



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE
Bacillus subtilis EN UN RECUBRIMIENTO PARA MANGO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JOSÉ LUIS TOVAR SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MA. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *Bacillus subtilis*
EN UN RECUBRIMIENTO PARA MANGO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JOSÉ LUIS TOVAR SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MA. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS

SINODALES

Dra. Ma. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS

DIRECTORA

Dr. EDMUNDO M. MERCADO SILVA

SINODAL

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA

SINODAL

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODAL

CONTENIDO

Página

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 El Mango	1
1.1.1 Aspectos históricos del mango	1
1.1.2 Importancia económica del mango	1
1.1.3 Variedades cultivadas en México	4
1.1.4 Morfología del mango	6
1.1.5 Índices de cosecha y manejo pos-cosecha	8
1.1.6 Composición nutrimental del fruto	11
1.2 Enfermedades del mango	13
1.2.1 Plagas del mango	14
1.2.2 La mosca de la fruta (del género <i>Anastrepha</i>) y su control	14
1.2.3 Antracnosis	15
1.3 Control biológico	17
1.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	18
1.4 Recubrimientos para mango	19
1.4.1 Ceras	19
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 General	24
3.2 Específicos	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1 Materiales	25

4.1.1	Material biológico	25
4.1.1.1	Cepa de <i>B. subtilis</i>	25
4.1.1.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	25
4.1.1.3	Mango	25
4.2	Reactivos	25
4.2.1	Recubrimientos céreos	25
4.2.2	Medios de cultivo	26
4.3	Métodos	26
4.3.1	Aislamiento de hongos	26
4.3.2	Reproducción de la enfermedad	28
4.3.3	Microcultivo para identificación de estructuras fúngicas	28
4.3.4	Preparación de la suspensión de <i>B. subtilis</i>	29
4.3.5	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de <i>B. subtilis</i> contra <i>C. gloeosporioides</i>	29
4.3.6	Evaluación de dos recubrimientos comerciales para mango	30
4.3.6.1	Aplicación de las ceras	30
4.3.6.2	Determinación de los parámetros de calidad	31
4.3.6.2.1	Calidad visual	31
4.3.6.2.2	Pérdida de peso	31
4.3.6.2.3	Firmeza	31
4.3.6.2.3	Sólidos solubles totales (°Bx)	32
4.3.7	Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. subtilis</i> en el recubrimiento seleccionado	32
5.	RESULTADOS	33
5.1	Aislamiento y purificación de hongos de mangos dañados	33
5.2	Identificación por microcultivo de hongos aislados de mangos dañados	34
5.3	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de <i>B. subtilis</i> contra <i>C. gloeosporioides</i>	35
5.4	Evaluación de dos recubrimientos comerciales para mango	37
6.	DISCUSION	43

6.1 Aislamiento e identificación de hongos a partir de lesiones en mangos con antracnosis	43
6.2 Actividad antagónica de <i>B. subtilis</i> contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	44
6.3 Evaluación de dos recubrimientos comerciales para mango durante el almacenamiento a 20°C	46
6.3.1 Pérdida de Peso	47
6.3.2 Pérdida de Textura	48
6.3.3 Contenido de Sólidos Solubles Totales (°Bx)	48
6.4 Viabilidad de <i>B. subtilis</i> en la cera Natural Shine™ TFC 210	49
7. CONCLUSIONES	50
8. REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Producción de Mango en México	3
2 Valor de la producción y porcentaje de la participación del mango en diferentes estados de la república mexicana	4
3 Valor nutricional de mango (<i>Mangifera indica</i> L)	12
4 Principales hongos y bacterias causantes de enfermedades postcosecha.	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Principales países productores de mango (FAOSTAT, 2013)	2
2 Variedades cultivadas en México	6
3 Morfología del fruto mango (Flores, 1994).	7
4 Estado de maduración de las variedades del mango	9
5 Mosca mexicana de la fruta (CESAVEG, 2005).	15
6 Lesiones de antracnosis (<i>C. gloeosporioides</i>) en mango cv Ataulfo (<i>Mangifera Indica</i>). A) Hojas maduras, B) Inflorescencias, C y D) Sépalos y pétalos, E) Ecurrimiento en fruto joven y, F)Roña inducida por antracnosis en frutos pequeños. (Becerra, 1995).	16
7 Estructura general de una cera	20
8 Estructuras de ceras usadas en la industria	21
9 Estrategia experimental	27
10 Técnica de Microcultivo para identificación de hongos	28
11 (a) Tratamiento hidrotérmico contra antracnosis (53°C/6 min), (b) aplicación de las ceras, (c) almacenamiento de mango a 20°C.	31
12 Mango con antracnosis (a); cultivo puro de <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> (b) y reproducción de la enfermedad (c).	33
13 Morfología microscópica de estructuras de fructificación; (a) conidias unicelulares hialinas curvadas de <i>C. gloeosporioides</i> y (b) conidióforos simples, tabicados, con septos transversales y verticales de disposición irregular de <i>A. alternata</i> teñidos con azul de lactofenol y observados al microscopio	34
14 <i>Bacillus subtilis</i> en Agar cuenta estándar (a) y Agar Papa Dextrosa (b) después de 24 horas de incubación a 25°C.	35
15 Agar cuenta estándar con <i>C. gloeosporioides</i> (arriba) y <i>B. subtilis</i> (abajo desarrollo en estría) 6 días de incubación a 25°C. Se observa el antagonismo de <i>B. subtilis</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> .	36

16	Agar papa dextrosa con <i>C. Gloeosporiodes</i> (arriba) y <i>B. subtilis</i> (abajo desarrollo en estría) 6 días de incubación a 25°C. Se observa el antagonismo de <i>B. subtilis</i> contra <i>C. gloeosporiodes</i> .	36
17	Efecto de las ceras sobre la pérdida de peso a 20°C. Línea azul sin cera (control), línea rosa cera Charol Mango y línea roja cera Natural Shine™ TFC 210	37
18	Valor promedio de pérdida de peso en frutos de mango sin cera y encerados con cera Charol Mango y Natural Shine™ TFC 210	38
19	Efecto de las ceras sobre la textura de mango manila almacenado a 20°C por 15 días. Línea azul sin cera (control), línea rosa cera de Charol Mango y línea roja cera Natural Shine™ TFC 210.	39
20	Efecto de las ceras sobre el contenido de sólidos solubles totales (°Bx) en mango almacenado a 20°C por 15 días. Línea azul sin cera (control), línea rosa cera de Charol Mango y línea roja cera Natural Shine™ TFC 210	40
21	Calidad visual mangos almacenados durante 15 días a 20°C; control (a), cera Natural Shine™ TFC210 (b) y Cera Charol Mango (c).	41
22	Dinámica de sobrevivencia de <i>B. subtilis</i> en cera Natural Shine™ TFC 210; recuento en ACE durante 15 días a 25°C.	42

Resumen

En el año 2013, el valor de las exportaciones de mango mexicano incremento un 16 por ciento, lo que contribuyó a consolidar a México en el primer lugar mundial en las ventas de este producto. La falta de calidad provocada por diversas enfermedades ocasiona cuantiosas pérdidas económicas. La antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* afecta al cultivo desde la floración hasta la pos-cosecha. Se estima que las pérdidas post-cosecha oscilan entre 30 y 60% del total de la producción. Los tratamientos comerciales que han mostrado potencial en el control de enfermedades pos-cosecha son el uso de aire caliente, tratamientos hidrotérmicos, almacenamiento en atmósferas modificadas, uso de extractos de plantas y control biológico. Para el mango, se ha demostrado que la bacteria *B. subtilis* es un antagonista de *C. gloeosporioides*. La mayoría de los experimentos sobre control biológico se han realizado en condiciones controladas de humedad y temperatura; sin embargo aún en esas condiciones los frutos pierden peso debido a la pérdida de agua por transpiración. Entre los propósitos de la aplicación de ceras es evitar la pérdida de peso y ser vehículos de compuestos inhibitorios del desarrollo de enfermedades provocadas especialmente por hongos. En este trabajo se aisló y se identificó por medio de microcultivo el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria alternata* de frutos de mango manila junto con la morfología microscópica de estructura de fructificación las conidias unicelulares hialinas curvadas dan referencia a *C. gloeosporioides*. En agar cuenta estándar la cepa de *Bacillus subtilis* mostró ser antagonista contra *C. gloeosporioides* cuando se estiró la caja de agar cuenta estándar con inóculo de *B. subtilis* en un extremo de la misma mientras que en el otro extremo se colocó el hongo en el cual el crecimiento del hongo fue inhibido demostrado por la inhibición radial por *B. subtilis*. Se probaron dos ceras de las cuales la cera Natural Shine™TFC 210 mantuvo la calidad de los mangos por 15 días a 13°C disminuyendo la pérdida de peso y la marchitez de frutos de mango. La cera Natural Shine™ TFC 210 permitió la sobrevivencia de *B. subtilis*, por 15 días a 25°C corroborado por la dinámica de sobrevivencia en el medio evaluado. La cera Natural Shine™TFC 210 además de ser un recubrimiento biodegradable puede permitir la sobrevivencia de *B. subtilis* lo cual puede ayudar a disminuir la incidencia de antracnosis (mancha negras hundidas) provocada por *C. gloeosporioides*, lo cual puede abrir posibilidades de exportación de mangos encerados.

1. ANTECEDENTES

1.1 El Mango

1.1.1 Aspectos históricos del mango

El mango es originario del Noroeste de la India, de la Región Indo Birmánica y las montañas Chittagong en Bangladesh, donde aún puede encontrarse en estado silvestre (Empaque de mangos del C.I.P, S.PR. DE R.L. de C.V.). Se estima que dicho fruto ha sido cultivado por más de 4,000 años en la India, lugar del cual se dispersó a otras áreas tropicales y subtropicales del mundo (SAGARPA, 2009). A partir del siglo XVI, este fruto fue distribuido gradualmente alrededor del mundo y llegó a América en el siglo XVIII. Los mangos se consideran universalmente como uno de los cultivos más importantes y de los frutos más finos en las áreas subtropicales y tropicales del mundo.

1.1.2 Importancia económica del mango

A nivel mundial el mango constituye un papel económico y social importante para diversas naciones, principalmente aquellas en desarrollo. En el caso de México es, además, una fuente de empleo, ingreso y generación de divisas significativa. Se estima que el mango es el tercer fruto tropical a nivel mundial, en cuanto a su producción e importación (después del plátano y la piña) y el quinto de todos los frutos que se comercializan a nivel mundial. El primer país productor es India con 15.2 millones de toneladas y México, con 1.8 millones de toneladas, ocupa sexto lugar de producción para este fruto (Figura 1) (FAOSTAT, 2013).

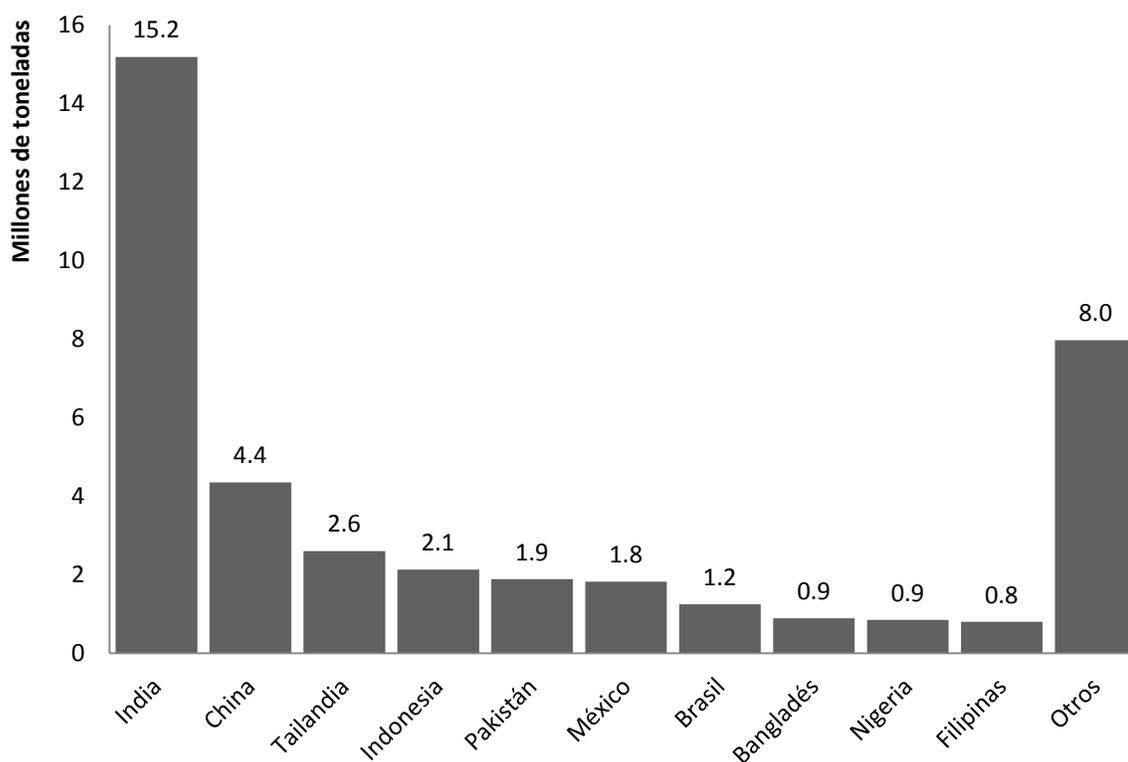


Figura 1. Principales países productores de mango (FAOSTAT, 2013).

Asia y África concentran el 89% de la producción mundial de mango, mientras América participa con el 11%. Nuestro país produce el 37% de la oferta total en América. En el año 2013, el valor de las exportaciones de mango mexicano incrementó un 16 por ciento, lo que contribuyó a consolidar a México en el primer lugar mundial en las ventas de este producto. (SAGARPA, 2013)

La producción de mango en el país ha disminuido un 7.4% respecto a la producción en el año 2006, la más alta históricamente (Cuadro 1). En el 2014 alcanzó un volumen de 1 451 890 millones de toneladas, con un valor de producción de 4.8 mdp. La superficie dedicada a este cultivo fue de 187 mil hectáreas, con un rendimiento promedio de 8.39 ton/ha. El número de productores dedicados a esta actividad es de cerca de 40 mil.

