulfametoxazol. En el 100% de los aislados, a tetraciclina en 90%, a eritromicina en 77%, a clindamicina en 74% y a cloranfenicol en 42%. Por otro lado, *K. cowanii*, miembro de la familia Enterobacteriaceae aislado del chile molido mexicano (Hernández Gómez et al., 2022), mostró resistencia a penicilina, ampicilina, carbenicilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina en el 100% de los aislados. En consecuencia, estos importantes resultados fueron un componente clave para ampliar el análisis. Según los resultados de este trabajo, los genes de resistencia a betalactámicos están ampliamente representados en el 100% de las muestras de chile molido por genes que codifican diversas clases de betalactamasas asociadas a las familias Enterobacteriaceae y Bacillaceae, lo que podría permitir la hidrólisis de cefalosporinas de espectro extendido, carbapenémicos y penicilina, donde los géneros bacterianos asociados a esta resistencia, como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*,

Proteus, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella* y *Serratia*, podrían ser de interés público como problema de salud pública (Bush & Bradford, 2020). Algunas de ellas, por ejemplo, las CTX-M, son las BLEE más comunes distribuidas globalmente entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae (Bush & Bradford, 2020). Además, se detectaron β -lactamasas tipo OXA, que confieren resistencia a los carbapenémicos, y están relacionadas con varias especies de *Acinetobacter*, lo que podría ser de particular interés en términos de salud pública (Bush & Bradford, 2020; Ibrahim et al., 2021). Las BLEE son fácilmente transferibles en una amplia gama de huéspedes bacterianos, ya que están codificadas principalmente por plásmidos y elementos genéticos móviles como integrones, secuencias de inserción y transposones, por lo que su diseminación mediante transferencia horizontal en condiciones específicas podría ser un importante contribuyente en comunidades bacterianas (De Angelis et al., 2020).

La resistencia a múltiples antibióticos provocada por bombas de eflujo está ampliamente conservada en las bacterias; encontramos que algunos de estos estaban codificados por los genes *oqxA* y *oqxB*. Según diversos informes, estos genes están asociados principalmente con la resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos (PMQR), que está presente entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae y confiere resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, como las quinolonas y las fluoroquinolonas, que se utilizan durante el tratamiento clínico de cepas bacterianas patógenas como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella* (Bharatham et al., 2021; J. Li et al., 2019; Moosavian et al., 2021). Otro mecanismo de resistencia a los antibióticos que se detectó fue a la tetraciclina a través de genes *tet*, que codifican principalmente bombas de eflujo y están presentes tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, están diseminados a través de plásmidos y transposones, y pueden transmitirse a través de diversos sistemas genéticos y se propaga en géneros bacterianos como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella* y *Serratia* (Grossman, 2016; Nøhr-Meldgaard et al., 2021). Otro mecanismo importante detectado fueron diversos genes de resistencia

a antibióticos que codifican enzimas con actividad modificadora (Figura 6). Estas enzimas realizan la transferencia de grupos funcionales como el acetilo (*cat86*, *catA10*, *catBx*, *aac3-I*, *aac3-Ib* y *aac3-IIa*), nucleotidilo (*aadA4-5*, *aadE-K*, *ant4-Ib* y *ant6-Ia*), fosforilo (*aph3''Ia*, *strA* y *strB*), o grupos tiol (*fosA2*), que confiere resistencia a géneros bacterianos como *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Erwinia* y *Xanthomonas*, y una variedad de antibióticos, incluidos aminoglucósidos, macrólidos y cloranfenicol, entre muchos otros (J. Schaenzer & D. Wright, 2020; Varela et al., 2021). Se ha detectado resistencia a los glicopéptidos por el grupo de genes *van* (*vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* y *vanXY*), que codifica enzimas que modifican el peptidoglicano, en varias especies de *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*), y la diseminación de la resistencia a la vancomicina entre especies grampositivas mediante transferencia horizontal de genes es común, debido a la presencia de determinantes genéticos (Stogios & Savchenko, 2020). Todos los resultados indican que el chile en polvo posee una alta diversidad bacteriana con un reservorio extendido de ARG y, por lo tanto, se necesita más investigación para comprender mejor la calidad del chile en polvo y el riesgo potencial para la salud pública.

