



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

ECOLOGÍA MICROBIANA DEL MANGO ATAU LFO TRATADO CON  
RADIACIÓN GAMMA COMO MÉTODO POSTCOSECHA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
QFB ARELI LÓPEZ GAZCÓN ZAMUDIO

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Dr. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D. F. JUNIO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE</b>	I
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	VI
<b>RESUMEN</b>	VII
<b>1. ABREVIATURAS</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>3. ANTECEDENTES</b>	7
<b>3.1 MANGO</b>	7
3.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	7
3.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MANGO	7
3.1.3 VARIEDADES DEL MANGO	8
3.1.4 COSECHA	9
3.1.5 MADURACIÓN DE FRUTOS CLIMATÉRICOS	9
3.1.6 MICROBIOTA DEL MANGO	12
3.1.6.1 <i>Escherichia coli</i>	14
3.1.7 PLAGAS DEL MANGO	14
3.1.8 ENFERMEDADES DEL MANGO	15
3.1.9 TRATAMIENTOS APLICADOS PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE LAS FRUTAS	16
<b>3.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS</b>	19
3.2.1 IMPACTO ECONÓMICO MUNDIAL DE LAS ETAs	20
3.2.2 ECOLOGÍA MICROBIANA	22
<b>3.3 RADIACIÓN</b>	25
3.3.1 RADIACIÓN GAMMA	25
3.3.1.1 FUENTES DE RADIACIÓN GAMMA	25
3.3.1.2 DOSIS DE RADIACIÓN GAMMA ABSORBIDA	25
3.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES	26
3.3.2.1 IONIZACIÓN	26
3.3.2.2 EFECTO DIRECTO E INDIRECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA	26
3.3.2.3 RADIÓLISIS DEL AGUA	27
3.3.2.4 DAÑO A MOLÉCULAS ORGÁNICAS	27
3.3.2.4.1 DAÑO A HIDRATOS DE CARBONO	27
3.3.2.4.2 DAÑO A PROTEÍNAS	28
3.3.2.4.3 DAÑO A LÍPIDOS	28

3.3.2.4.4	DAÑO A ÁCIDOS NUCLEICOS	29
<b>3.4</b>	<b>RADIACIÓN GAMMA EN ALIMENTOS</b>	<b>31</b>
3.4.1	VENTAJAS DEL TRATAMIENTO	32
3.4.2	DESVENTAJAS DEL TRATAMIENTO	33
3.4.3	FACTORES QUE CONFIEREN A LOS MICROORGANISMOS RESISTENCIA A LA RADIACIÓN	33
3.4.4	FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DEL TRATAMIENTO CON RAYOS GAMMA	34
3.4.5	MANGOS IRRADIADOS	35
3.4.6	ALIMENTOS IRRADIADOS EN MÉXICO	36
3.4.6.1	MANGOS IRRADIADOS EN MÉXICO	36
<b>3.5</b>	<b>DGGE</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>40</b>
6.1	OBJETIVOS PARTICULARES	40
<b>7.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>41</b>
<b>7.1</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA</b>	<b>41</b>
7.1.1	CONSERVACIÓN DE LA CEPA	41
7.1.2	IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	41
7.1.3	IDENTIFICACIÓN AUTOMATIZADA VITEK®	41
7.1.4	SEROTIPIFICACIÓN	42
7.1.4.1	ANTÍGENO SOMÁTICO "O"	43
7.1.4.2	ANTÍGENO FLAGELAR "H"	43
<b>7.2</b>	<b>MANGO</b>	<b>44</b>
7.2.1	LIMPIEZA	44
7.2.2	SELECCIÓN	44
7.2.3	EMPAQUETADO	45
7.2.4	TRATAMIENTO DE MUESTRAS	45
<b>7.3</b>	<b>EFFECTO DE LA IRRADIACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DEL MANGO.</b>	<b>46</b>
7.3.1	PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	46
7.3.1.1	RESPIRACIÓN	46
7.3.2	PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	47
7.3.2.1	FIRMEZA	47

7.3.2.2 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES	47
7.3.2.3 DETERMINACIÓN DE pH	47
7.3.2.4 DETERMINACIÓN DE ACIDEZ	47
7.3.2.5 DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE PESO.	48
7.3.2.6 DETERMINACIÓN DEL COLOR.	48
<b>7.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN EL PATÓGENO</b>	<b>49</b>
7.4.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.	49
7.4.2 INOCULACIÓN DE LOS FRUTOS.	50
7.4.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.	50
<b>7.5 ANÁLISIS SENSORIAL</b>	<b>50</b>
<b>7.6 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA MICROBIOTA DEL MANGO</b>	<b>51</b>
7.6.1 MÉTODO ENZIMÁTICO	52
7.6.1.1 RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA DE CADA LOTE	52
7.6.1.2 EXTRACCIÓN DE DNA	52
7.6.2 MÉTODO DE HERVIDO	53
7.6.2.1 RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA	53
7.6.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA	54
7.6.3 CUANTIFICACIÓN DE DNA	55
7.6.4 PCR	55
7.6.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	56
7.6.6 DGGE	57
7.6.6.1 PREPARACION DE LOS GELES	57
7.6.6.2 GEL PERPENDICULAR	58
7.6.6.3 GEL PARALELO	58
7.6.6.4 TINCIÓN CON PLATA	58
7.6.7 ANÁLISIS DE LAS HUELLAS DE COMUNIDADES MICROBIANAS	60
7.6.7.1 ÍNDICE DE RIQUEZA (R)	60
7.6.7.2 COEFICIENTE DE SIMILITUD DE DICE SD	60
7.6.7.3 ÍNDICE DE DIVERSIDAD	61
7.6.7.4 ÍNDICE DE DOMINANCIA DE SIMPSON (S)	61
7.6.7.5 RECUPERACIÓN, REAMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA DE LOS GELES DE DGGE	61

7.6.7.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	62
<b>7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	62
<b>8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	63
<b>8.1 CORROBORACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LA CEPA <i>E. coli</i></b>	63
<b>8.2 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA SOBREVIVENCIA DE <i>E. coli</i> O102:H6 Y EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MANGO ATAULFO</b>	63
8.2.1 TRATAMIENTO DE LOS MANGOS	63
8.2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA	64
8.2.3 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA SOBREVIVENCIA DE <i>E. coli</i> O102:H6	64
8.2.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MANGO ATAULFO	69
8.2.4.1 RESPIRACIÓN DEL MANGO ATAULFO	69
8.2.4.2 APARIENCIA DEL MANGO ATAULFO	73
8.2.4.3 COLOR DE LA CÁSCARA DEL MANGO ATAULFO	73
8.2.4.4 PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE LOS MANGOS	75
8.2.4.5 SÓLIDOS SOLUBLES EN LA PULPA DEL MANGO ATAULFO	76
8.2.4.6 FIRMEZA DE LA PULPA DEL MANGO ATAULFO	77
8.2.4.7 pH DE LA PULPA DEL MANGO ATAULFO	78
8.2.4.8 ACIDEZ DE LA PULPA DEL MANGO ATAULFO	79
<b>8.3 ANÁLISIS SENSORIAL</b>	81
8.3.1 GENERACIÓN DE DESCRIPTORES	81
8.3.2 TRATAMIENTO DE LOS MANGOS	83
8.3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA	83
<b>8.4 RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA EN LA SUPERFICIE DEL MANGO Y EXTRACCIÓN DEL DNA</b>	88
<b>8.5 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA MICROBIOTA NATURAL DEL MANGO Y SU EFECTO EN <i>E. coli</i> O102:H6 CON UNA DOSIS DE 1 KGy</b>	90
8.5.1 TRATAMIENTO DE LOS MANGOS	90

8.5.2	CARACTERIZACIÓN FÍSICA	91
8.5.3	EFEECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA SOBREVIVENCIA DE <i>E. coli</i> O102:H6	91
8.5.4	EFEECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA MICROBIOTA DE LA SUPERFICIE DEL MANGO	93
8.5.4.1	DGGE PARALELO DE PRUEBA	94
8.5.4.2	DGGE	96
8.5.4.3	RIQUEZA, ÍNDICE DE DOMINANCIA E ÍNDICE DE DIVERSIDAD	100
8.5.5	SELECCIÓN DE BANDAS PARA SECUENCIAR	104
8.5.6	COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS EN LA BASE DE DATOS NCBI (GENBANK)	106
8.5.6.1	<i>Leuconostoc</i> sp.	106
8.5.6.2	ENTEROBACTERIAS	109
8.5.6.2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	110
8.5.6.2.2	<i>Enterobacter</i> sp.	110
8.5.6.2.3	<i>Serratia marcescens</i>	111
8.5.6.3	<i>Arthrobacter</i> sp.	113
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	115
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	116
<b>11.</b>	<b>ANEXO I EQUIPO Y MATERIALES</b>	117
<b>12.</b>	<b>ANEXO II REACTIVOS</b>	120
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	124

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Se agradece al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca para Estudios de Posgrado.

Gracias a mi tutora y al Comité Tutor: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte, Dr. Francisco Javier Plasencia De La Parra y Dr. José Adelfo Escalante Lozada por su apoyo y por sus aportaciones.

Agradezco también a la Dra. Ma. Andrea Trejo Márquez de la FES Cuautitlán y al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos del Departamento de Salud Pública del Posgrado de Medicina por permitirme trabajar en sus instalaciones y por su apoyo en el proyecto.

Con mucho cariño agradezco el apoyo que me brindó la Dra. Gloria Ruíz, María Teresa Flores y todos mis compañeros del laboratorio 324, especialmente a David.

Gracias a mi familia por estar siempre conmigo y apoyarme en TODO .



## RESUMEN

El mango es muy valorado debido a los ingresos económicos que genera su exportación, por lo que es importante impulsar los productos agropecuarios, como lo es el mango Ataulfo, que además es la única variedad de origen mexicano. Si la competencia por los mercados siempre ha sido fuerte, la globalización la intensifica. La radiación gamma se ha propuesto como una tecnología segura para darle un valor agregado al alimento ya que reduce las enfermedades transmitidas por ellos. Actualmente, la irradiación gamma en el mango no contempla el control de patógenos; por lo que se requiere determinar el efecto de las dosis en el control de bacterias patógenas sin que éstas afecten la calidad del producto, así como conocer el efecto sobre la microbiota nativa después del tratamiento. Primero se caracterizó la cepa por métodos bioquímicos e inmunológicos, identificándola como *Escherichia coli* (*E. coli*) O102:H6 enteropatógena. Después se inocularon los mangos con esta cepa y se mandaron irradiar a 0, 0.5, 1 y 1.5 KGy; se almacenaron a temperatura ambiente y se realizó el análisis microbiológico por cuenta en placa. Se encontró que a mayor dosis de radiación gamma menor la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6. Y que el estado de madurez y la calidad del mango antes de ser irradiado fueron aspectos importantes para obtener mejores resultados. En el mismo lote se evaluó la calidad de los mangos donde se observó que la radiación gamma no tuvo un efecto negativo en los parámetros fisiológicos y fisicoquímicos evaluados. En otro lote se realizó el análisis sensorial por el método QDA®. La dosis de 0.5 y 1 KGy no afectaron el perfil sensorial del mango Ataulfo significativamente. Se escogió como dosis óptima la de 1 KGy ya que presentó la menor sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 sin afectar sensiblemente las propiedades fisiológicas, fisicoquímicas y sensoriales del mango Ataulfo. Se evaluó el efecto de la dosis de 1 KGy en la microbiota superficial del mango por el método 16S rRNA PCR-DGGE. Se observó un efecto directo (daño oxidante) y un efecto indirecto (interacciones interespecie), este último predominó sobre el estrés abiótico; por lo que el perfil de la comunidad bacteriana en el mango irradiado a las 72 h de almacenamiento fue similar al del control.

## 1. ABREVIATURAS

AC	Atmosferas controladas
AFF	Alianza por la alimentación y la agricultura (Alliance for Food and Farming)
AM	Atmosferas modificadas
APHIS	Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria (Animal and Plant Health Inspection Service)
C	Citosina
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades (Center for Disease Control Prevention)
CNP	Consejo Nacional de Producción
CIPF	Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
CNSNS	Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias
DBS	Ruptura doble de cadena (double strand break)
DGGE	Gel con gradiente desnaturalizante
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal
Dntp	Desoxirribonucleótido trifosfatado
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EMEX	Empacadoras de Mango de Exportación A.C.
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
EtOH	Etanol
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (Food and Agriculture Organization)
FAOSTAT	Base de datos estadísticos fundamentales de la FAO

FDA	Administración de medicamentos y alimentos de E.U.A. (Food and Drug Administration)
FoodNet	Programa Activo de Investigación de Enfermedades Transmitidas a Través de los Alimentos
G	Guanina
Gy	Gray
ICN	Instituto de Ciencias Nucleares
IAEA	Agencia Internacional de Energía Atómica (International Atomic Energy Agency)
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
IICA	Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
KGy	Kilo Grays
NAPPO	Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (North American Plant Protection Organization)
OECD	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (Organization for Economic Cooperation and Development)
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
OMS	Organización Mundial de Salud
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPQ	Protección de Plantas y Cuarentenas (Plant Protection and Quarantine)
PSA	Persulfato de amonio
RNA asa	Ribonucleasa

SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecil sulfato sódico
Senasica	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SINAIS	Sistema Nacional de Información en Salud
TAE	Amortiguador tris, ácido acético glacial, EDTA
TBE	Amortiguador tris, ácido bórico, EDTA
TE	Amortiguador tris, EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilenodiamina
TES	Amortiguador tris, EDTA, cloruro de sodio
TH	Tratamiento hidrotérmico
UFC	Unidades formadoras de colônia
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)

## 2. INTRODUCCIÓN

Las frutas tropicales son importantes para los países en desarrollo, tanto desde el punto de vista nutricional como en los ingresos que se obtienen con sus exportaciones. Sin embargo, la exportación hacia los principales mercados está obligada a cumplir con normas internacionales y estándares de seguridad y calidad alimentaria (FAO, 2009).

El mango es un fruto muy valorado debido a los ingresos económicos que genera su exportación. Es la variedad de fruta tropical que más se produce en todo el mundo, seguido por la piña, la papaya y el aguacate (FAO, 2009). Durante los primeros ocho meses de 2012, las exportaciones de mango alcanzaron los 215 millones de dólares (SAGARPA, 2012). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ubica a México con un valor de producción de mango estimado en 978 millones de dólares anuales (SAGARPA 2012).

Los principales productores de mango a nivel mundial son los países Asiáticos y México, siendo India el más importante. En 2002 India tuvo una participación del 44.6%, seguido por China con un 12.7%, México con un 6.4% y Tailandia con un 6.3% (Osuna-García et al, 2002). En el 2010 India siguió liderando con una participación del 42 %, pero México bajó al quinto lugar con el 4.2%. En cuanto a las exportaciones, México era hasta hace unos años el mayor exportador a nivel mundial; en el 2012 India lo desplazó y ahora es el segundo exportador mundial (SIAP, 2012) con envíos de alrededor de 270 mil toneladas (SAGARPA, 2010; SAGARPA, 2012). Sus exportaciones se destinan principalmente a los mercados de Estados Unidos, Canadá, Europa (Países Bajos, España y Reino Unido) y Japón. (SAGARPA-SIAP, 2008, SAGARPA, 2012).

El incremento de la demanda del mango fresco en los mercados europeos y estadounidenses, a partir de 1995, ha venido presionando a los países proveedores para que mejoren y estandaricen la calidad de las principales variedades, así como la regularidad del suministro.

En el mercado de los Estados Unidos de América (EUA), el cual es el mercado más importante para México donde se canaliza 80 % del volumen exportable (EMEX, 2011a), se observa que el precio de compra del mango año con año va teniendo una disminución. Del año 1993 al año 2002 se tuvo una pérdida del 34.1% del precio de

venta. Aún a pesar de ésta situación, México ha incrementado sus volúmenes de exportación en un 138% con respecto al año 1993 (SAGARPA, 2005). Del año 2008-2010, el precio del mango varió entre 1.8 a 3 pesos dependiendo la oferta y la demanda del mercado (EMEX, 2011a).

En los últimos años, países como Brasil, Ecuador, Perú, Guatemala y Nicaragua, entre otros, han estado desplazando a México en sus exportaciones, aún cuando nuestro país sigue conservando el liderazgo en cuanto al volumen en América Latina, estos países han tenido un despegue en sus precios de venta en comparación con el mango Mexicano. En promedio el mango Mexicano se cotiza un 40% menos que otros países. (USDA, 2003)

Las principales razones por las que se rechazaron productos que se querían importar a EUA en el 2010 fueron por mal uso de plaguicidas, etiquetado y por contaminación microbiana. La FDA ha podido ver un aumento en la contaminación microbiana, la cual es causada por agua de riego contaminada o por un mal manejo de las frutas y hortalizas frescas en el almacenamiento o empaque. Las principales bacterias encontradas por la FDA y por las cuales los productos hortofrutícolas son rechazados son *Salmonella*, *E. coli* (EMEX, 2011b).

En el momento de un rechazo de importación a Estados Unidos hay dos opciones:

1. Devolver el producto a su país de origen. Esto se presenta cuando el producto se encuentra en perfecto estado, pero no puede ingresar a los Estados Unidos por el etiquetado, empaque u otra razón que no comprometa la vida de quienes consumirían el producto. Al regresar el producto a su país de origen, la empresa puede venderlo en el mercado interno, o exportar a otros países.
2. Destruir el producto. Esta opción es utilizada cuando el producto está infectado por alguna bacteria o se encuentra en mal estado para su consumo. Cuando hay rechazos por salud pública, como por ejemplo por presencia de *E. coli*, se notifica a las entidades competentes del país de origen.

Cabe resaltar, que entre más riesgo tenga un producto de padecer de bacterias o efectos por mal uso de plaguicidas, habrá mayores inspecciones.

La inocuidad alimentaria se ha convertido en una prioridad, tanto para la salud pública, como para mantener la competitividad, posicionamiento y mayor acceso a los mercados nacional e internacional. Los consumidores de los países desarrollados con alto poder adquisitivo están dispuestos a pagar el costo de un régimen regulatorio que

garantice estándares más altos y exigen a sus gobiernos mayor vigilancia para garantizar el abasto de alimentos inocuos (Osuna-García et al, 2007).

El comercio del mango ha sido limitado por su naturaleza altamente perecedera. Es susceptible a enfermedades, a temperaturas extremas y daños físicos. La mayoría de las tecnologías postcosecha han sido diseñadas para el control de enfermedades del mango y la protección contra daño durante el empaque y el transporte. México exporta mangos tratados con agua caliente, método que se utiliza contra la mosca de la fruta, estimando una merma del 25% relacionado al uso de este procedimiento (NAPPO, 2008). Sin embargo, no se contempla el control de bacterias patógenas, las cuales causan gastos en el servicio de salud y cierre de fronteras; por lo tanto, causan pérdidas económicas muy importantes.

La radiación gamma se ha propuesto como una alternativa para dar al mango un valor agregado (interrumpe procesos que conducen a la descomposición y mata bacterias, aumentando su calidad). Aunado a esto, se conoce mucho acerca de la sobrevivencia de patógenos en el humano a partir de que se consumen; sin embargo, no se tiene información sobre las condiciones de sobrevivencia de estos en productos frescos. Se busca contribuir en el conocimiento sobre el comportamiento de patógenos y el efecto sobre la microbiota nativa en frutos, después de un tratamiento postcosecha. Por lo que es importante, entonces, observar los efectos que tiene la radiación gamma tanto en el patógeno como en la microbiota nativa del fruto.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 MANGO

Los mangos son los frutos del árbol también llamado mango, un árbol longevo de hoja perenne siempre verde que puede llegar a alcanzar los 20 metros de altura.

El fruto es una gran drupa carnosa, posee un mesocarpio comestible de diferente grosor según los cultivares y las condiciones de cultivo. Su peso varía desde 150 g hasta 2 kg. Su forma también es variable, pero generalmente es ovoide-oblonga. El color puede estar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta. La cáscara es gruesa, contiene un número importante de compuestos; como polifenoles, carotenoides, vitaminas, enzimas y fibra dietética; no debe comerse porque contiene una resina rica en mangiferina, ácido mangiférico y mangiferol que poseen propiedades irritantes para la piel. La carne es jugosa, dulce, fibrosa, con un profundo aroma y muy buen sabor (Vásquez-Valdivia *et al*, 2009).

##### 3.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MANGO

El Mango (*Mangifera indica* Linnaeus) pertenece a la familia de las anacardiáceas.

- Reino            Vegetal
- Clase            Angiospermae
- Subclase       Dicotyledonae
- Orden            Santalales
- Familia          Anacardiaceae
- Género          Mangifera
- Especie         *indica*

##### 3.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MANGO

**Tabla 1.** Composición química del mango Ataulfo en madurez comercial (Rodríguez y Romo, 2010)

Componente	Cantidad (%)
Humedad	83.83 ± 0.97
Carbohidratos	13.02 ± 1.02
Proteína	0.54 ± 0.34
Grasas	1.08 ± 0.49
Fibra Cruda	0.05 ± 0.04
Cenizas	0.47 ± 0.41



**Tabla 2.** Promedio de diferentes variedades: (FAO, 2013)

Mango, crudo					
Agua (g)	84.80	Ácidos grasos saturados (g)	0.06	Hierro (mg)	0.10
Proteínas (g)	0.50	Ácidos grasos monoinsaturados (g)	0.05	Fósforo (mg)	11.00
Grasas (g)	0.30	Ácidos grasos poliinsaturados (g)	0.01	Vitamina A (µg)	137.00
Cenizas (g)	0.30	Sodio (mg)	2.00	Tiamina (mg)	0.06
Carbohidratos totales (g)	14.10	Potasio (mg)	156.00	Rivoflavina (mg)	0.06
Vitamina C (g)	28.00	Calcio (mg)	10.00	Niacina (mg)	0.60

La composición del mango es diferente según la variedad, su estado de desarrollo y las condiciones de cultivo; pero todos ellos tienen en común su elevado contenido en agua (Tablas 1 y 2). Contiene una cantidad importante de hidratos de carbono por lo tanto, su valor calórico es elevado (Tablas y 2). Es rico en ácidos (málico, palmítico, p-cumárico y mirístico), flavonoides (quercetina, camferol), carotenoides (vitamina A), vitaminas del grupo B y en vitamina C (función antioxidante) (Tabla 2). El mango Ataulfo contiene también minerales como potasio [0.943 mg/Kg], calcio [0.176 mg/Kg], magnesio [0.07 mg/Kg], hierro [119.9 mg/Kg], zinc [5.7 mg/Kg], manganeso [38.5 mg/Kg], sodio [42.1 mg/Kg] y boro [8 mg/Kg] (Pérez-Barraza *et al*, 2007).

### 3.1.3 VARIEDADES DEL MANGO

Algunas de las variedades que produce México con calidad de exportación son Tommy Atkins, Haden, Kent, Keitt, Manila y Ataulfo (SIAP, 2012).

En los últimos años el mango Ataulfo ha incrementado su volumen de exportación. En el 2012, esta variedad tuvo la participación porcentual más alta en comparación con las otras variedades (SIAP, 2012). Entre las características más sobresalientes del mango Ataulfo que lo han posicionado en el mercado nacional e internacional, está su excelente calidad organoléptica, alto contenido de azúcares (gran palatabilidad para el consumidor), su gran vida de anaquel que le permite ser trasladado a mercados lejanos y su tolerancia a los tratamientos cuarentenarios contra la mosca de la fruta

que le permiten también expandir su mercado a países de Norteamérica e incluso a Europa.

Características: de color amarillo, forma alargado, longitud 12.5 - 14 cm, anchura 5.5–6 cm, peso 180 – 260 gr (SIAP, 2004). Susceptible a la antracnosis. Contiene muy poca fibra.

Los estados de Guerrero, Oaxaca, Colima, Sinaloa, Nayarit y Chiapas son los productores de mango Ataulfo más importantes en México. Nayarit figura como uno de los estados productores y exportadores más importantes de mango en México con más de 22,000 hectáreas (Pérez-Barraza *et al*, 2007), de las cuales más de 7,000 son cultivadas con mango Ataulfo, la única variedad de origen mexicano con calidad de exportación (Vázquez-Valdivia *et al*, 2009). En lo que respecta al cultivo de mango la variedad Ataulfo es la más importante en el estado de Chiapas.

#### **3.1.4 COSECHA**

La cosecha debe hacerse mediante el uso de escaleras y bolsas especiales de malla, con el fondo móvil para evitar que los frutos caigan al suelo al momento de cosecharlos, luego se colocan en cestas para ser llevados al sitio de selección y empaque. La caída de la fruta puede causarle magulladuras y posteriormente estropeamiento. Para el mercado nacional, los mangos deben ser cosechados cuando los frutos se encuentran cercanos a su madurez. Para el caso del mercado internacional los frutos se deberán cosechar en estado pintón (80% verdes), luego son llevados al centro de acopio donde serán clasificados, sometidos al tratamiento con agua caliente y posterior empaque. Los embarques con destino a emparadoras de exportación se deben movilizar en transportes protegidos con una malla sombra de propileno (60% de sombra) o enlonados. Los embarques deben tener las plataformas libres de hojarasca, ramas y desechos de fruta. Esta actividad es responsabilidad del transportista (NOM-075-FITO-1997).

#### **3.1.5 MADURACIÓN DE FRUTOS CLIMATÉRICOS**

La maduración de un fruto es un proceso de diferenciación bajo control genético, implicando la síntesis programada de enzimas específicas.

La madurez fisiológica de una fruta se alcanza cuando ha logrado un estado de desarrollo en el cual ésta puede continuar madurando normalmente aún después de

ser cosechada para llegar a la madurez de consumo. Si la cosecha se efectúa antes, la maduración se vuelve irregular.

La madurez de consumo es el estado fisiológico en el cual la fruta presenta las características físicas, químicas y sensoriales apropiadas para ser consumida.

Los frutos respiran para llevar a cabo la producción de energía, el carbono proviene de la oxidación de las reservas de almidón, azúcares solubles y otros metabolitos como ácidos orgánicos. Una vez cosechado, el producto no puede reemplazar estas reservas y la velocidad con la que disminuyen será un factor de gran importancia en la duración de la vida postcosecha del producto (Tabla 3).

Durante la maduración se producen cambios metabólicos intensos en donde los azúcares son los sustratos preferidos para la biosíntesis y suministro de energía pues son oxidados (vía glucólisis) hasta ácido pirúvico, el cual a su vez, por descarboxilación oxidante se convierte en Acetil-CoA que se metaboliza, vía ciclo de Krebs, dando lugar a la formación de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y energía (ATP, GTP) la cual queda disponible para la biosíntesis de azúcares, ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos, glucósidos, etc. Durante todo este proceso, el contenido de azúcares aumenta por hidrólisis del almidón, aunque algunos azúcares sean utilizados como sustratos para la actividad respiratoria.

**Tabla 3.** Principales cambios durante la maduración de los frutos. (Modificado de Primo-Yúfera, 1997)

Ácidos	Ácido cítrico Ácido málico (son sustratos gluconeogénicos)	Disminuyen con la maduración.
Polisacáridos	Almidón (carbohidrato de reserva) Pectinas (carbohidrato estructural)	Dan consistencia firme a los frutos. Se hidroliza durante la maduración.
Color	Clorofila Carotenoides	La clorofila se degrada en la maduración. Se inicia la biosíntesis de carotenoides.
Agua	Agua	Aumenta la transpiración, propicia la pérdida de peso.
Carbohidratos solubles	Fructosa, glucosa y sacarosa	Aumentan en la madurez

Todos estos procesos bioquímicos y fisiológicos son regulados por fitohormonas, en especial por el etileno. Las fitohormonas ejercen las reacciones primarias capaces de iniciar una serie de eventos moleculares que conducen a un efecto fisiológico medible como cambios de la expresión génica y modificación de procesos metabólicos. El etileno es la única hormona vegetal gaseosa; por lo tanto, ésta se puede mover rápidamente a través de los tejidos por difusión. La biosíntesis del etileno se inicia con la metionina que se asocia a la adenosina conformando la S-adenosilmetionina (AdoMet). El paso siguiente es la conversión de este intermediario en ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) el cual se desdobla en etileno con liberación de CO<sub>2</sub>. Las tres reacciones están gobernadas por las enzimas AdoMet-sintetasa para la síntesis de AdoMet; la ACC-sintasa para el ACC y la ACC-oxidasa para el etileno, siendo esta última una reacción aeróbica. Varios factores pueden acelerar o frenar estas interconversiones. La síntesis y actividad de la enzima ACC-sintasa es estimulada por factores abióticos como inundación, sequía y daño mecánico o durante algunas etapas de desarrollo como cierto grado de madurez de frutos. Aumentos de ACC, ACC-oxidasa y etileno se han observado en varios frutos un par de días después de su cosecha; sin embargo, las reacciones de síntesis también pueden ser incrementadas bajo algunas situaciones de estrés.

Los efectos más conocidos del etileno son a nivel de la maduración de frutos (Tabla 3). En breve también se denota un aumento global de la respiración con alta producción de CO<sub>2</sub>. Aunque este efecto es inicialmente lento, la producción de etileno se “retroalimenta”, es decir, los niveles endógenos auto-generan un mayor incremento de su síntesis rápidamente y en forma exponencial. El aumento explosivo del nivel de producción de etileno en algunas frutas se denomina climaterio. El fenómeno ocurre solamente en algunas especies. Entre los frutos climatéricos se puede citar a banana, manzana, tomate, paltas, kiwi, melón, pera, higo, durazno, nectarín y mango.

#### Mecanismos de acción

A nivel de la membrana del retículo endoplásmico está el receptor proteico del etileno denominado ETR1 de 79-kDa con dominio transmembranal en forma de dímero. El receptor ETR se dimeriza (por presencia de una proteína RAN citosólica mediante enlaces disulfuro y con fijación de un ión de Cu<sup>+2</sup>) interactúa con otra quinasa (CTR1) presente en el citosol y la activación de ésta inicia una cascada de MAP quinases que culmina con la desactivación de la proteína EIN2. Cuando el etileno es percibido, el receptor ETR se inactiva desacoplándose la interacción entre ETR y CTR1. La desactivación de la cascada de quinases resulta en la activación de la proteína EIN2 la

cual regula la activación de factores de transcripción EIN3 y EIL1, los que finalmente inducen la expresión de genes específicos de respuesta al etileno. Los genes blanco de EIN3/EIL1 son genes que también codifican para factores de transcripción. EIN3/EIL1 reconocen “elementos de respuesta primarios” (PERE) presentes en los promotores de genes ERBP. A su vez, los factores de transcripción EREBPs reconocen cajas GCC en genes de respuesta final a etileno. Un EREBP, ERF1, por ejemplo, está involucrado en regular genes de defensa de la planta (Jordán y Casaretto, 2006).

El proceso de maduración de una fruta se ha clasificado en tres etapas:

1. Preclimaterio o fruto inmaduro (E1 o estadio 1): este proceso ocurre en la planta, se empieza a desarrollar la fruta y todas las sustancias se acumulan en ella, la fruta está verde, su textura es fuerte, insípida y tiene una gran cantidad de ácidos orgánicos, almidones, enzimas y minerales.
2. Inicio del climaterio (E2 o estadio 2) y máximo climaterio o fruto maduro (E3 o estadio 3): cuando se cosecha aumenta la respiración y se presentan diferentes cambios en la fruta, se desarrollan sabores, olores característicos y pigmentos como los carotenos que darán coloraciones amarillas y rojas. La textura cambia, se vuelve más blanda, disminuye la cantidad de ácidos, los almidones comienzan a desdoblarse en azúcares lo que da un sabor más dulce a la fruta, llegando al punto donde ésta tiene las características para su consumo.
3. Postclimaterio o envejecimiento (E4 o estadio 4): todos los compuestos empiezan a degradarse, la respiración disminuye, los azúcares se desdoblan a alcoholes y dióxido de carbono y los tejidos se vuelven más blandos.

### 3.1.6 MICROBIOTA DEL MANGO

La microbiota del mango no se conoce con certeza, entre las bacterias que se han aislado del mango se encuentran:

- Coliformes: *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter agglomerans*, *Rahnella aquaris*. Predominan *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. (Guadarrama-Orozco, 2009)
- Enterobacterias: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, comúnmente se han detectados como responsables de brotes infecciosos (Perez-Jimenez, 2007; Ramírez-Villatoro, 2012).

- Bacterias ácido lácticas: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus viridescens* (Ramírez-Villatoro, 2012)

En estudios de Poubol e Izumi, 2005 se identificaron bacterias Gram negativas y el 60% eran de la familia *Enterobacteriaceae*.

Nuestro grupo de trabajo, encontró en mangos Manila *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus xylosum*, *Pantoea agglomerans* y *Corynebacterium xerosis*; en mangos Ataulfo se identificaron *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter aerogenus*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas stutzeri* (Guadarrama-Orozco, 2009).

Las fuentes de contaminación pueden ser por suelo, fecales, a través de la infiltración de aguas residuales en los campos, riego con agua contaminada, uso incorrecto de abonos y por la mala manipulación durante la cosecha, empaque, transporte, distribución o en el destino final. Algunas condiciones como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, pH, humedad y salinidad inadecuadas favorecen la multiplicación de estas bacterias.