Cuadro 1. Producción de Mango en México.

Año	Superficie (miles ha)	Volumen de producción (miles /ton)	Rendimiento (ton/ha)	Precio rural (\$/ton)	Valor de producción (mdp)
	Sembrada	Cosechada			
2000	158.2	154.3	1,559.4	1,934.8	3,017.0
2001	170.6	162.3	1,577.4	1,958.1	3,088.8
2002	169.5	161.9	1,523.2	2,348.2	3,576.6
2003	171.9	156.1	1,362.4	2,311.4	3,149.0
2004	176.8	165.9	1,573.3	2,168.4	3,411.5
2005	173.8	160.0	1,368.1	2,488.9	3,405.0
2006	181.5	172.2	1,734.8	2,288.0	3,969.1
2007	179.2	170.5	1,643.4	2,495.1	4,100.4
2008	183.0	172.3	1,716.5	2,203.3	3,782.0
2009	183.9	170.0	1,509.3	2,644.9	3,991.8
2010	183.1	175.0	1,632.6	2,663.0	3,447.7
2011	184.8	175.7	1,536.7	2,641.8	4,059.6
2012	186.8	174.7	1,465.2	2,805.1	4,109.9
2013	187.1	177.3	1,606.5	2881.69	4,621.6
2014	186.9	175.7	1,616.7	3339.09	4.847.9

Fuente: SIAAP-SAGARPA Octubre 2014

Del total producido en 2013, un 19% se destinó a la exportación (313 mil ton), mientras que cerca de un 16% fue a la industria (250 mil ton) y el restante 65% a la comercialización. Las exportaciones, cuyo principal destino es EEUU (87%), se han incrementado un 7% anual en los últimos cinco años.

México se distingue por su vasta riqueza agroecológica, lo cual permite la producción de diversas variedades de frutales; de las 54 especies que se cultivan en el país el mango ocupa el segundo lugar con respecto a la superficie cosechada y representa el 6.5% del valor de la producción de este grupo. De acuerdo a SIAP-SAGARPA en el 2013 se dedicaron 186,964,21 hectáreas a este cultivo obteniendo un volumen de producción de 1,603,809.53Toneladas. Con un rendimiento de 9 Ton/ha y un valor de producción de 4,621,576.78 miles de pesos(Cuadro 1).El mango se produce en 23 estados, de los cuales, 10 contribuyen con el 98 por ciento del total de la producción nacional. En el 2013, de acuerdo al promedio de

datos los estados de Guerrero, Nayarit, Sinaloa, Chiapas y Oaxaca encabezan los primeros cinco lugares a nivel nacional con el mayor volumen de producción de esta fruta (Cuadro2.), las cuales concentraron en 2013 el 72.7% del volumen de la producción y 71.3% del valor generado. (SAGARPA, 2013) El estado de Guerrero es el principal productor con el 23 por ciento del volumen total; Nayarit, con un 17 por ciento y Sinaloa con un 12.2 por ciento. Estas tres entidades participan con el 53 por ciento de la producción nacional. (SAGARPA, 2013)

Cuadro 2. Valor de la producción y porcentaje de la participación del mango en diferentes estados de la república mexicana.

Estados	Volumen		Valor	
	Miles de Ton	Participación (%)	mdp	Participación (%)
Guerrero	336.9	23.0	1,219.3	29.7
Nayarit	249.8	17.0	632.8	15.4
Sinaloa	178.2	12.2	361.6	8.8
Chiapas	162.9	11.1	461.6	11.2
Oaxaca	138.1	9.4	255.3	6.2
Michoacán	127.6	8.7	432.6	10.5
Veracruz	92.1	6.3	291.5	7.1
Resto del país	179.6	12.3	455.2	11.1
Total	1,465.2	100	4,109.9	100

Con respecto a la comercialización y con datos del CESAVEGRO(2010), el 97% de la producción se destina al mercado nacional y 3% se exporta principalmente a los Estados Unidos y Canadá, donde se concentran el 99.7% del volumen exportado y el 0.3% que resta se va a los mercados de Japón, Francia, Holanda y España.

1.1.3 Variedades cultivadas en México

El mango es el fruto del árbol *Mangifera indica*, el cual, es un árbol frondoso de hasta 20 metros de altura, de copa redonda, siempre verde, con inflorescencia (panícula) provista de numerosas ramas, con entre 550 hasta 4000 flores. El fruto

es una drupa que varía en forma (redonda, ovalada, ovoide-oblonga), tamaño (hasta más de 2 Kg.) y color, dependiendo de la variedad. El mango cuenta con una amplia gama de variedades a nivel mundial incluyendo Amelie, Kent, Alphoso, Bangapalli, Bombai, Carabao, Manila Super, Mulgoa, entre otras. Por su parte, el tipo o variedad de mango encontrado en una región o país determinado dependerá de las características propias de la región (principalmente clima). Las variedades más importantes en México son Ataulfo (que representan uno de cada cuatro mangos mexicanos y cuenta además con denominación de origen), Tommy Atkins, Haden, Keitt, Kent y Manila conjuntamente aportan 81.2% de la producción nacional. Algunas de las características de dichas variedades se describen a continuación (Cuadro 2):

Ataulfo: Su fruto ha tenido gran aceptación por su excelente calidad y resistencia al manejo. Posee un tamaño mediano (180-260 gramos), es de forma aplanada y alargada, con un sabor fuerte; el color de la pulpa es amarillo y contiene muy poca fibra.

Tommy Atkins: Fruto de excelente calidad, predomina el color rojo, de forma redonda y tamaño mediano (450-700g). La pulpa es jugosa con poco contenido de fibra. Tiene la desventaja de que si no se corta en su madurez óptima presenta problemas en el manejo de post cosecha; aunque presenta resistencia a daños mecánicos y con mayor periodo de conservación, no posee las mejores características en cuanto sabor y aroma.

Haden: Fruto que presenta una base de color amarillo en chapeo rojo, que lo hace muy atractivo tanto para el mercado nacional como para el de exportación. Es de tamaño grande (510 a 680 gramos), posee forma ovalada, de pulpa firme, de color y sabor agradable.

Keitt: Fruto grande con un peso que va de 600 a 800 gr. La base del fruto es de color verde con chapeo rosa rojizo. Tiene pulpa dulce con poca fibra.

Kent: Es de tamaño grande (500 a 700 gramos), posee un color amarillo-anaranjado adquiriendo en la madurez una chapa rojiza, es de forma ovalada orbicular, de agradable sabor, jugoso, de poca fibrosidad y alto contenido de azúcares. Presenta la desventaja de ser muy susceptible a la antracnosis, debido a que la época de cosecha coincide en la temporada de lluvias.

Manila: Son frutos de tamaño medio (200 a 275 gramos), presenta forma elíptica y color amarillo en la cascara, pulpa amarilla, firme, dulce y con un alto contenido de fibra.

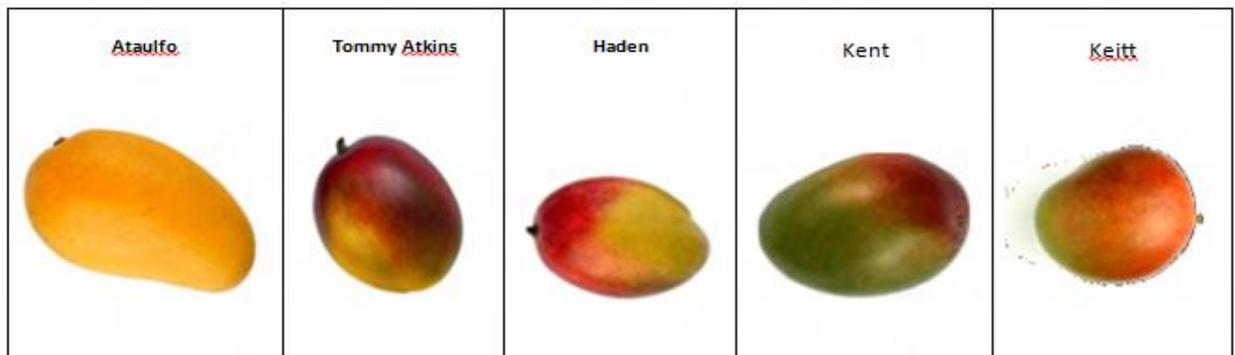


Figura 2. Variedades cultivadas en México

1.1.4 Morfología del mango

El mango es un árbol de hojas perennes y de una altura que varía de mediana a grande (9.1 a 30.5 m). Las copas rodeadas y simétricas, pueden variar de bajas y densas a erguidas y abiertas. Las hojas son lanceoladas, se disponen alternamente, tienen una textura áspera o correosa, y poseen una longitud de 15 a 40.6 cm. El color de la hoja es rosado, ámbar o verde pálido cuando son jóvenes, pero se transforman a verde oscuro cuando las hojas maduran.

Los frutos se clasifican como drupas, varían en forma (redondeada, oval u ovoide), tamaño y color en función de la variedad: los mangos pueden ser verdosos, amarillos- verdoso, amarillos, rojos, naranjas o purpuras. El peso va desde unos

pocos gramos hasta más de 2.3 Kg. El fruto (Figura 3) consta de pericarpio (epicarpio, mesocarpio, endocarpio) y semilla (tegumentos, cotiledón, radícula). El epicarpio se forma de células isodiamétricas con paredes duras y canales oleoresinosos en la parte inferior, que producen el típico sabor y olor a trementina (Flores, 1994).

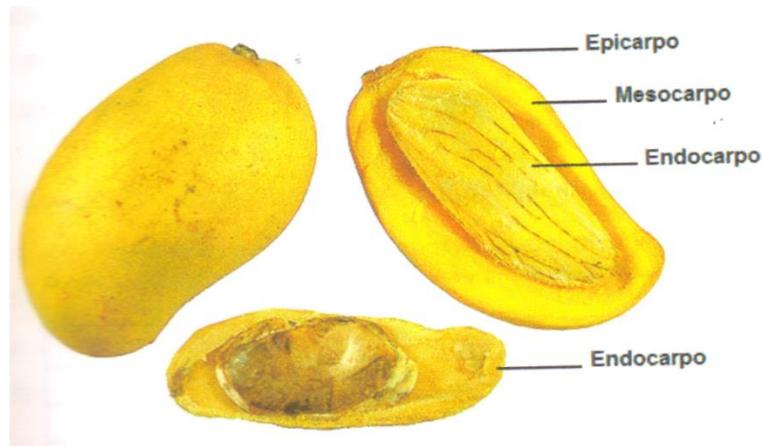


Figura 3. Morfología del fruto mango (Flores, 1994).

El mesocarpio (parte comestible) es un tejido de parénquima suave, con abundantes cromatóforos que contienen los pigmentos responsables del color de la pulpa; la cual es rica en sólidos solubles totales (aproximadamente 20%) en su estado de madurez comercial o de consumo, su contenido de acidez varía entre 0.2% y el 0.5%; mientras que el de proteínas es alrededor del 0.5%; así mismo es una fuente aceptable de vitaminas A, B y C. Los taninos se encuentran en forma moderada al igual que las grasas, y su sabor se asocia al contenido de azúcares, ácidos y ciertas sustancias aromáticas (Hulme, 1971).

El endocarpio es un tejido duro que en su lado externo se prolonga en fibras numerosas, mientras que es liso en el interior. La cantidad y longitud de las fibras es un carácter varietal, de importancia en el valor comercial de la cosecha. Los

mangos solo poseen una sola semilla grande, alargada, en forma de riñón y que posee una cubierta leñosa.

1.1.5 Índices de cosecha y manejo pos-cosecha

El mango es un fruto climatérico, es decir que tiene la capacidad de madurar después de que ha sido cosechado, presentando por tanto dos estados de madurez, la madurez fisiológica (maturation) cuando los frutos han logrado su máximo desarrollo y tamaño en árbol; y la madurez de consumo (ripening) cuando los frutos presentan la máxima calidad de sabor y color y que es muy apetecible (Kader, 1999). La segunda madurez puede lograrse una vez cosechado el fruto. Para poder manifestar las condiciones de calidad del mango es necesario el proceso de maduración en las condiciones óptimas, primordialmente de temperatura.

Cuando el mango madura a temperaturas entre 15.5°C y 18°C desarrolla cualidades que le hacen tener la piel más atractiva, pero su sabor es agrio; estos mangos necesitan 2 a 3 días adicionales a una temperatura de entre 21 y 23 °C para que el sabor sea dulce. Cuando el proceso de maduración se lleva a temperaturas entre 27 y 30°C se obtiene una piel oscura y desagradable; a temperaturas superiores a 30°C se retrasa la maduración. Por lo tanto, las condiciones ideales para que se presente la maduración de consumo del mango de manera homogénea y adecuada es tener el producto a temperaturas entre 21°C y 23°C con un rango de humedad entre 90 y 95% (Kader, 2009). Se han reportado 5 estados de madurez en los frutos de mango (Figura 4), en los cuales se observa una disminución de la firmeza de los frutos debido a la transformación de carbohidratos, de almidón a azúcares libres lo que se refleja en el aumento de los grados brix; además se observa un desarrollo de color en la pulpa.