Se obtuvieron 420 aislados, de los cuales 25 presentaron un índice de infección mayor en frutos de *Capsicum annuum* L., estos fueron probados en planta, pero no se observó ningún síntoma de infección (figura 9). Esto se debe a que la mayoría de las plantas, ya sea de uso agrícola o de vida silvestre, poseen una inmunidad o resistencia innata a muchos patógenos (Jibril et al., 2016). Debido a esto, se volvió a evaluar los 25 aislados en frutos de chile (*Capsicum annuum* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum*), donde, se seleccionaron cuatro aislados (SM2, Ch1-5, Ch1-39 y Ch9-16) que mostraron síntomas más evidentes de infectividad, como podredumbre blanda, necrosis y clorosis, en un periodo de tiempo más corto. De estos, se determinó que pertenecen al género *Pectobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Mixta*. Las especies identificadas mediante secuenciación fueron: *Pectobacterium aroidearum* (SM2), *Mixta gaviniae* (Ch1-5), *Klebsiella pneumoniae* (Ch1-39) y *Pseudomonas psychrotolerans* (Ch9-16).

El fitopatógeno *Pectobacterium* spp. es objeto de varios estudios debido a su capacidad para causar enfermedades devastadoras en una amplia variedad de plantas en todo el mundo, lo que resulta en considerables pérdidas comerciales (Ma et al., 2007). *P. aroidearum* fue identificado como una nueva especie bacteriana en 2013 y se caracteriza principalmente por causar la pudrición blanda en plantas monocotiledóneas (Nabhan et al., 2013; Xu et al., 2021). En este estudio, se informa sobre el aislamiento del patógeno *P. aroidearum* SM2 de frutos de *Capsicum annuum* var. Serrano que presentaban síntomas de pudrición blanda. El análisis del genoma de *P. aroidearum* SM2 mediante secuenciación reveló la presencia de genes de virulencia importantes que podrían desempeñar un papel crucial durante la maceración de los tejidos de los frutos analizados (*Capsicum annuum* L. y *Solanum lycopersicum*, (Figura 8)), incluyendo pectinasas, cinco tipos de sistemas de secreción (tipo I, II, III, IV y VI) y genes asociados con la motilidad e invasión (Tabla 6). Además, se observó que el fenotipo de resistencia a la eritromicina podría explicarse por la presencia de genes relacionados con los mecanismos de resistencia a los antibióticos de la bomba de eflujo. Investigaciones previas han demostrado que los principales determinantes de patogenicidad responsables de los síntomas de pudrición blanda en tejidos vegetales de diversas plantas de cultivo incluyen una variedad de genes que codifican enzimas como pectinasas extracelulares (pectina liasa, pectina metilesterasa, pectina poligalacturonasa), así como proteinasas, celulasas, toxinas y sistemas de secreción. Estos genes, ampliamente distribuidos y conservados en los genomas, son característicos de uno de los diez patógenos bacterianos vegetales más comunes, *Pectobacterium* spp. (He et al., 2021; Huang et al., 2019; Xu et al., 2021).

El género *Klebsiella* spp., como se ha mencionado anteriormente se reporta principalmente como un patógeno de humanos y animales que se ha convertido en un problema de salud pública (Effah et al., 2020; Navon-Venezia et al., 2017). A pesar de esto, el género *Klebsiella* spp. recientemente se ha reportado como un fitopatógeno emergente. *K. pneumoniae* se ha reportado como causante de lesiones necróticas en hojas de papa, haba y col y en cotiledones de pepino y calabaza (Turyanitsa & Korobko, 1984), también se encontró como causante de

decoloración, de coloración amarillenta o blanqueamiento en las hojas de maíz (HUANG et al., 2016) y como productor de la pudredumbre blanda en maíz (X. Li et al., 2023). En este estudio se aisló *K. pneumoniae* Ch1-39 de chile molido proveniente de San Luis potosí, México; que presentó infección en frutos de chile y jitomate (Figura 8). El análisis de genoma de *K. pneumoniae* Ch1-39 mediante secuenciación reveló la presencia de genes de virulencia (Tabla 9) como los genes *entS*, *entE*, *entB* y *entA*, que producen enterobactina (Peralta et al., 2016), la cual, por parte de los fitopatógenos les proporciona una ventaja competitiva al permitirles adquirir hierro en ambientes donde este nutriente es limitado, lo que facilita su capacidad para colonizar y causar enfermedades en las plantas hospederas.