Se ha demostrado que *Salmonella* y *E. coli* poseen sistemas de sobrevivencia a la acidez (inducidos por valores bajos de pH aproximadamente 3.65) (Guadarrama-Orozco, 2009) y *E. coli* puede sobrevivir en el jugo de mango con un pH de 3 (Hsin-Yi y Cheng-Chun, 2001, Hsin-Yi *et al*, 2002). *Salmonella* puede internalizarse en el mango durante la aplicación de los tratamientos hidrotérmicos (Penteado *et al*, 2004) y se ha visto que *Escherichia coli* O157 puede internalizarse en manzanas (Aruscavage *et al*, 2006) a través de heridas. *Escherichia coli* tiene la capacidad de formar biopelículas (comunidades bacterianas altamente especializadas y encapsuladas en una matriz de exopolisacáridos), que les confiere resistencia a agentes químicos como el cloro, los desinfectantes y los antibióticos, entre otros (Vélez *et al*, 2001) y donde puede ocurrir transferencia de material genético entre diferentes bacterias (Aruscavage *et al*, 2006). Además de que con los métodos postcosecha, se puede reducir la microbiota natural del mango y los patógenos como *E. coli* pueden crecer y ocasionar brotes.

### 3.1.6.1 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, su pH óptimo es de 6-7, mesófilo, se le considera un microorganismo de la microbiota normal del hombre, pero hay cepas que pueden ser patógenas. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen se clasifican por los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). El antígeno O es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual se asocia a un cuadro clínico en particular (Tabla 4).

**Tabla 4.** Características de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea. (Rodríguez-Ángeles, 2002)

Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes
<b>ETEC</b>	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20
<b>EHEC</b>	SUH, CH, diarrea con sangre, dolor, fiebre,	Niños y adultos	O157:H7 O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145
<b>EIEC</b>	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa.	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H
<b>EPEC</b>	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja.	Niños menores de 6 meses hasta 2 años.	O55, O86, O142, O111:H- O127, O102:H6
<b>EAEC</b>	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días.	Recién nacidos y niños menores de 2 años.	O44:H18
<b>DAEC</b>	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27

### 3.1.7 PLAGAS DEL MANGO (Briseño-Contreras y Vargas-Solano, 2008; Rodríguez-Ramírez y Romo-Escartín 2010)

- La mosca de la fruta: Las hembras depositan los huevos en la pulpa del fruto dando lugar a la maduración prematura del fruto originando su pudrición. La mosca mexicana de la fruta es perteneciente a la especie del género *Anastrepha*; es la principal plaga del mango.

- Aserrador del mango: (*Trachysomus* sp.) coleóptero que se alimenta de la madera muerta. Para ello corta las ramas circularmente, lo que impide que circule la savia. Luego pone las larvas en la rama afectada que termina por pudrirse.
- Escama blanca del mango: (*Aulacaspis tubercularis*) insectos que chupan la savia de la planta.
- Pulgón negro: (*Aphis craccivora* Koch.) las ninfas de estos insectos se comen los frutos en su estadio inicial.
- Coccidios: los insectos de esta familia que atacan al mango son numerosos, como la cochinilla del mango, de escudo, blanca, púrpura circular, marrón blanda, la cochinilla de la tizne, el piojo rojo, etc. Sus daños se producen tanto en el tronco como en hojas y frutos; además originan una melaza sobre las partes afectadas que favorece el ataque de diversos hongos. Los frutos pueden sufrir decoloraciones que impiden su exportación.

### **3.1.8 ENFERMEDADES DEL MANGO** (Briseño-Contreras y Vargas-Solano, 2008; Rodríguez-Ramírez y Romo-Escartín 2010)

- Antracnosis: (hongo *Colletotrichum gloesporioides* Penz) es la que aparece con más frecuencia. Ataca a todas las partes visibles de la planta produciendo manchas marrones en las hojas que se convierten en agujeros por destrucción del tejido, caída de las flores o del fruto. Esta enfermedad requiere tratamiento con fungicidas.
- Mildiu polvoriento: (*Oidium mangiferae*) su síntoma es un micelio polvoriento que cubre las hojas, frutos y flores. Puede producirse el cuarteado de la piel de los frutos y la caída de los más pequeños.
- Roña: (*Elsinoe mangifera*) Produce grietas en los frutos que terminan pudriéndose.
- Mancha negra: causada por el hongo *Alternaria alternata*. Los síntomas en los frutos se desarrollan tras la cosecha, al comienzo de la maduración, con la aparición de pequeñas manchas circulares. A continuación estas manchas se agrandan y dan lugar a una mancha única que llega a cubrir la mitad del fruto. La enfermedad avanza y las manchas penetran en la pulpa que se oscurece y ablanda.
- Mancha negra bacteriana: afecta a todos los órganos aéreos. Está causada por la bacteria *Xanthomonas campestris*. El síntoma típico de esta enfermedad se manifiesta en el tronco del mango por la aparición de chancros negros longitudinales con exudados de resina, aunque también aparecen síntomas en



hojas viejas y frutos. Tratamientos: la instalación de cortavientos y la poda sistemática de los brotes infectados disminuye la propagación de la enfermedad. El empleo de aspersiones cúpricas combate de manera eficaz esta enfermedad.

- Pudrición del pedúnculo: Es una enfermedad que puede ser ocasionada por un complejo de hongos, entre los que se encuentran *Lasiodiplodia* sp., *Dothiorella* sp., *Citosphaera mangiferae* y *Pestalotiopsis* sp. Los síntomas dependen del hongo involucrado, sin embargo, la lesión se ubica principalmente en el pedúnculo. Los síntomas incluyen áreas difusas de aspecto húmedo que crecen a partir del pedúnculo en proyecciones en forma de dedo, las que rápidamente se tornan a un color oscuro. Es común que la epidermis afectada se rompa y un líquido de color café fluya del pedúnculo o de las heridas abiertas.

### **3.1.9 TRATAMIENTOS APLICADOS PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE LAS FRUTAS**

#### **- Tratamiento hidrotérmico (TH)**

Como se mencionó anteriormente, todos los mangos destinados a la exportación a E.U.A. deben recibir inmediatamente después de la cosecha un tratamiento hidrotérmico, el cual consiste en inmersión en agua caliente para eliminar posibles infestaciones de moscas de la fruta (Senasica, 2012f). Una vez concluido el tratamiento con agua caliente, se saca del tanque y se transporta la canasta al área de cuarentena, en donde la canasta estará en espera de 30 minutos para posteriormente introducirla en el tanque de agua a una temperatura no menor de 21°C para evitar que la fruta se deshidrate.

#### **- Químicos**

De acuerdo con la NOM-075-FITO-1997, el tratamiento de fumigación para mango debe realizarse en cámaras de fumigación, con bromuro de metilo (100% puro), con dosificación de 40 g/m<sup>3</sup> durante 2 h de exposición a presión atmosférica normal y con media hora de ventilación.

Los plaguicidas incluyen al carbendazim, procloraz, ditiocarbamatos, imazilil, tiabendazol y benomilo como tratamiento postcosecha.

La vainillina puede ser un conservante práctico para el procesamiento de mangos frescos recién cortados. La actividad antimicrobiana de la vainillina en contra de cuatro bacterias (*Pantoea agglomerans*, *Aeromonas enteropelogenes*, *Micrococcus lylae*, y

*Sphingobacterium spiritovorun*), cuatro hongos (*Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y *Fusarium* sp.), y levaduras aisladas de rebanadas frescas de mango deteriorado fue evaluado por Manatchaya y colaboradores (2006). Todas las especies de prueba fueron sensibles a sus efectos antimicrobianos.

El ácido salicílico aumenta la resistencia de enfermedades en el mango. Zeng y colaboradores (2006) demostraron que las actividades de  $\beta$ -1,3-glucanasa y la fenilalanina amonio-liasa (PAL) (enzimas de defensa) en el mango fueron significativamente mayores con su uso.

#### -Vapor caliente

El vapor de agua saturado a alta temperatura se hace circular alrededor del producto hasta que éste alcanza la misma temperatura que el vapor, después el producto se mantiene a esa temperatura por un tiempo. La utilización de tratamientos térmicos para el control de insectos comenzó a realizarse a comienzos del siglo XX (Baker, 1952). Este autor encontró que huevos y larvas de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* morían luego de 8 h a 43°C. En el caso del mango manila, recibe un tratamiento de 6 h a 43.3°C (Jacobi *et al*, 2001).

#### - Controles biológicos y reguladores del crecimiento

El control biológico se basa en organismos antagonistas como herramienta complementaria a los tratamientos químicos y/o por calor. En cítricos se utiliza *Pseudomonas syringae* y *Candida oleophila*, su método de aplicación es por inmersión o rociado para contrarrestar patógenos de podredumbre. Liao (2009) identificó a *Pseudomonas fluorescens* 2-7 como una bacteria antagonista beneficiosa para la utilización en prácticas de seguridad alimentaria contra patógenos tales como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

Los reguladores de crecimiento como el ácido giberélico se usan para retrasar la senescencia en cítricos y consecuentemente retrasar su susceptibilidad a las pudriciones (FAO, 2003).

#### - Refrigeración (Slaughter, 2009)

Reduce la tasa de maduración, pero los productores deben evitar las lesiones por congelamiento. La mayoría de las variedades de mango deben almacenarse a temperaturas de enfriamiento no menores de 50-55°F (10-13°C) para evitar lesiones.

Los mangos verdes-maduros o mangos a punto de madurar se pueden mantener a 10-15°C por algunos días, sin presentar daño por frío, en cámaras de atmósfera controlada.

- Atmosferas modificadas (AM) o controladas (AC)

Los tratamientos de AM o AC consisten en una alteración de la composición del gas atmosférico normal. Una atmósfera controlada ideal para mangos verdes-maduros y mangos a punto de madurar sería 4% de oxígeno (con nitrógeno para balance de la atmosfera), una temperatura de 15 °C (59 °F) y la humedad del aire entre 90 a 95% para evitar la deshidratación de la fruta (Slaughter, 2009).

- Ozono

El ozono es amigable con el ambiente, y la FDA lo ha clasificado como seguro. El ozono ataca los enlaces olefínicos de los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana celular de las bacterias, lo que da lugar a la formación de un ozónido ( $O_3^-$ ), el cual tiene un alto potencial de oxidación; es inestable, y ejerce su propia acción de desinfección atacando e interrumpiendo la actividad enzimática de las bacterias actuando sobre los grupos sulfhidrilo o aldehídos en ciertas enzimas. La muerte bacteriana puede estar dada directamente por los cambios en la permeabilidad celular. El ozono también actúa sobre el material nuclear oxidando ácidos nucleicos (Beutelspacher-Santiago y Calderón-Ancona, 2005).

- Radiación ultravioleta UV-C

El tratamiento con UV-C induce la acumulación de poliaminas, las cuales pueden actuar como antioxidantes causando una reducción de los síntomas de daño por frío y del deterioro de los frutos, retardando la maduración y por lo tanto la senescencia. (González-Aguilar *et al.*, 2004). La irradiación UV-C tiene un pico de emisión a 254 nm, el cual presenta la mayor acción germicida.

- Radiación gamma

En México ha sido aprobada la radiación gamma como un tratamiento cuarentenario para exportación de frutas y es aceptado por organismos internacionales como la FAO, la OMS y el OIEA. La radiación gamma es un método que tiene efecto antimicrobiano aún cuando los microorganismos formen biopelículas (Niemira y Solomon, 2004).

### 3.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs)

De las enfermedades transmitidas por alimentos, el 21.9% de los brotes está relacionado por productos frescos (AFF, 2010). Los productos frescos son el segundo vehículo más común relacionado con brotes en los Estados Unidos en el periodo de 1990-2001 (CSPI, 2005). Ya que el mercado de Estados Unidos es el más importante para la exportación de mango en México; la presencia de un brote en este país debido al mango mexicano tendría un impacto importante en la economía.

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETAs. Incluyen infecciones causadas por bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersenia enterocolitica* y *Vibrio* (CDC, 2008). Se estima que ocurren 76 millones de casos de ETAs cada año en los Estados Unidos. La gran mayoría de estos casos son leves y causan síntomas por uno o dos días. Otros casos son más graves, y el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estima que hay 325 000 hospitalizaciones y 5 000 muertes relacionadas con las ETAs cada año. En México, las enfermedades infecciosas intestinales se encuentran entre las primeras 20 causas de mortalidad general (SINAIS, 2005).

Las ETAs constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la microbiota normal de aves, cerdos y ganado (Flores-González y Herrera-Rojas, 2005)

El reporte de investigación del Programa Activo de Investigación de Enfermedades Transmitidas a Través de los Alimentos (FoodNet, por sus siglas en inglés) del 2008, identifica a *Salmonella* como la infección bacteriana más comúnmente reportada.

En cuanto a *E. coli*, hay cerca de 70,000 infecciones con *E. coli* O157 cada año en los Estados Unidos y se cree que un igual número de personas tienen diarrea causada por otras cepas de *E. coli*. (CDC, 2008)

Nuestro grupo de trabajo ha detectado tanto *Salmonella* como serotipos de *Escherichia coli* en los mangos nacionales y en los destinados a exportación.

En 1998 hubo un brote de *S. oranienburg* en el estado de Washington causado por el consumo de mangos (FDA, 2003). En enero de 2000, las autoridades de Virginia, E.U.A., reportaron un brote epidemiológico debido al consumo de mangos provenientes de Brasil, la infección fue debida a *Salmonella enterica* serotipo Newport y tuvo como fuente de contaminación la etapa de enfriamiento, además de deficientes prácticas sanitarias de la empacadora. En 2001 otro brote en los E.U.A. ocurrió por *S. enterica* serotipo Saintpaul asociada al consumo de mango proveniente de Perú (Beatty *et al*, 2004)

### 3.2.1 IMPACTO ECONÓMICO MUNDIAL DE LAS ETAs

Las ETAs causan un aumento en los costos de servicios de salud, disminución de la productividad, cierre temporal o definitivo de establecimientos y de fronteras.

A continuación se mencionan algunos productos hortofrutícolas asociados con brotes de patógenos (FDA, 2003):

- 1990: *Salmonella poona*, melón cantaloupe
- 1994: *Cryptosporidium*, jugo de manzana sin pasteurizar
- 1995: *E. coli* O157:H7, germinados de rábano
- 1996: *E. coli* O157:H7, jugo de manzana sin pasteurizar.
- 1996: *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, germinados de alfalfa.
- 1996: *Cyclospora*, frambuesa.
- 1997: Hepatitis A, fresa
- 1999: *Shigella*, perejil.
- 2000: *Salmonella poona*, melón cantaloupe
- 2001: *S. agona*, melón cantaloupe
- 2002: *S. poona*, melón cantaloupe
- 2003: *E. coli* O157:H7, ensaladas, Hepatitis A, cebollín.

En 1997 fueron reportados 153 casos de hepatitis "A" en Michigan, E.U.A. y se culpó a la fresa mexicana de Baja California, nunca se pudo identificar la fuente de contaminación, la FDA alegó que era posible que los jornaleros cosecharan el fruto en condiciones no sanitarias; ya que encontraron letrinas en malas condiciones y deficiencias en el lavado de manos. La fresa no ha podido recuperar su mercado

nacional incluso. El caso del cebollín en el 2003, hubo diversos brotes de hepatitis “A” en E.U.A. que involucraron al menos 635 casos de enfermedad y tres muertes; con sólo visitas a los campos de cultivo se aplicó a cuatro empresas mexicanas la “Detención sin Evidencia Física”, en la que se impide el ingreso del producto a la Unión Americana. Nunca se demostró la contaminación. En el 2002 hubo varios brotes de salmonelosis en E.U.A. y Canadá por el melón cantaloupe; aunque el gobierno americano señaló a dos empresas como sospechosas, se impuso “Detención sin Evidencia Física” a todo el melón mexicano. Debido a esto en 2003, se dejó de percibir 170 millones de dólares; se considera la peor catástrofe del campo mexicano.

Recientemente, el mango fresco de origen mexicano, ha sido señalado por la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos de Canadá (CFIA por sus siglas en inglés), por la supuesta contaminación con *Salmonella entérica* serovar Braenderup, teniendo como resultado la emisión de una alerta publicada en su portal electrónico el pasado 24 de agosto de 2012. Derivado del consumo de este fruto presuntamente contaminado, se reportaron varios enfermos, por lo que la autoridad hizo un llamado a los consumidores para contactar al minorista e identificar los mangos afectados. La FDA también emitió una alerta a la Agrícola Daniella en Sinaloa, para negar el acceso de sus mangos a los E.U.A., a menos que demuestren que no están contaminados por *Salmonella* (FDA, 2012).

Lo anterior, ha generado preocupación en el sector exportador de este fruto, con la consecuente reacción por parte de la autoridad para desarrollar un “Plan de Acción” y fortalecer Sistemas de Reducción de Riesgos y Contaminación en la producción del mango (Senasica, 2012a). El objetivo de este Plan de Acción es la difusión, implementación y vigilancia de medidas preventivas de contaminación microbiológica durante la producción, cosecha, empaquetado, transporte y almacenamiento de frutos de mango. Esto solo se aplicará a empresas que exportan mango fresco a Canadá.

Pasos:

- Capacitación en la aplicación de los “Requisitos técnicos para reducir los riesgos de contaminación microbiológica durante la producción de mango”
- Identificar posibles fuentes de contaminación microbiológica.
- Realizar un monitoreo interno de *Salmonella* spp. y *E. coli*.
- Auditoría interna por personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal.
- Plan de muestreo previo a su envío realizado por Senasica.

“Requisitos técnicos para reducir los riesgos de contaminación microbiológica durante la producción de mango” (Senasica, 2012b, Senasica, 2012c, Senasica, 2012d, Senasica, 2012e)

1. Uso de desinfectantes con cloro sin exceder los límites máximos permisibles (cloruros: 250 mg/L, cloro residual: 0.2-1.5 mg/L)
2. Limpieza y desinfección de superficies de contacto no vivas (cajas de campo, contenedores de fruta, herramientas de corte, guantes, paredes de depósito de agua). Demostrar ausencia de coliformes fecales, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*.
3. Limpieza y desinfección de manos de trabajadores. Demostrar ausencia de coliformes fecales, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. El personal debe cumplir con la NOM-120-SSA1-1994.
4. Higiene de instalaciones, materiales, equipo agrícola y unidades de transporte.
5. Uso de agua potable de acuerdo con la NOM-127-SSA1-1994.
6. Demostrar la ausencia de organismos patógenos *Salmonella spp.* y *E. coli* en frutos cosechados.
7. Implementar barreras físicas de protección que prevengan el ingreso de animales domésticos o silvestres a los árboles de mango.
8. Asegurar que la materia fecal de estaciones sanitarias y fosas sépticas no entre en contacto con el mango.
9. Control de plagas durante la cosecha de acuerdo con la NOM-120-SSA1-1994.
10. En el tratamiento hidrotérmico se debe aplicar al agua un desinfectante y establecer un sistema de monitoreo que cumpla con lo establecido en la NOM-075-FITO-1997. Se debe aplicar a una temperatura constante de 46.1°C en la forma siguiente:

Variedades	Peso	Tiempo de exposición
Redondas	700 g o menos	90 minutos
	500 g o menos	75 minutos
Alargadas	570 g o menos	75 minutos
	375 g o menos	65 minutos

### 3.2.2 ECOLOGÍA MICROBIANA

El continuo aumento en el número de ETAs vinculadas a los productos frescos (frutas y hortalizas) desafía la noción de que los patógenos entéricos se definen sólo por su habilidad de colonizar el intestino. Existe evidencia científica de que la colonización de bacterias patógenas en productos frescos está vinculada con el aumento en la

incidencia de las ETAs (Brandl, 2006). Antes se creía que los brotes epidemiológicos ocasionados por productos frescos se debían por una contaminación cruzada con alimentos de origen animal contaminado; sin embargo, estudios de vigilancia hechos por la FDA y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (FDA, 2001; US Department of Agriculture, 2004) han detectado patógenos entéricos en productos frescos antes de que lleguen al consumidor, por lo que, es posible, una contaminación de estos en la precosecha o durante su procesamiento. El aumento de las ETAs podría indicar un papel mucho más importante de las plantas como un segundo hábitat de las bacterias patógenas, donde estos pueden encontrar microambientes con condiciones favorables para su sobrevivencia y crecimiento (Brandl, 2006; Critzer y Doyle, 2010).

Los patógenos tienen que competir con microbiota muy bien adaptada a la planta. Las interacciones del patógeno con la microbiota residente podrían beneficiar o perjudicar su crecimiento (Critzer y Doyle, 2010). Estudios moleculares indican que los microorganismos patógenos podrían utilizar los mismos mecanismos de adherencia que utilizan en el hospedero, para adherirse a plantas. *Escherichia coli*, (enterohemorrágica, enteropatógena, enterotoxigénica y uropatógena), *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp. utilizan fimbrias, pili y lipopolisacáridos para adherirse a tejidos de plantas (Sapers *et al*, 2005).

La ecología microbiana estudia las interacciones entre los microorganismos y entre los microorganismos y su medio ambiente. Estas interacciones podrían ser un factor importante en la persistencia que tienen algunos patógenos en los cultivos y en su potencial para causar enfermedades a través de los productos frescos; así como en su adaptación al hábitat de la planta (evolución) (Brandl, 2006).

Algunos de los problemas relacionados con la inocuidad en el mango se pueden asociar directamente con los tratamientos térmicos postcosecha aplicados al fruto para extender la vida de anaquel. Estos tienen la finalidad de evitar la incidencia de plagas y enfermedades del mango. Sin embargo, estos tratamientos pueden destruir o reducir la microbiota natural del mango, rompiendo el equilibrio dinámico entre los microorganismos. Al reducir la microbiota de competencia podría permitir el crecimiento de algún patógeno que antes estaba restringido. Por ejemplo; patógenos como *S. enterica* serotipo Newport y *E. coli* O157:H7 son capaces de moverse sobre y dentro de la planta *A. thaliana* en ausencia de microbiota de competencia. La



supervivencia de estos agentes patógenos se reduce en presencia de *Enterobacter asburiae* presente en el suelo (Cooley *et al*, 2003).

A pesar de que se necesita una dosis específica de un patógeno para ocasionar una infección en el ser humano, está la paradoja que en los productos frescos hay un número relativamente bajo de bacterias patógenas y aún así producen un brote (Isaacs *et al*, 2005, Vibha *et al*, 2006). La razón, se cree, es porque el ambiente de la planta afecta la fisiología de las bacterias patógenas (Critzler y Doyle, 2010). Por ejemplo, las bacterias patógenas se podrían adaptar a condiciones ácidas ya sea por las características del alimento o por alguna infección de éste (Bhagwat, 2006), evitando la primera barrera que tienen los humanos contra la infección (el pH bajo del estómago). También la exposición de los patógenos a péptidos antimicrobianos de las plantas y de otras bacterias podrían conferirles resistencia y aumentar la virulencia de estos (Parra-López *et al*, 1993).

Conocer y entender los factores que afectan el crecimiento de los microorganismos es importante para entender su ciclo de vida y así poder utilizar estos factores en la industria productora de alimentos y prevenir las ETAs.

### **3.3 RADIACIÓN**

La radiación es la propagación de energía en forma de ondas electromagnéticas (llamada radiación electromagnética) o partículas subatómicas (llamada radiación corpuscular).

Si esta propagación de energía es suficiente para ionizar el medio que atraviesa, se le denomina radiación ionizante (rayos X, rayos  $\gamma$ , partículas  $\alpha$ , partículas  $\beta$ ); si la energía no es suficiente para provocar la ionización se le denomina radiación no ionizante (rayos UV, ondas de radio). Esta característica es independiente de su naturaleza ondulatoria o corpuscular.

#### **3.3.1 RADIACIÓN GAMMA**

La radiación gamma son fotones muy energéticos y por lo tanto penetrantes. Se originan en las desintegraciones nucleares cuando el núcleo se desprende de la energía que le sobra para pasar de un estado de alta energía a otro estado de energía más baja. Este tipo de emisión acompaña a las radiaciones alfa y beta (Bushong, 1999).

##### **3.3.1.1 FUENTES DE RADIACIÓN GAMMA**

Existen dos fuentes de radiación gamma aprobadas para su uso en alimentos y son Cobalto 60 (Co-60) y Cesio 137 (Cs-137) (FDA, 2011). De estos, el cobalto 60 es el que genera rayos gamma de mayor energía durante su transformación al estado estable de níquel 60. Libera fotones con dos niveles de energía de 1.17 y 1.33 MeV con una longitud de onda entre  $10^{-11}$  y  $10^{-13}$  m (Ruíz-Hernández y Ruíz-Montiel, 2001). Se lo obtiene a partir del Cobalto en su estado natural, llamado Cobalto 59, cuando es expuesto a un flujo de alta velocidad de neutrones.

##### **3.3.1.2 DOSIS DE RADIACIÓN GAMMA ABSORBIDA**

La dosis absorbida es la parte de la energía que es absorbida por la materia (el alimento) cuando inciden sobre ella los rayos gamma, se mide en Gray (Gy) o en Kilo Grays (kGy). 1Gy es igual a la absorción de 1 J/kg. La dosis que cada producto absorbe se calcula por la tasa de dosis y el tiempo que la muestra está expuesta a la radiación (Ruíz-Hernández y Ruíz-Montiel, 2001). La tasa de dosis, es la radiación emitida por la fuente radiactiva por unidad de tiempo, se mide en Gray/hora (Gy/h).

Para irradiar un producto a una dosis determinada, se utiliza la tasa de dosis para calcular cuánto tiempo de exposición es necesario para lograr la dosis absorbida requerida.

### **3.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES IONIZANTES**

#### **3.3.2.1 IONIZACIÓN**

El proceso por el que un átomo o una molécula neutros se llegan a cargar, se denomina ionización, y a la entidad resultante se la conoce como ion. Así que el ion se forma por pérdida o captura de un electrón, esto hace que tenga un electrón desapareado y sea en esencia un radical libre (Molins, 2003). Los radicales libres son átomos o moléculas muy reactivos ya que el electrón desapareado o libre les permite sustraer electrones de moléculas estables para alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha sustraído un electrón, la molécula estable que se lo cedió se convierte en un radical libre por tener un electrón desapareado y se inicia así una reacción en cadena (López-Gazcón, 2005).

#### **3.3.2.2 EFECTO DIRECTO E INDIRECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA**

Los cambios químicos inducidos por la radiación gamma pueden ser por efecto directo o por efecto indirecto. El efecto directo se basa en el impacto de la radiación con el sustrato. El proceso más importante mediante el cual los rayos gamma interactúan con la materia, es denominado "dispersión Compton". En este proceso, el fotón transfiere parte de su energía a un electrón que es expulsado del átomo. El resultado es un fotón de baja energía que continúa en una dirección diferente y puede, a su vez, tomar parte en fenómenos Compton posteriores. El electrón expulsado lleva una porción sustancial de la energía del fotón incidente, y transferirá su energía al medio en una serie de interacciones con los átomos y moléculas, causando más ionizaciones. Los efectos directos no son específicos y pueden golpear cualquier molécula que se esté en el camino, sin preferencia específica para un átomo o grupo de átomos (Molins, 2003).

El efecto indirecto se debe a la interacción del haz de radiación con otros átomos y moléculas de la célula como el agua, produciendo radicales libres que al difundir interactúan con moléculas orgánicas (Ruíz-Hernández y Ruíz-Montiel, 2001).

### **3.3.2.3 RADIÓLISIS DEL AGUA**

En el mango, el agua representa alrededor del 84%, en consecuencia, la radiólisis del agua es de principal importancia. La ionización de la molécula de agua provocada por el fotón, genera el ion  $\text{HOH}^+$  más un electrón que es solvatado (electrón acuoso), la inestabilidad del ion conduce a  $\text{H}^+$  más el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), radical muy reactivo. El electrón acuoso reacciona con otra molécula de agua para formar el ion  $\text{HOH}^-$ , cuya inestabilidad genera al radical  $\text{H}^\bullet$  y al hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) (Bushong, 1999). Entre estos, el radical hidroxilo y el electrón acuoso son los que se producen en mayor cantidad. El radical hidroxilo se puede añadir a los compuestos aromáticos u olefínicos y sustraer átomos de hidrógeno de los enlaces C-H, mientras que el electrón acuoso puede atacar a compuestos aromáticos, ácidos carboxílicos, cetonas, aldehídos, iminas y tioles (Molins, 2003).

La ionización (provocada principalmente por la radiólisis del agua) que producen los rayos gamma daña carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Esto interrumpe los procesos que conducen a la descomposición de las sustancias orgánicas y mata bacterias rompiendo las cadenas del material genético, de manera tal que la división de las bacterias no tenga lugar. A su vez, las levaduras y hongos son destruidos y los parásitos, insectos o sus huevos y larvas son inactivados.

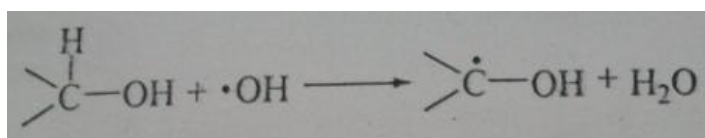
### **3.3.2.4 DAÑO A MOLÉCULAS ORGÁNICAS**

Es importante señalar que los daños a carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que se mencionan a continuación, son el resultado de irradiar soluciones puras; por lo tanto, se debe tener cuidado al extrapolar los resultados a una matriz multicomponente tal como lo es un alimento, donde los componentes constituyentes ejercen un cierto grado de protección mutua (Molins, 2003).

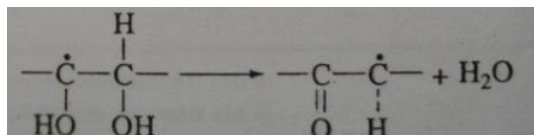
#### **3.3.2.4.1 DAÑO A HIDRATOS DE CARBONO**

El radical hidroxilo actúa sustrayendo un átomo de hidrógeno sujeto a un átomo de carbono (Reacción 1). Las reacciones que le siguen a este evento, pueden ser una deshidratación (Reacción 2), una oxidación del grupo alcohol a cetona (Reacción 3) o una dimerización (Reacción 4) donde dos átomos de carbono con electrones desapareados de diferentes hidratos de carbono, pueden unirse. La irradiación de los

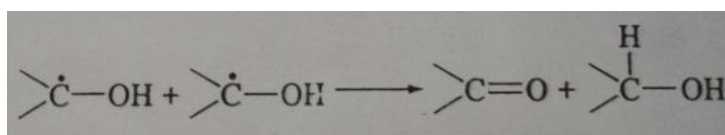
azúcares da como resultado la formación de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y una caída del pH (Molins, 2003).



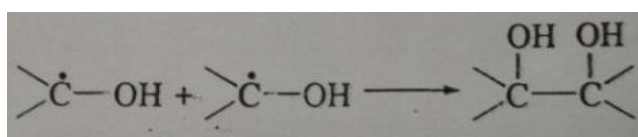
(1)



(2)



(3)



(4)

#### 3.3.2.4.2 DAÑO A PROTEÍNAS

El daño oxidante a proteínas es diverso, incluye la carbonilación de ciertos aminoácidos (prolina, arginina, lisina y treonina), la oxidación de grupos sulfhidrilos en metionina y cisteína, la introducción de grupos hidroxilos en fenilalanina y tirosina, la ruptura del anillo de triptófano, la escisión del enlace peptídico, la desaminación de la histidina y la formación de dímeros de tirosina (Slade y Rodman, 2011). La radiación gamma puede provocar el desdoblamiento, la agregación o la degradación de las proteínas al alterar las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de éstas. En el caso de un alimento, la radiosensibilidad intrínseca de las enzimas se puede reducir con la presencia de sustancias protectoras en el alimento como el ácido ascórbico (Molins, 2003).

#### 3.3.2.4.3 DAÑO A LÍPIDOS

Los lípidos en un alimento, son principalmente triglicéridos. La radiación de lípidos conduce a radicales catiónicos donde la carga positiva puede migrar al grupo carboxilo o a los dobles enlaces. Esto provoca que se rompan enlaces cercanos a los grupos carbonilo dando como resultado un radical libre que puede aceptar o perder átomo de hidrógeno para dar compuestos C<sub>n-1</sub> saturados (alcanos) o insaturados (alquenos), respectivamente. También se producen aldehídos y ésteres (Molins, 2003).

#### 3.3.2.4.4 DAÑO A ÁCIDOS NUCLEICOS

La radiación produce distintos tipos de lesiones en el DNA entre las que destacan (Almeida *et al*, 2004):

- Ruptura simple de cadena (SSB por sus siglas en inglés): se rompe el enlace fosfodiéster.
- Ruptura doble de cadena (DSB por sus siglas en inglés): Es una lesión compleja que se produce como consecuencia de la ruptura de las dos hebras del DNA en sitios muy próximos.
- Lesión en las bases nitrogenadas: Consiste en la pérdida de una o más bases (se rompe el enlace glucosídico). La modificación química de alguna de ellas, ya que pueden sufrir hidroxilación con formación de hidroperóxidos en presencia de oxígeno, como la guanina y generar la 8-oxo-guanina (causa transversiones GC-TA). Y la ligadura entre dos bases contiguas (dímeros de timina o citosina).
- Daño múltiple localizado: Combina una o más rupturas dobles de cadena, con un número variable de rupturas simples de cadena, lesiones de bases y azúcares difíciles de reparar y que conducen a la muerte celular.
- Alteración de los azúcares: pueden ser oxidados y después hidrolizados con liberación de la base.
- Modificaciones estructurales del DNA: se pueden producir entrecruzamientos de las cadenas de DNA o la unión de una cadena a una proteína. La alteración en la forma de la molécula es el origen de anomalías en la replicación y en la transcripción.

Existen diferentes mecanismos para la reparación de las lesiones en el DNA en bacterias; en el caso de lesiones causadas por la radiación gamma se activa el sistema de reparación SOS. Es el último recurso de la célula para asegurar su supervivencia frente a una lesión que no ha podido ser resuelta. Es un regulón integrado por más de 40 genes implicados en la reparación al DNA que se encuentran reprimidos por la proteína LexA y activados por RecA. Este sistema responde a lesiones en el DNA, a una parada en el proceso de replicación y a la acumulación de DNA de cadena sencilla (Jara-Ramírez, 2005).