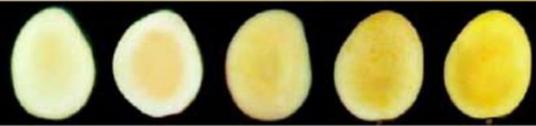
ATAULFO		COLOR PROMEDIO				
	COLOR INTERNO (PULPA)					
	MADUREZ / MADURACIÓN	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
	FIRMEZA (lbs - fuerza)	18 - 22	11 - 13	6 - 8	2 - 3	1 - 3
	SÓLIDOS SOLUBLES (° Brix)	7 - 8	9 - 10	11 - 12	12 - 15	14 - 18
HADEN		COLOR PROMEDIO				
	COLOR INTERNO (PULPA)					
	MADUREZ / MADURACIÓN	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
	FIRMEZA (lbs - fuerza)	12 - 15	12 - 14	5 - 8	4 - 5	2 - 3
	SÓLIDOS SOLUBLES (° Brix)	6 - 8	9 - 11	12 - 15	14 - 16	14 - 17
KEITT		COLOR PROMEDIO				
	COLOR INTERNO (PULPA)					
	MADUREZ / MADURACIÓN	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
	FIRMEZA (lbs - fuerza)	12 - 15	12 - 14	5 - 8	4 - 5	2 - 3
	SÓLIDOS SOLUBLES (° Brix)	6 - 8	9 - 11	12 - 15	14 - 16	14 - 17
KENT		COLOR PROMEDIO				
	COLOR INTERNO (PULPA)					
	MADUREZ / MADURACIÓN	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
	FIRMEZA (lbs - fuerza)	19 - 22	14 - 18	11 - 13	5 - 8	2 - 4
	SÓLIDOS SOLUBLES (° Brix)	8 - 10	9 - 11	12 - 13	12 - 14	14 - 15
MANILA		COLOR PROMEDIO				
	COLOR INTERNO (PULPA)					
	MADUREZ / MADURACIÓN	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
	FIRMEZA (lbs - fuerza)	8 - 12	6 - 10	4 - 6	2 - 4	1 - 2
	SÓLIDOS SOLUBLES (° Brix)	5 - 6	10 - 13	12 - 14	15 - 16	16 - 18
TOMMY ATKINS		COLOR PROMEDIO				
	COLOR INTERNO (PULPA)					
	MADUREZ / MADURACIÓN	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
	FIRMEZA (lbs - fuerza)	18 - 20	15 - 17	10 - 13	6 - 8	3 - 6
	SÓLIDOS SOLUBLES (° Brix)	7 - 9	8 - 11	9 - 11	10 - 13	12 - 15

Figura 4. Estado de maduración de las variedades del mango

La cosecha es una de las actividades más importantes dentro del proceso productivo, es considerada como una de las alternativas para ingresar al mercado en época temprana a fin de obtener mejores precios. Dada su característica climática, el producto del mango para exportación como producto fresco, se debe cosechar fisiológicamente maduro (ripening). La madurez fisiológica, es un estado en el cual el fruto no ha desarrollado todos sus atributos de calidad, pero al cosecharse desarrollaría su maduración con normalidad, manteniendo un buen color, olor y características organolépticas (Sergente, 1999). En cambio, la madurez de consumo o comercial, es cuando el fruto ha pasado por un proceso de maduración y ha alcanzado sus mejores características organolépticas (Flores, 1994).

Por tanto, es importante llevar a cabo la cosecha de los frutos en estado de madurez adecuado, porque al estado de madurez óptima sigue la desorganización de los tejidos, ablandamiento excesivo, pardeamiento enzimático y, en general, el deterioro del producto. Los índices de cosecha que se manejan para este producto son: cambio de forma de la fruta (llenado de hombros), cambio de coloración en la piel del verde oscuro al verde claro y al amarillo y el cambio de color de la pulpa del amarillo verdoso al amarillo o al anaranjado, dependiendo de los cultivares. El llenado de los hombros es de fácil reconocimiento, cuando el fruto está maduro, estos están sobre el punto de inserción del péndulo, cuando está medio maduro se encuentra al mismo nivel del punto de inserción y cuando están inmaduros están por debajo (Kader, 2009).

Un buen manejo posterior a la cosecha consiste en proteger la integridad del fruto, conservando su calidad de acuerdo con las tecnologías desarrolladas, de acuerdo a las propiedades físicas, químicas y biológicas; en busca de maximizar la calidad, evitando la pérdida de frutos y prolongando la vida de anaquel al mejor precio en el mercado.

La conservación de la calidad se obtiene mediante controles durante el proceso de maduración, así como evitando los daños físicos y las enfermedades. La

maduración presenta influencia en algunos factores de calidad como: color de pulpa y piel; sabor y olor, los cambios son dependientes del cultivar, estado o grado de maduración y clima en el que se desarrolla la variedad.

Posterior a la cosecha, es necesario manejar una cadena de frío a fin de retardar al máximo la maduración del fruto. El manejo del fruto en condiciones refrigeradas requiere de un conocimiento de la biología del mismo, ya que la respuesta es diferente para cada uno de los cultivares, tamaño, grado de madurez, y tiempo de refrigeración. La temperatura óptima para mangos inmaduros es de 13°C con una humedad relativa de 90-95%, ya que los cultivares pueden presentar daño por frío o manchas marrones grisáceas en la piel, cuando se refrigeran a temperaturas inferiores. Mientras que los mangos parcialmente maduros se pueden conservar a 10°C (Kader, 2009).

La investigación para controlar la marchitez a través del uso de ceras o películas plásticas es parcial e insuficiente, y no se ha desarrollado un material útil que permita controlar el problema de marchitez y manipular la fisiología del fruto particularmente después de los tratamientos cuarentenarios.

1.1.6 Composición nutrimental del fruto

Los frutos del mango constituyen un valioso suplemento dietético, pues son ricos en vitaminas C y A, minerales, fibras y antioxidantes; siendo bajo en calorías, grasa y sodio. En el cuadro 4 se muestra la composición química del mango, calculada para 100 g de pulpa en peso neto. Su valor calórico es de 62- 64 calorías por cada 100 g de pulpa.

La vitamina C es necesaria para el crecimiento y reparación de tejidos en todas las partes del cuerpo. Ayuda a la formación de una proteína importante utilizada para producir la piel, los tendones, los ligamentos y los vasos sanguíneos. Ayuda a sanar heridas y formar tejido cicatricial, reparar y mantener el cartílago, los huesos y los dientes. La vitamina C es uno de muchos antioxidantes, los cuales son

nutrientes que bloquean parte del daño causado por los radicales libres. El cuerpo no puede producir la vitamina C por sí solo, ni tampoco almacenarla; por lo tanto, es importante incluir muchos alimentos que contengan esta vitamina en la dieta diaria (MedlinePlus, 2015)

Cuadro 3. Valor nutricional de mango (*Mangifera indica* L)

Componente	Contenido
Grasas totales (g)	0.30
Proteína (g)	0.4
Fibra (g)	1.7
Carbohidratos (g)	13.0
Calcio (mg)	10.0
Fósforo (mg)	11.0
Hierro (mg)	0.10
Magnesio (mg)	9.00
Sodio (mg)	2.00
Potasio (mg)	156
Zinc (µg)	0.04
Vitamina A (UI)	3.89
Vitamina C (mg)	28.0
Vitamina B ₁ (mg)	0.06
Vitamina B ₂ (mg)	0.06
Vitamina B ₃ (mg)	0.60
Vitamina B ₆ (mg)	0.13
Vitamina E (mg)	0.10
Ácido fólico (µg)	14.0

(FAO/FOASTAT, 2002)

La vitamina A ayuda a la formación y al mantenimiento de dientes, tejidos blandos y óseos, membranas mucosas y piel sanos. Se conoce también como retinol, ya que produce los pigmentos en la retina del ojo. Esta vitamina favorece la buena visión, especialmente ante la luz tenue. También se puede requerir para la reproducción y la lactancia. Los carotenoides son provitaminas que se pueden convertir en vitamina A; el betacaroteno es uno de los más importantes que se encuentran en productos de origen vegetal; el cual es un antioxidante. Los antioxidantes protegen las células del daño causado por sustancias llamadas radicales libres, los cuales se cree contribuyen al desarrollo de ciertas enfermedades crónicas y juegan un papel en los procesos del envejecimiento. (MedlinePlus, 2015)

1.2 Enfermedades del mango

Las enfermedades constituyen un grave problema a nivel mundial, son causadas por acción de microorganismos, generalmente hongos o bacterias. Entre las más comunes se encuentran la antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, la cenicilla por *Oidium mangifera*, la roña por *Elsinoemangifera*, la pudrición texana provocada por *Phymatotrichum omnivorum*, entre otras (Fitzell y Peak, 1984).

Cuadro 4. Principales hongos y bacterias causantes de enfermedades postcosecha.

Patógeno	Enfermedad	Frutos atacados
<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul	Manzana, ciruela, kiwi, uva
<i>Monilinia fructicola</i>	Pudrición café	Durazno, cereza, ciruela
<i>Fusarium spp.</i>	Pudrición basal	Cebolla, jitomate
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Manzana, pera, kiwi, fresa, uva, naranja
<i>Colletotrichum spp.</i>	Antracnosis	Fresa, plátano, limón, papaya, mango, aguacate
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Marmoleado	Zanahoria, papa, lechuga, apio, cebolla
<i>Erwinia amylovora</i>	Fuego bacteriano	Manzana, pera

Sommer et al. (2002).

1.2.1 Plagas del mango

El mango es una fruta que puede presentar problemas de plagas, lo que hace difícil su comercialización. Existen diferentes especies de insectos que se han reportado, principalmente de los géneros *Diptera* y *Homoptera*, en las cuales pertenecen las diferentes especies como *Anastrepa obliqua* y *A. ludens* (Figura 5). Estas especies son nativas de América tropical y provocan un problema cuarentenario para proteger las zonas libres de estos insectos (Mata y Mosqueda, 1995).

1.2.2 La mosca de la fruta (del género *Anastrepha*) y su control

Las moscas de la fruta están consideradas como una de las 10 plagas agrícolas de mayor importancia económica en el mundo. El género *Anastrepha* (Figura 5) es endémico del nuevo mundo y está restringido a ambientes tropicales y subtropicales. Se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina; incluyendo la mayoría de las islas del Caribe.

De las especies conocidas las de mayor importancia económica son: *Anastrepha ludens* Loew, *A. Obliqua* (Macquart), *A. Serpentina* (Wiedemann), y *A. Striata* (Schiner). Las moscas de la fruta atacan en estado adulto y depositan los huevecillos en frutos en desarrollo por lo que el daño se hace evidente cuando se inicia la maduración del fruto. Las larvas se alimentan de la pulpa; sin embargo, la realidad es que la larva al ir dentro del fruto, una vez en el destino la mosca puede infectar zonas libres de dicha plaga en su distribución (Yahia y col., 1997).



Figura 5. Mosca mexicana de la fruta (CESAVEG, 2005).

El mango en México, está sujeto a una regulación federal de estado cuarentenario, debido a la infestación de la mosca de la fruta (*Anastrephaludens*, *A. oblicua* y *A. serpentina*). Para destruir este insecto comúnmente se utilizaba el dibromuro de etileno. Sin embargo este insecticida pone en riesgo la salud humana, por lo que la Gerencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos prohibió su aplicación en todas las frutas comestibles. En estas circunstancias, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Servicio de Inspección para las Enfermedades de Animales y Plantas (APHIS) aprobaron la aplicación del tratamiento con agua a 46.1°C por 90 minutos para desinfectar el mango de larva de mosca de la fruta.

1.2.3 Antracnosis

La antracnosis del mango es producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y Sacc, causa graves pérdidas económicas en diversos cultivos de regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rodríguez-López y col., 2009; Ploetz, 1994; Prusky et y col., 2000). La enfermedad es responsable de una pérdida dentro del 10 y 80% a nivel comercial, afectando el rendimiento y producción (Intra et., 2011). En México, se ha reportado como una enfermedad que afecta hojas, inflorescencias y frutos en las regiones productoras de mango, siendo el daño más importante en pos-cosecha (García, 1976; Mosqueda- Vázquez y col., 1996; Allende. Molar y

col.,2003; Benítez- Camilo y col.,2003).Su presencia se caracteriza por la aparición de manchas oscuras (Figura 6) en hojas, flores y pedúnculos, que se unen formando áreas necrosadas irregulares en forma y tamaño; son ligeramente sumergidas en relación con el tejido sano y con penetración en la pulpa del fruto. Las manchas oscuras aumentan durante la maduración de la fruta y se presenta la pudrición (Becerra, 1995).

En el campo *C.gloeosporioides* produce esporas en hojas, panículas y frutos momificados. Las esporas pueden ser diseminadas por las lluvias hacia otras hojas o flores causando infecciones secundarias: en el caso de antracnosis pos-cosecha, los frutos son infectados durante su desarrollo, pero la infección permanece latente hasta el inicio de la madurez que ocurre después de la cosecha. El término de la latencia del patógeno parece estar relacionada a la reducción de la concentración de compuestos fenólicos y con la producción de etileno en el fruto maduro. Asimismo, el proceso de infección es favorecido a temperatura entre 20 y 30°C y humedad relativa arriba del 90% (Arauz, 2000).



Figura 6.Lesiones de antracnosis (*C. gloeosporioides*) en mango cv Ataulfo (*Mangifera Indica*). A) Hojas maduras, B) Inflorescencias, C y D) Sépalos y pétalos,

E) Escurrimiento en fruto joven y, F) Roña inducida por antracnosis en frutos pequeños. (Becerra, 1995).

La variedad Kent se produce del mes de abril a agosto, siendo esta variedad más susceptible a antracnosis; sin embargo todas las variedades de mango pueden presentar la enfermedad. Entre los tratamientos pos-cosecha para reducir la antracnosis se encuentran los tratamientos térmicos y químicos (Galán, 1999).

La antracnosis se caracteriza por manchas negras hundidas; sin embargo otra enfermedad que mancha a los frutos es provocada por *Alternaria alternata*, el desarrollo de este hongo se manifiesta por manchas cafés oscuras sin hundimientos que pueden llegarse a confundir con el deterioro provocado por *C. gloeosporioides*.