El género *Pseudomonas* spp. es extremadamente diverso y comprende numerosas especies fitopatógenas que pueden causar enfermedades en una amplia gama de plantas cultivadas y silvestres. Estas enfermedades varían desde manchas foliares hasta marchitez y pudrición de raíces, afectando a cultivos de importancia económica como el tomate, la papa, el algodón y muchas otras (HÖFTE & DE VOS, 2006). *Pseudomonas psychrotolerans* exhibe una notable adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, lo que le permite sobrevivir y persistir en una amplia gama de hábitats vegetales. Se ha encontrado en suelos agrícolas, aguas superficiales y tejidos de plantas, lo que sugiere que puede desempeñar un papel significativo como patógeno en diversos sistemas agrícolas y ecológicos. *P. psychrotolerans* se ha reportado como causante de la mancha bacteriana en las hojas del tabaco (Y. Li et al., 2023), a pesar de esto se le reporta mayormente como una bacteria benéfica ya que ha sido reportada como bacteria promotora de crecimiento vegetal (Tian et al., 2023), incluso en presencia de metales pesados a presentado esta actividad (Kang et al., 2020). Se aisló *P. psychrotolerans* Ch9-16 de chile molido proveniente de Jalisco, México, la cual presentó infección en frutos de chile y jitomate (Figura 8). El análisis del genoma de *P. psychrotolerans* Ch9-16 mediante secuenciación reveló la presencia de genes de virulencia (Tabla 12) se identificaron los genes *flil*, *fliG*, *fliM*, *fliN* y *motA* que están involucrados en la formación y la función de los flagelos bacterianos, estructuras de locomoción que permiten a las bacterias moverse hacia y a través de los tejidos de las plantas. La movilidad bacteriana es

importante para la colonización de las plantas y la diseminación de la infección (Deakin et al., 1997), y los genes *algB*, *algU*, *algR* y *algC* que están involucrados en la biosíntesis de alginato, un exopolisacárido producido por algunas bacterias fitopatógenas, como *Pseudomonas aeruginosa* (DeVries & Ohman, 1994), que puede desempeñar un papel en la virulencia al facilitar la formación de biofilms y la resistencia a los factores de estrés ambiental.

El género *Mixta* fue propuesto en el 2018 como un nuevo género, en referencia a los diversos hábitats de los que se obtuvieron sus especies, incluidos plantas, humanos y productos alimenticios (Palmer et al., 2018; Popp et al., 2010; Stevens et al., 2018), por lo que las especies *Pantoea calida*, *Pantoea gaviniae*, *Pantoea theicola*, y *Pantoea intestinalis* fueron movidas al nuevo género *Mixta* (Palmer et al., 2018). Si bien no todas las especies dentro del género *Mixta* son fitopatógenas (Hagaggi & Mohamed, 2020; Hosseinpour et al., 2021), este género abarca una variedad de bacterias que podrían funcionar como fitopatógenos en diferentes sistemas de cultivo debido a la presencia de genes de virulencia en su genoma, aunque se necesitan más estudios para confirmarlo. Se aisló *Mixta gaviniae* Ch1-5 de chile molido proveniente de San Luis Potosí, México, la cual presentó infección en frutos de chile y jitomate (Figura 8). El análisis del genoma de *M. gaviniae* Ch1-5 mediante secuenciación reveló la presencia de genes de virulencia (Tabla 15) muchos de estos genes están relacionados con la motilidad, la quimiotaxis, la síntesis de LPS y la comunicación intercelular, características que pueden ser importantes para la fitopatogenicidad bacteriana y su interacción con las plantas hospedadoras. Sin embargo, su papel específico puede variar dependiendo del organismo y del contexto ambiental.

Conclusiones

1. El chile en polvo mexicano es un condimento muy importante y representa una fuente importante de ingresos, y muchas regiones geográficas productoras de chile continúan respaldando la demanda.
2. Es necesario promover un ambiente seguro que fomente el logro y la mejora continua de su calidad, en particular en términos de criterios microbiológicos.
3. La detección de patógenos debe ser una prioridad para evitar su propagación.
4. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el chile en polvo tiene una importante diversidad bacteriana con una enorme reserva de genes de resistencia a antibióticos.
5. En este trabajo reportamos los fitopatógenos como *P. aroidearum* SM2, *K. pneumoniae* Ch1-39, *P. psychrotolerans* Ch9-16 y *M. gaviniae* Ch1-5 con capacidad de causar pudrición blanda, y necrosis en frutos de *C. annuum* L. y *Solanum lycopersicum*.
6. La comprensión de estos resultados proporcionará direcciones de investigación futuras para disminuir los riesgos para la salud pública y la sanidad vegetal asociados con los microorganismos patógenos, que presentan diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos.