Acción de algunos genes SOS (Jara-Ramírez, 2005).

- La reparación por escisión que se ve incrementada por el aumento de producción de Uvr D helicasa y de las subunidades UvrA y UvrB de la endonucleasa UvrABC.
- La inducción de la DNA polimerasa II que incrementa la capacidad de la célula de copiar el DNA frente a sitios abásicos.
- Aumento de las proteínas RecA y RecN, cruciales en el proceso de la reparación por recombinación.
- Sobreproducción de SulA para inhibir la división celular.
- La inducción de genes que codifican bacteriocinas.

La proteína LexA es el represor común a todos los genes SOS, incluido el gen RecA, cuya proteína es la responsable de inducir o activar el sistema SOS. Cuando el DNA es dañado, se acumula DNA de cadena sencilla. Esta señal es reconocida por RecA, la cual pasa a su estado activado RecA\* (adquiere su actividad de coproteasa) y forma filamentos espirales nucleoproteicos alrededor del DNA. La proteína LexA reconoce esta estructura, se une a ella produciéndose la ruptura catalítica del represor LexA y la inducción de los genes del sistema SOS.

### 3.4 RADIACIÓN GAMMA EN ALIMENTOS

La alternativa para preservar la calidad de los alimentos frescos, controlar o eliminar los microorganismos y protegerlos del deterioro físico y químico, es con el uso de la radiación electromagnética. Las radiaciones de principal interés en la conservación de alimentos son las radiaciones ionizantes como la radiación gamma.

La clasificación de las dosis de acuerdo con la OMS es la siguiente (ININ):

*Dosis baja* (hasta 1 kGy): Retrasa los procesos fisiológicos, como maduración y envejecimiento de frutas frescas y vegetales, y sirve también para controlar insectos y parásitos en los alimentos.

*Dosis media* (hasta 10 kGy): Reduce los microorganismos patógenos; se utiliza para mejorar propiedades tecnológicas de los alimentos, como reducir los tiempos de cocción de vegetales deshidratados y para extender la vida de varios alimentos.

*Dosis alta* (superior a 10 kGy): Esteriliza carne, pollo, mariscos y pescados, y otras preparaciones, en combinación con un leve calentamiento para inactivar enzimas y para la desinfección de ciertos alimentos o ingredientes, como las especias.

La irradiación de alimentos consiste básicamente en la exposición de estos a la acción de las radiaciones ionizantes provenientes de una de las fuentes de radiación permitida para tal efecto. Aplicando la dosis correcta se logra la reducción bacteriana y se mantiene la calidad del producto. Los rayos gamma tienen suficiente energía para ionizar moléculas en su trayectoria sin que se eleve de forma apreciable la temperatura (esterilización fría), lo que minimiza los cambios adversos de olor, aroma, textura, color y calidad nutricional. Esto hace que los alimentos irradiados conserven más la apariencia, el sabor y las características del alimento fresco.

La norma general del Codex Alimentarius está basada en las investigaciones de un comité internacional de expertos en irradiación de alimentos de la FAO, la OMS y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y concluye que la irradiación de cualquier alimento hasta una dosis promedio total de 10 kGy no presenta riesgos toxicológicos y no requiere hacer ninguna prueba adicional, ya que no introduce problemas microbiológicos o nutricionales especiales.

Sin embargo, en septiembre de 1977, se formó otro grupo de científicos de estas mismas organizaciones para la evaluación de la calidad de los alimentos irradiados



con dosis superiores a 10 kGy, concluyendo que no hay evidencias científicas para que se limite la dosis suministrada a los alimentos a ese valor.

En México se autorizó la irradiación de alimentos en el año de 1988 (Ley General de Salud, 1989). Actualmente USDA permite la importación de frutas y verduras frescas tratadas mediante radiación gamma contra la mosca de la fruta (Senasica, 2012f).

El uso de la irradiación como tratamiento fitosanitario fue aprobado en 2003 por la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) de la FAO mediante la publicación de la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias n.º 18 denominada "*Directrices para utilizar la irradiación como medida fitosanitaria*".

En 2006, México y Estados Unidos firmaron un acuerdo para usar la irradiación como tratamiento postcosecha en frutas y vegetales para exportación, que cuenta con la aprobación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), y la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) (Food and Water Watch, 2006).

#### **3.4.1 VENTAJAS DEL TRATAMIENTO**

- Alto poder penetrante, por lo que el alimento puede tratarse ya envasado, impidiendo una posible recontaminación.
- No deja residuos como el caso de fumigantes.
- No produce un aumento apreciable de temperatura.
- Implica un menor gasto de energía, si se le compara con algunos métodos de preservación tradicionales, lo cual influye en el costo del proceso.
- Tecnología probada.
- Buena uniformidad de dosis.
- Control de los patógenos fúngicos que causan la podredumbre postcosecha.
- Inactivación de patógenos humanos para mantener la seguridad microbiológica y la calidad de las frutas.
- Tratamiento de cuarentena para productos sujetos a infestación de plagas de insectos.
- La mayor calidad microbiológica que ofrecen estos alimentos.
- Aumento de la vida útil de los alimentos mediante el retraso de los procesos fisiológicos y bioquímicos que conducen a la maduración.

### 3.4.2 DESVENTAJAS DEL TRATAMIENTO (NAPPO, 2008)

- No tiene aplicación general. No se puede tratar a todos los alimentos ya que no todos soportan la radiación dando como resultado efectos negativos en la apariencia y en el sabor.
- Estrictamente regulado.
- Pocos proveedores.

### 3.4.3 FACTORES QUE CONFIEREN A LOS MICROORGANISMOS RESISTENCIA A LA RADIACIÓN (Slade y Rodman 2011):

*Deinococcus radiodurans* es un microorganismo resistente a la radiación gamma, sobrevive a una radiación ionizante de 5 kGy sin ser letal o mutagénico para él. Si está en un medio rico en nutrientes puede crecer con una radiación crónica de 60 Gy/h sin ningún efecto. Analizando a *Deinococcus radiodurans* los científicos tienen hipótesis de los factores que se necesitarían para que un microorganismo fuera resistente a la radiación gamma.

*Deinococcus radiodurans* es una bacteria Gram positiva, produce un pigmento rojo, no esporula, no es patógena y es resistente a la radiación gamma y a la desecación. Estos dos últimos puntos originan especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales son especies de oxígeno reducidas de manera incompleta produciendo daño a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos.

Se ha observado que *Deinococcus radiodurans* no solo tiene mecanismos eficientes de reparación del daño al DNA; también tiene mecanismos que previenen del daño oxidante a sus proteínas, conservando así su actividad catalítica y pudiendo tener una respuesta rápida en condiciones de estrés.

Tradicionalmente, el DNA ha sido considerado como el principal blanco de la radiación. La investigación moderna en el campo de *D. radiodurans*, ha demostrado que esta bacteria es tan susceptible a DSBs inducidas por la radiación como todas las demás especies; sin embargo, su proteoma está mejor protegido contra las EROs. Estos hallazgos sugieren que el nivel de daño a las proteínas, y no al DNA, junto con la capacidad para secuestrar EROs de la célula determinan el que una bacteria sobreviva o no a la radiación.

Algunos de los mecanismos que previenen del daño oxidante a *D. radiodurans* son:

- Metabolitos de la vía de las pentosas: la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) aumenta después de la radiación gamma. Esta enzima cataliza la primera reacción en la vía de las pentosas. Esta vía metaboliza la glucosa a ribosa-5-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato y NADPH que son los precursores de los nucleótidos. El NADPH sirve como cofactor de la enzima glutatión y tiorredoxina reductasa que regeneran los antioxidantes glutatión y tiorredoxina, respectivamente. Estas disminuyen el peróxido de hidrógeno y las cisteínas oxidadas.
- Nucleótidos y aminoácidos funcionan como antioxidantes: *D. radiodurans* es incapaz de sintetizar  $\text{NAD}^+$  y de utilizar nucleósidos y productos del ciclo de Krebs como fuente de carbono; por lo tanto, se acumulan nucleótidos (precursores del  $\text{NAD}^+$ ) y aminoácidos (derivados del ciclo de Krebs) en el citoplasma. Estos forman complejos con el ion  $\text{Mn}^{2+}$  actuando como secuestradores de EROs y protegiendo proteínas.
- Gránulos de polifosfatos (poliP): estos gránulos funcionan como fuente de energía para la síntesis de ATP. En *D. radiodurans* también sirven como proveedores de ortofosfatos que actúan en sinergia con el ion  $\text{Mn}^{2+}$  para secuestrar radicales superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) protegiendo a proteínas del estrés oxidante.
- Trehalosa y sacarosa: durante la desecación, estos disacáridos no reductores reemplazan las moléculas de agua, estabilizando el citoplasma y reduciendo la liberación de radicales libres.
- Carotenoides: los carotenoides son eficientes secuestradores del oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y de radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), protegiendo del daño oxidante al DNA y a los lípidos de las membranas. La dinoxantina, es el carotenoide en mayor proporción en *D. radiodurans*.
- Complejos con el ion  $\text{Mn}^{2+}$ : el complejo Mn-aminoácidos secuestra  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el complejo Mn-ortofosfato secuestra al superóxido ( $\text{O}_2^-$ ).

#### **3.4.4 FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DEL TRATAMIENTO CON RAYOS GAMMA** (Suárez, 2001)

- Tipo y especie de microorganismo: bacterias Gram positivas son más resistentes que las bacterias Gram negativas. Las bacterias que esporulan son más resistentes que las que no. En las esporas de *B. subtilis*, hay un aumento

de los iones  $Mn^{2+}$  y pequeñas proteínas rodean al DNA promoviendo un empaquetamiento en forma de anillo que excluye a las moléculas de agua, previniendo el estrés oxidante (Slade y Rodman, 2011).

- Número de microorganismos: a mayor número de microorganismos en el inicio del tratamiento, menor la eficacia de una determinada dosis.
- Composición del alimento: los microorganismos son más sensibles en soluciones salinas que en medios que contienen alto porcentaje de proteínas. Algunos constituyentes de los alimentos ejercen una acción protectora sobre los microorganismos (catalasa). La cáscara del mango tiene compuestos con función antioxidante y antibacteriana como la mangiferina (González-Aguilar *et al*, 2007; Benites-Vilchez *et al*, 2011).
- Estado físico del alimento durante la irradiación: En un alimento con poca humedad las células serán más resistentes a la radiación gamma. En las frutas climatéricas, el grado de madurez en la recolección, el tiempo de retraso entre la recolección y la irradiación y el estado fisiológico pueden influir en el retraso de la maduración inducida por la radiación gamma (Molins, 2003).
- Fase de crecimiento: Los microorganismos son más resistentes durante la fase estacionaria. En esta fase las bacterias como *E. coli* disminuyen la tasa global de síntesis de DNA, RNA y proteínas, aumenta la degradación de proteínas, se reorganiza el metabolismo general y se acumulan compuestos de reserva (polifosfato y glucógeno) y osmoprotección (trehalosa). Ocurre una expresión diferencial de genes que contribuyen a que las células mantengan la viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores de estrés como la radiación. Este cambio en el patrón de transcripción de la célula depende principalmente del reemplazo del factor de transcripción  $\sigma^{70}$  en la enzima RNA polimerasa por  $\sigma^s$ . El factor  $\sigma^{70}$  media la transcripción de la mayoría de los genes importantes para un crecimiento activo, mientras que  $\sigma^s$  es un regulador que incrementa su actividad en respuesta al estrés nutricional y a otras condiciones como el daño al DNA, el choque osmótico y la disminución del pH (Ramírez *et al*, 2005). *D. radiodurans* presenta mayor actividad de antioxidantes enzimáticos como la catalasa, la superóxido dismutasa y las peroxidasas durante la fase estacionaria (Slade y Rodman, 2011).

### **3.4.5 MANGOS IRRADIADOS**

Varios países irradian mango; en Blangadesh, Chile, Sudáfrica, entre otros se aceptan los mangos irradiados para control de insectos y alargamiento de vida con una dosis máxima de 1 kGy; Tailandia acepta mangos irradiados hasta un máximo de 1.5 kGy (Fernández, 1992). En 2008 Australia irradió 300 toneladas de mango y las envió a Nueva Zelanda (CNEA, 2009). En el 2007 India exportó a Estados Unidos 160 toneladas de mango Alphonso irradiado. En 2007 Pakistán firmó un acuerdo con USDA para el uso de la irradiación de frutas tropicales hacia Estados Unidos, incluyendo mangos (Blakey *et al*, 2011).

### **3.4.6 ALIMENTOS IRRADIADOS EN MÉXICO**

En noviembre del 2008, México exportó el primer cargamento de guayaba fresca irradiada a Estados Unidos, después de que en 1935 se prohibiera el ingreso de esta fruta a territorio estadounidense debido a la detección de mosca de la fruta. En 2009 se exportaron dos embarques de mango Manila (34 toneladas) irradiados a los Estados Unidos y se tiene la expectativa que se puedan enviar cítricos (naranja, mandarina, tangerina, toronja y lima dulce), chile manzano y carambola irradiados en el futuro (INFOAGRO, 2008; SAGARPA, 2011b).

#### **3.4.6.1 MANGOS IRRADIADOS EN MÉXICO** (Senasica, 2009)

Los objetivos del tratamiento en el mango son la prevención de la emergencia de moscas de la fruta; neutralización, muerte, esterilidad o interrupción de su desarrollo para que no alcance el estado adulto. De acuerdo con las regulaciones de APHIS, la radiación gamma interrumpe el desarrollo de todas las plagas de la familia *Trephritidae* (mosca de la fruta) a una dosis mínima absorbida de 150 Gy.

El mango irradiado proveniente de México puede ser exportado a los Estados Unidos, solo si se cumple las siguientes condiciones:

- a. La fruta debe ser producida comercialmente y ser parte de un embarque comercial.
- b. Debe ser tratada con irradiación y recibir una dosis mínima absorbida de 150 Gy.
- c. Cada embarque debe ser inspeccionado en forma conjunta por inspectores de APHIS y SAGARPA.

### 3.5 DGGE

El análisis del DGGE es una técnica molecular independiente del cultivo que permite detectar los efectos de algún tratamiento, en este caso radiación gamma, en una comunidad microbiana (superficie del mango Ataulfo). Éste es un método de ecología para analizar cómo varía la comunidad bacteriana a través del tiempo y de acuerdo a un tratamiento (Cárdenas *et al*, 2003).

Los marcadores moleculares, como el gen 16S rRNA, se han utilizado ampliamente para detectar, identificar y medir la diversidad microbiana. La amplificación por PCR del gen 16S rRNA, en combinación con electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis o DGGE, por sus siglas en inglés) ha sido y es comúnmente utilizado para analizar las comunidades bacterianas. Algunas bacterias tienen múltiples copias de genes 16S rRNA y éstas tienen secuencias diferentes entre sí; lo cual complica la interpretación de los resultados. Sin embargo, tiene atributos clave que lo hacen ideal para el análisis de comunidades bacterianas y la identificación de microorganismos. Es común en todas las bacterias, tiene un mosaico conservado, dominios de secuencia variable y la base de datos de las secuencias es amplia, por lo que cada banda en el DGGE puede ser atribuida a una especie (Peixoto *et al*, 2002).

El DGGE es un tipo de electroforesis que permite detectar diferencias entre secuencias debido a las variaciones que estas diferencias provocan en la  $T_m$  de la molécula. La  $T_m$  se define como la temperatura a la que el 50 % de las moléculas de DNA se encuentran en estructura de doble cadena unida por puentes de hidrogeno. Este valor depende de la proporción de bases púricas y pirimídicas de la secuencia, debido a que la unión entre A-T (con dos puentes de hidrógeno) es más lábil que la unión G-C (con tres puentes de hidrógeno). El fundamento es que al aumentar la concentración de desnaturizante, la doble cadena de DNA se separará en distintos dominios (Grompe 1993). Por esto, la composición del DNA afecta el patrón de desnaturización, siendo posible distinguir entre moléculas con diferentes secuencias, debido a su movilidad diferencial en geles con un gradiente de concentración de un compuesto desnaturizante. El DNA desnaturizado tiene una velocidad de migración menor que el DNA de doble cadena, diferenciando dos o más fragmentos del mismo tamaño en pares de bases pero con distinta composición.

PCR-DGGE se clasifica como parte de las herramientas utilizadas para la detección de comunidades microbianas, disciplina de la ecología microbiana molecular (Muyzer y Smalla, 1998). El PCR-DGGE tiene la ventaja de no requerir conocimientos previos sobre las poblaciones microbianas. Proporciona patrones de diversidad genética (huellas dactilares) en los ecosistemas microbianos complejos, tales como los suelos, sedimentos, aguas profundas y biopelículas (Muyzer *et al*, 1993, Muyzer y Smalla, 1998). El PCR-DGGE es un método ecológico, que permite observar cambios en los patrones de microorganismos en diferentes muestras o como consecuencia de diferentes tratamientos (Cárdenas *et al*, 2003). Nuestro objetivo se centró en los cambios microbianos y su incidencia, más que identificar cada banda.

La estrategia para distinguir distintas secuencias de un gen en una muestra consiste en realizar un corrimiento preliminar que se denomina gel perpendicular. En este caso, el gradiente desnaturante es perpendicular a la dirección de la electroforesis. La molécula de DNA migra a través de una concentración constante de desnaturante. La curva resultante es debido a los diferentes dominios de fusión y el porcentaje de agentes desnaturantes a los que ocurre la desnaturación de cada dominio. Posteriormente, se realiza el gel paralelo en donde las moléculas de DNA migran a través de un incremento lineal de concentración del agente desnaturante para separar cada fragmento de DNA por secuencia.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Para impulsar, fomentar y fortalecer la competitividad del medio rural, es necesario ejecutar programas sanitarios. Para aumentar la productividad en la actividad agrícola, la tecnología juega un papel importante, ya que permite alcanzar mayores índices de producción y obtener productos con una buena condición sanitaria y de inocuidad, que proporcionen ventajas para la comercialización de los productos agropecuarios mexicanos, como el mango, en los mercados internos y externos (SAGARPA, 2010). Si la competencia por los mercados siempre ha sido fuerte, la globalización la intensifica.

Es por eso que surge la necesidad de nuevas técnicas postcosecha más eficaces. La irradiación de los alimentos ha sido identificada como una tecnología segura para reducir el riesgo de ETAs, en la producción, procesamiento, manipulación y preparación de alimentos con alta calidad.

La presencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli* son un problema de creciente preocupación para las autoridades de salud pública, ya que algunos alotipos resisten pH bajos y forman biopelículas, que puede reducirse con el uso de la radiación gamma.

Actualmente, los protocolos desarrollados con la técnica de irradiación gamma en el mango se enfocan más en la mosca de la fruta (dosis mínima de 150 Gy y máxima de 1kGy para el control de plagas) (USDA, 2003); no se contempla el control de patógenos; por lo que se requiere determinar el efecto de las dosis en el control de bacterias patógenas sin que éstas afecten la calidad del producto. Es sumamente importante, tanto desde el punto de vista de salud pública como económico, controlar los patógenos humanos potenciales en los productos frescos.



## **5. HIPÓTESIS**

Ya que la radiación ionizante, como los rayos gamma, es efectiva y penetrante, será posible eliminar enterobacterias patógenas, como *Escherichia coli*, con una dosis que no afecte las características sensoriales del mango Ataulfo.

## **6. OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la radiación gamma en la eliminación de enterobacterias patógenas de la superficie del fruto, así como en la modificación de la microbiota superficial del mango.

### **6.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

Encontrar una dosis de radiación gamma mediante la cual sea posible eliminar *E. coli* enteropatógena de la superficie del mango, sin modificar sensiblemente sus parámetros fisicoquímicos (color, firmeza, pH, grados Brix, acidez), fisiológicos (respiración) y sensoriales.

Determinar el efecto de la irradiación gamma sobre la microbiota superficial del mango mediante el método 16S rRNA PCR-DGGE.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA**

Se usó una cepa de *Escherichia coli* O102:H6 enteropatógena resistente a la ampicilina y aislada de la superficie de mangos por nuestro grupo de trabajo (Vélez *et al*, 2001).

Se sembró e incubó por 16 h a 37°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) para reactivar la cepa. Posteriormente se sembró en agar nutritivo con ampicilina (50 µg/mL), y en agar nutritivo con el fin de obtener cultivos puros y se realizó la tinción de Gram.

#### **7.1.1 CONSERVACIÓN DE LA CEPA**

Una vez que se comprobó que estaba pura se sembró en caldo BHI e incubó por 16 h, se tomó 1.2 mL del cultivo y se agregó 300 µL de glicerol en un tubo estéril; después de mezclar en vórtex para unir el glicerol al medio, se refrigeró por 1 h a 4°C y finalmente, se congeló la cepa a -60°C.

#### **7.1.2 IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli***

La identificación de la cepa se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM. La identificación de las cepas se realizó por medio del sistema Vitek® (bioMérieux) y la serotipificación mediante la metodología de Orskov y Orskov (1984) con sueros específicos (SERUNAM) que fueron obtenidos de la inmunización de conejos de Nueva Zelanda blanco.

#### **7.1.3 IDENTIFICACIÓN AUTOMATIZADA VITEK®**

Se utilizó el sistema automatizado Vitek®, con tarjetas de identificación GNI+, diseñadas para la identificación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas tarjetas tenían 30 pocillos, de los cuales 28 contenían caldos bioquímicos liofilizados, un caldo para control negativo y otro para control positivo de crecimiento (Tabla 5). Antes de utilizar las tarjetas se realizó la prueba de oxidasa que consistió en colocar en un trozo de papel de filtro 2-3 gotas de tetrametil-p-fenilendiamina (TMFD),

y se extendió con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado. Se consideró una reacción positiva si el reactivo pasó a púrpura al ser oxidado en 5-10 segundos.

**Tabla 5.** Caldos bioquímicos liofilizados (Benfari *et al*, 1981)

<b>DP-3</b> Fermentación de glucosa en presencia de DP-300	<b>OFG</b> Utilización de glucosa	<b>GC</b> Control de crecimiento	<b>ACE</b> Utilización de acetamida	<b>ESC</b> Hidrólisis de esculina	<b>PLI</b> Glucosidasa
<b>URE</b> ureasa	<b>CIT</b> Utilización de citrato	<b>MAL</b> Utilización de malonato	<b>TDA</b> Triptófano desaminasa	<b>PXB</b> Crecimiento en presencia del antibiótico Polimixina B	<b>LAC</b> Fermentación de lactosa
<b>MLT</b> Fermentación de maltosa	<b>MAN</b> Fermentación de D-manitol	<b>XYL</b> Fermentación de D-xilosa	<b>RAF</b> Fermentación de rafinosa	<b>SOR</b> Fermentación de D-sorbitol	<b>SUC</b> Fermentación de sacarosa
<b>INO</b> Fermentación de inositol	<b>ADO</b> Fermentación de adonitol	<b>COU</b> Fermentación de glucosa en presencia ácido p-cumárico	<b>H<sub>2</sub>S</b> Producción de ácido sulfhídrico	<b>ONP</b> Hidrólisis de orto-nitrofenol galactopira nosido	<b>RHA</b> Fermentación de L-ramnosa
<b>ARA</b> Fermentación de L-arabinosa	<b>GLU</b> Fermentación de glucosa	<b>ARG</b> Arginina dihidrolasa	<b>LYS</b> Lisina descarboxilasa	<b>ORN</b> Ornitina descarboxilasa	<b>OXI</b> Prueba de oxidasa

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Se sembró la cepa en agar Mac Conkey y en agar sangre para determinar la pureza de la cepa, se tomaron 5 colonias de cada medio (en total 10) y se sembraron en agar TSA, incubándose a 37°C por 24 h. El cultivo en TSA se ajustó con solución salina al 0.45% a  $3.0 \times 10^8$  ufc/mL en la escala de Mac Farland con el colorímetro. Se hidrató cada pocillo de la tarjeta GNI+ con la suspensión bacteriana de manera automática (en la unidad de llenado/sellado). Se incubaron las tarjetas a 37 °C en la cámara incubadora con un lector óptico (BioMerieux Vitek 32) y se almacenan los resultados en el software del equipo.

### 7.1.4 SEROTIPIFICACIÓN

Las mismas 10 colonias utilizadas en el sistema Vitek® se sembraron individualmente en tubos de 10 mL de TSA inclinado y las mismas colonias en medio semisólido Colindale con tubo de Craigie.

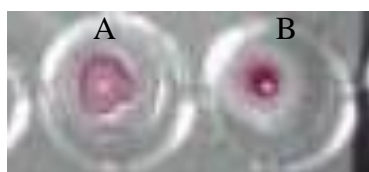
Las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondo. Se analizó el antígeno somático de la cepa, empleando una batería de 181 sueros monovalentes obtenidos de los antígenos somáticos conocidos (SERUNAM).

Para analizar el antígeno flagelar, se utilizaron 56 sueros específicos correspondientes a los antígenos conocidos. Los sueros se encontraban diluidos 1:100.

#### **7.1.4.1 ANTÍGENO SOMÁTICO “O”**

Se incubaron los tubos de TSA a 37°C por 24 h, después de ese periodo, las células fueron cosechadas en 10 mL de solución salina al 0.85%. La suspensión bacteriana se hirvió a vapor efluyente por 1 h entre 5 y 10 libras de presión para romper las proteínas y que el antígeno se encontrara más libre. Se dejaron enfriar para luego agregar formalina al 0.06% y fijar el antígeno. Esta suspensión bacteriana fue empleada como antígeno somático.

Las microplacas se prepararon con 50 µL del suero monovalente y 50 µL del antígeno somático. Las placas se envolvieron con papel plástico para evitar la evaporación durante la incubación a 50°C por 24 h. Después de la cual, se realizó la interpretación de los resultados. Se consideró como positivo la presencia de aglutinación en el fondo de los pozos y como negativo la presencia de un botón de antígeno en el fondo del pozo (Figura 1). Todos los sueros que dieron un resultado positivo se tomaron para hacer diluciones con solución salina al 0.85% desde 1:100 hasta 1: 12 800 en las microplacas (50 µL de la dilución + 50 µL del antígeno), se incubaron a 50°C por 24 h y se realizó la interpretación de los resultados. Cuando se presentaron reacciones cruzadas, el antígeno se enfrentó con sueros puros diluidos desde 1:50 hasta 1:6 400. El serogrupo se definió al determinar el mayor grado de aglutinación en la dilución más alta del suero en comparación con la que se presenta con el antígeno homólogo.



**Figura 1.** A: aglutinación positiva, B: aglutinación negativa

#### **7.1.4.2 ANTÍGENO FLAGELAR “H”**

Los tubos del medio semisólidos Colindale con los tubos de Craigie se utilizaron para evaluar la movilidad. Se sembraron las 10 colonias a la mitad del interior del tubo de Craigie por picadura y se incubaron a 30°C durante 15 días. Se consideró que el cultivo bacteriano era móvil, si se observó un crecimiento dentro del tubo de Craigie y en el exterior de él hasta llegar a la superficie del medio. Los flagelares positivos se

sembraron en caldo biotriptasa al 2% y se incubaron 24 h a 37°C. Después del tiempo de incubación, se agregó formalina al 0.06%. Esta suspensión bacteriana fue empleada como antígeno flagelar.

Las microplacas se prepararon con 50 µL del suero monovalente y 50 µL del antígeno flagelar. Las placas se envolvieron con papel plástico para evitar la evaporación durante la incubación a 50°C por 2.5 h. Después de la cual, se realizó la interpretación de los resultados. A los positivos se les realizó diluciones de la misma manera que se hizo para el antígeno somático.

## **7.2 MANGO**

Se utilizó mango (*Mangifera indica*) variedad Ataulfo, en su etapa preclimática, procedente de la central de abasto de la Ciudad de México.

La evaluación del efecto de la irradiación sobre las características de calidad del mango y en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 se realizaron con el mismo lote de mangos que venían del estado de Guerrero en el mes de agosto, categoría II.

El análisis sensorial se realizó con mangos que venían de Chiapas en el mes de abril, categoría extra.

La réplica de sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 y la evaluación del efecto de la radiación gamma en la microbiota natural de la superficie del mango se realizaron con mangos de Chiapas en el mes de junio, categoría I.

### **7.2.1 LIMPIEZA (Tratamiento previo)**

Se realizó un lavado previo en tinas con agua por 30 min para eliminar tierra y otras impurezas como hojas, tallos, raíces y basura sobre la piel del fruto.

### **7.2.2 SELECCIÓN**

Se eliminaron los mangos que presentaron daños físicos y mecánicos como, malformaciones, arrugamiento, grietas, esponjosidad, hongos, insectos, para contar con lotes de frutos con características homogéneas.

### 7.2.3 EMPAQUETADO

Los mangos se empaquetaron en cajas de cartón para exportación a E.U.A. Sus dimensiones fueron: largo 32.5 cm, ancho 27.5 cm y alto 11 cm. Se almacenaron a temperatura ambiente después de aplicada la dosis de radiación gamma correspondiente.



Figura 2. Mangos en cajas de cartón

### 7.2.4 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las cajas se enviaron al Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) para ser irradiadas a una tasa de dosis entre 23.7 Gy/min y 26.2Gy/min. Las cajas se etiquetaron dependiendo de la radiación recibida (Figura 2 y Tabla 6).

Tabla 6. Grupos del experimento

Grupo	Código de color
Control	blanco
0.5 KGy	amarillo
1 KGy	azul claro
1.5 KGy	Rojo

**Nota:** En el caso del experimento de sobrevivencia para *E. coli* O102:H6 los mangos se inocularon antes del tratamiento de radiación gamma.

Posterior al tratamiento se almacenaron a temperatura ambiente, y se consideró ese momento como el tiempo cero.

### 7.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA IRRADIACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DEL MANGO.

#### DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y FISICOQUÍMICOS.

Los parámetros de calidad se evaluaron en la FES Cuautitlán con el apoyo de la Dra. Ma. Andrea Trejo Márquez. Para determinar el estado de madurez de los mangos, se evaluó diariamente el parámetro fisiológico de respiración en los frutos, el cual es un indicativo del estado de madurez en frutos climatéricos ( $E_1$  = pre-climaterio,  $E_2$  = inicio del climaterio,  $E_3$  = máximo climaterio y  $E_4$  = post-climaterio). Una vez llegado a cada estadio se evaluaron los parámetros de calidad: color, firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles, pH y acidez. Todos los parámetros se midieron por triplicado. El parámetro fisiológico (respiración) se determinó diario, del día 1 al día 11 de almacenamiento. Los parámetros fisicoquímicos se determinaron los días: 1, 5, 8 y 12 analizando apariencia, color, firmeza, pH, acidez y sólidos solubles.

#### 7.3.1 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS (Trejo, 2010)

##### 7.3.1.1 RESPIRACIÓN

Se determinó con base en la producción de  $\text{CO}_2$  generado por los frutos. Se colocaron los mangos en un contenedor de vidrio de 480 mL sellado con parafilm. El contenedor se conectó de la parte superior al analizador de gases por infrarrojos (marca NITEC LLC) (Figura 3). Se tomó la primera lectura del contenedor recién sellado después de 1 minuto y se registró esa lectura; posteriormente, se dejó transcurrir 30 min a temperatura ambiente para medir la acumulación de  $\text{CO}_2$ . Los resultados se expresaron en  $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 3.** Analizador de gases por infrarrojos (marca NITEC LLC)

## **7.3.2 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS** (Trejo *et al*, 2010)

### **7.3.2.1 FIRMEZA**

Se utilizó el penetrómetro manual marca Tr. Fruit Pressure Tester modelo FT 327 con un pistón de 11.3 mm de diámetro. Se sostuvo el mango sobre una cara ecuatorial y se presionó el penetrómetro hasta que se introdujo parcialmente el émbolo (hasta una muesca que tiene el émbolo). El valor obtenido se expresó en Kg/cm<sup>2</sup>.

### **7.3.2.2 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES**

El contenido de sólidos solubles se determinó por medio de la lectura directa en un refractómetro (marca ATAGO, mod. 2111). Este se calibró con una gota de agua destilada; posteriormente, se colocó una gota del jugo del mango para tomar la lectura. Los resultados se expresaron como °Brix.

### **7.3.2.3 DETERMINACIÓN DE pH**

Una muestra de aproximadamente 15 g de la pulpa del mango se molió en licuadora. Se pesó 10 g del producto molido en un vaso de precipitado y se añadió 90 ml de agua destilada, se agitó hasta lograr la homogenización completa. La mezcla se filtró con papel filtro y del filtrado se determinó el pH con un pHmetro manual digital (marca HANNA instruments, modelo pHep1). El electrodo del equipo se sumergió en la solución a temperatura ambiente después de calibrarlo con las soluciones buffer de acuerdo con las instrucciones del equipo.

### **7.3.2.4 DETERMINACIÓN DE ACIDEZ**

La determinación de este parámetro se realizó por medio del análisis de titulación directa. Se tomó 20 mL de la solución que se obtuvo en el punto anterior, se le adicionaron 3 gotas de fenolftaleína al 1% y se valoró con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N.