1.3 Control biológico

La salud humana y los riesgos ambientales asociados con residuos de fungicidas y la generación de resistentes microorganismos patógenos han sido la fuerza impulsora principal para el desarrollo de nuevos métodos seguros de control. El control biológico, especialmente usando antagonistas (principalmente levaduras y bacterias) de los patógenos fúngicos de plantas, ha ganado considerable atención y parece ser prometedor como una alternativa viable al control químico. (Spadaro y Guilino, 2004). Cada vez son mayores las restricciones de orden higiénico sanitarias sobre el uso de compuestos químicos, debido a sus efectos tóxicos y de residuos (que pueden impactar en la salud humana), contaminación del medio ambiente y la inducción del desarrollo de patogénesis resistentes (Astúay col., 1994). Provocando la necesidad de la búsqueda de alternativas biológicas para combatir problemas fitopatológicos en los cultivos hortícolas.

El biocontrol es uno de los principales componentes del manejo integrado de plagas y se define como la suma de acciones emprendidas para favorecer la acción de parásitos, depredadores y patógenos, en el control de un insecto plaga. El auge de los insecticidas biológicos de uso agrícola, en reemplazo de los químicos, se sustenta porque son más limpios ecológicamente y, por lo tanto, menos contaminantes. Estos compuestos no son tóxicos para las plantas, animales ni el hombre y por ser biodegradables no constituyen riesgo de contaminación.

El control biológico se puede definir como la reducción del inoculo o de la actividad productora de enfermedad del patógeno, debido a uno o más organismos, en una planta hospedera (Carrillo y col. 2005).

Para evitar la antracnosis en mango, Juárez (2001) reporto una extensiva búsqueda de microorganismos antagonistas al agente causal de esta enfermedad, donde se aislaron 120 cepas de la filósfera de mango, de las cuales dos cepas (una bacteria y una levadura) presentaron mayor actividad antagonista en ensayos *in vitro* contra *C. gloeosporioides*. En bioensayos realizados *in vitro*, la levadura *R. minuta* presentó principalmente el fenómeno de antagonismo por competencia y la bacteria *B. subtilis* por antibiosis (Allende y col., 2001; Patiño y col., 2001).

1.3.1 *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram positiva, catalasa-positiva, aerobio, tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas. Además, el *B. subtilis* es una bacteria que se desarrolla en la rizósfera de diferentes cultivos debido a que se adapta al medio de diferentes vegetales al crear esporas.

1.4 Recubrimientos para mango

Tras la recolección, las frutas y hortalizas, al ser productos perecederos sufren un proceso acelerado de envejecimiento y degradación, caracterizado por un deterioro físico (deshidratación, arrugamiento, cambio de color, entre otros) unido a la pérdida de propiedades organolépticas y nutricionales debido al metabolismo propio del organismo. Desde hace tiempo se ha buscado retrasar estos efectos por medio de empleo de recubrimientos, obteniendo una tecnología de formulación y aplicación de ceras y otros recubrimientos adecuados para estos fines.

Existen actualmente dos tipos de recubrimientos de frutas, los llamados “ceras” y los “recubrimientos comestibles”. Las ceras son recubrimientos realizados a partir de diferentes familias de ceras autorizadas como aditivos alimentarios (carnauba, polietileno oxidado, abejas, microcristalina), resinas (colofonia, shellac) y combinaciones de las mismas; y los llamados recubrimientos comestibles, formulados a base de polisacáridos, proteínas y otras combinaciones, en ocasiones también con ceras de abejas.

1.4.1 Ceras

Las ceras son mezclas de ésteres de alta masa molecular, constituidas por ácidos grasos y alcoholes monohidroxilados, en su estructura, Figura 7, n y m representan el número de veces que se repite el grupo CH_2 , entonces los valores más frecuentes son: $n= 8-18$ y $m=16-36$, son abundantes en la naturaleza, por lo que las mismas pueden ser obtenidas de fuentes animales y plantas.

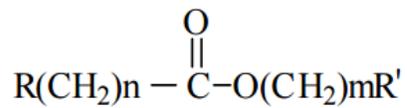
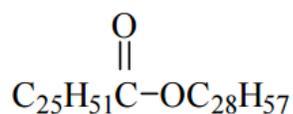


Figura 7. Estructura general de una cera

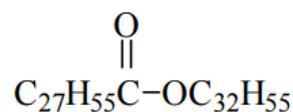
Ejemplos de ceras tenemos a la cera de abeja, la cera de carnauba, la lanolina; en los árboles forestales se puede encontrar la cera del follaje de conífera y de varios tipos de latifolias. La figura 8 muestra estructuras de algunas fuentes.

Las ceras empleadas en frutos no climatéricos, como es el caso de los frutos cítricos, son el polietileno oxidado, la carnauba, la goma laca y otros recubrimientos tales como sucro-ésteres de ácidos grasos, la maltodextrina, lecitina, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, entre otras. Las ceras empleadas en frutos climatéricos, como es el caso de las manzanas y las peras, son habitualmente formuladas a base de carnaúba y goma laca, siendo la goma laca de selección.

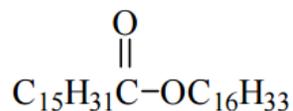
Se aplican recubrimientos céreos para mejorar el aspecto y, sobre todo para incrementar la vida comercial de la fruta, reduciendo las pérdidas de peso, retrasando las senescencia y reduciendo fisiopatías, como por ejemplo daños por frío a un sin fin de productos. Además las ceras pueden usarse como vehículos de compuestos con actividad fungicida.



Cera de abeja



cera de carnauba.



cera de plantas.

Figura 8. Estructuras de ceras usadas en la industria

Gómez Britto y Mazo Gray, citados por Galvis y Herrera (1995), utilizaron cera comercial TAG (polietileno en emulsión acuosa) y encontraron que el tratamiento no sólo retardó el proceso de maduración sino que también disminuyó las pérdidas por deshidratación. Pérez Agripino (1992) citado por Galvis y Herrera (1995), indica que una capa de cera WAX aplicada como una emulsión en agua o en aceite mineral, aumenta la vida útil del mango en un 50%. También produce ese efecto la cera parafinada (Galvis y Herrera, 1995).

En el mercado existen diferentes marcas comerciales de ceras usadas para productos climáticos tal como el mango; la cera Charol Mango distribuida por la empresa Gestagro S.A. de C.V y la cera comercial Natural Shine™ TFC 210 distribuida por la empresa Pace International.

La cera de Charol Mango es una cera comestible; es un producto biodegradable que ha sido desarrollado y probado tanto en laboratorios especializados como en las empacadoras mexicanas y extranjeras dedicadas a la exportación. Los ingredientes activos son ácidos grasos, carbohidratos (sacarosa), Polipropilenglicol, emulsificantes, estabilizadores (Carboximetilcelulosa) y antioxidantes, los cuales

están avalados por FDA (Food and Drug Administration, E.U.A.) para su empleo directo en alimentos y son catalogados como ingredientes GRAS (Substances Generally Recognized As Safe). La recomendación de uso es en dilución con agua al 50%.

Por su parte la cera Natural Shine™TFC 210 está formulada con componentes grado alimenticio regulados por la FDA, 21 CFR, Part 172, para uso en recubrimientos comestibles. Tiene en su composición agua, carnauba, goma laca, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, antiespumante a base de silicona de calidad alimentaria. No contiene ingredientes peligrosos en cantidades de 1% o más en su formulación. Su uso principal es para intensificar el color del fruto donde fue aplicado, previene el control de la deshidratación, disminuye la madurez sin provocar efectos adversos a la calidad y sabor de los frutos. Presenta alta resistencia a la humedad y es compatible con muchos fungicidas (Pace International). Según su ficha técnica, el principal uso es para proveer de un brillo natural para las frutas de exportación tales como mangos, aguacates, papayas, cítricos, entre otros.

2. HIPÓTESIS

Bacillus subtilis, antagonista de *Colletotrichum gloeosporioides*, puede permanecer viable en un recubrimiento para mango el cual puede ser usado para disminuir el desarrollo de antracnosis.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Seleccionar un recubrimiento para mango según su efecto pos-cosecha sobre la calidad de frutos y evaluar la viabilidad de *Bacillus subtilis*.

3.2 Específicos

- Aislar y purificar el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* de muestras de mango con desarrollo de antracnosis.
- Identificar a *C. gloeosporioides* con su desarrollo en microcultivo.
- Evaluar *in vitro* la actividad antagónica del *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*.
- Evaluar dos tipos de ceras comerciales sobre la calidad pos-cosecha de mango.
- Evaluar la viabilidad de *B. subtilis* en la cera seleccionada.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

4.1.1.1 Cepa de *B. subtilis*

La cepa de *B. subtilis* utilizada fue donada por el departamento de microbiología de la UAQ, la cual será activó para su posterior utilización.

4.1.1.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

El mango es hospedero natural del hongo *C. gloeosporioides*, de mangos que presentaron más del 20% de la enfermedad se aisló el hongo *C. gloeosporioides* tomando directamente de la “mancha negra y hundida”.

4.1.1.3 Mango

Se utilizaron frutos de mango de la variedad ‘Manila’ en estado de madurez fisiológica $\frac{3}{4}$ o en estado de pre-climaterio. Los frutos se obtuvieron de un huerto comercial ubicado en el estado de Guerrero, México. Una vez en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica Pos-cosecha de la UAQ se seleccionaron eliminando aquellos frutos con defectos o maduros.

4.2 Reactivos

4.2.1 Recubrimientos céreos

La cera NaturalShine™ TFC 210 fue proporcionada por la empresa Pace International. Su composición es a base de agua, carnauba, goma laca, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, antiespumante a base de silicona de calidad alimentaria.

La cera comestible Charol Mango fue proporcionada por la empresa GESTAGRO S.A. de C.V. Los ingredientes activos son ácidos grasos, carbohidratos (sacarosa), Polipropilenglicol, emulsificantes, estabilizadores (Carboximetilcelulosa) y antioxidantes.

4.2.2 Medios de cultivo

Agar papa dextrosa (APD), agar cuenta estándar (ACE), Caldo Soya Trypticasa (CST), diluyente de peptona, agua destilada, ácido tartárico, rosa de bengala 0.06 g/L e hidróxido de sodio NaOH 0.1 N, los cuales se adquirieron de casas comerciales.

4.3 Métodos

La Figura 9 detalla el esquema general de los procedimientos realizados para aislar, purificar e identificar las especies de hongos aisladas de mangos enfermos; los ensayos de antagonismo de *B. subtilis* sobre *C. gloeosporioides*, la evaluación de dos recubrimientos cereos para mango sobre la calidad de los mismos; así como la prueba de viabilidad de *B. subtilis* en la cera que mejor mantuvo la calidad de los frutos durante el almacenamiento.

4.3.1 Aislamiento de hongos

El mango es hospedero natural del hongo *C. gloeosporioides*. En estudios previos, en el laboratorio de fisiología poscosecha de frutas y hortalizas se trabajó con frutos de mango 'Manila' provenientes directamente de una huerta de Guerrero, México; una muestra de mangos se dejaron dentro de una bolsa de plástico y se almacenaron en una cámara de almacenamiento a 25°C por 7 días con la finalidad de acelerar el desarrollo de la antracnosis. Una vez que los mangos presentaron más del 20% de la enfermedad se aislaron muestras tomando directamente de las manchas negras e inoculando en placas con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa

(APA) marca Bioxon adicionado con 1 mL de una solución de rosa de bengala al 0.6% y 1 mL de solución de ampicilina al 0.1% por cada 100 mL del medio; la inoculación se hizo por picadura dejando aproximadamente 1 cm entre cada punción. Las placas se incubaron a 22°C de 3 a 5 días en una incubadora marca Blinder. Una vez desarrollados los hongos se observaron las placas bajo microscopio estereoscópico para determinar si se evidencian diferentes estructuras macroscópicas o diferentes tonalidades. De los desarrollos similares a *C. gloeosporioides* reportados en la literatura (Oliviera y col., 2005), se tomaron nuevamente esporas que se colocaron en APD por picadura para tener los cultivos puros.