REFERENCIAS

- Aguilar Rincón, V. H., Corona Torres, T., López López, P., Latournerie Moreno, L., Ramírez Meraz, M., Villalón Mendoza, H., & Aguilar Castillo, J. A. (2010). *Los chiles de México y su distribución*.
- Akita, H., Itoiri, Y., Takeda, N., Kimura, Z., Inoue, H., & Matsushika, A. (2021). Draft Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* CCI2, Isolated from Leaf Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 10(25). <https://doi.org/10.1128/MRA.00343-21>
- Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Gironés, R., & Wahlström, H. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14, 4524–1.
- Alvarez, D. M., Barrón-Montenegro, R., Conejeros, J., Rivera, D., Undurraga, E. A., & Moreno-Switt, A. I. (2023). A review of the global emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Infantis. *International Journal of Food Microbiology*, 403, 110297. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110297>
- Annavajhala, M. K., Gomez-Simmonds, A., & Uhlemann, A.-C. (2019). Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00044>
- Bach, E., Seger, G. D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 99, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>
- Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. In *Food Chemistry* (Vol. 274, pp. 872–885). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.047>
- Banerjee, M., & Sarkar, P. K. (2003). Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International*, 36, 469–474. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00194-1)
- Beneduzi, A., Peres, D., da Costa, P. B., Bodanese Zanettini, M. H., & Passaglia, L. M. P. (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology*, 159(4), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.03.003>

- Bharatham, N., Bhowmik, P., Aoki, M., Okada, U., Sharma, S., Yamashita, E., P. Shanbhag, A., Rajagopal, S., Thomas, T., Sarma, M., Narjari, R., Nagaraj, S., Ramachandran, V., Katagihallimath, N., Datta, S., & Murakami, S. (2021). Structure and function relationship of Oqx B efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*, 12, 5400.
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., & Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Buckenhüskes, H. J. (2003). *Current requierements on paprika powder for food industry*. (A. Krishna, Ed.).
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Celestino Hernández, A. G., Gómez Ortiz, V., Arviruz Gómez, J. L., Ramos López, M. Á., Rodríguez Morales, J. A., Flores Macías, A., Álvarez Hidalgo, E., Nuñez Ramírez, J., Flores Gallardo, F. J., García Gutiérrez, M. C., Romero Gómez, S., H. Jones, G., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2021). Detection of bacillus cereus sensu lato isolates posing potential health risks in mexican chili powder. *Microorganisms*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112226>
- Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 307. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>
- Cui, B., Hu, C., Fan, X., Cui, E., Li, Z., Ma, H., & Gao, F. (2020). Changes of endophytic bacterial community and pathogens in pepper (*Capsicum annuum* L.) as affected by reclaimed water irrigation. *Applied Soil Ecology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103627>
- Davis, J. J., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Pusch, G. D., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., & Yoo, H. (2016). PATtyFams: Protein families for the microbial genomes in the PATRIC database. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00118>

- De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- Deakin, W. J., Sanderson, J. L. C. I., Goswami, T., & Shaw, C. H. (1997). The *Agrobacterium tumefaciens* motor gene, *motA*, is in a linked cluster with the flagellar switch protein genes, *fliG*, *fliM* and *fliN*. *Gene*, 189(1), 139–141. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00853-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00853-0)
- DeVries, C. A., & Ohman, D. E. (1994). Mucoid-to-nonmucoid conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *Journal of Bacteriology*, 176(21), 6677–6687. <https://doi.org/10.1128/jb.176.21.6677-6687.1994>
- DGHM. (2011). *Veroeffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln*. . http://www.dghm.org/m_275.
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2008). Summer meeting 2007 - The problems with fresh produce: An overview. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 105, pp. 317–330). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03746.x>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>
- EFSA. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- Fajardo-Rebollar, E., Estrada, K., Grande, R., Ek Ramos, M. J., Vargas, G. R., Villegas-Torres, O. G., Juarez, A. M., Sanchez-Flores, A., & Diaz-Camino, C. (2021). Bacterial and fungal microbiome profiling in chilhuacle negro chili (*Capsicum annuum* L.) associated with fruit rot disease. *Plant Disease*, 105(9), 2618–2627. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-2098-RE>
- FAOSTAT. (2022). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. FAOSTAT. Statistics Database. <https://www.fao.org/home/en/>
- Farmer Iii, J. J., Farmer, M. K., & Holmes, B. (n.d.). *The Enterobacteriaceae: general characteristics*. www.booksinprint.com