Titulación: Se adicionó gota a gota la solución de hidróxido de sodio hasta que se mantuviera el vire al color rosa. Los resultados se expresaron como % de ácido cítrico ya que es el ácido predominante en el mango (AOAC, 1990).



$$\% \text{Acidez} = \frac{(\text{meqAc} \times V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}})}{\text{mLAc}} * 100$$

Donde:

meq Ac = Mili equivalente de ácido cítrico

$V_{\text{NaOH}}$  = Volumen gastado NaOH

$N_{\text{NaOH}}$  = Normalidad NaOH

mL Ac = mililitros de la muestra

### 7.3.2.5 DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA DE PESO.

Se determinó por diferencia de peso por método gravimétrico con una balanza analítica (marca SARTORIUS modelo j1800). El porcentaje para la pérdida de peso se realizó con la siguiente ecuación:

$$\% PP = (P_i - P_f) \times 100$$

Donde:

%PP = Porcentaje de pérdida de peso

$P_i$  = Peso inicial

$P_f$  = Peso final

### 7.3.2.6 DETERMINACIÓN DEL COLOR.

La determinación de color se llevó a cabo con un colorímetro marca Minolta modelo CR300 (Figura 4). Los valores de "a" en abscisas van desde los valores negativos para el verde a valores positivos para el rojo; los valores "b" en ordenadas van desde el azul al amarillo y el parámetro "L" representa la luminosidad desde la reflexión nula o color negro (L=0) a reflexión difusa perfecta o blanca (L=100). Los parámetros a y b se utilizaron para evaluar la saturación y el tono. La saturación es la pureza del color y el tono es el color propiamente dicho. El instrumento se calibró por medio de una baldosa blanca de cerámica. Las mediciones se realizaron en la piel del mango en un punto de la zona ecuatorial del fruto.

El tono (ángulo de Hue) se calculó con la ecuación  $h^{\circ} = \pi - \arctan a/b$  (para variedades verdes y amarillas) donde: 0 = rojo-púrpura, 90 = amarillo, 180 = azulado-verde y 270 = azul; y la saturación de color se calculó mediante la ecuación  $C = (a^2 + b^2)^{1/2}$  (McGuire, 1997)



**Figura 4.** Colorímetro marca Minolta

## **7.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN EL PATÓGENO**

### **CEPA USADA**

*E. coli* O102:H6 aislada del mango.

#### **7.4.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.**

Se marcaron 2 círculos con un área de 3.14 cm<sup>2</sup> en un costado del mango, realizados con un disco estéril y posteriormente se colocaron en charolas plásticas para mantenerlos a temperatura ambiente hasta su inoculación.

Se reactivó la cepa en BHI e incubó a 37° C durante 24 h; posteriormente, se sembró por estría en cajas Petri de 9 cm de diámetro con 20 ml de agar nutritivo con ampicilina (50 µg/ml) y se incubó a 37° C por 24 h. Transcurrido ese tiempo se tomó una colonia, se colocó en BHI y se incubó a 37° C durante 16 h.

Para la preparación del inóculo se centrifugó la suspensión con microorganismos a 15000 rpm durante 15 min a 4° C a continuación se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de agua peptonada al 0.1% estéril para volverse a centrifugar a 15000 rpm durante 15 min a 4° C; de igual manera se descartó el sobrenadante y el pellet finalmente se resuspendió en agua peptonada al 0.1%.

#### **7.4.2 INOCULACIÓN DE LOS FRUTOS.**

Los lotes de frutos se colocaron bajo condiciones asépticas y se inocularon a temperatura ambiente. Se tomó 100 µl del inóculo que contenía  $10^8$  UFC/ml ( $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>) y se inocularon en las áreas previamente marcadas. El inóculo se colocó en forma de pequeñas gotas en toda la superficie del círculo y se dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente; posteriormente, los frutos se irradiaron a dosis de: 0.5, 1, 1.5 kGy, se almacenaron a temperatura ambiente y se realizó el análisis microbiológico a los diferentes tiempos. La sobrevivencia se evaluó por quintuplicado.

#### **7.4.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.**

Para la toma de muestras se realizó un frotis sobre el área inoculada de cada fruto. Tomando un hisopo estéril humedecido con agua peptonada, se frotó la superficie inoculada, se colocó el hisopo en un vial con agua peptonada al 0.1% estéril, una vez tomadas las muestras se agitó por espacio de 1 min para recuperar los microorganismos que se encontraban en el hisopo y se realizaron las diluciones seriales de la mezcla recuperada. De estas diluciones se tomó 100 µl y se plaqueó en agar nutritivo con 50 µg/ml de ampicilina. Se incubó a 37° C durante 24 h y se realizaron las cuentas. Las muestras se tomaron a 0, 3, 6, 18 y 96 h; y 0, 3, 6, 18, 24, 48, 72 y 96 h en el experimento de réplica, después de ser irradiados los frutos. Como control negativo se tomó un área de igual magnitud a la inoculada pero sin el inóculo en el fruto y como control positivo se tomó 100 µl del inóculo original diluido en 5 ml de agua peptonada al 0.1 % y se plaqueó de igual manera en agar nutritivo con ampicilina.

Se determinó si existían diferencias significativas en las cuentas de las bacterias patógenas en los mangos control con cada uno de las dosis de radiación.

#### **7.5 ANÁLISIS SENSORIAL**

Para el perfil sensorial del mango se utilizó el análisis descriptivo cuantitativo QDA®, por ser es un método cualitativo que da una descripción cuantitativa completa de las propiedades sensoriales (Stone y Sidel, 1993). Umbelino (2005) realizó el perfil descriptivo de distintos jugos de mango utilizando esta técnica y analizando atributos de apariencia, sabor, aroma y textura.

Este análisis tuvo la intención de buscar la dosis a la cual no se viera afectado el perfil sensorial del mango y que fuera agradable para el consumidor.

Antes de realizar el análisis se dio información sobre el objetivo y el procedimiento de la técnica a los panelistas. Fueron 15 panelistas familiarizados con la metodología y la muestra, entre 21 y 60 años, 13% hombres y 87% mujeres. El panel probó mango Ataulfo en madurez comercial y sin tratamiento de radiación gamma para elegir en consenso los descriptores, los cuales proporcionaron una descripción completa de las propiedades sensoriales del fruto. Una vez que se escogieron los descriptores, se explicaron tanto las definiciones como la manera de realizar la evaluación para cada descriptor una sesión antes. Posteriormente, el mismo panel realizó el análisis sensorial del fruto irradiado a diferentes dosis (0, 0.5, 1, 1.5 KGy) en estado post-climatérico (doceavo día) y almacenados a temperatura ambiente. Se presentaron ante los panelistas las 4 muestras diferentes en platos de plástico con un código de 3 dígitos y cuantificaron la intensidad de cada descriptor en una escala lineal del 1 al 10 incrementando la intensidad de izquierda a derecha, donde el panelista marcó en ella el punto que mejor reflejó la intensidad del descriptor. Se introdujeron referencias en las escalas para poder ayudar a los panelistas a precisar los puntos en ella y así hacer la evaluación sensorial más homogénea y sencilla.

La medición de los valores en la escala se realizó con una regla tomando en cuenta decimales. El análisis de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Esto permitió monitorear el desempeño de los miembros del panel, así como identificar diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras analizadas. Con los resultados obtenidos se realizaron “gráficas de araña” que son diagramas que representan el valor de la intensidad para cada atributo sensorial, en una serie de líneas que radian de un centro. Cada línea representó un atributo siendo el centro la intensidad mínima.

## **7.6 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA MICROBIOTA DEL MANGO**

Para determinar cambios en la microbiota nativa se usó el método PCR-DGGE. El primer paso es la extracción de DNA de los microorganismos que se encontraron en la superficie. Debido a que se parte de mangos lavados con una cuenta baja de microorganismos fue necesario usar muestras compuestas por 9 mangos y escoger el método adecuado para extraer una baja concentración de DNA.

**7.6.1 METODOLOGÍA 1. MÉTODO ENZIMÁTICO** (Técnica montada en el laboratorio para mango no lavado)

**7.6.1.1 RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA DE CADA LOTE**

(Una sola muestra de 5 mangos)

Se colocaron 5 mangos en bolsas de plástico normales y con doble nudo. Se adicionó 100 mL de SSI 0.085% y se agitó en Barnsted/Thermolyn Type 50800 Rotomix, velocidad 4.8 por 15 minutos volteándose 2 veces para cumplir la agitación por 45 minutos. Se recuperó el líquido en un matraz y se agregaron 50 µL de Macerex (mezcla de peptinasa y celulosa). Después de incubar 30 min a 37°C se filtró por una membrana de 0.45 µm en equipo de filtración Millipore. La membrana se cortó en pequeños trozos con tijeras estériles y se colocaron en tubos de centrifuga. La mezcla de microorganismos retenida en la membrana se recuperó con 2 mL de amortiguador TES 50X.

**7.6.1.2 EXTRACCIÓN DE DNA**

Para la extracción del DNA por el método enzimática se utilizó lisozima ya que ha sido eficiente en la extracción del DNA de bacterias Gram negativas como enterobacterias y bacterias Gram positivas como las ácido lácticas, grupos microbianos que se encuentran principalmente en la superficie del mango (Péloquin y Greer, 1993; Serbolisca *et al*, 1999; Vasek *et al*, 2001; Poubol e Izumi, 2005; Perez-Jimenez, 2007; Guadarrama-Orozco, 2009; Ramírez-Villatoro, 2012).

A 500 µL de la mezcla de microorganismos (en microtubos) se le agregó 20 µL de lisozima (10 mg/µL), se agitó e incubó a 37°C por 1 h. Posteriormente, se agregó 8 µL de pronasa (20 mg/µL) y 8 µL de RNAasa (20 mg/µL), se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por 1 h. Después se agregó 120 µL de SDS 10% y se incubó a 65°C por 30 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 600 µL de la mezcla fenol-cloroformo (1:1). Se agitó hasta formar una emulsión y se centrifugó 10 min a 5000 rpm. Posteriormente se transfirió a microtubos limpios y se adicionaron 2.5 volúmenes de EtOH al 100% a -20°C agitándose suavemente. Se centrifugó 10 min a 14 000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente por 24 h. El pellet se resuspendió en amortiguador TE.

### **METODOLOGÍA 1.1**

Se siguió el procedimiento de la metodología 1 a excepción de que se utilizaron 10 mangos para obtener una sola muestra de DNA.

### **METODOLOGÍA 1.2**

Se siguió el procedimiento de la metodología 1 a excepción de que para recuperar la microbiota se utilizó una esponja que fue previamente sumergida en 50 mL de SSI 0.85% y 10 mangos para obtener una sola muestra de DNA.

### **METODOLOGÍA 1.3**

Se siguió el procedimiento de la metodología 1 a excepción de que se utilizaron 10 mangos para obtener una sola muestra de DNA, un hisopo estéril de algodón humedecido en 50 mL SSI + tween 80 al 1% y no se usó macerex. El líquido se filtró por un embudo con papel filtro antes del filtrado por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  en el equipo Millipore. La membrana se colocó en un tubo de centrifuga y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Se cortó la membrana en 4 partes y se regresó al tubo de centrifuga; se adicionó 1ml de buffer TES y se agitó por 5 minutos en un vórtex Fisher en el número 8. El líquido se transfirió a microtubos y se congelaron a  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta el día siguiente para realizar la extracción enzimática.

## **7.6.2 METODOLOGÍA 2. MÉTODO DE HERVIDO**

### **7.6.2.1 RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA**

Diez mangos lavados fueron considerados como una sola muestra. Se recuperó la microbiota con una esponja que se humedeció en SSI 0.85%. Se agregó a la suspensión 50  $\mu\text{L}$  de Macerex (mezcla de pectinasa y celulosa) y se incubó por 15 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . El líquido se filtró por un embudo con papel filtro y el filtrado se pasó por una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  en un equipo Millipore.

### **7.6.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA**

La membrana se colocó en un tubo de centrifuga y se congeló a -20°C por 30 min. Se cortó la membrana en 4 partes y se regresaron al tubo de centrifuga; se adicionó 1ml de buffer TES y se agitó por 5 minutos en un vórtex Fisher al nivel 8. Se colocó en un congelador a -70 °C por 10 minutos. Después de ese tiempo, se transfirió a un congelador y se almacenó a -20 °C durante 10 minutos. El tubo se transfirió a un baño de agua y se calentó a 92 °C por 10 minutos. Se agitó el tubo que contenía la membrana sumergida en el buffer por 30 segundos en el vórtex al nivel 8. Se transfirió el líquido a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se puso en hielo por 5 min; posteriormente, se centrifugó a 15 000 rpm por 5 minutos. Se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100% a -20 °C. Se agitó cuidadosamente con la mano y se centrifugó a 15 000rpm por 5 minutos. Se retiró el etanol por decantación y se dejó secar el pellet. Se resuspendió el pellet en 50 µL de buffer TE.

#### **METODOLOGÍA 2.1**

Se siguió el procedimiento de la metodología 2 a excepción de que para recuperar la microbiota se utilizó una esponja sumergida en agua peptonada al 1%+ tween 80 al 1%.

#### **METODOLOGÍA 2.2**

Se siguió el procedimiento de la metodología 2 a excepción de que para recuperar la microbiota se utilizó una esponja sumergida en SSI+ tween 80 al 1%.

#### **METODOLOGÍA 2.3**

Se siguió el procedimiento de la metodología 2 a excepción de que para recuperar la microbiota se utilizó un hisopo estéril de algodón sumergido en SSI+ tween 80 al 1% y no se usó macerex.

Finalmente, se decidió trabajar con la metodología 1.3. Se utilizaron 9 mangos para obtener una muestra suficiente de DNA. Las muestras se hicieron por triplicado en el tiempo cero, 24 y 72 h después de ser irradiados a 1KGy.

### 7.6.3 CUANTIFICACIÓN DE DNA

Para la cuantificación del DNA se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Agilent 8453E) y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\left( \text{Absorbancia}_{260\text{nm}} \right) \left( 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{DNA}_{\text{doble cadena}} \right) (5) = \text{Concentración DNA}_{\text{extraído}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]$$

Considerándose la longitud de la celda (2mm) y que  $A_{260} = 1 = 50\mu\text{g/mL}$  de DNA de doble cadena.

Se determinó la pureza del DNA extraído mediante el cociente de las absorbancias a 260 nm y 280 nm que refleja la proporción ácidos nucleicos y proteínas que hay en la muestra.

$$\frac{DO_{260\text{nm}}}{DO_{280\text{nm}}} = \text{Pureza DNA}_{\text{extraído}}$$

### 7.6.4 PCR

Se amplificó la región V3 del gen 16S rRNA con los oligonucleótidos Agc338F y B518R (Tabla 9) utilizando los reactivos descritos en la tabla 8 y el protocolo de la tabla 7. Se usaron controles positivos y controles negativos.

**Tabla 7.** Condiciones de la reacción de PCR para la región V3 del gen 16S rRNA:

Periodo	Temperatura/tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización	94°C/5min	1
Desnaturalización	94°C/1 min	20
Alineamiento	65°C/1 min	
Extensión	72°C/3 min	
Desnaturalización	94°C/1 min	10
Alineamiento	55°C/1 min	
Extensión	72°C/3 min	
Extensión final	72°C/10 min	1
Enfriamiento	4°C	1



**Tabla 8.** Protocolo de PCR para la amplificación de la región V3 del gen 16S rRNA.

Reactivo	Para 1 tubo (µL)	Concentración en la mezcla de reacción
Agua	c.b.p 50	-
Albúmina	5	400 ng/µL
Amortiguador 10X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	5	2.5 mM
dNTP`s 2mM	1	0.2 mM
Cebador de región V3 del gen 16S rRNA Agc338F 1X	1	25 pmol/µL
Cebador de región V3 del gen 16S rRNA B518R 1X	1	25 pmol/µL
Taq polimerasa 50 U/µL	1	1 U/ µL
DNA	-	50 ng/µL

**Tabla 9.** Oligonucleótidos para la región V3 del gen 16S rRNA.

Agc338F	Bacteria V3 región (338-358)	*ACT CTA CGG AGG CAG CAG	Hacia adelante	Ampe,1999
B518R	Universal V3 región (534-518)	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Reversa	

\*cola de GC añadida al extremo 5' del primer 5' CGC CCG CCG GGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GG 3'

### 7.6.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La evaluación de la integridad del DNA se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 1X y la calidad de los amplicones obtenidos en el PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X. La mezcla se calentó en el horno de microondas por 1 min y después se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C para verterse en un acrílico. Se introdujo un peine para formar los pozos. Una vez que se gelificó, se cargó 5 µL de cada muestra con 0.5 µL de amortiguador (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA, 0.005 % azul de bromofenol, 10 % glicerol). Se colocó el gel en una cámara de electroforesis y se aplicó 65 V por 1 h. El gel se reveló con bromuro de etidio (5 µg/µL) por 15 min.

## 7.6.6 DGGE

### 7.6.6.1 PREPARACIONES DE LOS GELES (DCode System (Bio-Rad Laboratories))

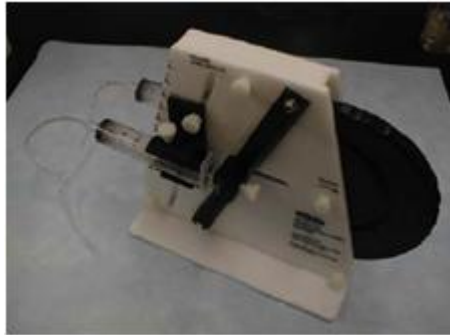
Los geles utilizados se prepararon al 8 % de acrilamida. Se preparó una solución desnaturante de baja densidad (0 % para el gel perpendicular y 20 % para el gel paralelo) y otra de alta densidad (100 % para el gel perpendicular y 90 % para el gel paralelo) (Tabla 10 y 11). Se filtraron ambas soluciones usando un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se desgasificaron por 15 min. Los vidrios, los espaciadores y el peine se colocaron en la base para hacer el gel, se montó el sistema formador de gradiente con las mangueras y dos jeringas, una jeringa con 20 mL de la solución desnaturante de baja densidad, 70  $\mu\text{L}$  de APS 10 % y 15  $\mu\text{L}$  de TEMED y la otra con 20 mL de la solución desnaturante de alta densidad, 70  $\mu\text{L}$  de APS 10 % y 15  $\mu\text{L}$  de TEMED (Figura 5). Se conectaron las mangueras a la cavidad entre los vidrios (Figura 6) y se giró la rueda del sistema formador de gradiente hasta llenarlo completamente, se colocó el peine y se esperaron 90 min para que se llevara a cabo la polimerización.

**Tabla 10.** Preparación del gel de acrilamida al 8%

Acrilamida (%)	8%
Acrilamida/Bis 40% (ml)	20
TAE 50X (ml)	2
Formamida (ml)	Ver Tabla 11
Urea (g)	Ver Tabla 11
Agua desionizada (ml)	c.b.p. 100 ml

**Tabla 11:** Cantidades requeridas de agentes desnaturantes para preparar soluciones a distintos porcentajes de desnaturante.

<b>Desnaturantes (%)</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>90</b>	<b>100</b>
Formamida (ml)	0	8	36	40
Urea (g)	0	8.4	37.8	42



**Figura 5.** Sistema formador del gradiente con las dos jeringas y mangueras



**Figura 6.** Llenado del gel

#### **7.6.6.2 GEL PERPENDICULAR**

Se mezcló todo el DNA de las muestras en un solo tubo quedando una cantidad final de 3  $\mu\text{g}$  de DNA en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ ; se agregó un volumen igual de buffer de carga (glicerol 50%, TAE 2X, azul de bromofenol 0.25%). Se realizó la electroforesis con un gradiente de desnaturalización de 0 – 100% (Tabla 11) perpendicular al voltaje de 80 v por 2 h 45 min a una temperatura constante de 60 °C.

#### **7.6.6.3 GEL PARALELO**

En cada pozo se cargaron 900 ng de DNA y buffer de corrida en un volumen total de 40  $\mu\text{L}$ . Se realizó la electroforesis con un gradiente de desnaturalización de 20 – 90% paralelo al voltaje de 80 v por 17 h a una temperatura constante de 60 °C.

#### **7.6.6.4 TINCIÓN CON PLATA**

Se retiró el gel del contenedor y se realizó la tinción con plata utilizando el Kit Plus One DNA Silver Satining, de (Pharmacia Biotech) (Tabla 12 y 13). La imagen se capturó con el equipo Kodak Image Station y el programa Carestream.

**Tabla 12:** Preparación de soluciones para tinción (GE Healthcare, DNA Silver Staining Kit)

Solución	Reactivos requeridos del Kit	Disolver en 100 ml de
Solución de fijación	25 ml de solución de fijación 5X	Solución de etanol 24 % (100 mL)
Solución de tinción	25 ml de solución de tinción 5X	100 mL Agua destilada
Solución de desarrollo	25 ml de solución de carbonato 5X 125 $\mu$ L de tiosulfato de sodio 125 $\mu$ L de formaldehído	100 mL Agua destilada
Solución de paro y preservación	25 ml de solución de paro 5X	100 mL Agua destilada

**Tabla 13.** Protocolo de tinción (GE Healthcare, DNA Silver Staining Kit)

Paso	Procedimiento	Tiempo
1. Fijación	Agitación lenta en solución de fijación	30 min
2. Tinción	Agitación lenta en solución de tinción	30 minutos
3. Lavado	Agitación lenta en Agua MilliQ (125 ml)	1 minuto
4. Desarrollo	Agitación lenta en solución de desarrollo	10 minutos o hasta que se visualicen las bandas
5. Paro	Agitación lenta en solución de paro y preservación	Al menos 30 minutos o toda la noche.

## 7.6.7 ANÁLISIS DE LAS HUELLAS DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Los geles paralelos con los patrones de las comunidades microbianas de la superficie del mango Ataulfo obtenidas con la técnica de DGGE fueron digitalizados utilizando el software Diversity Database versión 2.2 para Windows (BIORAD). Posteriormente, se determinó la similitud de la comunidad microbiana entre cada muestra y entre cada tiempo para elaborar el dendrograma que permitió la interpretación del comportamiento de la comunidad microbiana. Con el mismo software se obtuvo la intensidad de cada una de las bandas determinada como la altura del pico para obtener los índices de diversidad y de dominancia en cada una de las comunidades microbianas.

### 7.6.7.1 ÍNDICE DE RIQUEZA (R)

El estimado de riqueza (R), se obtuvo contando el número de bandas visibles para cada muestra y tiempo determinado (Nübel *et al*, 1999).

### 7.6.7.2 COEFICIENTE DE SIMILITUD DE DICE $S_D$

Para determinar la similitud entre la microbiota de las diferentes muestras y tiempos, se realizó el análisis de agrupamiento a partir de matrices de similitud mediante la presencia (1) o ausencia (0) de bandas. Con la matriz de similitud se calculó el coeficiente de similitud de Dice  $S_D$ . El coeficiente promedió los valores de similitud por cada combinación de par de muestras mediante la siguiente ecuación:

$$S_{ij} = 2a / (2a+b+c)$$

Donde:

$S_{ij}$  = coeficiente de similitud entre las muestras  $i$  y  $j$

$a$  = número de bandas compartidas por  $i$  y  $j$

$b$  = número de bandas presentes en  $i$  pero ausentes en  $j$

$c$  = número de bandas presentes en  $j$  pero ausentes en  $i$ .

Se usó el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) para calcular el dendrograma utilizando el software Diversity Database versión 2.2 para Windows (BIORAD).

### **7.6.7.3 ÍNDICE DE DIVERSIDAD**

Se obtuvo a partir del índice general de diversidad de Shannon-Weaver (H) y fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$H = - \sum P_i \log_2 P_i$$

Se utilizó la intensidad de las bandas, medida como la altura de los picos de las curvas densitométricas. Se calculó la probabilidad de encontrar un determinado individuo en la comunidad ( $P_i$ )

$$P_i = n_i / \sum n_i$$

Donde:

$n_i$ : la altura del pico  $i$  en la curva densitométrica.

### **7.6.7.4 ÍNDICE DE DOMINANCIA DE SIMPSON (S)**

El índice de dominancia de Simpson (1949) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$S = \sum (P_i)^2$$

Donde:

S= índice de diversidad de Simpson.

$P_i$ : proporción de individuos de la especie  $i$  en la comunidad.

### **7.6.7.5 RECUPERACIÓN, REAMPLIFICACIÓN PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA DE LOS GELES DE DGGE**

La banda seleccionada se cortó del gel con un bisturí y pinzas estériles, se depositó en un microtubo con 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril. Los tubos se incubaron a 37°C por 1 h, después a 4°C por 3 días. Las muestras se llevaron a una concentración de 5 ng/ $\mu$ L y 10  $\mu$ L del sobrenadante se utilizó para realizar el PCR (protocolo de la tabla 10) con los mismos oligonucleótidos B518R y Agc338F sin cola G-C. Se realizó la electroforesis con las muestras y las señales se cuantificaron usando el software Diversity Database versión 2.2 para Windows (BIORAD). Se purificó el DNA utilizando el kit Montage PCR Centrifugal Filter Devices. El DNA se resuspendió en un volumen final de 20  $\mu$ L de agua desionizada estéril. El DNA purificado se guardó en tubos

ependorf a -20°C con parafilm hasta que fueron enviados a secuenciar. Las secuenciaciones se realizaron en Macrogen (Korea).

#### **7.6.7.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS**

Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en la base de datos del GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el algoritmo BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool). Se buscaron secuencias correspondientes al gen, optimizado por el programa megablast (Highly similar sequences).

#### **7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos se presentaron como promedio  $\pm$  error estándar de la media, se analizaron con el programa Prism 5 (GraphPad) usando la prueba ANOVA de dos vías, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni en el caso del experimento de sobrevivencia, índice de diversidad, índice de dominancia y riqueza; para el análisis sensorial y los experimentos de calidad se utilizó una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 8.1 CORROBORACIÓN DE LA IDENTIDAD DE LA CEPA *E. coli*

La identificación bioquímica de las cepas mediante el equipo automatizado Vitek es importante para asegurarnos que la cepa en este estudio fuera *Escherichia coli* y no otro microorganismo. Un análisis bioquímico en este equipo nos da un resultado confiable en corto tiempo. En la tinción de Gram se observaron bacilos cortos Gram negativos y con las 30 pruebas bioquímicas que se incluyen en las tarjetas GNI+ (Tabla 14) la cepa finalmente se identificó como *Escherichia coli* con 99% de certeza.

**Tabla 14.** Resultados obtenidos por el sistema automatizado Vitek®

DP-3 (-)	OFG (+)	GC (+)	ACE (-)	ESC (-)	PLI (-)
URE (-)	CIT (-)	MAL (-)	TDA (-)	PXB (-)	LAC (+)
MLT (+)	MAN (+)	XYL (+)	RAF (-)	SOR (+)	SUC (-)
INO (-)	ADO (-)	COU (+)	H <sub>2</sub> S (-)	ONP (+)	RHA (-)
ARA (+)	GLU (+)	ARG (-)	LYS (+)	ORN (-)	OXI (-)

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación. El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual se asocia con un cuadro clínico en particular. El serogrupo de la cepa en este estudio fue O102; y su serotipo O102:H6 perteneciente al grupo de las enteropatógenas (EPEC) (Vélez *et al*, 2001)

### 8.2 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA SOBREVIVENCIA DE *E. coli* O102:H6 Y EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MANGO ATAULFO

#### 8.2.1 TRATAMIENTO DE LOS MANGOS

Los mangos se enviaron irradiar a 3 diferentes dosis (0.5, 1, 1.5 KGy) en el Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) el 16 de agosto de 2010 con una tasa de dosis de 26.2 Gy/min.



## 8.2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA

De acuerdo con la norma NMX-FF-058-SCFI-2006 (Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruta fresca – mango (*Mangifera indica* L.) – Especificaciones) la calidad de los mangos fue de Categoría II al presentar cubrimiento de látex, manchas de lluvia en algunos de los mangos (manchas irregulares de color más oscuro que la cáscara). Su peso y longitud polar y ecuatorial (tabla 15) fueron menores que los establecidos en esta norma. El mango Ataulfo presentó forma alargada, cáscara suave, lisa y de color verde ligeramente amarillo.

**Tabla 15.** Características físicas del mango Ataulfo

Parámetro	
Peso (g)	104.9 ± 43.8
Largo ecuatorial (cm)	9.81 ± 0.63
Longitud polar (cm)	5.78 ± 0.29

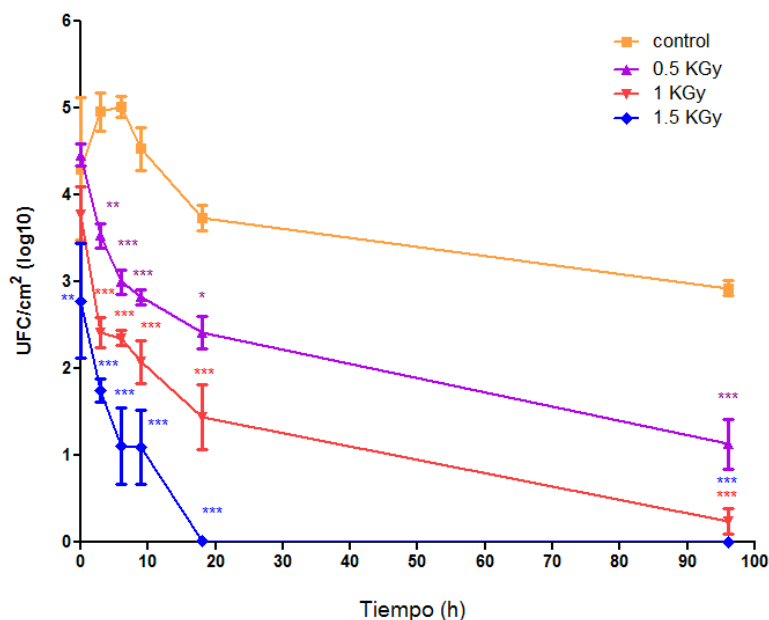
Los datos muestran el valor promedio ± desviación estándar, n=192

## 8.2.3 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA SOBREVIVENCIA DE *E. coli* O102:H6

En la figura 7 se observa que la mortalidad de *E. coli* O102:H6 no siguió una línea recta. Hay un creciente número de publicaciones y observaciones que muestran que la sobrevivencia vs tiempo es claramente una relación no lineal. De acuerdo con Peleg y Cole (1998), la curva resultante es una forma acumulativa de eventos temporales de muerte de diferentes subpoblaciones de un mismo microorganismo. Dada la variabilidad natural que hay en una cepa (mezcla de subpoblaciones), se tienen diferentes espectros de resistencia; por lo tanto, los microorganismos van muriendo en diferentes tiempos.

Resistencia no necesariamente significa “resistencia a la radiación”. La irradiación gamma de cualquier sistema biológico, produce la absorción de una porción de la energía incidente en sitios al azar dentro del sistema biológico (Little, 2000; Roginskaya y Razskazovskiy, 2009; ININ, 2011b), dando lugar a especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Estas moléculas se difunden desde los sitios de su formación y dañan a ácidos nucleicos (EUROATOM, 2008; Gill y Tuteja, 2010), a lípidos (Gill y Tuteja, 2010; Tyurina *et al*, 2011), a proteínas (Gill y Tuteja, 2010; ININb,

2011b) y a carbohidratos (Gill y Tuteja, 2010; ININ, 2011b). Si las moléculas que han sido dañadas, son las que desempeñan un papel crítico en la proliferación celular, entonces pierden su capacidad para realizar esta función vital, y la célula ya no puede multiplicarse (ININ, 2011). Esto quiere decir que algunos microorganismos tuvieron daños en genes esenciales y otros no, o algunos tuvieron un mayor número de mutaciones o daños en sus macromoléculas que otros; y como consecuencias murieron en diferentes tiempos.



**Figura 7.** Efecto de las dosis de radiación gamma de 0.5, 1 y 1.5 KGy en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 en la superficie del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=5 ensayos en medio nutritivo con 50  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 24 h. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto al control mediante una prueba de Bonferroni. \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

#### **Mangos control** (Figura 7)

Los mangos control tuvieron una cuenta inicial de 4.3 UFC/mL (log10); durante las primeras 6 h hubo un aumento de *E. coli* O102:H6 indicando que se adaptó al microambiente llegando a un máximo pico de sobrevivencia con 5.0 UFC/mL (log10). Después de estas 6 h empezaron a disminuir las cuentas hasta las 96 h con 2.9 UFC/mL (log10). Del tiempo cero a las 96 h hubo una disminución de 1.4 ciclos logarítmicos.

### **Mangos irradiados con 0.5 KGy vs mangos control (Figura 7)**

En el tiempo cero no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), a las 3 h la sobrevivencia en los mangos tratados disminuyó 1.4 ciclos logarítmicos con respecto a los mangos control siendo altamente significativo ( $p < 0.01$ ). A las 6 y 9 horas la diferencia fue más marcada, con una disminución de 2.0 y 1.7 ciclos logarítmicos respectivamente entre los mangos irradiados y los mangos control siendo alta y significativa ( $p < 0.001$ ). A las 96 horas el grupo control tuvo una cuenta final de 2.9 UFC/mL ( $\log_{10}$ ) y los mangos tratados de 1.1 UFC/mL ( $\log_{10}$ ), siendo esta diferencia alta y significativa ( $p < 0.001$ ). Del tiempo cero a las 96 h disminuyó 3.3 ciclos logarítmicos en los mangos irradiados, 1.9 unidades de diferencia con respecto al control.