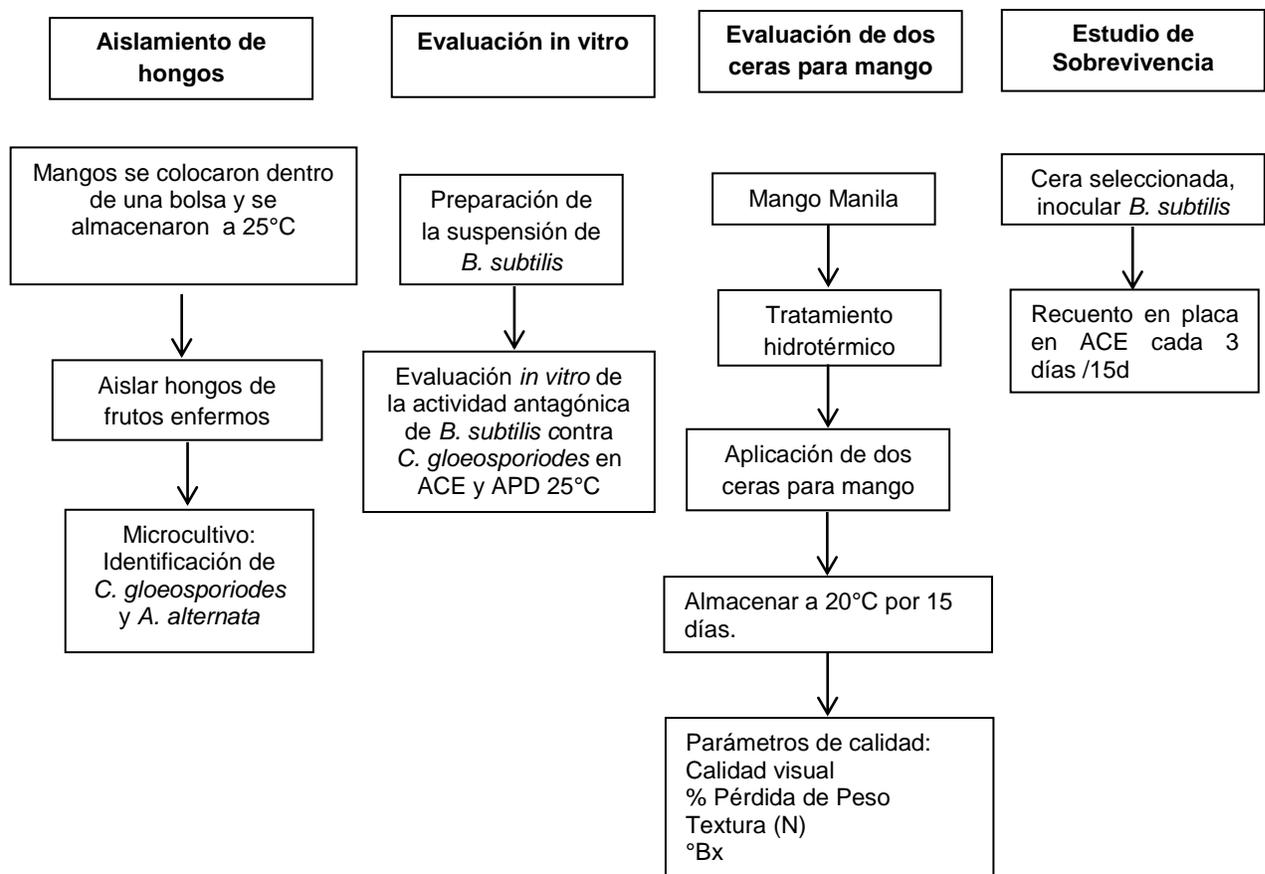


Figura 9. Estrategia experimental

4.3.2 Reproducción de la enfermedad

Para reproducir la enfermedad con el hongo aislado, se trabajó con frutos desinfectados en su superficie con hipoclorito de sodio al 1%; a los frutos se les infecto por picadura en su superficie con el hongo y se dejó en almacenamiento a 25°C por 5 – 7 días para observar el desarrollo de la enfermedad. Los frutos control fueron mangos desinfectados sin inocularse.

4.3.3 Microcultivo para identificación de estructuras fúngicas

Los hongos aislados de mangos con antracnosis de las lesiones negras y lesiones cafés se identificaron usando la técnica de microcultivo, la cual se basa en seguir el desarrollo monospórico de los hongos diariamente y hasta por 5 días. Primeramente se acondicionaron cajas de Petri con una varilla doblada en forma de “V” y sobre ella se colocó un porta objetos y un cubreobjetos, los cuales se esterilizaron a 121°C por 15 min (Figura 10).



Figura10. Técnica de Microcultivo para identificación de hongos

Por otro lado de una placa con medio de APD de grosor de 0.5 mm, se cortaron con hoja de bisturí, cuadraditos de APD de 1 cm de cada lado. Con la espátula o la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos estéril, dicho cuadrado se coloca de lado izquierdo. Se inoculó el hongo con el asa micológica en los cuatro lados del bloque de agar haciendo una punción suave. Se colocó el cubreobjetos

sobre el bloque de APD y se llevó a incubar a 22°C (Figura 10). Cada 24 horas se retiró un sistema de microcultivo de la incubación, en el lado derecho del portaobjetos se colocó una gota de azul de lactofenol (anexo 1) y sobre ella el cubreobjetos que estaba cubriendo al cuadrado de agar; posteriormente se retiró con cuidado el bloque de agar y en su lugar se colocó otra gota de azul de lactofenol, sobre ella se colocó un nuevo cubreobjetos, esto permite tener dos preparaciones para observar el desarrollo micelar. Las preparaciones se sellaron usando barniz de uñas para su mejor conservación. Las estructuras de los hongos se observaron con ayuda del microscopio óptico Carl Zeiss 49342 y se compararon con las reportadas en por Oliviera y col., 2005. Una vez identificadas, el cultivo puro de dichos hongos se mantuvo en APD.

4.3.4 Preparación de la suspensión de *B. subtilis*

La cepa de *B. subtilis* conservada en ACE a se activó inoculándola en caldo soya tripticasa (CST) y después de 24 hr de incubación a 35°C se inoculó por estría en ACE y se incubó las placas a 35°C por 24 horas. Posteriormente se preparó una suspensión que contenía 10^6 ufc mL⁻¹. El inóculo se conservó a 4°C.

4.3.5 Evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*

Del cultivo puro del hongo identificado como *C. gloeosporioides* se tomó esporas para sembrarlas en APD para obtener un cultivo reciente, esta se realizó en 3 ocasiones más incubando por 5 días cada resiembra.

Para evaluar *in vitro* la actividad antagónica de *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*, se usó la prueba de antagonismo por confrontación directa. Se utilizaron placas con APD con cultivo reciente de *C. gloeosporioides* y la suspensión de *B. subtilis* de concentración de 10^6 ufc mL⁻¹. En placas Petri con APD y ACE, de forma

independiente, se inoculo *B. subtilis* por la técnica de estriado desde la mitad de la placa a la orilla; en la otra mitad se colocó un cuadrado de APD con *C. gloeosporioides*. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (25°C) y se observaron diariamente hasta 10 días.

Para comprobar que el APD no tiene influencia en el crecimiento de *B. subtilis*. Éste se inoculo en ambos medios (ACE y APD) y se incubo por 7 días a 25°C observando su desarrollo.

4.3.6 Evaluación de dos recubrimientos comerciales para mango

Se aplicaron dos ceras comerciales: la cera “Charol Mango” y la Natural Shine™ TFC 210. Los frutos antes de encerarlos se les aplicó el tratamiento térmico para eliminar antracnosis el cual consiste en colocar los frutos en agua a 53°C por 6 min (Figura 11a); posteriormente se enfrían en agua a 7°C por 6 min. Una vez secos los frutos se enceraron.

4.3.6.1 Aplicación de las ceras

La ficha técnica de la cera Natural Shine™ TFC210 sugiere hacer una solución con agua destilada a pH 7.00, diluyendo la cera 1:1 con agua. Esta misma dilución se hizo para la cera “Charol Mango”. Las ceras se aplicaron por frotación con ayuda de una esponja suave para no dañar los frutos (Figura 11b), los cuales se dejaron secar en un estante de metal. Una vez secos, los frutos se almacenaron a 20°C durante 15 d. Cada 5 días se tomaron 6 mangos a los cuales se les determinaron los parámetros de calidad. Estos fueron calidad visual (registro fotográfico), pérdida de peso, textura, grados Brix y Acidez titulable.



Figura 11. (a) Tratamiento hidrotérmico contra antracnosis (53°C/6 min), (b) aplicación de las ceras, (c) almacenamiento de mango a 20°C.

4.3.6.2 Determinación de los parámetros de calidad

4.3.6.2.1 Calidad visual

La calidad visual de los frutos de mango se realizó observando los frutos tomado un registro fotográfico a los 15 días de almacenamiento.

4.3.6.2.2 Pérdida de peso

La pérdida de peso se monitoreo durante el almacenamiento comparando el peso de los frutos al momento del muestreo (P_f) con el peso inicial (P_i) registrado, la diferencia de esos pesos por 100 nos proporciona el % de pérdida de peso.

$$\% PP = \frac{P_i - p_f}{P_i} \times 100$$

4.3.6.2.3 Firmeza

La firmeza o textura de los frutos de mango se midió con un analizador de textura TA-HD utilizando una sonda plana de 5cm de diámetro, se midió la fuerza que opone el fruto a un deformación del mismo de 5%, para esto la velocidad de la

prueba fue 1 mm/s. Los resultados fueron reportados como la fuerza en (N) para deformar la masa.

4.3.6.2.3 Sólidos solubles totales (°Bx)

La concentración de sólidos solubles totales (SST) se determinó en el jugo de los frutos. Para esto una mitad de mango se “exprimió” directamente sobre la celda del refractómetro (método 932.12 establecido por la AOAC, 2002) modelo HI 96801 a 20 °C, el cual mide el índice de refracción. Este valor se reportó como °Brix.

4.3.7 Evaluación de la sobrevivencia de *B. subtilis* en el recubrimiento seleccionado

Se evaluó la sobrevivencia de *B. subtilis* en el recubrimiento de cera Natural Shine™TFC 210. Para esterilizar el recubrimiento éste se filtró a través de una membrana de nylon de tamaño de poro de 0.22 micras. Posteriormente se inocularon 20 mL de recubrimiento con 2mL de la suspensión de *B. subtilis* (10^6 ufcmL⁻¹), el recubrimiento inoculado se incubo a 25°C y se hizo un recuento por la técnica de vaciado en placa cada 3 días y hasta 15 días tomando 1 mL por triplicado para evaluar la sobrevivencia durante el almacenamiento por la técnica de vaciado en placa usando ACE.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento y purificación de hongos de mangos dañados

Mangos sanos de la variedad manila se colocaron dentro de una bolsa en una incubadora a 25°C por 7 días para provocar el desarrollo de antracnosis, enfermedad típica de frutos de mango. Al final de la incubación se pudo evidenciar dos tipos de lesiones en los frutos; manchas negras hundidas (Figura 13a) y otras color café sin hundimientos, de ambas lesiones se pudieron aislar e identificar el hongo causal. En la figura 13a observamos un fruto con evidente desarrollo de antracnosis, incluso se observa el micelio del hongo con tonalidad anaranjada. Los aislamientos en caja Petri de agar papa dextrosa desarrollaron micelio esponjoso y denso, presentándose una variación de color de blanco a crema y con tonalidades anaranjadas en los conidios (Figura 13b) estas observaciones se hicieron bajo microscopio estereoscópico. La figura 13c muestra un fruto de mango donde se reprodujo la enfermedad.

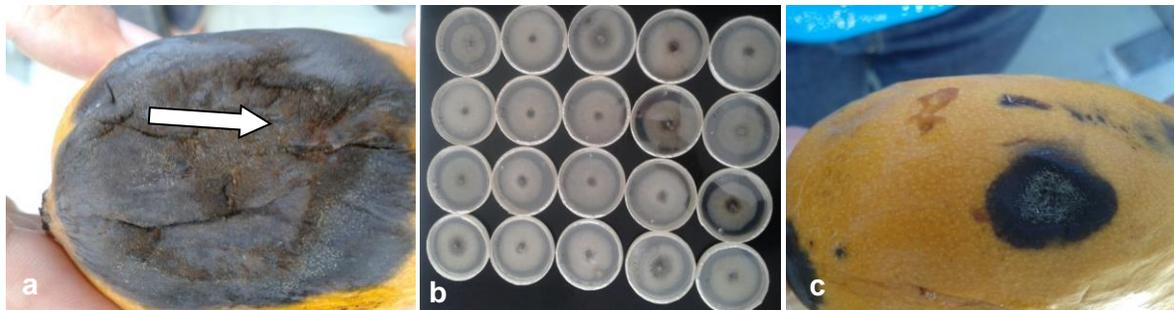


Figura 12. Mango con antracnosis (a); cultivo puro de *Colletotrichum gloeosporoides* (b) y reproducción de la enfermedad (c).

5.2 Identificación por microcultivo de hongos aislados de mangos dañados.

La figura 14 muestra las características microscópicas de cada aislado de hongo; los aislados de las manchas negras durante el desarrollo en microcultivo y con la tinción con azul de lactofenol presentaron hifas hialinas con conidios unicelulares ovalados de apariencia cilíndrica; mientras que el desarrollo en microcultivo del hongo aislado de las manchas café corresponden a un hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, con septos transversales y verticales de disposición irregular como se muestra en la Figura 14b. De acuerdo con las observaciones microscópicas por la técnica de microcultivo, los aislados fúngicos de las manchas negras corresponden a *C. gloeosporioides* (Figura 7a), mientras que los de las manchas café pertenecen a *Alternaria alternata*, (Figura 7b).

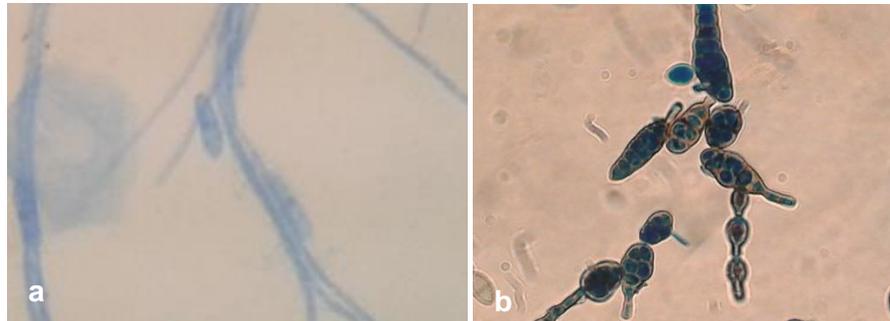


Figura 13. Morfología microscópica de estructuras de fructificación; (a) conidias unicelulares hialinas curvadas de *C. gloeosporioides* y (b) conidióforos simples, tabicados, con septos transversales y verticales de disposición irregular de *A. alternata* teñidos con azul de lactofenol y observados al microscopio.

5.3 Evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*

La figura 15 muestra el desarrollo de *B. subtilis* tanto en ACE (Figura 15a) como en APD (figura 15b), se observa el mejor desarrollo de *B. subtilis* en ACE que en APD.

El pH del APD es de 3.5 lo cual pudo influir en el desarrollo de la bacteria; sin embargo se pudo evidenciar el desarrollo de *B. subtilis*.