- FDA. (2008, February). *Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables*. FDA-2008-D-0108. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-cut-fruits-and-vegetables>
- FDA. (2023). *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Fernández, A. L., Adrio, B., Martínez Cereijo, J. M., Martínez Monzonis, M. A., El-Diasty, M. M., & Alvarez Escudero, J. (2020). Clinical study of an outbreak of postoperative mediastinitis caused by *Serratia marcescens* in adult cardiac surgery. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 30(4), 523–527. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivz312>
- Frentzel, H., Kraushaar, B., Krause, G., Bodi, D., Wichmann-Schauer, H., Appel, B., & Mader, A. (2018a). Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. *Food Control*, 83, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.022>
- Frentzel, H., Kraushaar, B., Krause, G., Bodi, D., Wichmann-Schauer, H., Appel, B., & Mader, A. (2018b). Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. *Food Control*, 83, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.022>
- García-González, T., Sáenz-Hidalgo, H. K., Silva-Rojas, H. V., Morales-Nieto, C., Vancheva, T., Koebnik, R., & Ávila-Quezada, G. D. (2018). *Enterobacter cloacae*, an Emerging Plant-Pathogenic Bacterium Affecting Chili Pepper Seedlings. *The Plant Pathology Journal*, 34(1), 1–10. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0128>
- Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
- Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>

- Hagaggi, N. Sh. A., & Mohamed, A. A. A. (2020). Enhancement of *Zea mays* (L.) growth performance using indole acetic acid producing endophyte *Mixta theicola* isolated from *Solenostemma argel* (Hayne). *South African Journal of Botany*, 134, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.034>
- Hariram, U., & Labbé, R. (2015). Spore Prevalence and Toxigenicity of and Isolates from U.S. Retail Spices. *Journal of Food Protection*, 78(3), 590–596. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-380>
- Hariram, U., & Labbe, R. (2015). Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from U.S. retail spices. *Journal of Food Protection*, 78(3), 590–596. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-380>
- Hashem, M., & Alamri, S. (2010). Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.02.011>
- Haydushka, I., Markova, N., Kirina, V., & Atanassova, M. (2012). Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 4(1), 82. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.93768>
- He, X., Lu, T., & Zhou, X. (2021). Whole genome sequencing and comparative genomics analysis of *Pectobacterium carotovorum* identifies key pathogenic genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 162, 107114. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107114>
- Hernández Gómez, Y. F., González Espinosa, J., Ramos López, M. Á., Arvizu Gómez, J. L., Saldaña, C., Rodríguez Morales, J. A., García Gutiérrez, M. C., Pérez Moreno, V., Álvarez Hidalgo, E., Nuñez Ramírez, J., Jones, G. H., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2022). Insights into the Bacterial Diversity and Detection of Opportunistic Pathogens in Mexican Chili Powder. *Microorganisms*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081677>
- HÖFTE, M., & DE VOS, P. (2006). PLANT PATHOGENIC *PSEUDOMONAS* SPECIES. *Springer*, 507–533.
- Hosseinpour, Z., Najafpour-Darzi, G., Latifi, N., Morowvat, M. H., & Manahiloh, K. N. (2021). Synthesis of a biopolymer via a novel strain of *Pantoea* as a soil stabilizer. *Transportation Geotechnics*, 26, 100425. <https://doi.org/10.1016/j.trgeo.2020.100425>
- HUANG, M., LIN, L., WU, Y., Honhing, H., HE, P., LI, G., HE, P., XIONG, G., YUAN, Y., & HE, Y. (2016). Pathogenicity of *Klebsiella pneumonia* (KpC4)

- infecting maize and mice. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(7), 1510–1520. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61334-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61334-5)
- Huang, Y., Liu, C., Wang, H., Guan, T., Liu, L., & Yu, S. (2019). Bioinformatic analysis of the complete genome sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* BZA12 and candidate effector screening. *Journal of Plant Pathology*, 101(1), 39–49. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0126-7>
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I. M. S., & Aziz, S. N. (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*, 48(10), 6987–6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
- INIFAP. (2008). *Principales enfermedades del chile*. 15, 1–42.
- Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A. A., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alawfi, A., Alshengeti, A., Sulaiman, T., & Khan, A. (2023). Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review. *Molecules*, 28(3), 927. <https://doi.org/10.3390/molecules28030927>
- ISO 7932:2004. (2004). ISO 7932:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count technique at 30 degrees C. ISO. <https://www.iso.org/standard/38219.html>
- ISO 21871:2006. (2006). ISO 21871:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* — Most probable number technique and detection method. ISO. <https://www.iso.org/standard/36015.html>
- J. Schaezner, A., & D. Wright, G. (2020). Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. *Trends in Molecular Medicine*, 26, 768–782.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2021). The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>
- Jibril, S. M., Jakada, B. H., Kutama, A. S., & Umar, H. Y. (2016). Plant and Pathogens: Pathogen Recognition, Invasion and Plant Defense Mechanism. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 247257. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.028>