### **Mangos irradiados con 1 KGy vs mangos control (Figura 7)**

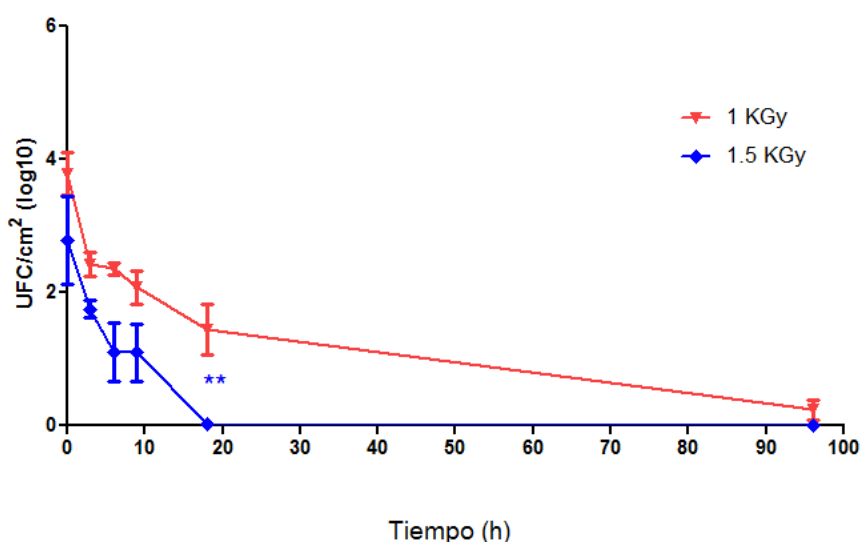
En el tiempo cero no hubo diferencia significativa entre los mangos irradiados a 1 KGy y los mangos control, a partir de las 3 horas hubo una diferencia alta y significativa con respecto al control ( $p < 0.001$ ), y esta se mantuvo hasta las 96 h. La mayor diferencia se presentó a las 6 y 96 h, donde la sobrevivencia en los mangos tratados disminuyó 2.6 y 2.7 ciclos logarítmicos respectivamente con respecto al control. Del tiempo cero a las 96 h disminuyó 3.5 ciclos logarítmicos en los mangos irradiados, 2.1 unidades de diferencia con respecto al control.

### **Mangos irradiados con 1.5 KGy vs mangos control (Figura 7)**

A diferencia de las otras dosis, con la dosis de 1.5 KGy sí hubo una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.01$ ) desde el tiempo cero con respecto al control; a las 3 h esa diferencia fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ), y esto se mantuvo hasta las 96 h. La mayor diferencia se presentó a las 6 y 18 h, donde la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 en los mangos irradiados disminuyó 3.9 y 3.7 ciclos logarítmicos respectivamente. Del tiempo cero a las 18 h disminuyó 2.8 ciclos logarítmicos con respecto al control. Es 0.7 ciclos logarítmicos menos que en los mangos irradiados a 1 KGy; pero, esto fue porque desde el tiempo cero hubo una disminución de 1.5 ciclos logarítmicos con la dosis de 1.5 KGy que no se observó en los mangos sometidos a 1 KGy y desde las 18 h ya no se encontraron microorganismos en los mangos sometidos a la dosis más alta.

### Mangos irradiados con 1 KGy vs mangos irradiados con 1.5 KGy (Figura 8)

Actualmente, los protocolos desarrollados con la técnica de irradiación gamma en el mango permiten una dosis máxima de 1KGy (USDA, 2003); por lo tanto, se compararon los resultados de esta dosis con la dosis más alta evaluada en este estudio de 1.5 KGy. Sólo hubo una diferencia altamente significativa a las 18 h ( $p < 0.01$ ), donde hubo una disminución de 1.4 ciclos logarítmicos en los mangos de 1.5 KGy con respecto a los mangos tratados a 1 KGy. Sin embargo, esta diferencia ya no existió a las 96 h. Con ambas dosis se llegó a resultados similares a las 96 h; la diferencia es que con la dosis de 1.5 KGy se llegó más rápido.



**Figura 8.** Efecto de la radiación gamma (dosis 1.5 KGy) en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 en la superficie del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM,  $n=5$  ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto a los mangos tratados a 1 KGy mediante una prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

A mayor dosis de radiación gamma menor la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6. El mango Ataulfo está compuesto principalmente de agua (83.8%); por lo tanto las ionizaciones (provocada principalmente por la radiólisis del agua) que producen los rayos gamma actúan interrumpiendo procesos fisiológicos dañando a hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El daño a hidratos de carbono provoca su deshidratación, la oxidación del grupo alcohol a cetona o su dimerización (Molins, 2003). El daño a proteínas incluye la carbonilación de ciertos aminoácidos (prolina, arginina, lisina y treonina), la oxidación de grupos sulfhidrilos en metionina y cisteína,

la introducción de grupos hidroxilos en fenilalanina y tirosina, la ruptura del anillo de triptófano, la escisión del enlace peptídico, la desaminación de la histidina y la formación de dímeros de tirosina (Slade y Rodman, 2011). La radiación gamma puede provocar el desdoblamiento, la agregación o la degradación de las proteínas al alterar las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de éstas (Molins, 2003). La radiación de lípidos conduce a radicales catiónicos donde la carga positiva puede migrar al grupo carboxilo o a los dobles enlaces. Esto provoca que se rompan enlaces cercanos a los grupos carbonilo dando como resultado un radical libre que puede aceptar o perder átomo de hidrógeno para dar compuestos  $C_{n-1}$  saturados (alcanos) o insaturados (alquenos), respectivamente (Molins, 2003). Varios estudios indican que las radiaciones ionizantes alteran, principalmente, la estructura de las membranas (Estévez-Tapia, 2013). Y el daño a ácidos nucleicos provocando SSB, DSB, pérdida de una o más bases, la modificación química de alguna base, la ligadura entre dos bases contiguas (dímeros de timina o citosina), alteración de los azúcares que pueden ser oxidados y después hidrolizados con liberación de la base, modificar la estructura del DNA. La alteración en la forma de la molécula es el origen de anomalías en la replicación y en la transcripción (Almeida *et al*, 2004).

Todos los daños producidos por la radiación gamma provocan que la división celular no tenga lugar correctamente y disminuya la sobrevivencia del microorganismo (ININ, 2011a). A mayor dosis, mayor número de ionizaciones y mayor el daño a las macromoléculas.

Con la dosis de 1 y 1.5 KGy, los mangos tuvieron cuentas cercanas a cero para la enterobacteria *E. coli* O102:H6. Sin embargo, las dosis de radiación gamma en las que se ve un efecto en los microorganismos, varían según el alimento, incluso entre las variedades de un mismo alimento. Por ejemplo, se investigó la sensibilidad a la radiación de un aislado de *E. coli* O157:H7 que produjo un brote en cuatro tipos de lechuga y se encontraron diferencias significativas dependiendo del tipo de lechuga (Rossi *et al*, 2009). Un estudio pudo establecer que las dosis de 0.26-0.34 KGy a una temperatura de irradiación de 19 °C son suficientes para la inactivación de *E. coli* O157:H7 en alfalfa inoculada, brócoli, y brotes de rábanos, dosis muy similares a aquellas observadas para su inactivación en carnes. En el caso de las semillas de alfalfa, rábanos y habas, se llegó a la conclusión que solamente una dosis de irradiación de 2 KGy, en combinación con calor seco, lo eliminaba completamente de las semillas de alfalfa y de las habas, pero que era necesario una dosis de 2.5 KGy para eliminar los patógenos de las semillas de rábanos (Rossi *et al*, 2009).

## 8.2.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MANGO ATAULFO

### 8.2.4.1 RESPIRACIÓN DEL MANGO ATAULFO

Durante la maduración, a través del metabolismo, se sintetizan proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos y sustancias volátiles. Estos procesos anabólicos requieren de energía, la cual es suministrada en el fruto por la actividad respiratoria (Nelson y Cox, 2000).

Durante la respiración el fruto extrae energía de moléculas orgánicas, como azúcares y ácidos orgánicos (degradación oxidante), por un proceso complejo en el que se forma dióxido de carbono y agua, con liberación de energía (FAO, 1987).

El mango es un fruto climatérico (FAO, 1987); por lo que, la intensidad respiratoria de las frutas disminuye durante su desarrollo y también después de la recolección (preclimaterio), posterior a éste hay un aumento de su respiración hasta un máximo (pico climatérico) que luego disminuye al comenzar la senescencia o postclimaterio (Figura 9) (Bolívar-Fernández *et al*, 2011a).

De acuerdo con los resultados (Figura 10); en el día uno, se observó que los mangos control presentaron la menor tasa de respiración con una producción de 91.21 mg CO<sub>2</sub>/Kgh correspondiente al preclimaterio; el cuarto y quinto día se presentaron los valores más altos con 296.68 y 268.15 mg CO<sub>2</sub>/Kgh, respectivamente y que corresponden al máximo climaterio; para después iniciar con el postclimaterio disminuyendo la respiración hasta 91.45 mg CO<sub>2</sub>/Kgh en el onceavo día.

Los mangos tratados por radiación gamma presentaron diferencias significativas con respecto al control solo en los primeros días, ya que los mangos control tuvieron una respiración baja. La dosis de 0.5 Kgy tuvo una diferencia significativa de 169.7 mg CO<sub>2</sub>/Kgh en el primer día y de 144.7 mg CO<sub>2</sub>/Kgh en el segundo con una ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente).

La respiración de los mangos tratados con una dosis de 1 Kgy tuvieron diferencias significativas de 217.3 y de 240.7 mg CO<sub>2</sub>/Kgh con respecto al control el primero y segundo día respectivamente ( $p < 0.001$ ) y en el tercer día hubo una diferencia de 193 mg CO<sub>2</sub>/Kgh con una  $p < 0.01$ .

La respiración de los mangos tratados con una dosis de 1.5 KGy fue mayor durante los primeros 3 días (diferencias de 240.8, 338.1 y 254.9 mg CO<sub>2</sub>/Kgh) siendo éstas diferencia altas y significativas con respecto al control ( $p < 0.001$ ).

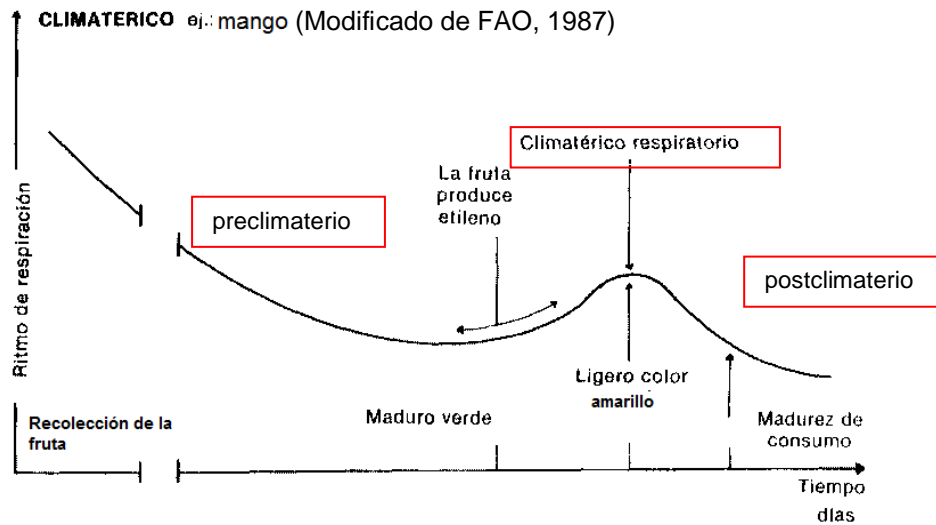


Figura 9. Modelo climatérico de respiración del mango.

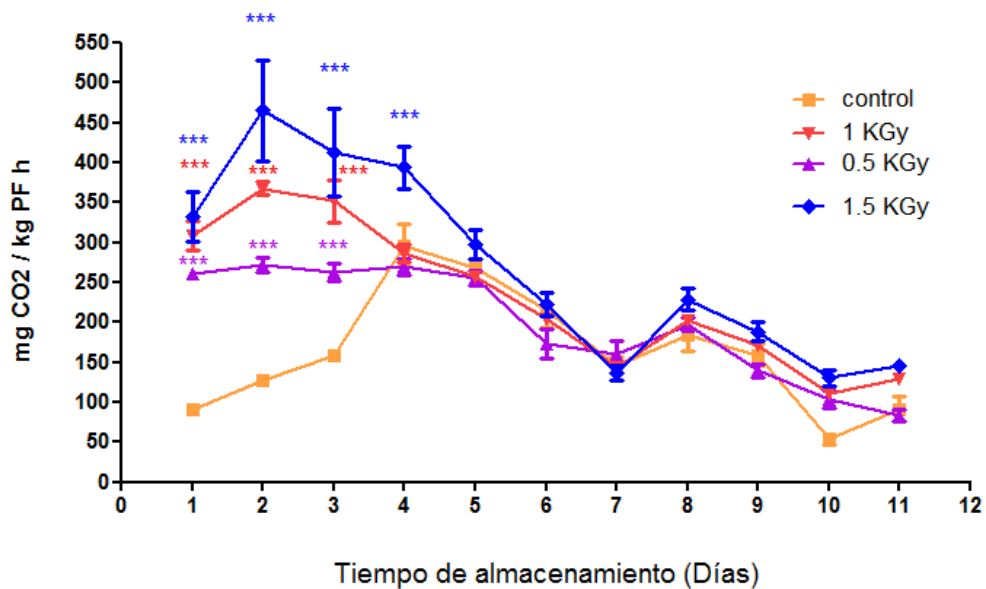


Figura 10. Efecto de la radiación gamma en la respiración de mangos Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$  ensayos. De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. mangos control.

Ya se ha observado que la respiración de los mangos aumenta inmediatamente después del tratamiento de radiación gamma (Arévalo-Galarza *et al*, 2002; Molins, 2003). Hernández y colaboradores (2008) encontraron que la fruta tenía una respiración mayor en condiciones de estrés como el estrés oxidante que genera la radiación gamma.

Un aumento en la actividad respiratoria está asociado con una mayor síntesis de las enzimas que participan en la vía respiratoria por el incremento en la producción de etileno. Esta fitohormona involucrada en la maduración del fruto, también es una hormona del estrés, cuya síntesis es inducida por varias condiciones de estrés abiótico como la radiación que causa estrés oxidante. Cuando existe estrés, el incremento en la biosíntesis del etileno se debe al aumento en la actividad transcripcional del gen de la ACC-sintasa, enzima que convierte AdoMet en ACC, para que luego éste se oxide y forme el etileno (Fernández-Amaro, 2012). En frutas como el aguacate se ha observado un incremento de etileno los primeros días después de la irradiación para luego disminuir drásticamente probablemente debido a daños en las membranas ya que la enzima ACC oxidasa, reguladora del paso de ACC a etileno está localizada en el tonoplasto (Arévalo-Galarza *et al*, 2002; Estévez-Tapia, 2013).













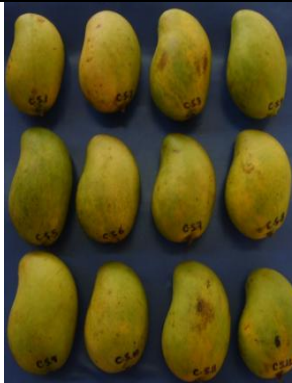



Varios estreses abióticos originan la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en plantas (Gill y Tuteja, 2010) y la respiración es un indicador para medir el impacto que tienen estos estreses en el fruto (Hodges y Toivonen, 2008).

El aumento en la tasa de respiración en los primeros días de los mangos irradiados pudo deberse al estrés que sufrieron por la aplicación de la dosis. A mayor dosis de radiación, mayor el estrés oxidante y mayor fue la tasa de respiración.

En el máximo climaterio los mangos tratados a 0.5 KGy presentaron un pico de producción de CO<sub>2</sub> de 269.99 mg CO<sub>2</sub>/Kgh, mientras que los mangos sometidos a dosis de 1 y 1.5 KGy presentaron una respiración de 287.57 y 393.87 mg CO<sub>2</sub>/Kgh, respectivamente; indicando que a mayor dosis mayor producción de CO<sub>2</sub> durante los primeros días. En el postclimaterio mantuvieron el mismo comportamiento que los mangos control (Figura 10). El hecho de que la respiración disminuyera a partir del cuarto día es un indicador de que también disminuyó el estrés.



**Tabla 16.** Tabla comparativa de mango Ataulfo irradiado a diferentes dosis

Tratamiento	Día 1	Día 5	Día 8	Día 12
Control Lavado				
Dosis 0.5 KGy				
Dosis 1 KGy				
Dosis 1.5 KGy				

#### **8.2.4.2 APARIENCIA DE LOS MANGOS ATAULFO (Tabla 16)**

En el día 1 después de la irradiación, se observó uniformidad en el color, forma y tamaño de los diferentes grupos de mangos. El color de la piel fue verde con ligera tendencia a amarillo, los que tendían más hacia el amarillo fueron los mangos control. En el quinto y octavo día se observó la evolución del color de verde a amarillo con respecto al día 1. El cambio de color es debido a la degradación de la clorofila a feofitina y luego a otros compuestos incoloros por medio de sistemas químicos (procesamiento térmico, por frío, pH ácido) o enzimáticos (por la acción de la clorofilasa), desenmascarando e iniciando la síntesis de otros pigmentos como los carotenoides que le dan el color amarillo al mango (Barreiro y Sandoval, 2006).

El color es el criterio más importante utilizado por el consumidor para decidir si el fruto está maduro o no. En el doceavo día se pudo observar el retraso en la maduración de los mangos irradiados. El color de la piel del grupo control fue amarillo opaco y oscuro con aparición de manchas negras (posible infección por antracnosis); mientras que los mangos irradiados permanecieron verde-amarillos y no presentaron marcas de quemaduras.

#### **8.2.4.3 COLOR DE LA CÁSCARA DEL MANGO ATAULFO**

Los cambios en el color no reflejaron una tendencia asociada al tratamiento de radiación gamma. Los mangos irradiados se comportaron con la misma tendencia que el grupo control ( $p > 0.05$ ). Se ha observado que en la irradiación de mangos verdes, no se tiene un efecto sobre el nivel de carotenoides en la maduración, aunque si se retrasa la degradación de la clorofila en la piel (Molins, 2003).

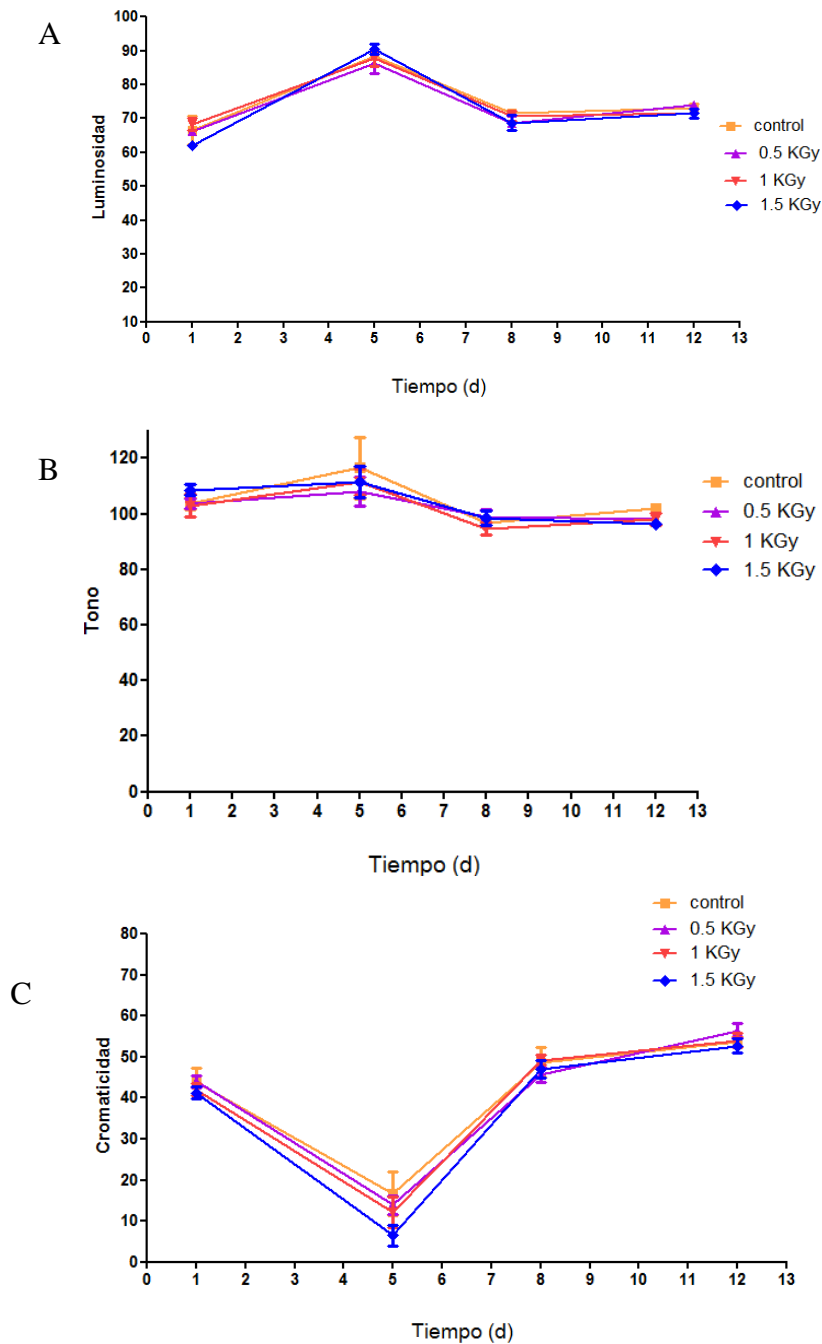
#### **Luminosidad (L) (Figura 11-A)**

En el quinto día se presentó el mayor grado de luminosidad con valores de 91 a 97. Posteriormente su luminosidad descendió a valores cercanos a 70 ( $p \geq 0.05$ ).

#### **Tono (Figura 11-B)**

El grupo control y los mangos sometidos a las diferentes dosis no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el tono (Figura 11-B). El tono disminuyó ligeramente de un valor promedio de 108.29 en el preclimaterio (color verde-

amarillento) a un valor promedio de 98.6 (color amarillo) en el postclimaterio; es decir se volvió más amarillo. Se observó sólo una ligera disminución debido a que los mangos eran de categoría II y ya tenían un color verde ligeramente amarillo.



**Figura 11.** Efecto de la radiación gamma en la luminosidad, tono y cromaticidad de la piel del mango Ataulfo medido con el colorímetro Minolta. **A)** Luminosidad, reflexión nula o color negro ( $L=0$ ) a reflexión perfecta o blanca ( $L=100$ ) **B)** Tono, calculado con la ecuación  $h^{\circ} = \pi - \arctan a/b$  donde:  $90$ =amarillo y  $180$ =verde. **C)** Cromaticidad, calculado con la ecuación  $C = (a^2 + b^2)^{1/2}$ . Los datos son promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$  ensayos. De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni: \*\*\*  $p<0.001$  vs. mangos control.

### **Cromaticidad** (Figura 11-C)

Los mangos irradiados a las diferentes dosis no presentaron diferencias significativas en la cromaticidad con respecto a los mangos control ( $p > 0.05$ ). Sin embargo sí hubo diferencias entre los diferentes estadíos. La cromaticidad indica el grado de saturación del tono o la intensidad de éste. Un menor valor indica un color menos intenso. En el quinto día fue cuando se obtuvo el color menos intenso de todos los estadíos.

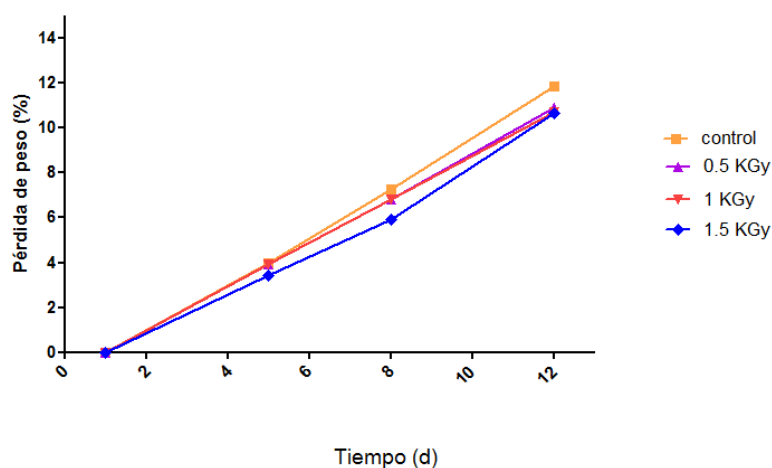
Esto puede explicarse por que en el inicio del climaterio es cuando comienza a degradarse la clorofila (Rodríguez y Romo, 2010); posteriormente aumenta la biosíntesis de carotenoides (Primo, 1997) responsables de darle al mango un color amarillo más intenso y no tan luminoso. Si se comparan con las gráficas de tono, cromaticidad y luminosidad, el primer día el mango presentó un color verde-amarillento con la menor luminosidad en comparación con los otros estadíos, el quinto día los mangos presentaron un amarillo poco intenso y en el octavo y doceavo día los mangos presentaron un amarillo más intenso y menos luminoso.

#### **8.2.4.4 PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE LOS MANGOS** (Figura 12)

El porcentaje de pérdida de peso es la diferencia entre el peso de los mangos en el tiempo "x" con respecto al peso inicial (tiempo 0). La pérdida de peso es una consecuencia directa de la disminución del contenido de agua por efecto de los procesos fisiológicos y bioquímicos que se dan durante la maduración de la fruta.

En la etapa de crecimiento el mango tiene un abastecimiento abundante de agua a través del sistema radicular de la planta. Con la cosecha, este abastecimiento de agua se detiene y el fruto debe sobrevivir con sus propias reservas. El fruto cosechado pierde agua hacia la atmósfera, tal como lo hacía antes de la cosecha, por un proceso conocido como transpiración, que no puede ser reemplazada. La atmósfera interna de la fruta está saturada con vapor de agua y el aire circundante esta menos saturado. Existe pues, un gradiente a lo largo del cual el vapor de agua se mueve desde la fruta al aire que lo rodea. La velocidad con que se pierde esta agua es un factor determinante en la vida de postcosecha de la fruta. La pérdida de agua causa una disminución significativa del peso y a medida que avanza, disminuye la apariencia y elasticidad del producto perdiendo su turgencia, es decir, se vuelve blando y marchito (FAO, 1987).

En la figura 12 podemos observar que los mangos control perdieron mayor cantidad de peso que los mangos tratados con radiación gamma, aunque esta pérdida de peso fue poca. Al doceavo día, la reducción del grupo control fue de 11.84%; para la dosis de 0.5 KGy fue de 10.94%; para la dosis de 1 KGy fue de 10.73% y para la dosis de 1.5 KGy fue de 10.68%. A mayor dosis de radiación gamma menor fue la pérdida de peso, aunque ésta no fue significativa con respecto al control ( $p>0.05$ ).



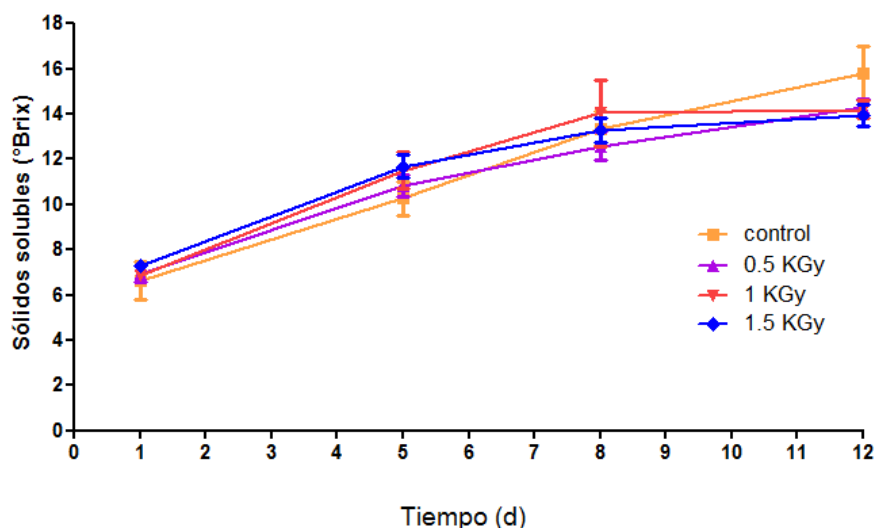
**Figura 12.** Efecto de la radiación gamma en la pérdida de peso del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$  ensayos. De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni: \*  $p<0.05$  vs. mangos control.

#### 8.2.4.5 SÓLIDOS SOLUBLES EN LA PULPA DEL MANGO (Figura 13)

Durante la maduración del fruto el metabolismo modifica el contenido de carbohidratos, principalmente en la conversión del almidón en azúcares solubles como la glucosa, la sacarosa y la fructosa. A pesar del consumo de una parte de estos azúcares solubles por la actividad respiratoria; se produce un aumento de su contenido por la hidrólisis del almidón, que hace a los productos más dulces y aceptables para el consumidor. La hidrólisis del almidón es uno de los cambios más comunes que acompaña la maduración de muchos frutos climatéricos como lo es el mango (Blandón-Navarro, 2012).

En la gráfica se observa que el contenido de sólidos solubles aumentó a medida que maduró el fruto debido, probablemente, a la hidrólisis del almidón. No se observó efecto de la radiación gamma sobre el contenido de los sólidos solubles. Los cambios en los °Brix de los diferentes tratamientos (0.5 KGy, 1 KGy, 1.5 KGy) no tuvieron diferencias significativas con respecto al control ( $p>0.05$ ), se comportaron con la

misma tendencia. Sin embargo, a medida que avanzó el grado de madurez, se reflejó el retraso de la maduración en dicho parámetro ya que el grupo control tuvo mayor contenido de sólidos solubles en el doceavo día (15.82 °Brix) que los mangos irradiados a 0.5 KGy (14.3 °Brix), a 1 KGy (14.2 °Brix) y a 1.5 KGy (13.95 °Brix) aunque no fue estadísticamente significativo.



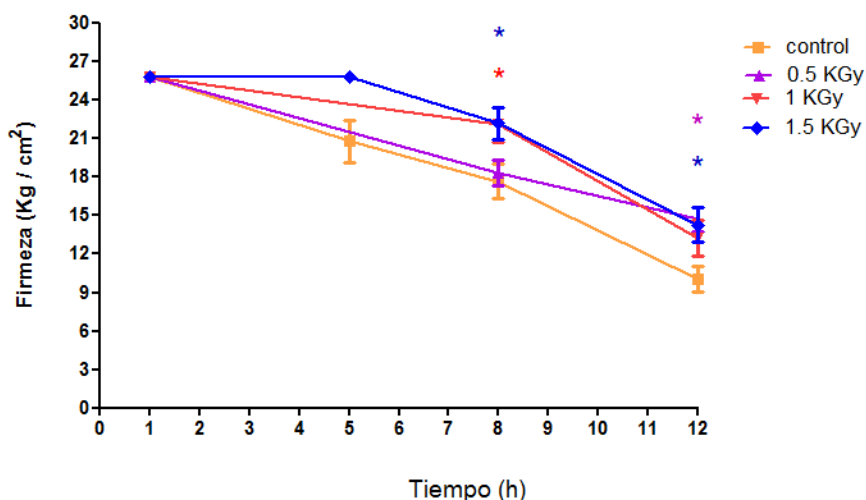
**Figura 13.** Efecto de la radiación gamma en el contenido de sólidos solubles en el mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=3 ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto al control lavado mediante una prueba de Bonferroni, \* $p < 0.05$  vs el control.

#### 8.2.4.6 FIRMEZA DE LA PULPA DEL MANGO ATAULFO (Figura 14)

La pectina es un polisacárido de ácido poligalacturónico que tiene la propiedad de dar firmeza a los alimentos ya que es un componente que enlaza la pared celular de los tejidos vegetales. Durante la maduración se activan enzimas que actúan a nivel de la pared celular como son la poligalacturonasa o pectinasa y la pectin metil esterasa y que pasan las protopectinas insolubles a pectinas solubles en la pulpa del mango; como consecuencia, la firmeza disminuye a medida que madura la fruta (Blandón-Navarro, 2012).

Los mangos irradiados a una dosis de 1 KGy fueron 4.4 veces más firmes que el control y los irradiados a 1.5 KGy fueron 4.5 veces más firmes que el control en el octavo día ( $p < 0.05$ ). Los mangos irradiados a una dosis de 0.5 KGy presentaron diferencias significativas con respecto al control solo hasta el doceavo día con una

diferencia de 4.6 ( $p < 0.05$ ). En el postclimaterio, los mangos con la dosis de 1.5 KGy presentaron la mayor firmeza ( $14.29 \text{ Kg/cm}^2$ ) con respecto al control ( $10.08 \text{ Kg/cm}^2$ ) ( $p < 0.05$ ).

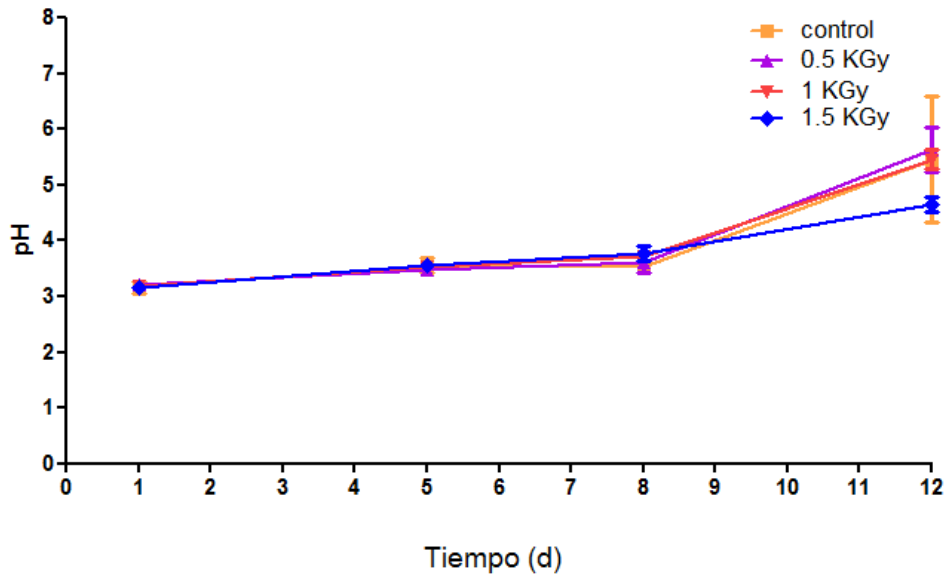


**Figura 14.** Efecto de la radiación gamma en la firmeza del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM,  $n=3$  ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto al control lavado mediante una prueba de Bonferroni  $*p < 0.05$ .