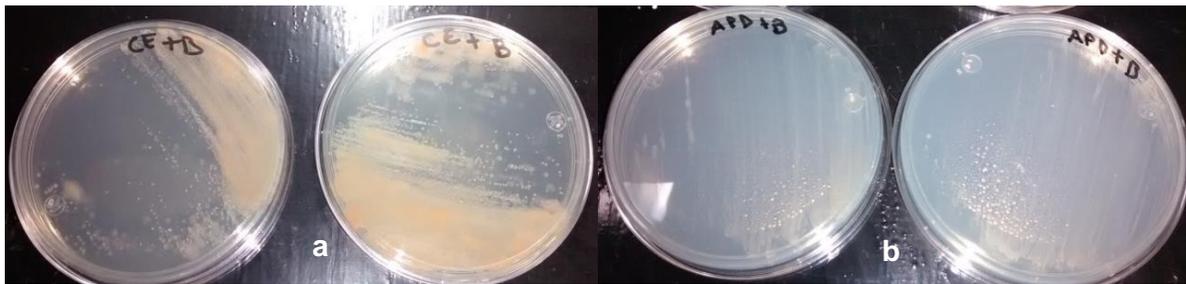


Figura 14. *Bacillus subtilis* en Agar cuenta estándar (a) y Agar Papa Dextrosa (b) después de 24 horas de incubación a 25°C.

Las figuras 16 y 17 muestran el desarrollo de *C. gloeosporioides* frente a *B. subtilis* en ACE y APD, respectivamente. Las placas se incubaron por 6 días a 25°C. Se puede observar el característico desarrollo de *B. subtilis* en el ACE (figura 16) mostrando un desarrollo en toda la estría. Se observa el efecto antagónico de *B. subtilis* contra el hongo ya que el *B. subtilis* desarrolla a lo largo del estriado mientras que *C. gloeosporioides* limita su crecimiento radial, indicado por la flecha amarilla.



Figura 15. Agar cuenta estándar con *C. gloeosporioides* (arriba) y *B. subtilis* (abajo desarrollo en estría) 6 días de incubación a 25°C. Se observa el antagonismo de *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*.



Figura 16. Agar papa dextrosa con *C. Gloeosporioides* (arriba) y *B. subtilis* (abajo desarrollo en estría) 6 días de incubación a 25°C. Se observa el antagonismo de *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*.

La figura 17 muestra el desarrollo de *C. gloeosporioides* frente a *B. subtilis* en APD. El medio se ajustó a pH 7.0 para descartar que el medio tuviera un efecto negativo sobre el desarrollo de *B. subtilis*. A pesar de que APD no es el medio idóneo para el *B. subtilis*; éste desarrollo mejor a pH neutro que a pH ácido (figura 15b), el hongo desarrollo mejor en APD que en ACE; sin embargo, también se puede evidenciar el efecto antagónico del *B. subtilis* contra el *C. gloeosporioides* en este medio (APD).

5.4 Evaluación de dos recubrimientos comerciales para mango

La Figura 18 muestra el efecto de las ceras sobre la pérdida de peso de mango manila almacenado a 20°C. Línea azul refiere a los frutos sin cera, línea rosa a los encerados con la cera Charol Mango y línea café a los frutos encerados con la cera Natural Shine™TFC 210. La pérdida de peso para los frutos sin cera es mayor que para los frutos encerados con ambas ceras. Los valores de PP para los frutos control fue de 15.94%; para los encerados con la cera de Charol Mango de 10.25% y para los encerados con la cera Natural Shine™ TFC 210 de 7.02% a los 15 días de almacenamiento a 20°C.

El análisis estadístico, muestra que los frutos de mango encerados con la cera Natural Shine™ TFC 210 pierden menos peso durante el almacenamiento con un valor promedio de 3.9427 (Figura 19) y un p-Value de 0.0005 contra el control y de 0.0324 contra charol Mango.

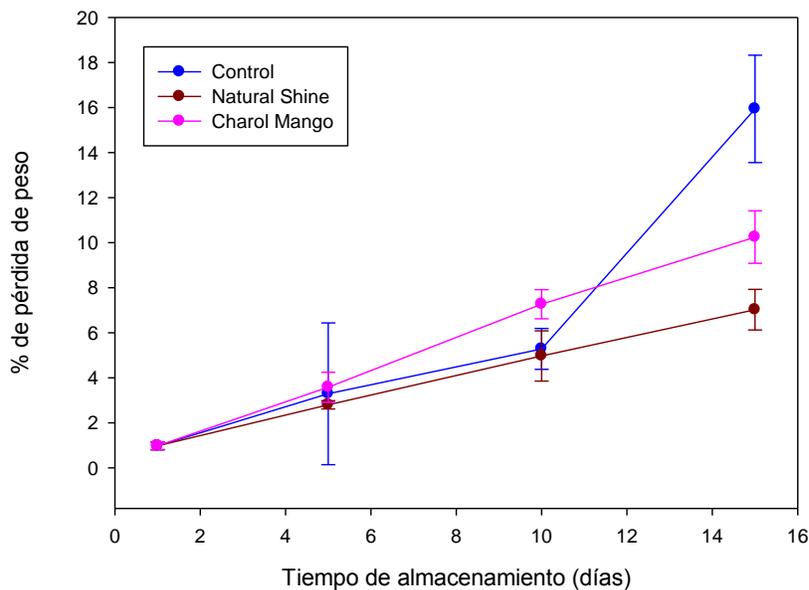


Figura 17. Efecto de las ceras sobre la pérdida de peso a 20°C. Línea azul sin cera (control), línea rosa cera Charol Mango y línea roja cera Natural Shine™ TFC 210

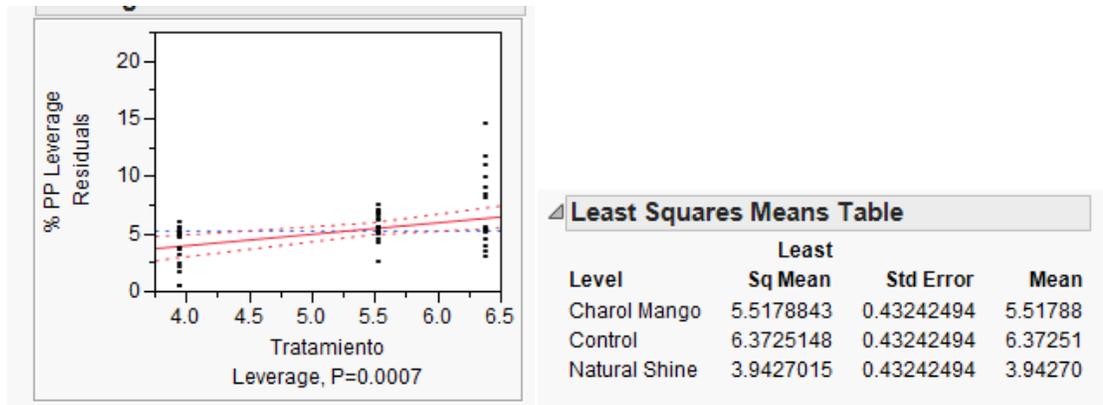


Figura 18. Valor promedio de pérdida de peso en frutos de mango sin cera y encerados con cera Charol Mango y Natural Shine™ TFC 210

Los cambios de textura de los mangos almacenados a 20°C por 15 días se muestran en la Figura 19. De forma general, todos los frutos pierden firmeza a lo largo del almacenamiento, desde 21.70 N hasta 6.163N en promedio. Los mangos encerados muestran mayor firmeza comparados con los mangos control; y entre las ceras, la cera Charol mango mantuvo más firmes los frutos a los 5 y 10 días de almacenamiento que la cera Natural Shine™ TFC 210; sin embargo en los últimos 5 días de almacenamiento los frutos control como los encerados con Charol Mango presentaron una mayor pérdida de textura que los mangos encerados con Natural Shine™ TFC 210; los valores promedios fueron de 3.505N para los mangos control, de 6.41N para los mangos con Charol Mango y de 8.61N para los encerados con Natural Shine™ TFC 210, respectivamente.

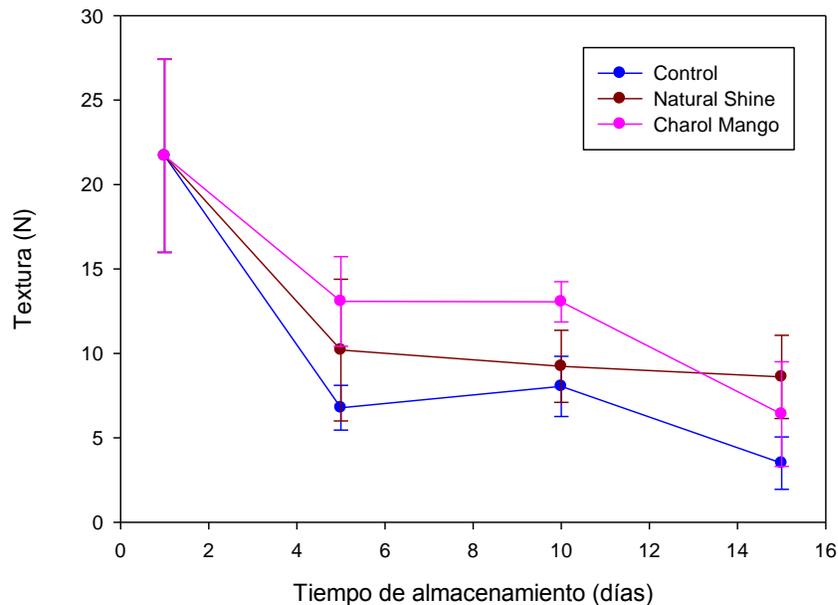


Figura 19. Efecto de las ceras sobre la textura de mango manila almacenado a 20°C por 15 días. Línea azul sin cera (control), línea rosa cera de Charol Mango y línea roja cera Natural Shine™ TFC 210.

Los cambios en el contenido de sólidos solubles expresados como °Bx de los mangos almacenados a 20°C por 15 días se muestran en la Figura 20. De forma general, todos los frutos aumentan el contenido de °Bx a lo largo del almacenamiento; al inicio del mismo los frutos en promedio presentaron valores de 8.55°Bx y al final un valor promedio de 14.35°Bx lo que muestra una adecuada madurez; sin embargo los frutos encerados con la cera Charol mango y los frutos control presentaron los valores más altos alrededor de 14.73 y 14.50 °Bx respectivamente; mientras que los encerados con Natural Shine™ TFC 210 lograron valores promedio de 13.833 °Bx. El análisis estadístico indica que los frutos encerados con Natural Shine™ TFC 210 al final del almacenamiento son estadísticamente diferentes en su grado de madurez con respecto al control.

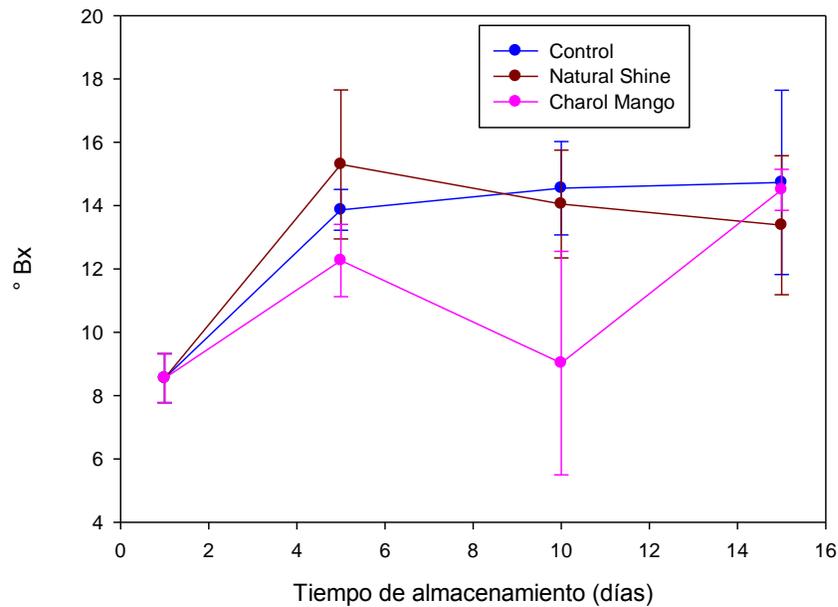


Figura 20. Efecto de las ceras sobre el contenido de sólidos solubles totales (°Bx) en mango almacenado a 20°C por 15 días. Línea azul sin cera (control), línea rosa cera de Charol Mango y línea roja cera Natural Shine™ TFC 210

La Figura 21 muestra la calidad visual de mangos encerados y almacenados durante 15 días a 20°C. La marchitez de los mangos control (A) y los encerados con cera de Charol Mango (C) es similar; en ambos tratamientos se aprecian frutos con un arrugamiento de la piel; mientras que los mangos encerados con la cera Natural Shine™ TFC 210 (B) no presentan síntomas de marchitez mostrando frutos firmes y turgentes.



Figura 21. Calidad visual mangos almacenados durante 15 días a 20°C; control (a), cera Natural Shine™ TFC 210 (b) y Cera Charol Mango (c).

5.5 Evaluación de la sobrevivencia de *B. subtilis* en la cera Natural Shine™ TFC 210

La cera Natural Shine™ TFC 210 disminuyó la deshidratación (pérdida de peso) y marchitez de mango manila; así como la pérdida de textura mejor que la cera Charol Mango; además permitió una adecuada madurez de los frutos. Considerando a la calidad visual de los frutos, la cera Natural Shine™ TFC 210 fue la mejor opción para los mangos y fue la que se consideró para evaluar la sobrevivencia de *B. subtilis*.

La dinámica de crecimiento de *B. subtilis* en la cera Natural Shine™ TFC 210 se muestra en la gráfica 22. Se puede observar que la cepa de *B. subtilis* no solo sobrevive en la cera si no que manifiesta una tendencia a desarrollar. Al día cero de inoculación se pudo contar $1.3 \cdot 10^6$ UFC/mL, las cuales permanecieron sin mayor cambio a los 3 días; esto se puede deber a la fase lago de adaptación del microorganismo al medio. Al sexto día de incubación se evidencia un incremento a $1.95 \cdot 10^6$ UFC/mL, finalmente a los 15 días de incubación se pudo contar hasta $2.25 \cdot 10^6$ UFC/mL; lo que indica que *B. Subtilis* sobrevive en la cera través de los días de estudio.