- Jyothirmayi, T., Rao, G. N., & Rao, D. G. (2008). PHYSICOCHEMICAL CHANGES DURING PROCESSING AND STORAGE OF GREEN CHILI (*CAPSICUM ANNUUM*) POWDERS. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(5), 868–880. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00219.x>
- Kalantar, K. L., Carvalho, T., de Bourcy, C. F. A., Dimitrov, B., Dingle, G., Egger, R., Han, J., Holmes, O. B., Juan, Y.-F., King, R., Kislyuk, A., Lin, M. F., Mariano, M., Morse, T., Reynoso, L. V, Cruz, D. R., Sheu, J., Tang, J., Wang, J., ... DeRisi, J. L. (2020). IDseq—An open source cloud-based pipeline and analysis service for metagenomic pathogen detection and monitoring. *GigaScience*, 9(10). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa111>
- Kang, S.-M., Asaf, S., Khan, A. L., Lubna, Khan, A., Mun, B.-G., Khan, M. A., Gul, H., & Lee, I.-J. (2020). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas psychrotolerans* CS51, a Plant Growth-Promoting Bacterium, Under Heavy Metal Stress Conditions. *Microorganisms*, 8(3), 382. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030382>
- Kannan, V., Bastas, K., & Devi, R. (2015). Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria. In *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18892-21>
- Krawczyk, K., & Borodynko-Filas, N. (2020). *Kosakonia cowanii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.). *European Journal of Plant Pathology*, 157(1), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01998-8>
- Laborde C, J. A., & Pozo C, O. (1982). Presente y pasado del chile en México. *México: INIA*, 85.
- Lehmacher, A., Bockemühl, J., & Aleksic, S. (1995). Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and Infection*, 115(3), 501–511. <https://doi.org/10.1017/S0950268800058660>
- León, J. S., Jaykus, L.-A., & Moe, C. L. (2009). *FOOD SAFETY ISSUES AND THE MICROBIOLOGY OF FRUITS AND VEGETABLES*.
- Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., & Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0489-3>

- Li, X., He, P., He, P., Li, Y., Wu, Y., Mu, C., Munir, S., & He, Y. (2023). Native endophytes from maize as potential biocontrol agents against bacterial top rot caused by cross-kingdom pathogen *Klebsiella pneumoniae*. *Biological Control*, 178, 105131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105131>
- Li, Y., Wang, D., Cao, S., Wang, X., & Ren, G. (2023). First Report of Bacterial Leaf Spot on Tobacco Caused by *Pseudomonas psychrotolerans* in China. *Plant Disease*, 107(3), 935. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1069-PDN>
- Liu, L.-H., Wang, N.-Y., Wu, A. Y.-J., Lin, C.-C., Lee, C.-M., & Liu, C.-P. (2018). *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(4), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016>
- Lu, J., & Salzberg, S. L. (2020). Ultrafast and accurate 16S rRNA microbial community analysis using Kraken 2. *Microbiome*, 8(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00900-2>
- Lu, Y., Liu, P., Li, C., Sha, M., Fang, J., Gao, J., Xu, X., & Matthews, K. R. (2019). Prevalence and Genetic Diversity of Cronobacter Species Isolated From Four Infant Formula Production Factories in China. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01938>
- Lugo-Jiménez, N., Caballero-Bautista, M., Sauri-Duch, E., Centurión-Yah, A., & Tamayo-Canul, E. (2010). EFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) DESPUÉS DE SU COSECHA. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11, 171–179. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81315809009>
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H.-S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., & Charkowski, A. O. (2007). Host Range and Molecular Phylogenies of the Soft Rot Enterobacterial Genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*®, 97(9), 1150–1163. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1150>
- Martínez Blanch, J. Francisco. (2008). *Desarrollo de métodos rápidos para el control del Bacillus cereus en alimentos*. Universidad de Valencia.
- Molina Loya, K. G. (2012). *DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN PUNTO DE VENTA DE CHILE JALAPEÑO (Capsicum annuum) Y CHILE SERRANO (C. annuum var accuminatum) E IDENTIFICACIÓN DE PELIGROS MICROBIOLÓGICOS DURANTE SU CULTIVO*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Montes S, Heredia E, & Aguirre A. (2004, June 23). Fenología del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.). Cultivo y recursos genéticos. *Primera Convención Mundial de Chile*.
- Monticelli, J., Knezevich, A., Luzzati, R., & Di Bella, S. (2018). Clinical management of non- faecium non- faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(4), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.01.001>
- Moosavian, M., Khoshkholgh Sima, M., Ahmad Khosravi, N., & Abbasi Montazeri, E. (2021). Detection of OqxAB Efflux Pumps, a Multidrug-Resistant Agent in Bacterial Infection in Patients Referring to Teaching Hospitals in Ahvaz, Southwest of Iran. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2021/2145176>
- Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E., & Wydra, K. (2013). *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_7), 2520–2525. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.046011-0>
- Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M. de L., Moya Hernández, S. L., & González Ochoa, M. G. (2014). Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. In *Revista Mexicana de Fitopatología* (Vol. 32, Issue 2). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200075#:~:text=Las%20bacterias%20que%20est%C3%A1n%20asociadas,de%20enfermedades%20en%20nuevas%20%C3%A1reas
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Ngalimat, M. S., Yahaya, R. S. R., Baharudin, M. M. A., Yaminudin, S. Mohd., Karim, M., Ahmad, S. A., & Sabri, S. (2021). A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9(3), 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>
- Nicholson, F. A., Groves, S. J., & Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.030>