#### 8.2.4.7 pH DE LA PULPA DEL MANGO ATAULFO (Figura 15)

El mango es inicialmente ácido (Thanaraj *et al*, 2009). Durante la maduración aumenta el pH debido a que los ácidos orgánicos son degradados o convertidos en azúcares (Blandón-Navarro, 2012). Se encontró que el tratamiento de radiación gamma, no tuvo efecto sobre estos cambios de pH.

Debido al proceso normal de maduración todos los mangos presentaron un incremento en el pH. Los cambios de pH de los mangos tratados a las diferentes dosis de radiación gamma (0.5 KGy, 1 KGy, 1.5 KGy) no tuvieron diferencias significativas con respecto al control ( $p > 0.05$ ), se comportaron con la misma tendencia. Los mangos control presentaron un pH final de 5.46 en el post-climaterio, los mangos con la dosis de 0.5 KGy presentaron un pH de 5.64, los sometidos a la dosis de 1 KGy un pH de 5.46 y los de 1.5 KGy tuvieron un pH de 4.64.



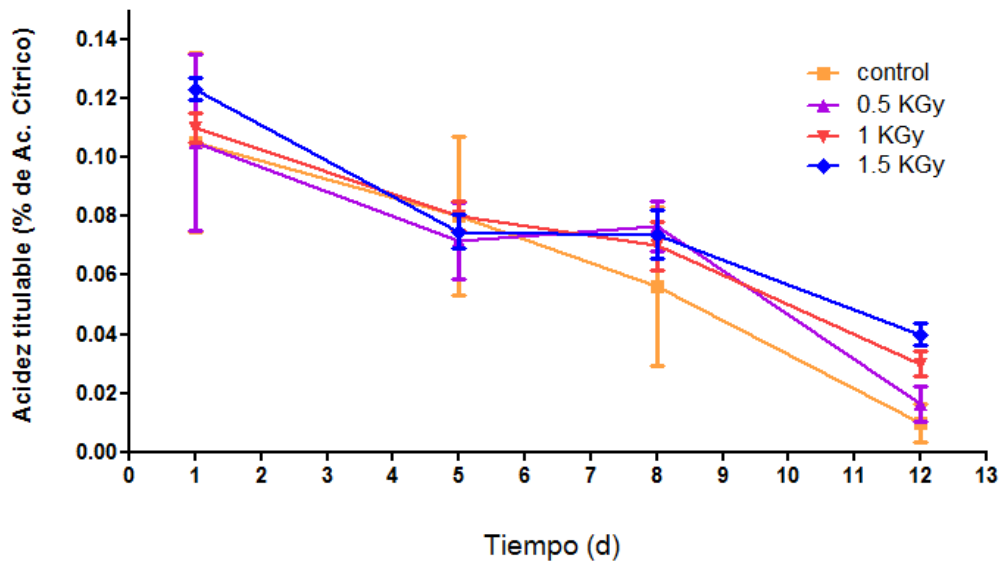
**Figura 15.** Efecto de la radiación gamma en el pH del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=3 ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto al control lavado mediante una prueba de Bonferroni  $*p < 0.05$ .

#### 8.2.4.8 ACIDEZ DE LA PULPA DEL MANGO ATAU LFO (Figura 16)

La maduración de la fruta es acompañada por cambios en el contenido de los ácidos orgánicos. Estos alcanzan su máximo durante el crecimiento y desarrollo de la fruta en el árbol. La maduración presupone un descenso de la acidez, debido a que los ácidos orgánicos se degradan o son convertidos a azúcares disminuyendo su concentración en el curso de la maduración; siendo esta disminución de ácidos orgánicos responsable de que el sabor ácido disminuya (Blandón-Navarro, 2012).

El porcentaje de acidez determinado volumétricamente se reportó como ácido cítrico ya que es el principal ácido orgánico en el mango. El tratamiento de radiación gamma no tuvo un efecto sobre los cambios en la acidez. Los cambios en la acidez en los mangos de los diferentes tratamientos (0.5 KGy, 1 KGy, 1.5 KGy) no tuvieron diferencias significativas con respecto al control ( $p > 0.05$ ), se comportaron con la misma tendencia. Al doceavo día de almacenamiento, los mangos control tuvieron el menor porcentaje de acidez con 0.0099 %, seguido de los mangos irradiados a 0.5 KGy con 0.0165%, y después las dosis altas de 1 KGy y 1.5 KGy que presentaron el mayor porcentaje de acidez con 0.03% y 0.0399% respectivamente. Estos datos concordaron con los obtenidos en el pH, ya que a mayor dosis de radiación gamma mayor fue el porcentaje de acidez en el postclimaterio y menor el pH aunque estas diferencias no fueron significativas ( $p \geq 0.05$ ).





**Figura 16.** Efecto de la radiación gamma en la acidez del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=3 ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto al control lavado mediante una prueba de Bonferroni \* $p < 0.05$ .

Los cambios en los parámetros de control de calidad evaluados no reflejaron una modificación asociada al tratamiento de radiación gamma. Sin embargo, se pudo apreciar en los parámetros fisicoquímicos de pérdida de peso, firmeza, contenido de sólidos solubles, pH y acidez que a mayor dosis de radiación gamma el proceso de maduración fue menor. Se ha postulado que la inhibición de la maduración provocada por la irradiación implica una sensibilidad disminuida a la acción del etileno y/o una disminución en la producción del mismo debido a daños en la membrana celular ya que la enzima ACC oxidasa, reguladora del paso de ACC a etileno está localizada en el tonoplasto (Arévalo-Galarza *et al*, 2002). Al inhibir ACC oxidasa, se inhibe la biosíntesis de etileno, fitohormona responsable de regular la maduración del fruto (Molins, 2003). También se ha atribuido el retraso de la maduración a alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono y la interferencia resultante en la producción del ATP necesario para los procesos biosintéticos durante la maduración. En mangos se ha observado un deterioro de la actividad de la succinato deshidrogenasa después de la irradiación (Molins, 2003). La enzima succinato deshidrogenasa (SDH) forma parte de un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones; y al ser inhibida reduce la producción de ATP y como consecuencia la maduración es más lenta (Molins, 2003).

### 8.3 ANÁLISIS SENSORIAL



Inocuidad alimentaria implica la garantía de que el consumo de alimentos no cause daño en la salud de los consumidores, lo cual se puede alcanzar minimizando los peligros biológicos, físicos y químicos durante todo el proceso de producción, empaque, comercialización y consumo. Sin embargo, la comunidad internacional no solo considera importante la inocuidad alimentaria; sino también la calidad alimentaria que incluye atributos como color, aroma, apariencia y sabor (Osuna *et al*, 2007). Por esta razón fue importante realizar un análisis sensorial; para poder evaluar el efecto del método postcosecha en la aceptación del consumidor frente al mango irradiado.

La evaluación sensorial se ocupa de la medición y cuantificación de las características de un producto, las cuales son percibidas por los sentidos humanos. Por una parte, los análisis colorimétricos y químicos proporcionaron buenas correlaciones unidimensionales de los atributos sensoriales individuales; en cambio, las respuestas sensoriales son más complejas debido a la integración simultánea de señales múltiples (apariencia, aroma, gusto, etc.) las cuales el panelista asocia con su experiencia pasada.

#### 8.3.1 GENERACIÓN DE DESCRIPTORES

En la primera parte del experimento, los 15 panelistas proporcionaron una descripción de las propiedades sensoriales del mango sin irradiar. De estas descripciones, se generaron descriptores de apariencia (tabla 17), de sabor/aroma (tabla 18) y de textura (tabla 19).

**Tabla 17.** Descriptores de apariencia generados para evaluar el mango Ataulfo (Arias-Balderas, 2012; Carrasco-García, 2010)

Atributos	Definición	Escala
Color	Radiaciones electromagnéticas que un objeto emite o refleja hacia su entorno. Es el color de la muestra percibido a simple vista aproximadamente a 30 cm y comparándolo con una imagen proporcionada a los panelistas.	2. Pantone 134  9. Pantone 138 
Homogeneidad del color	El color de la muestra es homogéneo si podemos percibir el mismo color y en la misma tonalidad en las diferentes zonas de	De menos a más homogéneo

	la muestra. Heterogéneo: cuando el color varía de acuerdo con la zona del mango.	
Brillo	Es la propiedad que poseen las superficies de reflejar, total o parcialmente, la luz incidente.	De opaco a brillante 1. Huevo 8. Huevo envuelto en plástico adherente
Jugosidad	Cantidad de agua observable del mango.	Seco a húmedo 1. Pan 3. Limón

**Tabla 18.** Descriptores de sabor/aroma generados para evaluar el mango Ataulfo. (Lawless y Heymann, 1998)

Atributos	Definición	Escala
Intensidad global del aroma	La propiedad de una sustancia o una mezcla de sustancias, que a determinada concentración activan el sentido del olfato promoviendo la percepción. Se evalúa a 10 cm de distancia entre la muestra y la nariz.	Poco intenso a muy intenso.  3. Tang de mango
Intensidad global del sabor	Está definido como la combinación del gusto, olor y sensaciones trigeminales percibidos durante la evaluación del alimento.	Poco intenso a muy intenso
Gusto ácido	Gusto ácido provocado por la interacción entre los H <sup>+</sup> y los receptores gustativos presentes en la lengua.	Poco ácido a muy ácido
Gusto dulce	Gusto básico provocado por la interacción de distintas moléculas (carbohidratos, polioles, entre otros) y los receptores gustativos presentes en la lengua.	Poco dulce a muy dulce

**Tabla 19.** Descriptores de textura generados para evaluar el mango Ataulfo. (Szczesniak, 2006)

Atributos	Definición	Escala
Firmeza	Fuerza necesaria para penetrar el mango con los dientes incisivos.	Poco firme a muy firme 3. Durazno 9. Apio
Fibrosidad	Cantidad de fibras que se sienten durante el masticado. Se evalúa al contacto de la muestra y la lengua contra el paladar	Poco fibroso a muy fibroso 1. Durazno 10. Apio
Jugosidad	Cantidad de agua del mango que se percibe al masticarla. Se evalúa en el momento de la masticación. Sensación de humedad.	Poco jugoso a muy jugoso

Se introdujeron referencias en las escalas para poder ayudar a los panelistas a precisar los puntos en ella y así hacer la evaluación sensorial más homogénea y sencilla.

### 8.3.2 TRATAMIENTO DE LOS MANGOS

Los mangos se mandaron irradiar a 3 diferentes dosis (0.5, 1, 1.5 KGy) en el Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) el 27 de marzo de 2011 con una tasa de dosis de 24.3 Gy/min. Posterior al tratamiento se almacenaron a temperatura ambiente, y se consideró ese momento como el tiempo cero.

### 8.3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA

De acuerdo con la norma NMX-FF-058-SCFI-2006 (Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruta fresca – mango (*Mangifera indica* L.) – especificaciones) la calidad de los mangos fue de Categoría extra, presentaron forma alargada (fruto bien formado), cáscara suave, lisa y de color verde (madurez fisiológica). El lote tuvo uniformidad en el color, forma y tamaño.

**Tabla 20.** Características físicas del mango Ataulfo

Parámetro	
Peso (g)	412 ± 29.22
Largo ecuatorial (cm)	13.4 ± 0.52
Longitud polar (cm)	6.8 ± 0.66

Los datos muestran el valor promedio ± desviación estándar, n=82

Una vez que los mangos desarrollaron la madurez comercial (al doceavo día), se pelaron y picaron en trozos de igual tamaño y se realizó el análisis sensorial.

Características de los panelistas:

- Familiarizados con la metodología y la muestra
- entre 21 y 60 años
- 13% hombres y 87% mujeres

Se evaluaron 4 atributos de apariencia (Figura 17A); de los cuales el atributo color fue el único en donde no hubo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los tratamientos y el control. A pesar de esto, el mango irradiado a una dosis de 1.5 KGy se percibió con un color amarillo más descolorido ya que tuvo un valor promedio de 5.11 mientras que el control y las dosis de 0.5 KGy y 1KGy estuvieron entre 7.15, 5.95 y 5.65, respectivamente (Figura 17A).

Para los otros 3 atributos de apariencia (Figura 17A, Tabla 21), los mangos irradiados a 1.5 KGy fueron percibidos como menos brillosos (valor promedio 2.96), con menor apariencia jugosa (valor promedio 2.74) y con un color heterogéneo (valor promedio 2.43) siendo en todos estos casos significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control y con los mangos tratados a las dosis de 0.5 y 1KGy.

El pardeamiento que se observó en la pulpa de los mangos Ataulfo irradiados a 1.5 KGy, tiene lugar en frutas expuestas a dosis de radiación más altas de las que puede soportar y ha sido atribuido a un aumento de la actividad polifenol oxidasa (Molins, 2003; Rodríguez-Ramírez y Romo Escartin, 2010). Esta enzima se encuentra parcialmente soluble en el citoplasma y parcialmente insoluble en membrana celular, sin embargo; cuando la radiación es muy alta, las ionizaciones pueden producir cambios en los lípidos de las membranas y la enzima y sus sustratos que se encuentran en las vacuolas entran en contacto (Pabón-Calderón, 2011; Mendoza y Herrera, 2012). La polifenol oxidasa cataliza la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles y posteriormente son oxidados a ortoquinonas, las cuales se polimerizan dando lugar a pigmentos que presentan color marrón (Gasull y Becerra, 2006). Bolívar-Fernández y colaboradores (2011a) encontraron que la enzima polifenol oxidasa utiliza como sustrato a las antocianinas y los taninos. Los reportes sugieren que el contenido fitoquímico de la pulpa del mango consiste en ácido gálico, mangiferina y muchos taninos hidrolizables que han sido identificados pero no caracterizados (Schieber *et al*, 2000). En muchos frutos la astringencia está íntimamente relacionada con la reacción de oscurecimiento de los taninos condensados, por lo que también afecta el sabor característico del alimento (Rodríguez-Ramírez y Romo Escartin, 2010; Bolívar-Fernández *et al*, 2011b).

En la figura 17B y tabla 22 se observa que la intensidad del sabor a mango fue menor en los frutos tratados con una dosis de 1.5 KGy (valor promedio 2.92) siendo significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control (valor promedio 7.4) y a las dosis de 0.5 KGy (valor promedio 7.27) y 1 KGy (valor promedio 6.76). De hecho, el

sabor que se detectó en los mangos irradiados a la dosis más alta presentó un resabio metálico y además éstos fueron percibidos más ácidos (valor promedio 8.02) y menos dulces (valor promedio 2.18) que el control y los tratados a 0.5 y 1 KGy ( $p \leq 0.05$ ).

En cuanto al atributo de la intensidad del aroma (Figura 17A, Tabal 21) no hubo diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre las diferentes muestras, pero se apreció, de nuevo, que los mangos irradiados a 1.5 KGy tenían una menor intensidad del aroma a mango (valor promedio 2.55) con respecto al control (valor promedio 3.99) y a los tratamientos de 0.5 KGy (valor promedio 3.29) y 1 KGy (valor promedio 3.47).

**Tabla 21.** Prueba de atributos de apariencia y aroma en mango Ataulfo irradiado a diferentes dosis (0, 0.5, 1, 1.5 KGy)

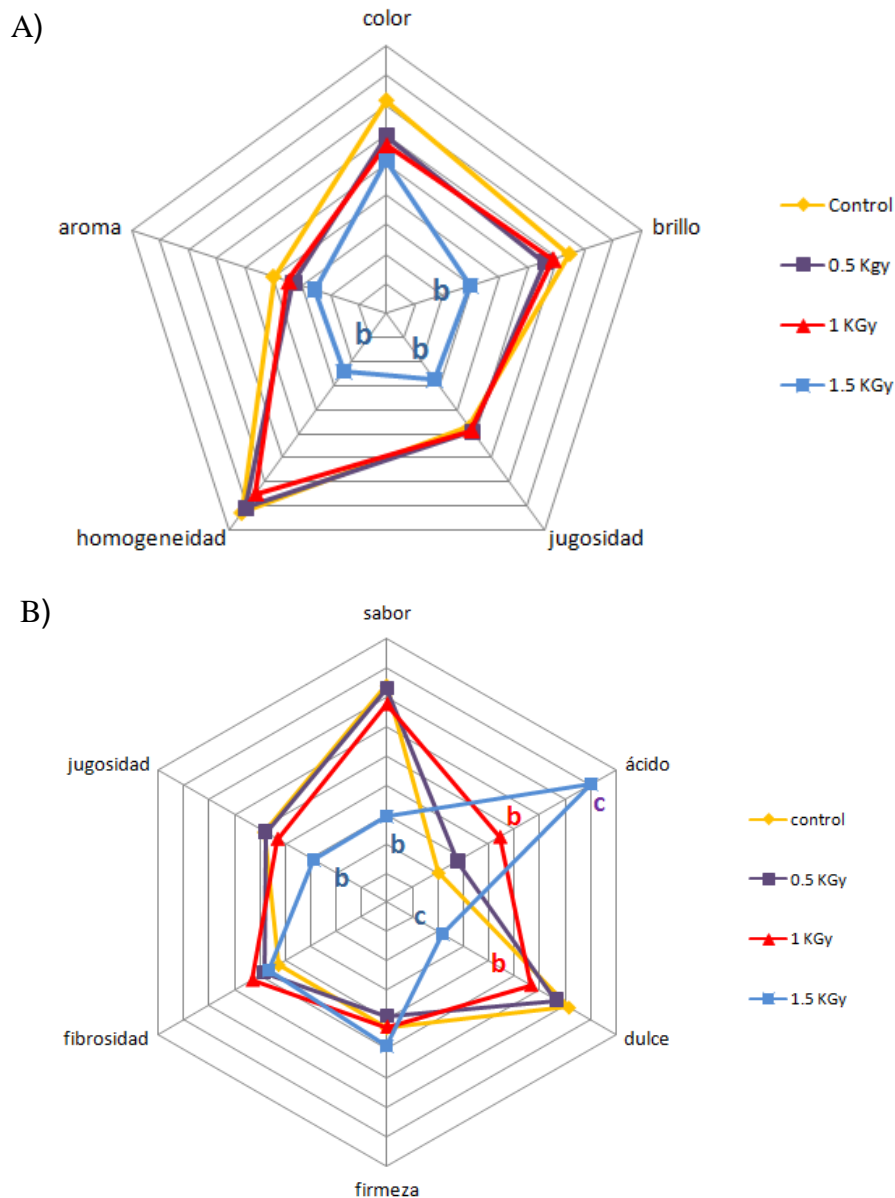
Tratamiento/atributo	Control	0.5 KGy	1 KGy	1.5 KGy
<b>Color</b>	7.15 ± 1.31 a	5.95 ± 1.69 a	5.65 ± 1.89 a	5.11 ± 2.82 a
<b>Brillo</b>	6.46 ± 1.54 a	5.59 ± 1.93 a	5.89 ± 1.56 a	2.96 ± 1.24 b
<b>Jugosidad</b>	4.73 ± 2.11 a	4.90 ± 2.46 a	4.85 ± 1.88 a	2.74 ± 1.21 b
<b>Homogeneidad</b>	8.27 ± 1.44 a	8.04 ± 1.35 a	7.49 ± 1.91 a	2.43 ± 2.20 b
<b>Aroma</b>	3.99 ± 2.47 a	3.29 ± 2.27 a	3.47 ± 2.64 a	2.55 ± 2.73 a

Filas con letras diferentes indican diferencia significativa.  $p < 0.05$

**Tabla 22.** Prueba de atributos de sabor y textura en mango Ataulfo irradiado a diferentes dosis (0, 0.5, 1, 1.5 KGy).

Tratamiento/atributo	Control	0.5 KGy	1 KGy	1.5 KGy
<b>Sabor</b>	7.40 ± 2.14 a	7.27 ± 1.83 a	6.76 ± 2.12 a	2.92 ± 0.85 b
<b>gusto ácido</b>	2.03 ± 0.87 a	2.78 ± 2.39 a	4.44 ± 2.83 b	8.02 ± 1.18 c
<b>gusto dulce</b>	7.15 ± 1.43 a	6.65 ± 2.30 a	5.66 ± 2.14 b	2.18 ± 2.00 c
<b>Firmeza</b>	4.27 ± 1.84 a	3.87 ± 1.94 a	4.25 ± 1.61 a	4.90 ± 2.23 a
<b>Fibrosidad</b>	4.24 ± 1.51 a	4.81 ± 1.56 a	5.30 ± 1.72 a	4.63 ± 2.42 a
<b>Jugosidad</b>	4.81 ± 2.15 a	4.77 ± 1.99 a	4.32 ± 2.32 a	2.88 ± 1.70 b

Filas con letras diferentes indican diferencia significativa.  $p < 0.05$



**Figura 17.** A) Prueba de atributos de apariencia y aroma en mango Aaulfo irradiado a diferentes dosis (0, 0.5, 1, 1.5 KGy). B) Prueba de atributos de sabor y textura en mango Aaulfo irradiado a diferentes dosis (0, 0.5, 1, 1.5 KGy). Atributos con letras indican diferencia significativa.  $p < 0.05$

El gusto ácido y dulce que se detectó en los mangos tratados a 1 KGy también fue significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) al de los mangos control y al de los mangos irradiados a 0.5 y 1.5 KGy. Esto significa que a pesar de que los mangos de 1 KGy no fueron tan dulces como los mangos control, éstos no fueron tan ácidos como los mangos de 1.5 KGy. Estos datos concordaron con los observados en los parámetros de calidad de pH (Figura 15), porcentaje de acidez (Figura 16) y sólidos solubles (Figura 13). A mayor dosis de radiación gamma, mayor porcentaje de acidez, menor

pH y menor el contenido de sólidos solubles al doceavo día, reflejando el retraso en la maduración del fruto. Por lo tanto, a mayor dosis de radiación gamma se tuvo un sabor más ácido y menos dulce con respecto al control (Figura 17B, Tabla 22).

En los atributos de firmeza y fibrosidad no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre las diferentes dosis y el control; en el atributo de jugosidad los mangos tratados con 1.5 KGy (valor promedio 2.88) estadísticamente fueron menos jugosos ( $p \leq 0.05$ ) que los mangos control (valor promedio 4.81) y los tratados a 0.5 KGy (valor promedio 4.77) y 1KGy (valor promedio 4.32) (Figura 17B, Tabla 22).

Los resultados que se obtuvieron con los mangos tratados a 0.5 y 1KGy fueron similares a los del control, a excepción del gusto ácido y gusto dulce en la dosis de 1 KGy. Sin embargo, estos 2 atributos se debieron a una disminución en la velocidad de la maduración y no a una modificación directa del sabor global del mango. Por lo tanto, el efecto de la radiación gamma en la evaluación sensorial del mango Ataulfo no afectó los atributos analizados a estas dosis; mientras que a dosis mayores de 1 KGy disminuyó la aceptación del fruto, debido a que perdió el sabor característico del mango y presentó una apariencia distinta a la del control (intensidad de color menor y un color heterogéneo). Utilizando la dosis adecuada de radiación gamma se pueden mantener las propiedades sensoriales del fruto; sin embargo, al aplicar dosis elevadas que no soporta la fruta, se producen modificaciones en el sabor y color que la hacen inaceptable para su consumo. Estos cambios en las propiedades sensoriales se dan por el efecto de los radicales libres sobre fenoles, lípidos y proteínas, ya que al aumentar los productos oxidados de estos, modifican el sabor original de la fruta (Hidalgo *et al*, 1992; Bernal *et al*, 2003; Rodríguez-Ramírez y Romo Escartin, 2010; Bolívar-Fernández *et al*, 2011b).

Aunado a esto, en la figura 8, se observa que no hubo diferencia significativa entre la dosis de 1 y 1.5 KGy en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6; por lo tanto, en los siguientes experimentos se trabajó con la dosis de 1KGy ya que fue la dosis donde se presentó la menor sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 sin que se haya afectado sensiblemente las propiedades fisiológicas, fisicoquímicas y sensoriales del mango analizadas en este estudio.



#### **8.4 RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA EN LA SUPERFICIE DEL MANGO Y EXTRACCIÓN DEL DNA**

Para la extracción de DNA se utilizaron dos metodologías diferentes; el método enzimático y el método de hervido. Solo se pudo evaluar la integridad del DNA para muestras de mangos no lavados; ya que en el gel de agarosa ninguna de las muestras de mangos lavados presentó bandas. Así que se decidió realizar diferentes variantes a los métodos.

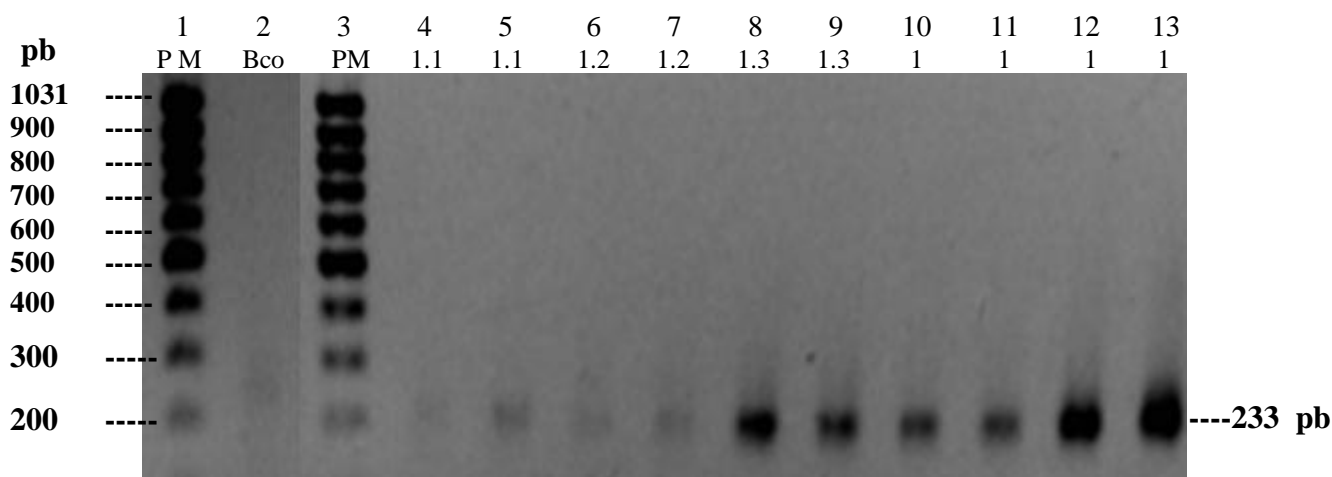
Con el método enzimático utilizando 5 mangos no lavados para una sola muestra, se obtuvieron buenos resultados en la extracción de DNA y en el PCR; sin embargo, cuando se aplicó a mangos lavados no se observó banda en el gel de agarosa. Se supuso que en mangos lavados, no se tenía la carga microbiana suficiente para que la cantidad de DNA extraído de ella fuera detectada. Para obtener suficiente DNA se aumentó el número de mangos a 10 para una sola muestra pero aún no se observó ninguna banda. Al cuantificar el DNA por el método espectrofotométrico parecía haberse obtenido 966.075 ng/ $\mu$ L (Tabla 23). Por lo tanto, se procedió a realizar el PCR sin obtener una buena señal (carril 4 y 5; figura 18). Probablemente, la agitación de los mangos en las bolsas con agua no fue suficiente para extraer a los microorganismos de la superficie del fruto. Así que para recuperar la microbiota se utilizó una esponja sumergida en 50 mL de SSI 0.85% y 10 mangos para obtener una sola muestra de DNA (Método 1.2). En este caso tampoco se pudo evaluar la integridad del DNA en el gel de agarosa ya que no se observó señal. Al igual que en el método 1.1 se cuantificó el DNA por el método espectrofotométrico obteniendo al parecer una suficiente cantidad de 980.175 ng/ $\mu$ L (Tabla 23); sin embargo, al realizar el PCR no se obtuvo una buena señal (carril 6 y 7; figura 18). El valor alto de absorbancia que se detectó en estas muestras se pudo deber a la presencia de un precipitado del color de la esponja. Por lo tanto se realizó la recuperación de la microbiota con un hisopo estéril humedecido en 50 mL SSI+ tween 80 al 1%; un tensoactivo para favorecer la recuperación de los microorganismos y el líquido se filtró por un embudo con papel filtro para eliminar partículas grandes antes de filtrarlo por millipore (método 1.3). La membrana se colocó en un tubo de centrifuga y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min antes de cortarla y resuspenderla con sólo 1ml de buffer TES para no tener la muestra diluida. El líquido se transfirió a tubos eppendorf y se congelaron hasta el día siguiente para realizar la extracción enzimática. La extracción de DNA mejora notablemente si se congelan y descongelan las células dos veces antes de la extracción enzimática con lisozima, lo que ayuda a romper la pared celular y permite un mejor rendimiento de

DNA incluso para bacterias Gram positivas como las actinobacterias (Cuesta-Amat, 2004). Al cuantificar el DNA por el método espectrofotométrico se obtuvo una menor cantidad que las otras muestras de 133.175 ng/μL (Tabla 23); sin embargo fue la muestra en donde se obtuvo el DNA más puro, 1.23 (tabla 23). Un cociente menor a 1.8 indican la presencia de contaminantes (proteínas o polifenoles); sin embargo, el mejor test de la calidad del DNA es su funcionalidad en la aplicación de interés (Alvarado, 2009). A pesar de haber obtenido un cociente 0.57 veces menor, después de realizar el PCR se observó el amplicón de 233 pb correspondiente a la región V3 del gen 16S rRNA (carril 8 y 9; figura 18).

**Tabla 23.** Resultados de la extracción de DNA con variantes del método enzimática y hervido

Método	Mango lavado	260 nm	280 nm	Cociente (260nm/280)	DNA (ng/μL)	Nota
1	NO	3.9302	3.6121	1.08	982.625	Carril 12 Carril 13
		3.9302	3.6121	1.08	982.625	-
1	NO	3.8655	3.1401	1.09	982.55	Carril 10 Carril 11
1.1	SI	3.8643	3.3113	1.17	966.075	Carril 4 Carril 5
		3.5264	3.0615	1.15	881.6	-
2	SI	0.1310	0.1073	1.22	32.72	Muy poco DNA
1.2	SI	3.9207*	3.8164*	1.03	980.175	Carril 6 Carril 7
		0.9607*	0.8548*	1.12	240.175	* Presencia de precipitado
2.1	NO	4.0000*	3.6979*	1.08	1000	* Presencia de precipitado
2.1	SI	3.6673*	4.0000*	0.92	916.825	* Presencia de precipitado
2.2	SI	1.8210*	1.7172*	1.06	455.25	* Presencia de precipitado
2.3	SI	0.1791	0.1528	1.17	44.775	Muy poco DNA
1.3	SI	0.5327	0.4341	<b>1.23</b>	133.175	Carril 8 Carril 9
		0.4588	0.3753	<b>1.22</b>	114.7	-

El método de hervido (método 2) se utilizó como una posible alternativa al método enzimático ya que no tiene pasos de purificación; por lo se esperaba obtener una mayor cantidad de DNA aunque éste no estuviera puro. Sin embargo, no se logró una mejor extracción ni pureza del DNA a comparación del método enzimático (Tabla 23).



**Figura 18.** Corrimiento electroforético de los productos de PCR de la región V3 del gen 16S rRNA para muestras de la microbiota superficial de mangos lavados: carril 4: se utilizó el método 1.1 y DNA a una concentración final de 50 ng/μL, carril 5: se utilizó el método 1.1 y el DNA a una concentración de 100 ng/μL, carril 6: se utilizó el método 1.2 y el DNA a una concentración de 50 ng/μL, carril 7: se utilizó el método 1.2 y el DNA a una concentración de 100 ng/μL, carril 8: se utilizó el método 1.3 y el DNA a una concentración de 50 ng/μL, carril 9: se utilizó el método 1.3 y el DNA a una concentración de 100 ng/μL, carril 10: se utilizó el método 1 en mango no lavado y el DNA a una concentración de 50 ng/μL, carril 11: se utilizó el método 1 en mango no lavado y el DNA a una concentración de 100 ng/μL, carril 12: se utilizó el método 1 en mango no lavado y el DNA a una concentración de 50 ng/μL, carril 13: se utilizó el método 1 en mango no lavado y el DNA a una concentración de 100 ng/μL, carriles 1 y 3: Marcador de peso molecular. Carril 2: blanco

## 8.5 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA MICROBIOTA NATURAL DEL MANGO Y SU EFECTO EN *E. coli* O102:H6 CON UNA DOSIS DE 1 KGY

### 8.5.1 TRATAMIENTO DE LOS MANGOS

Los mangos se mandaron irradiar a 1 KGy (la mejor dosis de acuerdo con la evaluación microbiológica, sensorial y con los parámetros fisicoquímicos y fisiológicos evaluados) en el Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) el 13 de junio de 2011 con una tasa de dosis de 23.7 Gy/min. Posterior al tratamiento se almacenaron a temperatura ambiente, y se consideró ese momento como el tiempo 0.