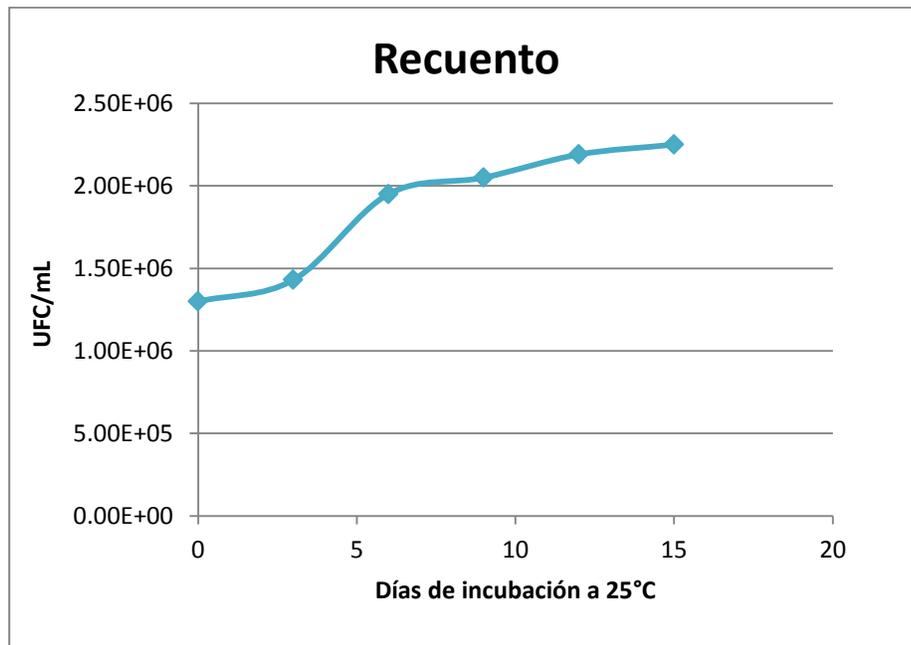


Figura 22. Dinámica de sobrevivencia de *B. subtilis* en cera NarturalShine™ TFC 210; recuento en ACE durante 15 días a 25°C.

6. DISCUSION

6.1 Aislamiento e identificación de hongos a partir de lesiones en mangos con antracnosis

Los frutos de mango están expuestos al ataque de diversos patógenos que ocasionan enfermedades. Las enfermedades causadas por hongos patógenos representan uno de los factores limitantes para la producción y comercialización; la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es la principal causa de pérdidas poscosecha. La habilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* para causar infecciones latentes o quiescentes lo han agrupado entre los patógenos más importantes en poscosecha. En particular en el cultivo mango se ha reportado que las especies de este hongo pueden estar presentes en varios órganos (hojas, flores y frutos) (Ploetz, 1994). En frutos sanos de mango manila almacenados en condiciones de 25°C y una humedad relativa alta se pudo inducir el desarrollo de la enfermedad caracterizada por lesiones negras y cafés. Realizando una purificación y un con ayuda de la técnica de microcultivo; se pudo evidenciar el desarrollo de los aislados. De forma normal la antracnosis en mango se evidencia por el desarrollo de manchas negras en la piel en las cuales no se observa la presencia de micelio en los frutos; en condiciones de laboratorio, los mangos se dejaron a 25°C con alta humedad hasta que se logró la esporulación en los mismos; en la figura 13a se observa la presencia de micelio color naranja sobre la piel dañada (mostrada por la flecha), aunado al ablandamiento; esto sugiere que el fruto presenta evidente desarrollo de antracnosis; también se pudo observar el desarrollo de manchas cafés los cuales no presentaron hundimientos. A diferencia de las bacterias, la identificación de los hongos se realiza siguiendo el desarrollo de sus diferentes estructuras morfológicas; a través de la técnica de microcultivo (Zamora *et al.*, 2001; Ureña *et al.*, 2002), una vez obtenido el cultivo puro, con esta técnica se puede obtener las distintas fases del ciclo de vida de los hongos aislados, la cual va desde la germinación de la espора, formación de hifas, micelio, diferenciación de las estructuras reproductivas. La Figura 14a muestra la morfología microscópica de estructuras de fructificación en particular las conidias unicelulares hialinas curvadas

de *C. gloeosporioides* (Cano *et al.*, 2004, Nuñez-Oregel, 2012) y la Figura 14b muestra los conidióforos simples, tabicados, con septos transversales y verticales de disposición irregular de *A. alternata* (García-León y col., 2013) teñidos con azul de lactofenol y observados al microscopio.

6.2 Actividad antagónica de *B. subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides*

La antracnosis es la principal enfermedad pre y poscosecha del mango, la cual causa pérdidas directas en el rendimiento en el campo, en las plantas de empaques, así como en la calidad del fruto y comercialización posterior (Ploetz y Prakash, 1997, Ploetz, 2003). Esta enfermedad es causada principalmente por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, por esta razón el efecto antagónico de *Bacillus* se evaluó sobre este. Los resultados obtenidos en pruebas *in vitro* muestran que *Bacillus subtilis* presenta actividad antagónica sobre *C. gloeosporioides*; utilizando dos distintos medios de cultivo como es el agar papa dextrosa (APD) y agar cuenta estándar (ACE) se pudo observar dicho efecto. El ACE es el medio por excelencia para el desarrollo de *B. subtilis* mientras que APD lo es para el *C. gloeosporioides*; el hecho de utilizar los dos medios de cultivo es para disminuir el efecto selectivo del medio; ya que la bacteria desarrolla adecuadamente en ACE el cual tiene un pH de 7.0 mientras que el hongo lo hace en APD con un pH de 3.5. La figura 15a muestra el desarrollo del *B. subtilis* en ACE y la Figura 15b en APD; se puede observar el efecto del pH sobre el crecimiento de la bacteria ya que en ACE el desarrollo es abundante sobre toda la estría y aunque en APD el desarrollo es escaso si se puede evidenciar el crecimiento. Por su parte el *C. gloeosporioides* después de 6 días de incubación en ACE se pudo evidenciar su desarrollo; esto puede considerarse como un comportamiento normal ya que incluso en APD el recuento se hace a los 3 o 5 días de incubación.

El desarrollo de *C. gloeosporioides* frente a *B. subtilis* en ACE y APD se observa en las Figuras 15 y 16, respectivamente. En las placas de ACE, después de la incubación por 6 días a 25°C se observa el característico desarrollo de *B. subtilis* y el efecto antagónico contra el hongo ya que el *B. subtilis* desarrolla a lo largo del estriado mientras que *C. gloeosporioides* limita su crecimiento radial lo cual está mostrado por la flecha amarilla en la figura 15. El hongo crece mejor en pH ácidos como el de APD que en ACE. Para evaluar el efecto antagónico del *B. subtilis* en APD (Fig. 16), el medio se ajustó a pH 7.0 para descartar que el pH de 3.5 característico del APD tuviera un efecto negativo sobre el desarrollo de *B. subtilis*. A pesar de que APD no es el medio idóneo para el *B. subtilis*; éste desarrolla mejor a pH neutro (Figura 16) que a pH ácido (figura 15b) aunque no mejor que en ACE (Figura 15a) esto se puede observar por el escaso desarrollo del *B. subtilis* en APD ajustado a pH 7.0 (figura 16). En un estudio realizado por Calvo y Zúñiga, (2010) caracterizaron fisiológicamente a cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de la rizósfera de papa y encontraron que el 100% de cepas aisladas (43 cepas) crecieron bien en medios de pH de 4.0 y 5.5 lo que indica una buena adaptación a pH ácidos. Sin embargo; el pH del APD es de 3.5 lo cual pudo influir en el pobre desarrollo de la bacteria. A pesar de que el medio estaba neutro y *B. subtilis* creció de manera escasa se puede evidenciar el efecto antagónico contra el *C. gloeosporioides* en este medio (APD) ya que también se observa la inhibición en su crecimiento radial.

Varios mecanismos de acción se han propuesto para explicar el funcionamiento antagónico microbiano. La competencia de nutrientes y el espacio entre el patógeno y el antagonista son considerados como los principales mecanismos de acción (Hipólito *et al.*, 2000; Jijakli *et al.*, 2001). Otros mecanismos es la producción de antibióticos, el parasitismo directo y la resistencia inducida (Janisiewicz *et al.*, 2000).

La competencia por nutrientes, desempeña un papel importante en la capacidad de control biológico contra el patógeno; se han demostrado a través de estudios *in vitro* que los microorganismos antagonistas absorben más rápidamente los nutrientes que los agentes patógenos y al establecerse más rápido; inhiben la

germinación de esporas de los patógenos en el sitio de la herida (Sharma *et al.*, 2009). *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de matar a los patógenos mediante la producción de antibióticos (Gueldner *et al.*, 1988).

Bacillus subtilis se ha reportado que produce una amplia variedad de antibióticos, antibacterianos y antifúngicos; otro mecanismo de acción de este género de bacterias antagonistas en las plantas con crecimiento de patógenos es por medio de enzimas que degradan los polímeros estructurales de los hongos (Nuñez, 2012). Este desarrollo experimental nos ayuda a comprender el mecanismo de acción de este microorganismo para inhibir a sus competidores en el territorio que el desarrolla y así ser utilizado en el control biológico.

6.3 Evaluación de dos recubrimientos comerciales para mango durante el almacenamiento a 20°C

El mango es un climatérico típico, cuyo pico respiratorio se produce entre los 6 y 10 días posteriores al momento de la cosecha, el cual es identificado por el incremento de la actividad respiratoria y un alta en la tasa de respiración. Debido al deterioro que sufre la cutícula del mango se han estudiado alternativas que ayuden a mantener las características de esta cubierta y mantener la calidad del mismo (Pérez *et.*, col. 2005).

La aplicación de recubrimientos comestibles se ha proyectado como una alternativa viable para disminuir pérdidas poscosecha debido a la fisiología normal de la fruta que produce importantes disminuciones en el peso por la deshidratación, pérdida de textura y de apariencia, en el deterioro causado por hongos y plagas. Se han realizado numerosos estudios para adecuar un tratamiento que ayude a prolongar la conservación de los frutos, garantizando que pueden ser almacenados, transportados y comercializados con la calidad requerida para los clientes. En este trabajo se evaluó el desempeño de dos ceras comerciales; la cera Charol Mango y

la cera Natural Shine™TFC210 sobre la pérdida de peso (PP), la textura y la maduración de los frutos a través de la determinación de °Bx.

La presencia de una barrera artificial de difusión alrededor de las frutas; puede causar distintos efectos, tales como: disminución en los niveles de O₂ y aumento en las concentraciones de CO₂, alteraciones en las concentraciones de etileno, disminución el porcentaje de agua y cambio en los procesos fisiológicos. Estos procesos dependen de la variedad del fruto, el cultivar, la masa, y tasa de respiración (Stepek y col., 1987).

6.3.1 Pérdida de Peso

El efecto más significativo de los tratamientos se observó en la pérdida de peso (PP, Figura 17), a los cinco días de almacenamiento a 20°C los frutos de los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas en la PP; el rango varió de 2.80 a 3.60 %. A los diez días de almacenamiento la PP de los frutos control y de los frutos encerados con la cera Natural Shine™TFC 210 presentaron tendencias similares con valores aproximadamente de 5.28±0.9% y 4.97±1.11%, respectivamente; mientras que los frutos encerados con la cera Charol Mango presentaron la mayor PP con aproximadamente de 7.26±0.64% en el mismo periodo de almacenamiento. Para los quince días, los frutos control fueron los que presentaron la mayor PP con valores de 15.95±2.38% PP; en este periodo los frutos tratados con la cera Charol Mango perdieron alrededor de 10.24±1.17% y los tratados con Natural Shine™ TFC 210 perdieron 7.02±0.9%PP. La cera Natural Shine presenta un mejor desempeño que la Charol Mango ya que los frutos pierden 46% menos de peso y hasta el 66% menos que los frutos sin encerar; a pesar de que ambas ceras son elaboradas para frutos climatéricos y en particular para mango, las diferencias entre ellas es debido a su composición; mientras Natural Shine tiene como base de cera de carnauba y goma laca, la cera Charol Mango está elaborada a base de propilenglicol y la sacarosa; se ha demostrado que los primeros ofrecen una mejor barrera contra la pérdida de agua.

6.3.2 Pérdida de Textura

Al evaluar la textura en los frutos durante el almacenamiento (Figura 19) se observa que todos los frutos, control y encerados, presentan una tendencia a disminuir, desde 21.6 N hasta 8.6, 6.4 y 3.5N para los frutos encerados con Natural Shine™ TFC 210, los encerados con Charol Mango y los frutos control, respectivamente. A los 5 días de almacenamiento todos los frutos presentaron una disminución lineal con una mayor pendiente negativa para los frutos control (6.78N), seguido de los encerados con Natural Shine™ TFC 210 (10.20N) y los encerados con Charol Mango (13.07N). La textura de los frutos se mantuvo sin cambios importantes dentro de los 5 días posteriores; sin embargo para los 15 días de almacenamiento los frutos control presentaron los menores valores de textura, 3.5 N; y aunque la cera Charol mango a los 10 d de almacenamiento mantuvo mejor la textura de los frutos que la Natural Shine™ TFC 210, a los 15 días el comportamiento fue contrario ya que la cera Charol Mango presentó una disminución de alrededor 5N llegando a un valor final de $6.41 \pm N$; mientras que los frutos encerados con Natural Shine TFC 210 perdieron solo 2N aproximadamente teniendo una valor final de 8.61 N.