- Nøhr-Meldgaard, K., Struve, C., Ingmer, H., & Agersø, Y. (2021). The Tetracycline Resistance Gene, tet(W) in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Follows Phylogeny and Differs From tet(W) in Other Species. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658943>
- NOM-002-SAG/FITO-2015. (n.d.). *NOM-002-SAG/FITO-2015, Por la que se establecen las características y especificaciones que deben reunir las etiquetas de certificación de la calidad de las semillas para siembra*. Retrieved June 9, 2024, from https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5418054&fecha=01/12/2015#gsc.tab=0
- NOM-003-SAGARPA-2016. (n.d.). *NOM-003-SAGARPA-2016, Relativa a las características de sanidad, calidad agroalimentaria, autenticidad, etiquetado y evaluación de la conformidad del jarabe de agave*. Retrieved June 9, 2024, from https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5461591&fecha=18/11/2016#gsc.tab=0
- NOM-189-SSA1/SCFI-2002. (n.d.). *NOM-189-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Etiquetado y envasado para productos de aseo de uso doméstico*. Retrieved June 9, 2024, from https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=715284&fecha=02/12/2002#gsc.tab=0
- Ondov, B. D., Treangen, T. J., Melsted, P., Mallonee, A. B., Bergman, N. H., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2016). Mash: Fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>
- Palmer, M., Steenkamp, E. T., Coetzee, M. P. A., Avontuur, J. R., Chan, W.-Y., van Zyl, E., Blom, J., & Venter, S. N. (2018). Mixta gen. nov., a new genus in the Erwiniaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4), 1396–1407. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002540>
- Peralta, D. R., Adler, C., Corbalán, N. S., Paz García, E. C., Pomares, M. F., & Vincent, P. A. (2016). Enterobactin as Part of the Oxidative Stress Response Repertoire. *PLOS ONE*, 11(6), e0157799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157799>
- Pérez Moreno, L., Niño Mendoza, G. H., Mendoza Celedón, B., León Galván, Ma. F., Robles Hernández, L., & González Franco, A. C. (2016). Pathogenic viruses incidence, severity and detection in lettuce, in the state of Queretaro, Mexico. *Acta Universitaria*, 26(2), 3–11. <https://doi.org/10.15174/au.2016.842>