### 8.5.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA

De acuerdo con la norma NMX-FF-058-SCFI-2006 (Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruta fresca – mango (*Mangifera indica* L.) – especificaciones) la calidad de los mangos fue de Categoría I, presentaron forma alargada (fruto bien formado), cáscara suave, lisa y de color verde (madurez fisiológica). El lote tuvo uniformidad en el color, forma y tamaño. En 90 mangos se evaluó el efecto de la radiación gamma en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6. En 162 se evaluó el efecto de la radiación gamma en la microbiota de la superficie del mango Ataulfo.

**Tabla 24.** Características físicas del mango Ataulfo

Parámetro	
Peso (g)	311 ± 39.86
Largo ecuatorial (cm)	11.4 ± 0.62
Longitud polar (cm)	6.6 ± 0.30

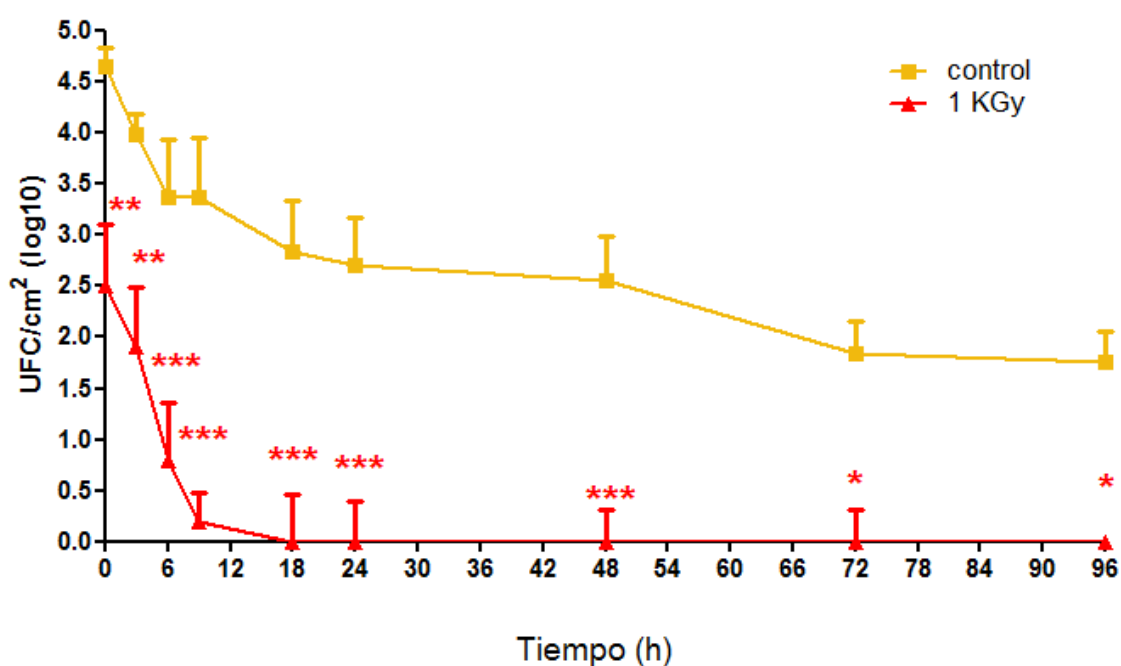
Los datos muestran el valor promedio ± desviación estándar, n=252

### 8.5.3 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA SOBREVIVENCIA DE *E. coli* O102:H6 CON UNA DOSIS DE 1 KGy

En la figura 19 se observa el mismo efecto no lineal en la mortalidad de *E. coli* O102:H6 que en el primer experimento de sobrevivencia (Figura 7); sin embargo, no se observa un pico máximo a las 6 h como en las muestras control del primer experimento. Los mangos control tuvieron una cuenta inicial de 4.7 UFC/mL (log10); a las 24 h disminuyó a 2.7 UFC/mL (log10), a las 72 h disminuyó a 1.8 UFC/mL (log10) y esta cuenta se mantuvo a las 96 h. Del tiempo cero a las 96 h hubo una disminución de 2.9 ciclos logarítmicos; 1.5 ciclos logarítmicos más que en el primer experimento (Figura 7). Esta diferencia se pudo deber a la calidad que los mangos presentaron antes de ser irradiados. Los del primer experimento (Figura 7) fueron de categoría II ya que presentaron manchas de lluvia y látex. En general los factores ambientales como la temperatura, viento y precipitación afectan la calidad del fruto. En un año de lluvias abundantes, la calidad del mango baja y es susceptible a infecciones por hongos y bacterias. Diversos investigadores han comprobado el impacto de la carga del inóculo y la lluvia sobre la severidad del deterioro de la fruta en postcosecha (Arpaia *et al*,

2004). Los mangos de categoría II, al ser una cosecha que se dio en un año con abundantes lluvias fue más susceptible a *E. coli* O102:H6.

En la figura 19 se observa que los mangos irradiados a 1 KGy tuvieron una diferencia significativa ( $p \leq 0.01$ ) desde el tiempo cero, con una disminución en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 de 2.2 ciclos logarítmicos con respecto al control. La mayor diferencia se presentó a las 6, 9, 24 y 48 h, en la que la sobrevivencia en los mangos tratados disminuyó 2.5, 3.3, 2.8, 2.7 y 2.6 ciclos logarítmicos respectivamente con respecto al control ( $p \leq 0.001$ ). A las 72 y 96 h la diferencia fue menor ( $p \leq 0.05$ ) con 1.8 ciclos logarítmicos menos que el control.



**Figura 19.** Efecto de la radiación gamma (dosis 1 KGy) en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 en la superficie del mango Ataulfo. Los datos son promedio  $\pm$  EEM,  $n=5$  ensayos en medio nutritivo con 50  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina e incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto a los mangos control mediante una prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

El efecto de la radiación gamma en la sobrevivencia de *E. coli* O102:H6 fue más marcado en este experimento que en el primero (Figura 7). Esta condición se puede atribuir a que la irradiación se llevó a cabo en mangos en un estado de madurez menos avanzado (totalmente verdes) que en los del primer experimento que eran verdes ligeramente amarillos. Pérez-Gómez (2010) observó que el estado de madurez

es un aspecto sumamente importante para la aplicación del tratamiento; cuando se irradian los mangos inmediatamente después de la cosecha, estos son más resistentes al estrés y soportan mejor la irradiación presentando mejor calidad.

Se ha reportado que la cáscara del mango contiene polifenoles como la mangiferina, carotenoides, enzimas (peroxidasa), vitaminas, pectinas, antocianinas, ácido mangiférico (terpenoide) y fibra (Vargas-Simón *et al*, 2002; Schieber *et al*, 2003; López-Martínez *et al*, 2011; Vásquez-Hidalgo, 2011; Garrido y Valdés, 2012) y se ha determinado, que extractos de la cáscara de mango tienen actividad antibacteriana y antioxidante (Benites-Vilchez *et al*, 2011). Los extractos de cáscara de frutos verdes tienen una mayor cantidad de polifenoles totales y presentan la mayor actividad antioxidante que en otros estados de madurez (Villanueva-Tiburcio *et al*, 2010).

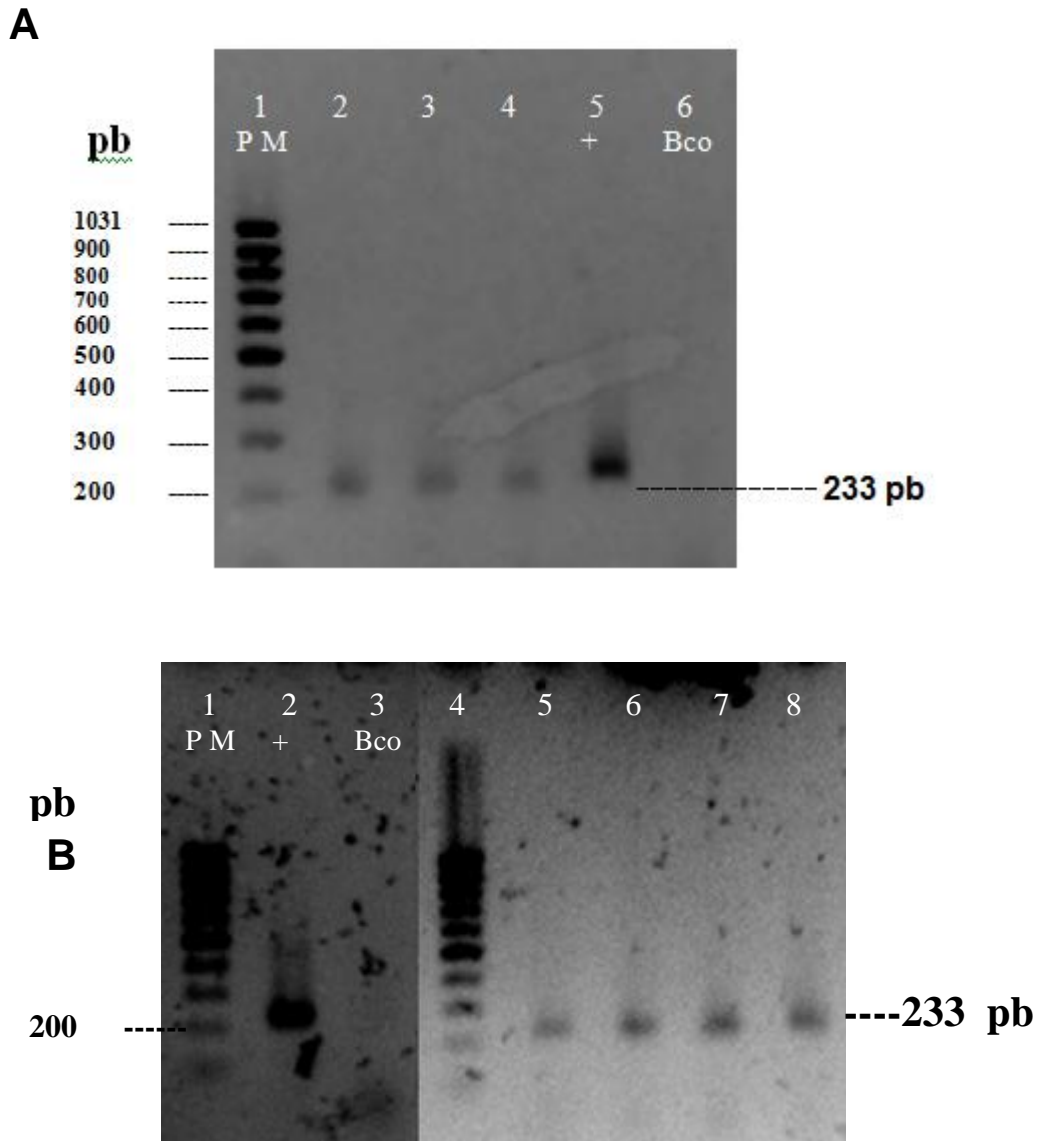
Esto sugiere, que un mango verde tendrá mejores defensas contra microorganismos y será más resistente a la radiación que mangos más maduros.

#### **8.5.4 EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LA MICROBIOTA DE LA SUPERFICIE DEL MANGO**

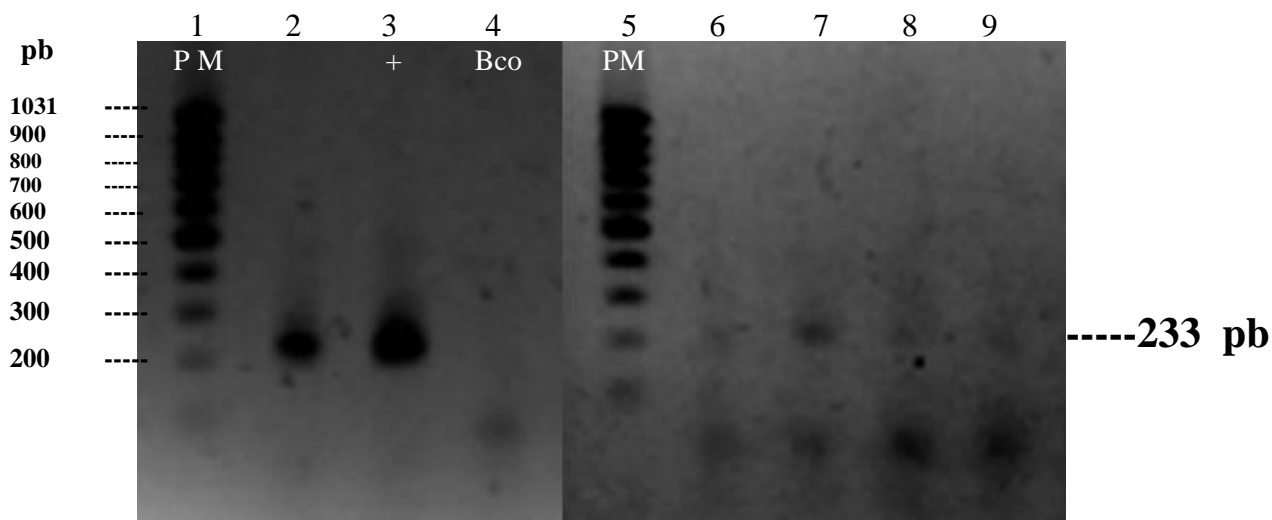
Para analizar el efecto de la radiación gamma en la microbiota de la superficie del mango, se realizó por triplicado la recuperación de la microbiota superficial del mango irradiado a 1KGy y mango control a los tiempos 0, 24 y 72 h. La recuperación de la microbiota se llevó a cabo con hisopos estériles humedecidos en SSI+ tween 80 al 1% y se realizó la extracción de DNA por el método enzimático. Se obtuvo una pureza de 1.20 - 1.38, con una cantidad aproximada de DNA de 130 ng/μL. Posterior a la extracción se realizó el PCR con los cebadores Agc338F (con cola G-C) y B518R (Ampe, 1999) para amplificar la región V3 del gen 16S rRNA. Al realizar la electroforesis en gel de agarosa se observó una sola banda de 233 pb (Figura 20) correspondiente al tamaño de la región V3 del gen 16S rRNA. En algunas muestras no se alcanzó a ver esta banda bien, como en el caso de los carriles 6, 7, 8 y 9 de la figura 21. En estas muestras se concentró el DNA a 60 °C durante 30 min utilizando un concentrador (Vacufuge plus). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del amplicón (Figura 22) donde se lograron observar las bandas más intensas correspondientes al gen 16S rRNA; pero, también otra banda de menor tamaño. Estas bandas de menor tamaño, que se observaron también en el control, pudieron haber sido los cebadores que también se concentraron durante el tratamiento de la muestra.

### 8.5.4.1 DGGE paralelo de prueba

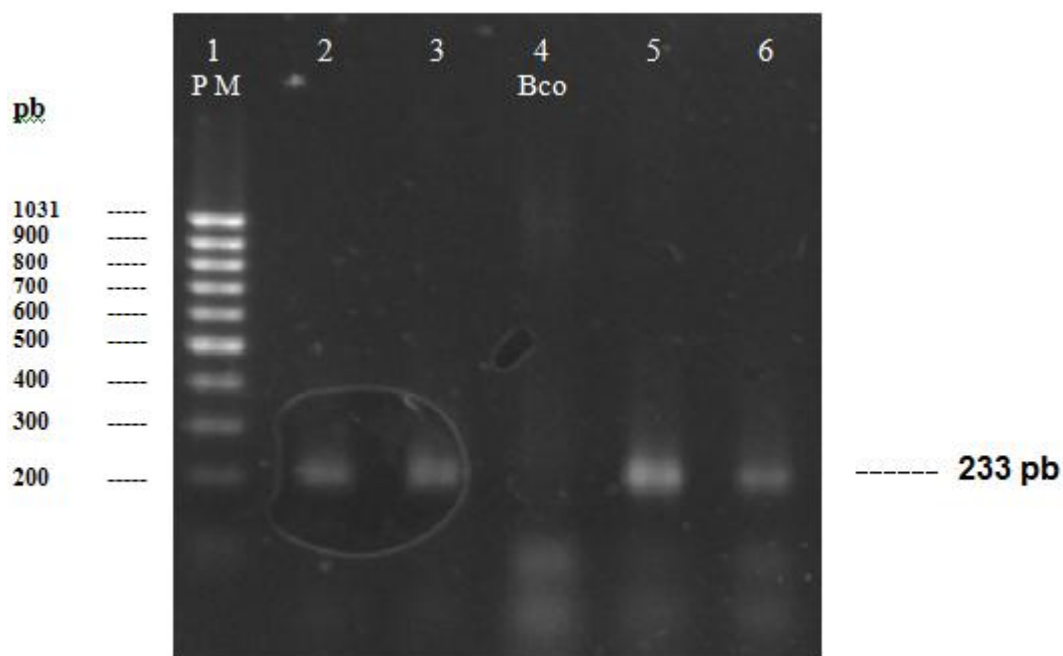
Con muestras del DNA del gen 16S rRNA que fueron concentradas se realizó un DGGE paralelo de prueba para familiarizarse con la técnica. Se utilizó un gradiente desnaturalizante de 10-50% (Figura 23) y 6 µg de DNA por muestra. La primera banda se observó a una concentración de 25% de desnaturalizante.



**Figura 20.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa con los productos de PCR de la región V3 del gen 16S rRNA a partir del DNA de la microbiota superficial de mangos. Gel de agarosa A: Carriles: 1. Marcador de peso molecular 2, 3 y 4 microbiota natural de la superficie del mango 5. Control positivo 6. Blanco. Gel de agarosa B: Carril: 1. Marcador de peso molecular 2. Control positivo 3. Blanco 4, 5, 6, 7 Y 8: microbiota natural de la superficie del mango.

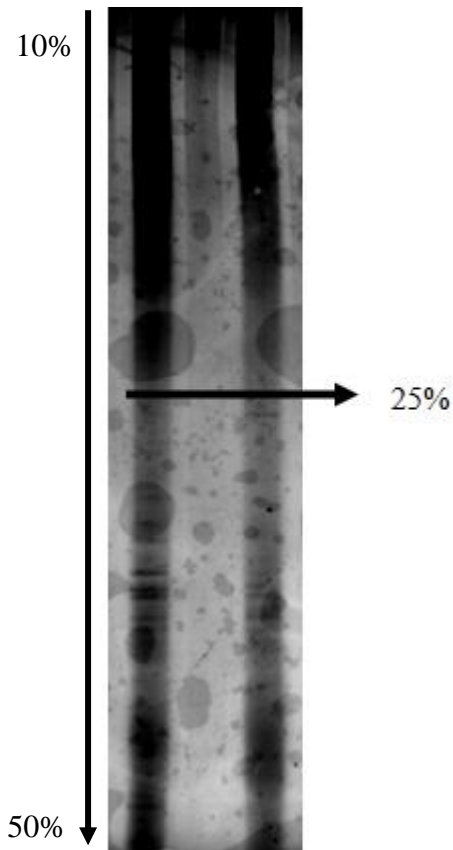


**Figura 21.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa con los productos de PCR de la región V3 del gen 16S rRNA a partir del DNA de la microbiota superficial de mangos. Carriles: 1 y 5. Marcador de peso molecular 2, 6, 7, 8 y 9 microbiota natural de la superficie del mango 3. Control positivo 4. Blanco.



**Figura 22.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa con los productos de PCR de la región V3 del gen 16S rRNA a partir del DNA de la microbiota superficial de mangos. Carril: 1. Marcador de peso molecular 2, 3, 5 y 6 microbiota natural de la superficie del mango 4. Blanco.

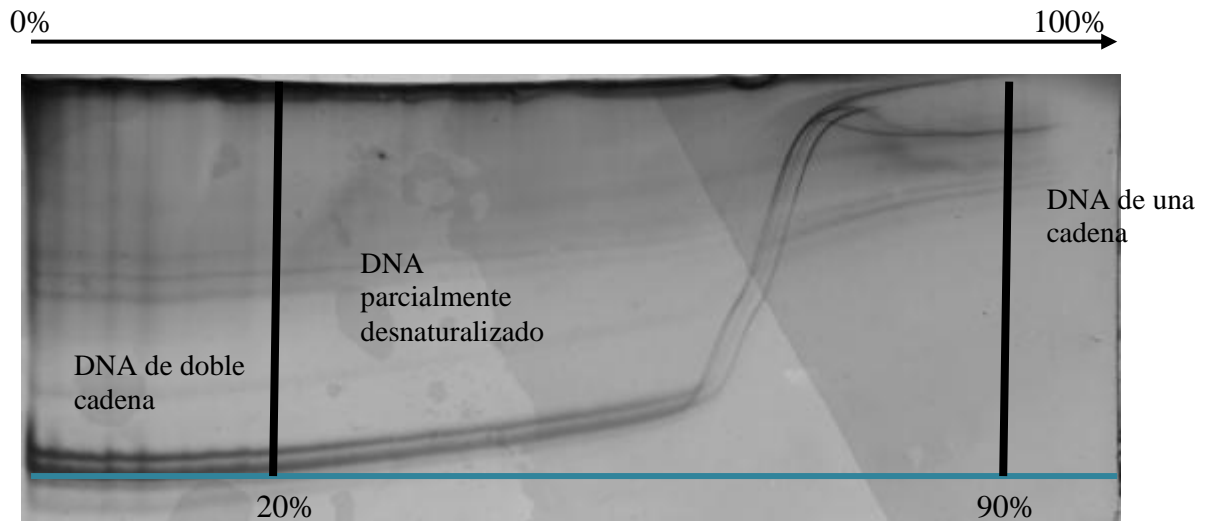




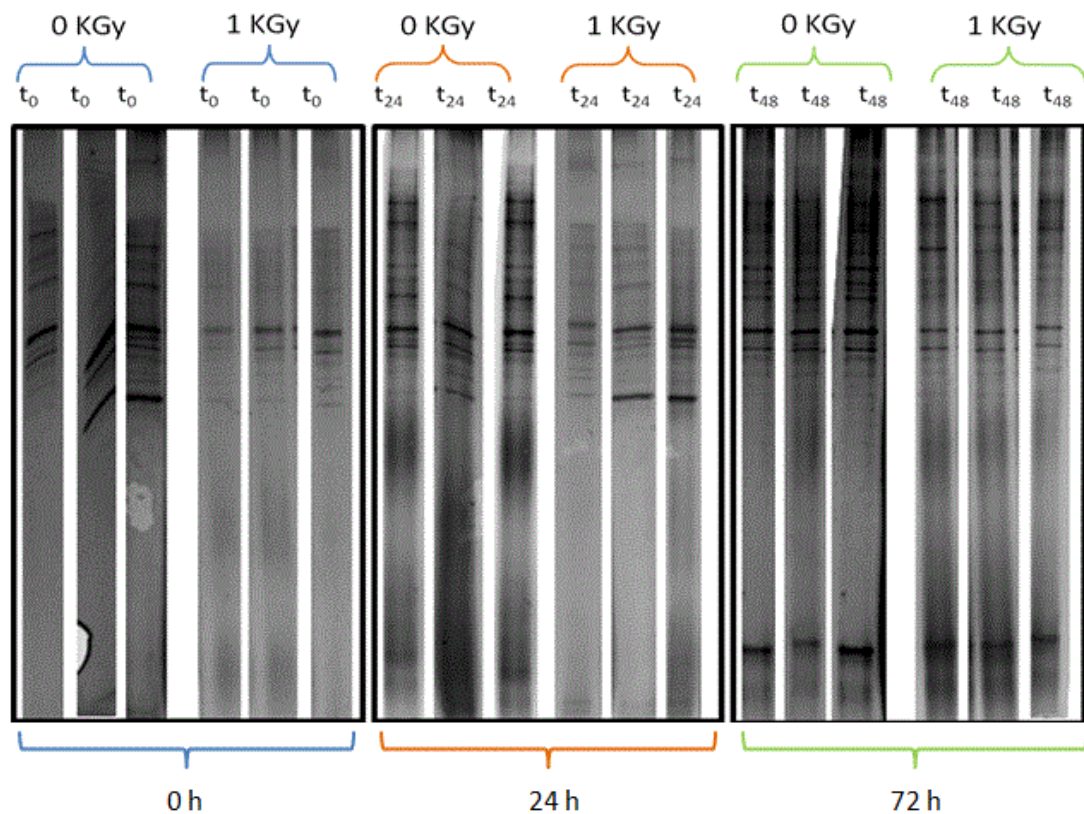
**Figura 23.** Gel DGGE con los patrones de bandas de los productos de PCR de la región V3 del gen 16S rRNA a partir del DNA de la microbiota superficial de mangos.

#### 8.5.4.2 DGGE

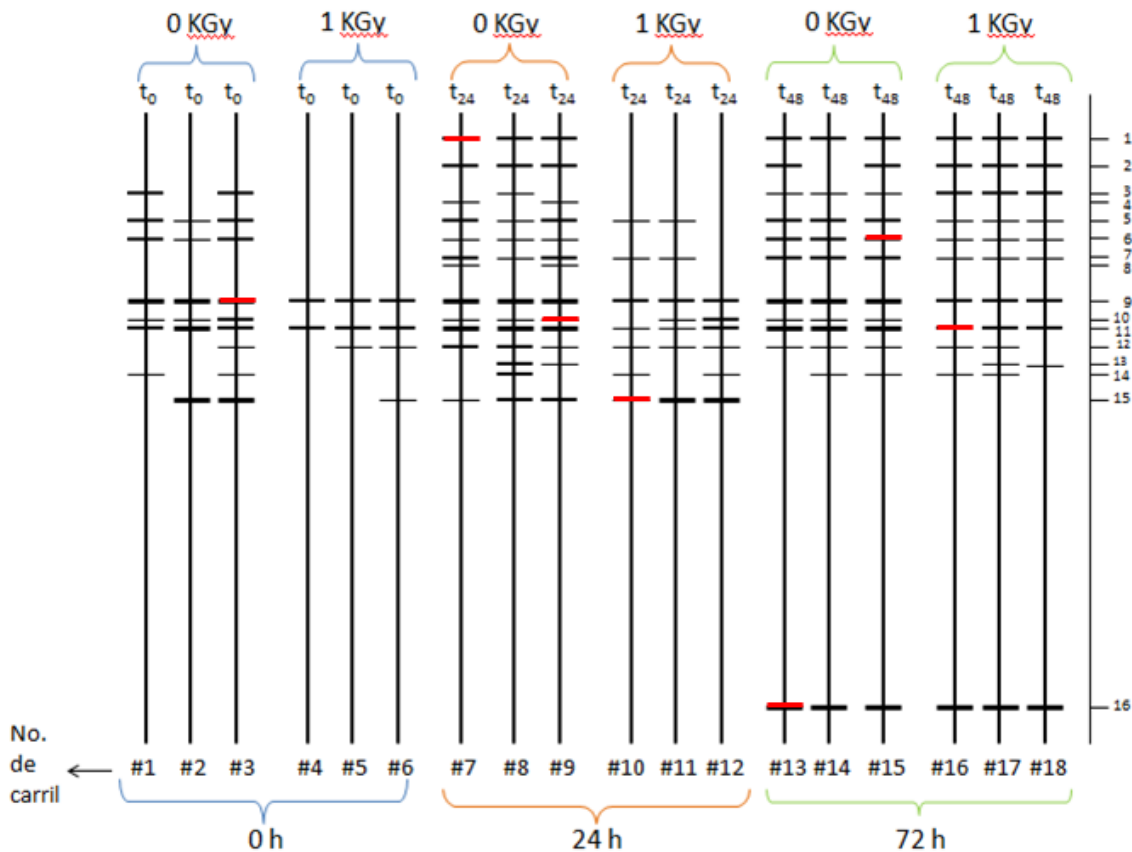
Se realizó el gel de acrilamida al 8% debido a que el rango de separación de pb a este porcentaje es de 200-400 pb y los productos de PCR obtenidos son de 233 pb. El gradiente desnaturante del gel perpendicular fue de 0-100% (Figura 24) para detectar el comportamiento de fusión de los fragmentos del DNA de la microbiota superficial del mango y determinar el rango de desnaturización óptimo para usarlo en el DGGE paralelo. En este gel el DNA migra durante toda la electroforesis en una concentración de desnaturante constante. El DNA de doble cadena migra a una velocidad mayor que el DNA parcialmente desnaturizado, y éste a su vez migra a una mayor velocidad que el DNA de una cadena.



**Figura 24.** Separación de DNA en gel perpendicular DGGE (acrilamida del 8%) con gradiente desnaturalizante de 0%-100%. Se muestra la zona donde se encuentra el DNA con la característica de extracción.



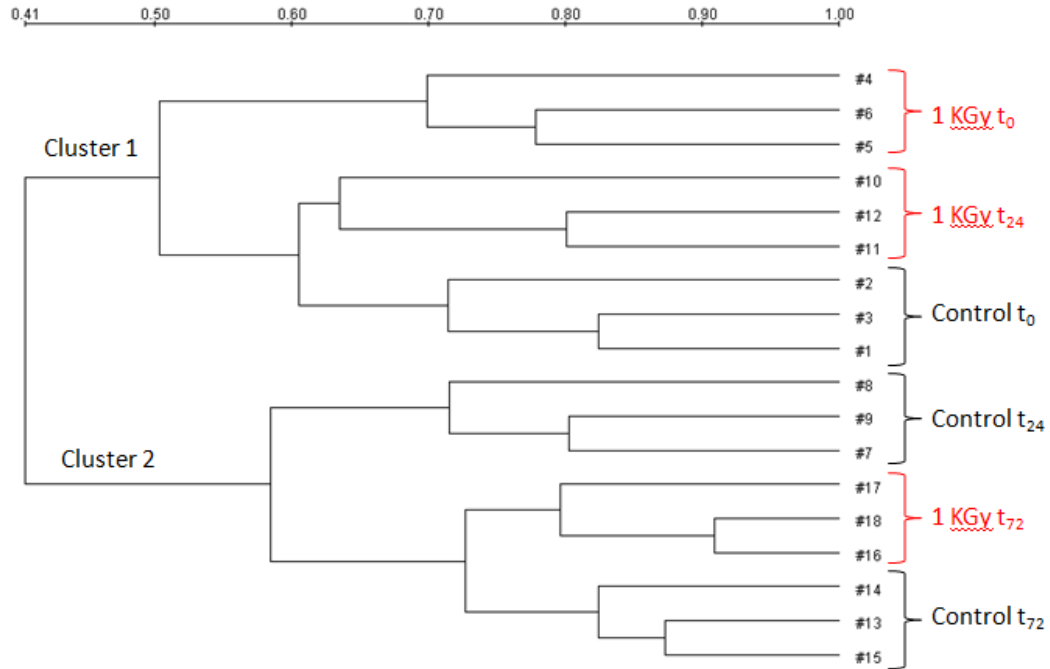
**Figura 25.** Patrones de DNA obtenidos en gel paralelo obtenido por la técnica DGGE con los patrones de bandas de los productos de PCR de la región V3 del gen 16S rRNA a partir del DNA de la microbiota superficial de mangos por triplicado a los tiempo 0, 24 y 72 h.



**Figura 26.** Diagrama de los patrones de bandas a partir del gel DGGE de la figura 25 utilizando el programa Diversity Database versión 2.2 para Windows (BIORAD). Los números en los perfiles indican el filotipo (1 al 16). En rojo se señalan las bandas o filotipos que se mandaron secuenciar.

Con el resultado obtenido en el gel perpendicular (Figura 24) se determinó que el gradiente de desnaturalización óptimo era del 20% al 90%. Se escogió 20% porque fue el porcentaje donde se empezó a ver la desnaturalización parcial del DNA al ya no seguir una línea horizontal. Posteriormente, las muestras se sometieron al gel paralelo del DGGE (Figura 25) con el objetivo de obtener los perfiles de la comunidad bacteriana de la superficie de mangos irradiados y de mangos control a las 0, 24 y 72h.

Existe una consideración importante sobre la técnica del DGGE. Es posible que un microorganismo genere más de una banda o que diferentes especies generen una misma banda; por lo tanto, los índices evaluados deben considerarse estimaciones relativas entre las comunidades y considerar cada banda como filotipo en lugar de especie (Escalante, 2007; Sánchez-Castro, 2009). Se considera el mismo filotipo cuando las bandas aparecen a la misma altura en diferentes carriles (Nakuma-González, 2010; González-de la Cruz *et al*, 2011).



**Figura 27.** Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud de Dice  $S_D$  a partir de los patrones de bandas de muestras de la superficie del mango Ataulfo.

Los geles paralelos con los patrones de las comunidades microbianas de la superficie del mango Ataulfo obtenidas con la técnica de DGGE se analizaron utilizando el software Diversity Database versión 2.2 para Windows (BIORAD), se determinó la similitud (coeficiente de Dice) entre las comunidades microbianas y se elaboró el dendrograma que identifica el agrupamiento entre las muestras (Figura 27). Si se agruparon en el mismo cluster significó que las muestras tenían un coeficiente de similitud de Dice alto y que las comunidades bacterianas fueron similares entre sí. De acuerdo con el dendrograma, las réplicas que recibieron el mismo tratamiento y que se analizaron en un mismo tiempo presentaron un patrón similar y se agruparon juntas (Figura 27). Por lo tanto, en cada réplica, las comunidades bacterianas fueron homogéneas y hubo reproducibilidad en los resultados. También se observa que la composición de la comunidad microbiana cambió con respecto al tratamiento y al tiempo; ya que algunas bandas o filotipos estuvieron presentes solo en algunas muestras y no en otras, o variaron de intensidad (Figura 25 y 26). En general las comunidades bacterianas de las muestras se dividieron en dos grandes clusters (Figura 27), el cluster 1 donde se agruparon las comunidades bacterianas de las muestras del mango irradiado a 1 KGy tiempo 0 y 24 h junto con las comunidades bacterianas de las muestras del mango control tiempo 0 h. Y el cluster 2, donde se agruparon las comunidades bacterianas de las muestras del mango control tiempos 24 y 72 h, junto con las muestras del mango irradiado tiempo 72 h.