6.3.3 Contenido de Sólidos Solubles Totales (°Bx)

La figura 20 muestra los valores de sólidos solubles totales expresados como grados °Bx. Al inicio del almacenamiento los frutos presentaron valores de °Bx de 8.55 ± 0.77 los cuales incrementaron en los primeros 5 días de almacenamiento; contrario a lo esperado, dado el carácter climatérico del mango, este incremento fue mayor en los frutos encerados con Natural Shine™ TFC 210 ($15.30 \pm 2.35^\circ\text{Bx}$) que los frutos control (13.85 ± 0.64) y que los encerados con Charol Mango ($12.26 \pm 1.14^\circ\text{Bx}$). El efecto del encerado fue similar entre las dos ceras a los 10 y 15 días de almacenamiento logrando valores finales de 13.86 y 14.5°Bx para los frutos con Natural Shine™ TFC 210 y charol Mango respectivamente.

Al analizar las gráficas la cera Natural Shine™ TFC 210, brinda mayor protección al fruto de mango durante el ciclo de almacenamiento, por lo cual se tomó como medio selectivo para analizar la viabilidad del *B. subtilis* durante el almacenamiento.

6.4 Viabilidad de *B. subtilis* en la cera Natural Shine™ TFC 210

La cera Natural Shine™ TFC 210 disminuyó la deshidratación (pérdida de peso) y marchitez de mango manila; así como la pérdida de textura mejor que la cera Charol Mango; además permitió una adecuada madurez de los frutos. Considerando la calidad visual de los frutos (figura 21), en la cual observamos como la cera Natural Shine™ TFC 210 brinda mayor protección a los frutos después de 15 días de almacenamiento a 20°C demostrando así que la cera Natural Shine™ TFC 210 es la mejor opción para la conservación de los frutos de mangos y es en la que se evaluó la sobrevivencia de *B. subtilis*.

La cepa de *B. subtilis* no solo sobrevive en la cera Natural Shine™ TFC 210 sino que manifiesta una tendencia a desarrollar, tal como se muestra en la figura 22. Al día cero de inoculación se pudo contar 1.3×10^6 UFC/mL, las cuales permanecieron sin cambios hasta los tres días, esto se puede atribuir a la fase lag (fase de adaptación al medio). Después de seis días de incubación se evidenció un desarrollo de 1.95×10^6 UFC/mL y a los quince días de hasta 2.25×10^6 UFC/mL, el grafico nos muestra que la bacteria sobrevive durante este tiempo (15 días), lo que puede sugerir que *B. subtilis* se encuentra en la fase log, en esta fase la cepa presenta una adaptación estable al medio. Por lo tanto *B. subtilis* después de seis días de incubación se encuentra viable en la cera por lo que puede representar un beneficio a los factores de calidad (pérdida de peso, textura y °Bx), en el décimo día se observan manifestaciones marcadas en los valores de dichos factores de calidad, lo que indica que la presencia de *B. subtilis* en la cera Natural Shine™ TFC 210 contribuye a la estabilización de los factores de calidad aumentando la vida de comercialización de los frutos encerados e inoculados.

7. CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* se demostró la capacidad antagónica de *B. subtilis* contra *C.gloeosporoides*.

La aplicación de la cera Natural Shine™TFC 210 mantiene la calidad de los frutos de mango, contribuyendo a preservar la firmeza y reduciendo las pérdidas de peso en pos-cosecha hasta por 12 días.

Bacillus subtilis puede permanecer viable en la cera Natural Shine™ TFC 210 por al menos 15 días.

La cera Natural Shine™TFC 210 además de ser un recubrimiento biodegradable puede permitir la sobrevivencia de *B. subtilis* lo cual puede ayudar a disminuir la incidencia de antracnosis (mancha negras hundidas) provocada por *C. gloeosporioides*, lo cual puede abrir posibilidades de exportación de mangos encerados.

8. REFERENCIAS

Abbott, J. Quality measurement of fruits and vegetables. Horticultural Crops Quality Laboratory, USDA. Postharvest Biology and Technology. **1999**. Vol. 15:207-225.

AOAC. Fruits and fruits products Official Methods of Analysis of AOAC. AOAC, (ed). Washington, USA. **1990**, pp. 829-830.

AOAC. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists. 16va. Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. **1998**.

Aluja, M. Manejo integrado de la mosca de la fruta 2da. ed., Editorial Trillas, México, D.F. **1993**, pp: 250-261.

Allende, R., Juárez, C., García, R., y Galindo, E. *Rhodotorula minuta*, agente control biológico potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. Brazilian Phytopathology. **2001**; 26: 461.

Bateman, M.A. The ecology of fruits flies. Rev. Entomol. **1972**; 17:49-18.

Becerra, N.E. Enfermedades del cultivo de mango. 2da. ed., Editorial Limusa, México, D.F. **1995**; 6.

Bustos, R. M.E. Irradiation as a Quarantine Treatment. Proceedings of the NAPPO Workshop on Phytosanitary Alternatives to Methyl Bromide. 24va ed., Annual Meeting Bulletin. **2001**; 16:4-13.

Cano J., Guarro J. and Gené J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* Species of clinical Interest. Journal Clinical Microbiology. **2004**.

Carrillo Fasio, José Armando; García Estrada, Raymundo Saúl; Muy Rangel, María Dolores; Sañudo Barajas, Adriana; Márquez Zequera, Isidro; Allende Molar, Raúl; de la Garza Ruiz, Zagidh; Patiño Vera, Martín; Galindo Fentanes, Enrique Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México Revista Mexicana de Fitopatología. **2005**. vol. 23, núm. 1; pp. 24-32.

CESAVEGRO. Fichas técnicas de insectos y plagas en frutales. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato. **2005**: 13 de Marzo 2012.

CESAVEGRO. Informe de evaluación de avances logrados entre 2006 y 2010. Campaña contra la mosca de fruta en la cadena de mango. **2010**: 13 de mayo de 2015.

Calvo P. y Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1) pp 31-39.

Empaques de mangos del C.I.P., S.P.R de R.L. de C.V. Identificación de las necesidades logísticas para la comercialización del sistema producto Mango en la Región Noroeste. Asesoría Financiera. 30 de Noviembre de **2009**. Pag:14.

FAO/FOASTAT. Organización de las naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. **2013**; 13 de marzo de 2013.

Fellows, P. Food Processing technology, principles and practice. 2da ed., CRC Press. Reino Unido. **2000**; P 230.

Financiera Nacional de Desarrollo, Información del sector rural. **2014** Consulta: 14 de marzo 2015

<http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Mango%20%28jul%202014%29.pdf>

Fitzell, R.D. y C.M. Peak. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Ann. Appl. Biol.* **1984**; 104: 53-59.

Flores, A. Manejo poscosecha de frutas y hortalizas en Venezuela. 2da. ed., Unellez, Venezuela. **1994** : 319.

Galán, S.V. El Cultivo del Mango. Ediciones MundiPrensa. Gobierno de Canarias. Madrid, España. **1999**. 224 p.

Galvis, Jesús A. y Herrera, Aníbal. El mango, manejo y poscosecha. Santa Fé de Bogotá: Sena-Universidad Nacional de Colombia. **1995**.

García-León , E., Leyva-Mir, G., Villaseñor-Mir Eduardo., Rodríguez-García, F., Tovar-Pedraza, J M. Identification and incidence of three phytopathogenic fungi of new report on oat (*Avena sativa* L.) at Mexico's Central Plateau. *Agrociencia* 47: 815-827. **2013**.

Gueldner RC, Reilly CC, Pussey PL, Costello CE, Arrendale RF, Cox RH, Himmelsbach DS, Crumley FG, Culter HG. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis* *Journal, of Agriculture and Food Chemistry* 36. **1988**. 366-370.

Hulme, A.C. The mango In the Biochemistry of fruits and their products. Academic Press London: **1971**; Vol 1. 233-254.

Huerta-Palacios G. Holguín-Melendez, F. Benítez- Camilo F.A. Epidemiología de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología: **2009**; 93.

Huerta-Palacios, G., Francisco Holguín-Meléndez, Flor Azucena Benítez-Camilo y Jorge Toledo-Arreola. Epidemiología de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz y Sacc) en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México Rev. mex. fitopatol. **2009** vol.27 no.2.

Hipólito A, El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski MA. Control of postharvest decay of Apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. Postharvest Biology and Technology 19. **2000**. 265-272.

Intra B. Mungsuntisuk I, Nihira T, Igarasshi Y, Panbangred W. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soil with inhibitory against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. BMC Research Notes 4. **2011**.1-9.

Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Sherer C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruit with a simple method to study competition for nutrients. Phytopathology 90. **2000**. 1196-1200.

Jijakli MH, Grevesse C, Lepoivre P. Modes of action of biocontrol agents of postharvest diseases: challenges and difficulties. Bulletin- OILB/SROP 24. **2001**. 317-318.

Josephson, E.S. and Peterson, M.S. Preservation of Food by Ionizing Radiation, CRC Press Inc., 2000 Corporate Blvd. NW, Boca Raton, Florida, **1982**. Vol. 1, 3343.

Kader, A. A. Fruit Maturity, Ripening and Quality relationships. Acta Horticulturae, 485.ISHS.**1999**; 203-208.

Kader, A.A. Potential applications of ionizing radiation in postharvest handling of fresh fruits and vegetables. Food Technology. **1986**; 40:117-121.

Kader, A.A. Índices de madurez, factores de calidad, normalización e inspección de productos hortícolas. In: Fisiología y Tecnología Postcosecha de Productos Hortícolas en México. Yahia E. e Higuera, I. (eds). Limusa. D.F., México. **1991**.

Ke, D. and Kader, A. A. External and internal factors influence fruits tolerant to low oxygen atmosphere. Journal American Society For Horticultural Science. **1992**; 117: 913-918.

Mata, B. y Mosqueda V. La producción de mango en México, 1era ed., Editorial Limusa, México, D.F. **1995**. 159 p

MedlinePlus. Uso médico de la vitamina A. **2015:** 18 de mayo de 2015. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002400.htm>

MedlinePlus. Uso médico de la vitamina C. **2015:** 18 de mayo de 2015. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002404.htm>

McMillan R.T. Jr., Spalding, D. H., and Reeder, W. F. 1987. Effectiveness of various postharvest treatments for mango decay control. Proc. Fla. State Hort. Sci. 100: 7-9.

Muy, R. Manejo pos-cosecha de frutas y hortalizas. Conferencia. Instituto Tecnológico de Culiacán. **2003**.

Natural Shine™ TFC 210. Pace International. Mayo **2015**
<http://www.paceint.com/fabsheets/mangoes/Coatings/NaturalShineTFC210-Mang.pdf>

Núñez-Oregel, V. Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya. Tesis de Maestría, IPN, **2012**.
<http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/12238/1/N%C3%9A%C3%91EZ%20OREGEL%20VERONICA%20-%20B081003.pdf>

Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K y Trapero, A. Caracterización morfológica y cultural de aislados de Colletotrichum spp. Causantes de la Antracnosis del Olivo. Bol. San. Veg. Plagas. **2005**; 31:531-548.

Pérez, B.; Bringas, E.; Cruz, L.; Báez-Sañudo, Reginaldo Evaluación de cera comestible en mango "Tommy Atkins" destinado a la comercialización para el turismo parte I: Efecto en las características físico-químicas Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 7, núm. 1, julio, **2005**, pp. 24-32.

Ploetz, R.C. 1994. Anthracnose (Mango). In: Compendium of tropical fruit diseases. Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W. T., Rohrbach, K.G., and Ohr, H.D. (Eds) p. 35-36. APS Press. The American Phytopathology Society St. Paul, Minnesota, USA.

PROEXANT Corporación. Proyectos exitosos para el sector agroexportador. Promoción de Exportaciones Agrícolas no Tradicionales. **2006**. http://www.proexant.org.ec/HT_Mango.html

Radmanesh, M.M. Radiofrecuencia y Electrónica de Microondas Ilustrado. 1era ed., Editorial Prentice may PTR, Estados Unidos de América, **2001**; 190.

Rodríguez–López Edgar Saúl, Juan Manuel González–Prieto y Netzahualcoyotl Mayek–Pérez. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. Rev. mex. fitopatol vol.27 no.1 Texcoco. **2009**.

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, pesca y Alimentación. Empaque de Mangos del C.I.P., S.P.R. de R.L. de C.V. Identificación de las necesidades logísticas para la comercialización del sistema producto Mango en la Región Noroeste **2009**. [Consultado 2015 Marzo 10]. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/Mangos.pdf.

SAGARPA- SIAP, Cierre de la producción agrícola por cultivo. **2013**. Consulta en 14 de Marzo 2012 en <http://www.siap.gob.mx/opt/123/77/76.html>

Sangeetha, C.G., and Rawal, R.D. Nutritional Studies of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. And Sacc. The In citant of Mango Anthracnose. World Journal of Agricultural Sciences **2008**; 6: 717.

Sharma RR, Dinesh S, Rajbir S. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50. **2009**. 205-209.

Sergent, E. Efectos del sombraje y época de cosecha sobre la calidad del mango (*Mangifera indica* L.) "Haden". Bioagro. Revista del Decanato de Agronomía. UCLA. **1999**.

Seymour, G.B., Taylor, J. and Tucker, G.A. Biochemistry of Fruit Ripening. 1era ed., Chapman & Hall, London, U.K. **1993**.

Sommer, N.F., Fortalage, J., Edwards, D.C. Postharvest Diseases of selected commodities. En Kader, A.A. (Ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops **2002**. (pp.223-227). University of California.

Spadaro, D. and Gullino, M.L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruits diseases. International Journal of Food Microbiology **2004**; 91:185.

Súmamo, M. O. Modificación de la actividad antioxidante y la calidad poscosecha de frutos de mango (*Mangifera indica*) irradiado. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México. **2009**.

Steppek, S.; Geeson, J. and Stow, J.. Production of modified atmospheres in deciduous fruits by the use of films and coatings. HortScience 22 (5): **1987**. 772-776.

USDA. Importation of Fresh Mangifera Indica (mango) Fruit from India into the Continental United States. Risk Management. **2002**; 1-12.

Yahia, E.M., L.A. Carrillo y D. N. Rivera. Manejo postcosecha del mango. Editorial Universidad de Colima. Colima, México.**1997**.

Zarazua, A. y Ponce, P. Situación y perspectivas del mango en México.**2005**.