- Pickersgill B. (1969). *The domestication of chili peppers*. En: *The domestication and exploration of plants and animals* (P. J. Ucko & Dimbley G. W., Eds.).
- Popp, A., Cleenwerck, I., Iversen, C., De Vos, P., & Stephan, R. (2010). *Pantoea gaviniae* sp. nov. and *Pantoea calida* sp. nov., isolated from infant formula and an infant formula production environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2786–2792. <https://doi.org/10.1099/ij.0.019430-0>
- Puig Peña, Y. I., Leyva Castilloll, V., Rodríguez SuárezIII, A., Carrera VaralV, J., MolejónV, P. L., Pérez MuñozVI, Y., & Dueñas MoreiraVII, O. (2013). Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. In *Revista Habanera de Ciencias Médicas* (Vol. 13, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>
- Robles-Hernández, L., Salas-Salazar, N. A., Hernández-Huerta, J., & González-Franco, A. C. (2019). *Principales enfermedades que afectan el potencial productivo del chile (Capsicum annuum L.) en Chihuahua, México*. <https://www.researchgate.net/publication/353105157>
- SADER. (2021, September 15). *Creció 2.7 por ciento la producción de chile verde en México en 2020 y registra mayor demanda en los mercados internacionales*. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crecio-2-7-por-ciento-la-produccion-de-chile-verde-en-mexico-en-2020-y-registra-mayor-demanda-en-los-mercados-internacionales?idiom=es#:~:text=De%20origen%20mexicano%2C%20la%20producci%C3%B3n,de%20Agricultura%20y%20De>
- SAGARPA. (2018). *Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria*. <https://www.agricultura.gob.mx/sites/default/files/sagarpa/document/2020/03/21/1980/21032020-informe-evaluacion-psia-inocuidad-2015-2017-puebla.pdf>
- Sauceda-Acosta, C. P., Lugo-García, G. A., Villaseñor-Mir, H. E., Partida-Ruvalcaba, L., & Reyes-Olivas, Á. (2015). UN MÉTODO PRECISO PARA MEDIR SEVERIDAD DE ROYA DE LA HOJA (*Puccinia triticina* Eriksson) EN TRIGO. In *Ensayo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol. 38, Issue 4). <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- SIAP. (2010). *Un panorama del cultivo del chile*. <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
- Smith, N. R., Gordon, R. E., & Clark, F. E. (1946). *Aerobic mesophilic sporeforming bacteria* (Vol. 552). US Department of Agriculture.

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Steele, M., & Odumeru, J. (2004). Irrigation Water as Source of Foodborne Pathogens on Fruit and Vegetables. In *Journal of Food Protection* (Vol. 67, Issue 12). http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/12/2839/1676190/0362-028x-67_12_2839.pdf
- Stevens, M. J. A., Zurfluh, K., & Stephan, R. (2018). Complete and Assembled Genome Sequences of *Pantoea calida* DSM 22759^T and *Pantoea gaviniae* DSM 22758^T. *Genome Announcements*, 6(12). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00157-18>
- Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2020). Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, 29(3), 654–669. <https://doi.org/10.1002/pro.3819>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Sundin, G. W., & Wang, N. (2018). Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 161–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- Tan, G., Xi, Y., Yuan, P., Sun, Z., & Yang, D. (2019). Risk factors and antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas putida* infection in Central China, 2010–2017. *Medicine*, 98(44), e17812. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017812>
- Tapia-Arreola, A. K., Ruiz-Garcia, D. A., Rodulfo, H., Sharma, A., & De Donato, M. (2022). High Frequency of Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in the Lerma River Basin, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21). <https://doi.org/10.3390/ijerph192113988>
- Tian, Y., Liu, Y., Uwaremwe, C., Zhao, X., Yue, L., Zhou, Q., Wang, Y., Tran, L.-S. P., Li, W., Chen, G., Sha, Y., & Wang, R. (2023). Characterization of three new plant growth-promoting microbes and effects of the interkingdom interactions on plant growth and disease prevention. *Plant Cell Reports*, 42(11), 1757–1776. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03060-3>
- Torres Moreno, R. (2016, September). *LA DIVERSIDAD MICROBIANA (NECESARIA Y PELIGROSA)*. REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA.

<https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol29num3/articulos/La-diversidad-microbiana.html>

- Tripodi, P., & Kumar, S. (2019). The Capsicum Crop: An Introduction. In *Compendium of Plant Genomes*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=715284&fecha=02/12/2002#gsc.tab=0
- Turyanitsa, A. I., & Korobko, A. P. (1984). Phytopathogenic properties of bacteria of the genus *Klebsiella*. *Mikrobiologicheskii Zhurnal*, 45.
- UNESCO. (2003). *Water for People Water for Life*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000129556>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 10(5), 593. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Xu, P., Wang, H., Qin, C., Li, Z., Lin, C., Liu, W., & Miao, W. (2021). Analysis of the Taxonomy and Pathogenic Factors of *Pectobacterium atrosepticum* L6 Using Whole-Genome Sequencing and Comparative Genomics. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679102>