### 8.5.4.3 Riqueza, índice de dominancia e índice de diversidad

#### Tiempo 0 h después de irradiar los mangos Ataulfo

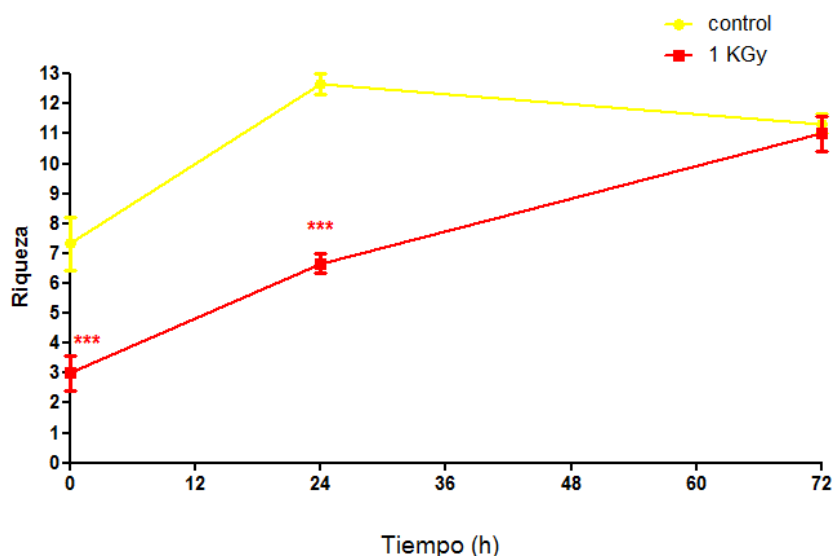
La comunidad bacteriana de las muestras del mango irradiado y analizado a tiempo 0 h presentó los menores índices de riqueza (Figura 28) y de diversidad (Figura 29) en comparación a todas las muestras. Al haber menor diversidad ( $P \leq 0.05$ ), ciertos microorganismos tienden a dominar en una comunidad microbiana; por lo tanto, ésta muestra presentó el mayor índice de dominancia, siendo estadísticamente significativo con respecto al control. ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 30). Se consideró que los filotipos 9 y 11 (bandas 9 y 11) (Figura 26) eran los dominantes; ya que no sólo se encontraron en las muestras del mango irradiado tiempo 0 h, sino en todas las demás muestras independientemente del tratamiento, y se identificaron con mayor intensidad y frecuencia (Tabla 25). Los filotipos que corresponderían a estas bandas pudieron haber persistido por dos razones: (a) eran resistentes a la radiación o (b) la densidad microbiana fue abundante y la dosis utilizada no fue suficiente para eliminarlos totalmente. La densidad bacteriana es un factor importante que influye en las interacciones interespecies y en el comportamiento de una comunidad microbiana expuesta a radiación gamma (Fuma *et al*, 2010).

#### Tiempo 24 h después de irradiar los mangos Ataulfo

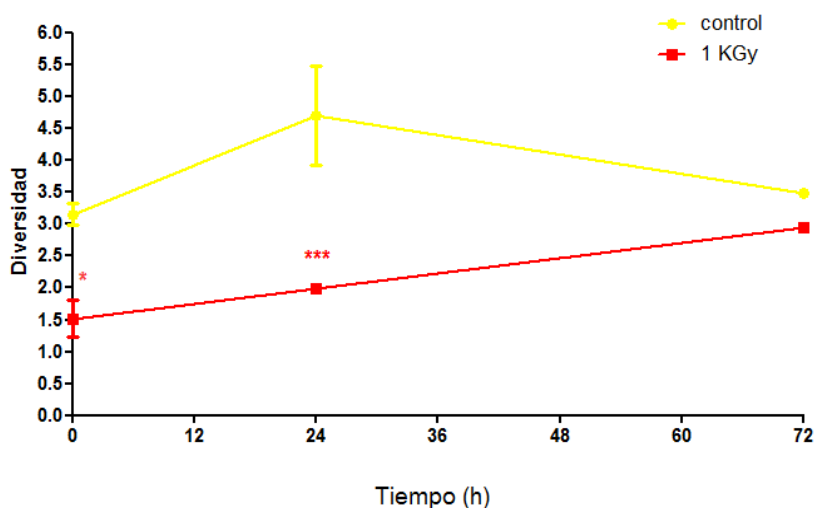
En las comunidades microbianas de las muestras del mango irradiado, tiempo 24 h aparecieron filotipos o bandas; la mayoría más tenues que en el control. Sin embargo, el filotipo 15 (banda 15) apareció con mayor intensidad (Figura 25), por lo que se mandó secuenciar para identificar al microorganismo. Los resultados de la secuenciación lo identificaron como *Arthrobacter* sp. (Tabla 26), una bacteria resistente a la radiación gamma (Mongodin *et al*, 2006; Osman *et al*, 2008).

Conforme transcurrió el tiempo de almacenaje aumentó el índice de riqueza tanto de las muestras del mango control como del irradiado (Figura 28); debido a esto, el perfil de la comunidad bacteriana en las muestras del mango irradiado, tiempo 24 h presentaron mayor similitud con el perfil de la comunidad bacteriana en muestras del mango control, tiempo 0 h y se agruparon en el mismo cluster (Figura 27). Sin embargo, las muestras del mango irradiado, tiempo 24 h presentaron diferencias significativas con respecto al control, tiempo 24 h en el índice de riqueza ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 28), diversidad ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 29) y dominancia ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 30). Esto quiere decir, que en el mango irradiado hubo un aumento en la riqueza y en el índice

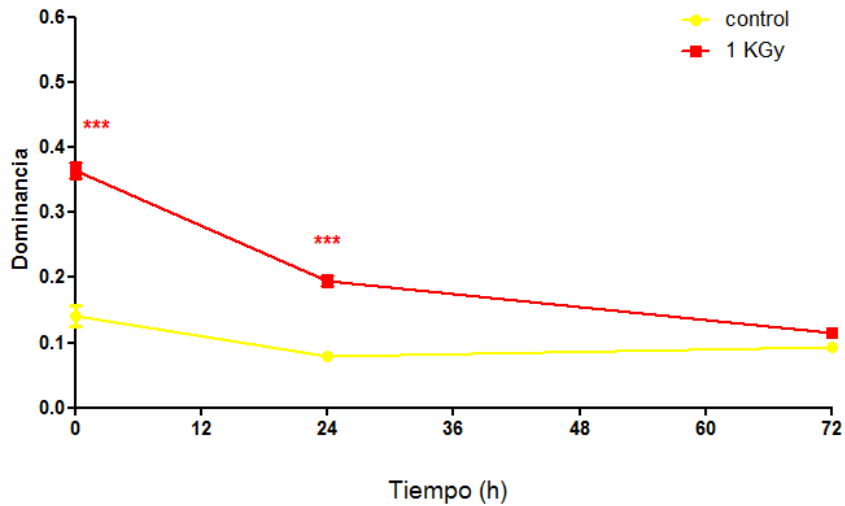
de diversidad de las comunidades bacterianas del tiempo 0 a las 24 h (0.47), pero este incremento fue estadísticamente menor que en las muestras del mango control (1.5).



**Figura 28.** Promedios de riqueza en las comunidades bacterianas en la superficie del mango Ataulfo de mango irradiado a 1KGy y mango no tratado analizados a diferentes tiempos (0, 24 y 72 h). Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=3 ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto a los mangos control mediante una prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 29.** Índice de diversidad en las comunidades bacterianas en la superficie del mango Ataulfo de mango irradiado a 1KGy y mango control analizados a diferentes tiempos (0, 24 y 72 h). Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=3 ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto a los mangos control mediante una prueba de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 30.** Índice de dominancia en las comunidades bacterianas en la superficie del mango Ataulfo de mango irradiado a 1KGy y mango no tratado analizados a diferentes tiempos (0, 24 y 72 h). Los datos son promedio  $\pm$  EEM, n=3 ensayos. Se analizaron todos los tratamientos a un mismo tiempo y se compararon con respecto a los mangos control mediante una prueba de Bonferroni. \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

No. De banda	Frecuencia de la banda (%)
1	50
2	44.44
3	50
4	11.11
5	61.11
6	77.78
7	66.67
8	11.11
9	100
10	66.67
11	94.44
12	72.22
13	22.22
14	50
15	50
16	33.33

**Tabla 25:** Porcentaje de las frecuencias de bandas o filotipos encontradas en todas las muestras de la microbiota de la superficie de mango Ataulfo irradiado a 0 y 1 KGy.

### Tiempo 72 h después de irradiar los mangos Ataulfo

El perfil de la comunidad bacteriana en las muestras del mango irradiado, tiempo 72 h fue similar a las muestras del mango control, tiempo 72 h y por lo tanto presentaron índices de riqueza similares ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 28) y se agruparon en el mismo cluster

(Figura 27). Sin embargo, aparecieron filotipos o bandas en las muestras de los mangos irradiados con diferente intensidad a comparación del control (Figura 25). A pesar de estos cambios de intensidad, los índices de diversidad y dominancia fueron similares ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 29 y 30). En ambos casos apareció el filotipo 16 (banda 16) y desapareció el filotipo 15 (banda 15) (Figura 26). Esto podría sugerir actividad antimicrobiana del filotipo 16, ya que desaparecieron bandas en ambas muestras independientemente del tratamiento. A pesar de que el filotipo 15 correspondía a un microorganismo resistente a la radiación; las interacciones interespecie pudieron haber provocado que desapareciera. Fuma y colaboradores (2010) sugirieron que las interacciones interespecies pueden contribuir con la persistencia de alguna especie bacteriana radiosensible aun en dosis altas de radiación gamma. Por lo que las interacciones interespecie pudieran también contribuir a que desapareciera alguna especie bacteriana aun cuando fuera resistente a la radiación gamma.

De acuerdo con los resultados obtenidos se podría indicar que la importancia de las interacciones interespecie predomina sobre el estrés abiótico y por eso la composición de la comunidad microbiana a la que se llegó en las muestras de mangos control y en irradiados, tiempo 72 h fue similar independientemente del tratamiento. La homeostasis es la capacidad de la comunidad microbiana de mantener su estabilidad e integridad en un ambiente sujeto a modificaciones bióticas y abióticas. Las comunidades usualmente contienen unas pocas especies con muchos individuos y muchas especies con pocos individuos. En este estudio los filotipos 9 y 11 (Figura 25) fueron las bandas más intensas y que se presentaron con mayor frecuencia (Tabla 25), por lo que corresponderían a los “filotipos dominantes”. Los mismos “filotipos dominantes” se encontraron tanto en los mangos control como en los irradiados. De acuerdo con Pérez-Luyo (2005), las especies dominantes son responsables de la mayor parte del flujo de la energía dentro del nivel trófico. Las especies menos abundantes determinan la diversidad (cantidad e intensidad de las interacciones) de ese nivel trófico y de la comunidad entera. Esto quiere decir que a pesar de que hubo una perturbación en la comunidad bacteriana de la superficie del mango Ataulfo por el tratamiento de radiación gamma; a las 72 h se llegó a una estabilidad que podría ser el resultado de un balance dinámico, sostenido por una serie de interacciones, tanto sinérgicas como antagónicas, entre los diferentes grupos que conforman la comunidad. Estas interacciones proveen protección de las presiones del medio, a través del mantenimiento de un medio local favorable aún durante fluctuaciones desfavorables periódicas que puedan ocurrir en el microambiente. Y son estas



interacciones las que le permiten a los organismos, dentro de una comunidad, persistir y crecer sobre un hábitat (Pérez-Luyo, 2005).

De acuerdo con los resultados en este estudio, los efectos directos del tratamiento de radiación gamma en el mango Ataulfo se observaron principalmente a tiempo 0 h ya que desaparecieron filotipos o bandas con respecto al control (Figura 26) indicando que el tratamiento dañó a ciertos filotipos y que estos murieron o disminuyeron su población hasta un punto donde no pudieron ser detectadas con la técnica del DGGE. Después de este tiempo, el efecto directo e indirecto del tratamiento (interacciones interespecie) estarían actuando de forma sinérgica sobre la composición y el comportamiento de la comunidad microbiana, por lo menos hasta a las 72 h.

Un ejemplo del efecto directo e indirecto actuando juntos sería que un grupo de microorganismos (Grupo A) tuviera mutaciones que alteraran la velocidad de su crecimiento y que esto favoreciera que otros grupos microbianos (Grupo B) ocuparan su lugar en el microambiente, aún cuando el grupo B también tuviera daños en su DNA por el efecto directo de la radiación gamma (Harwood y Buckley, 2008).

El fundamento de la radiación gamma es que los microorganismos irradiados son destruidos por la generación de radicales libres producto, principalmente, por la radiólisis del agua y consecuente daño al DNA. Sin embargo, la eficiencia del tratamiento depende de muchos factores como el tipo, especie y número de microorganismos y la composición y el estado físico en que se encuentre el alimento durante la radiación (Suárez, 2001; González-Aguilar *et al*, 2007; Slade y Rodman, 2011).

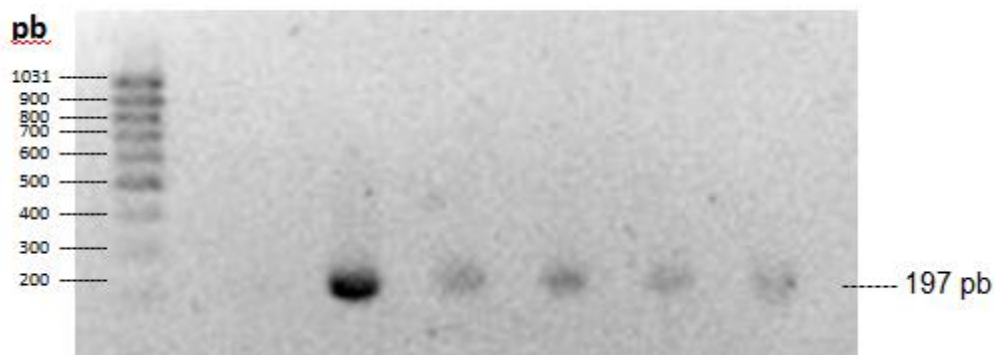
#### **8.5.5 SELECCIÓN DE BANDAS PARA SECUENCIAR**

La selección de bandas para enviar a secuenciación, se realizó mediante la ayuda del software Diversity Database versión 2.2 para Windows (BIORAD) que muestra la altura y la intensidad con la que se observa cada banda en el gel. Se seleccionaron las bandas que tuvieran mayor definición, que pudieran ser predominantes en las muestras o que fueran consideradas clave para entender el comportamiento de la comunidad bacteriana después del tratamiento de radiación gamma.

Del gel paralelo obtenido con la técnica DGGE se realizó la recuperación del DNA de 7 filotipos o bandas (Figura 26).

- Filotipo 1 (Banda 1). Se escogió este filotipo porque no se observó en ninguna muestra a tiempo 0 h, pero apareció de forma intensa a las 72 h independientemente del tratamiento.
- Filotipo 6 (Banda 6). Se escogió este filotipo porque se observó desde el tiempo 0 h hasta las 72 h en el mango control; y sólo hasta las 72 h en el mango irradiado.
- Filotipos 9 y 11 (Bandas 9 y 11). Se escogieron estos filotipos porque se presentaron con mayor frecuencia en todo el experimento (Tabla 25).
- Filotipo 10 (Banda 10). Se escogió este filotipo porque, a pesar de que apareció a las 24 h, éste desapareció en el mango irradiado a las 72 h y en las muestras del mango control se mantuvo constante.
- Filotipo 15 (Banda 15). Se escogió esta filotipo porque desapareció a las 72 h independientemente del tratamiento.
- Filotipo 16 (Banda 16). Se escogió este filotipo porque apareció a las 72 h independientemente del tratamiento.

El DNA se reamplificó utilizando los cebadores Agc338F (sin cola G-C) y B518R (Figura 31). El amplicón de 197 pb correspondiente a la región V3 del gen 16S rRNA. De los 7 filotipo que se mandaron secuenciar; 5 se analizaron en la base de datos GenBank de NCBI (bandas 1, 6, 10, 11 y 15) (Tabla 26); ya que los otros dos no arrojaron resultados en la base de datos; esto debido a que pudo haber solapamiento de varias bandas.



**Figura 31.** Fotografía del gel de agarosa con los productos de PCR reamplificados utilizando los cebadores Agc338F (sin cola G-C) y B518R de la región V3 del gen 16S rRNA a partir de las bandas extraídas del gel DGGE paralelo. Carril: 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco; 3: Positivo; 4: Filotipo 1; 5: Filotipo 6; 6: Filotipo 9; 7: Filotipo 10. Se obtuvo una concentración promedio de DNA de 60 ng/μL.

### 8.5.6 COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS EN LA BASE DE DATOS NCBI (GenBank)

Se encontraron 3 grupos microbianos: bacterias ácido lácticas (*Leuconostoc* sp.), enterobacterias (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp. y *Serratia marcescens*) y actinobacterias (*Arthrobacter* sp.) (Tabla 26).

**Tabla 26.** Comparación de las secuencias de los filotipos seleccionados del gel DGGE (región V3 del DNAr 16S, de aproximadamente 180 pb) con la base de datos existente en NCBI (GenBank).

<u>Filotipo</u> <u>Banda</u>	<u>Afiliación</u> <u>taxonómica más</u> <u>probable</u> <u>(clase/familia)</u>	<u>Solapamiento</u>	<u>Microorganismo</u> <u>más similar</u>	<u>N° de</u> <u>acceso</u>	<u>Valor-E</u>	<u>% de</u> <u>identidad</u>
1	Lactobacillales	246	<i>Leuconostoc</i> sp.	AF138782.1	3e-62	94
6	Y- proteobacteria	226	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	EF032681.1	4e-50	92
10	Y- proteobacteria	202	<i>Enterobacter</i> sp.	JN645951.1	7e-49	90
11	Y- proteobacteria	209	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	GQ981177.1	4e-51	90
15	Actinobacteria	209	<i>Arthrobacter</i> sp.	GU213401.1	4e-51	93

#### 8.5.6.1 FILOTIPO 1 (BANDA 1) *Leuconostoc* sp.

Los *Leuconostoc* son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, asporógenos, catalasa-negativos, su DNA contiene relativamente bajo G-C ( $37 \pm 45$  mol%), producen ácido láctico y dextrano a partir de sacarosa. Para *Leuconostoc dextranicus*, su valor  $D_{10}$  es de 0.9 KGy (Suárez, 2001), para *Leuconostoc mesenteroides* su valor  $D_{10}$  es de 0.3 y 0.45 KGy en jugo de caña de azúcar (Alcarde *et al*, 2003). Pero hay que recordar que la eficiencia del tratamiento con rayos gamma depende de varios factores.

El género *Leuconostoc* abarca un grupo filogenético de bacterias ácido lácticas (BAL) y consta de ocho especies: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc fallax* y *Leuconostoc argentinum*. *L. mesenteroides* contiene tres subespecies, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Kim *et al*, 2000).

Estas bacterias ácido lácticas se desarrollan en una variedad de entornos y dada su capacidad para crecer en condiciones ambientales variadas, resultan muy competitivas. Crecen en presencia de altas concentraciones de carbohidratos y con pH bajos (López-Tomás, 2004). Este grupo microbiano se ha detectado en plantas y frutos (Kim *et al*, 2000; Chambel *et al*, 2006). De hecho ya se han detectado algunos en la superficie del mango por Ramírez-Villaturo (2012) que identificó a *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus viridescens*.

El filotipo 1 identificado como *Leuconostoc* sp., no se observó en las muestras del mango control ni en el irradiado a tiempo cero. A las 24 h se observó en todas las muestras de los mangos control pero en ninguna de los tratados. A las 72 h; se observó tanto en las muestras del mango irradiado como en el control (Figura 25 y 26).

La técnica utilizada para el análisis de las comunidades microbianas (DGGE), solo permite detectar las poblaciones que muestran una abundancia relativa superior al 1% (Muyzer y Smalla, 1998). Es posible que *Leuconostoc* sp. tuviera una abundancia relativa menor al 1% debido a que el lavado previo de los mangos disminuyó su densidad microbiana y por eso en la mayoría de las muestras control no se detectó la banda 1 sino hasta las 24 h y en los mangos irradiados hasta las 72 h (24 h después que en el control). Probablemente, *Leuconostoc* sp. tuvo un crecimiento más lento en las muestras de mangos irradiados que en las muestras de mangos control debido al efecto de la radiación gamma. El hecho de que se detecte *Leuconostoc* sp. en la superficie del Mango Ataulfo, podría ser benéfico para evitar el desarrollo de microorganismos no deseados, como especies del género *Enterobacter*, debido a la producción de bacteriocinas, que actúan como sustancias antimicrobianas. (López-Tomás, 2004; López, 2006).

Hay dos factores que pudieron haber influido en que *Leuconostoc* sp. sobreviviera al tratamiento de radiación gamma:

1. Son cocos Gram positivos: Estos son las más resistentes de las bacterias asporógenas (Suárez, 2001). Se puede hacer una generalización con la tinción de Gram y la resistencia a la radiación de las bacterias. La mayoría de las bacterias resistentes a la radiación son Gram positivos, mientras que la mayoría de las bacterias sensibles a la radiación son Gram negativo (Slade y Rodman, 2011). La pared de las bacterias Gram positivas está constituida principalmente por cadenas de peptidoglicano, unidas por puentes peptídicos. Contienen una gran cantidad de ácidos teicoicos que no están presentes en las bacterias Gram negativas. Estos ácidos

teicoicos están formados principalmente por un alcohol (glicerol o ribitol) y fosfato. Algunas de las funciones que presentan son i) controlar la entrada y salida de cationes (magnesio), ii) regular la actividad de las autolisinas, iii) tienen un papel en la elongación y división y iiiii) pueden estar implicados en el almacenamiento de fosfato; ya que cuando las concentraciones de fosfato en el medio son bajas, los ácidos teicoicos de la pared celular son sustituidos por ácidos teicurónicos (polisacáridos compuestas por ácidos urónicos y N-acetilglucosamina) y de esta manera se evita el uso de los fosfatos que contienen los ácidos teicoicos; permitiéndole a la célula seguir produciendo ATP y otros componentes celulares (Swoboda *et al*, 2010).

Es posible que esta última característica sea uno de los factores por el que las bacterias Gram positivas presentan una mayor radiorresistencia que las bacterias Gram negativas. Los ácidos teicoicos podrían ser proveedores de ortofosfatos que actúan en sinergia con el ion  $Mn^{2+}$  para secuestrar radicales superóxido ( $O_2^-$ ) protegiendo a proteínas del estrés oxidante como ocurre en *Deinococcus radiodurans* (Slade y Rodman, 2011). Aprea (2006) encontró en bacterias ácido lácticas (lactobacilli y lactococci) la presencia de estos gránulos de polifosfato. Y diversas especies de *Leuconostoc* y todos los *Lactobacillus* necesitan de  $Mn^{2+}$  para crecer, mineral que tienen los extractos vegetales y que explica la presencia de las BAL en estas matrices (García-Guerrero y Mora-Peñaflor, 2007). De hecho, se ha reportado manganeso en la cáscara de mango (Guzmán-Estrada *et al*, 1996). Por lo que *Leuconostoc* sp. podría tener disponibilidad del ion  $Mn^{2+}$  y gránulos de polifosfato para protegerse de los radicales libres causados por la radiación gamma.

2. *Leuconostoc* produce dextranos a partir de sacarosa y manitol a partir de fructosa. El manitol funciona como antioxidante al secuestrar EROs y, como ya se ha observado en fermentadores de manitol, también ayuda a mantener la turgencia de la célula (Hyun-Myung *et al*, 2010). La sacarosa (Camacho *et al*, 2008; Slade y Rodman, 2011) estabiliza lípidos de membrana y proteínas cuando hay baja actividad de agua (deseccación). Se ha observado que el daño causado a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos debido a la desecación es similar al daño causado por la radiación gamma (liberación de radicales libres). Ya que en nuestro planeta los ambientes áridos son más comunes que los ambientes con una alta dosis de radiación, la radiorresistencia podría seguir la hipótesis de "la adaptación a la desecación", que sugiere que la resistencia a la radiación es una consecuencia incidental de la adaptación a la deshidratación. Se encontró que cepas de *D. radiodurans* sensibles a la radiación son proporcionalmente sensibles a la desecación; lo que indica que la resistencia a la

radiación y la resistencia a la desecación son fenómenos relacionados (Slade y Rodman, 2011).

Villalpando-Guzmán (2010) reportó que la cáscara del mango tiene carbohidratos, dentro de los cuales están la sacarosa, la glucosa y la fructosa, siendo la sacarosa la que se encontró en mayor proporción. Por lo tanto, la sacarosa, podría actuar en el género *Leuconostoc* sp. como protector de los componentes celulares durante el estrés oxidante causado por desecación o radiación gamma, al estabilizar lípidos y proteínas.

#### **8.5.6.2 FILOTIPOS 6, 10 Y 11 (BANDA 6, 10 Y 11) ENTEROBACTERIAS**

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Pueden ser patógeno o microorganismos ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales como el hombre (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

Los géneros de *Klebsiella* y *Enterobacter* son coliformes fecales. Los coliformes fecales están definidos como bacilos Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  dentro de las  $24 \pm 2$  horas. Su presencia es indicio de que el alimento tiene una contaminación de origen fecal (Cortés-Lara, 2003). El grupo de microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

El filotipo 6 se identificó como *Klebsiella pneumoniae*, el filotipo 10 como *Enterobacter* sp. y el filotipo 11 como *Serratia marcescens* (Tabla 26). Los 3 microorganismos ya han sido aislados del mango antes (Poubol e Izumi, 2005; Perez-Jimenez, 2007; Guadarrama-Orozco, 2009).

De acuerdo con la NOM-113-SSA1-1994, la detección de coliformes indicaría prácticas sanitarias deficientes en el manejo del mango. Sin embargo, algunos autores señalan que debido a que los géneros de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* se encuentran en grandes cantidades en el ambiente (fuentes de agua, vegetación y suelos), no están asociados necesariamente a una contaminación de origen fecal, y su detección no significaría con certeza la presencia de microorganismos patógenos (Allen, 1996).

#### **8.5.6.2.1 FILOTIPO 6 (BANDA 6) *Klebsiella pneumoniae***

De acuerdo con los resultados (Figura 26), el filotipo 6 correspondiente a *Klebsiella pneumoniae* se detectó en todas las muestras de los mangos control. En el mango irradiado, el filotipo 6 no se detectó durante las primeras 24 h; sin embargo, a las 72 h se observó muy tenue (Figura 25).

#### **8.5.6.2.2 FILOTIPO 10 (BANDA 10) *Enterobacter sp.***

Es un microorganismo patógeno oportunista, se encuentra ampliamente distribuido en el agua, los afluentes cloacales, la tierra y los vegetales (Luz-Alves *et al*, 2010). Al ingresar en el número de acceso en la base de datos NCBI (genbank) que correspondió al de mayor porcentaje de identidad para esta banda (Tabla 26) se encontró que este microorganismo fue aislado de un cultivar de mango (Jaiswal *et al*, 2011). Su presencia en alimentos es indicador de malas prácticas de higiene. Está asociado con infecciones nosocomiales, incluyendo infecciones en el tracto urinario y bacteremia.

Dentro del género *Enterobacter* las principales especies causantes de infecciones en humanos son: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* y *E. sakazakii* (ahora *Cronobacter sakazakii*). Otras especies son: *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. cowanii*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. kobei*, *E. nimipressuralis*, *E. pyrinus* (Murray *et al*, 1999).

En el trabajo de Guadarrama-Orozco (2009) se encontró que cepas de *Enterobacter cloacae* aisladas de la superficie del mango fueron resistentes a antibióticos como amoxicilina, cefazolina y ampicilina y el 53.8% de las cepas presentaron adherencia media a células Hep-2 y cierta capacidad para formar biopelículas. Por lo que su presencia no se debe restar importancia ya que, al asociarse a problemas de salud pública, estas características de adherencia y resistencia a antibióticos pueden constituir con los factores de virulencia de este patógeno oportunista.

De acuerdo con los resultados (Figura 26), el filotipo 10 correspondiente a *Enterobacter sp.* desapareció en los mangos irradiados al tiempo 0, reapareció a las 24 h y desapareció a las 72 h; mientras que en los mangos control su presencia fue constante durante las 72 h. El hecho de que apareciera a las 24 h en el mango irradiado significó que el filotipo se recuperó del tratamiento de rayos gamma; sin embargo esta recuperación pudo no haber sido al 100%, quedar sensible (efecto

directo) y morir después, o murió porque no pudo enfrentarse a la microbiota de competencia (interacciones interespecie). En la figura 43 se observa que en las muestra de mangos irradiados, tiempo 72 h; las bandas de los filotipos 1, 2 y 3 estuvieron intensas, al mismo tiempo que las bandas de los filotipos 5, 6 y 7 estuvieron tenues. Es posible que el comportamiento de la comunidad bacteriana haya influido en la desaparición del filotipo 10 a las 72 h en el mango irradiado. Por ejemplo, bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (identificado como filotipo 1) inhiben a especies del género *Enterobacter* como *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter agglomerans* debido a la competencia por los mismos nutrientes y por la producción de bacteriocinas (Sapers *et al*, 2005). Lo más probable, es que los dos efectos hayan influido en la desaparición del filotipo 10.

#### **8.5.6.2.3 FILOTIPO 11 (BANDA 11) *Serratia marcescens***

De acuerdo con los resultados (Figura 26), los filotipos 11 y 9 estuvieron presentes en todas las muestras de mangos control e irradiado. Fueron los filotipos cuyas bandas estuvieron con mayor frecuencia (Tabla 25). Ya que estos filotipos se detectaron independientemente del tratamiento, las interacciones interespecie no tuvieron un efecto en su presencia.

Para el filotipo 9 no se pudo realizar el análisis de su secuencia; es probable que fuera más de una banda que comigró en el gel paralelo. Al analizar la secuencia de DNA del filotipo 11 en las base de datos, se identificó como *Serratia marcescens* (Tabla 26). Existen estudios que demuestran que esta bacteria es resistente a la radiación. Zakeri y colaboradores (2012) mostraron que *S. marcescens* puede desarrollar resistencia a la radiación gamma. Ellos aislaron a una *S. marcescens* de aguas termales en la ciudad de Ramsar, en la costa del Mar Caspio resistente a la radiación por  $Ra^{226}$  (la cual produce radiación gamma también) y llevaron a cabo un análisis proteómico donde se encontró un aumento en las siguientes proteínas que lo protegen del estrés oxidante: a) Chaperonas Dna K y GroEL que estabilizan a las proteínas promoviendo su plegamiento adecuado y previniendo una asociación incorrecta, b) Factores de elongación como EF-Tu y EF-G que se cree pueden tener un papel importante en disminuir los errores durante la síntesis de proteínas, c) Proteínas que catalizan la formación de clusters de hierro-azufre; los cluster de hierro-azufre son cofactores importantes para muchas de las proteínas implicadas en distintos procesos celulares, incluido el transporte de electrones y la protección contra el estrés oxidante, d) Aumento de la proteína Dps, una proteína de unión inespecífica al DNA con un dominio tipo ferritina por lo que atrapa hierro, lo que disminuye la reacción de Fenton y



con ellos la generación de radicales libres, e) Regulación positiva de enzimas glucolíticas, lo que le permite a las células tener energía para hacer frente a condiciones adversas. Se ha visto que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es inactivada frente a estrés oxidante, lo que redirige temporalmente el flujo metabólico de la glicolisis a la vía de las pentosas, generando más NADPH, importante cofactor de enzimas que regeneran antioxidantes, f) Proteína A (OmpA) que tiene un importante papel en estabilizar la membrana externa de factores dañinos, g) Lipoproteína de membrana (Lpp) que interactúa con el peptidoglicano para mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

*Serratia marcescens* es un fermentador lento de lactosa, puede crecer en niveles de pH que varían entre 5 y 9, tiene motilidad y produce un pigmento rojo-violeta, que es un complejo proteico con  $Fe^{2+}$  y que presenta actividad mimética de superóxido dismutasa (Venil y Lakshmanaperumalsamy, 2009); también produce un pigmento color rojo-naranja (prodigiosina) de naturaleza pirrólica unido a la membrana interna (Venil y Lakshmanaperumalsamy, 2009) que ha mostrado actividad antimicrobiana (Venil y Lakshmanaperumalsamy, 2009) y antioxidante (Yanagimoto *et al*, 2002), lo que podría contrarrestar los radicales libres formados por el tratamiento de radiación gamma. Los biotipos que no sintetizan prodigiosina son considerados patógenos oportunistas; los biotipos de ambientes naturales que la producen raramente se han relacionado con infecciones.

Al ingresar en el número de acceso en la base de datos NCBI (genbank) que correspondía a la *Serratia marcescens* de mayor porcentaje de identidad con el filotipo 11 (Tabla 26) se encontró que este microorganismo fue estudiado en México por Gutiérrez-Román y colaboradores en 2012. Sus estudios mostraron que *Serratia marcescens* (aislada de las zonas tropicales de México) producía prodigiosina y quitinasas. Concluyeron que la producción de prodigiosina no se veía afectada por el pH, que las cepas estaban bien adaptadas a climas tropicales y que por su producción de prodigiosina y quitinasas inhibían el crecimiento micelial (40%) y la germinación de conidios (81-89%) de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en frutos. El mango posee una elevada susceptibilidad al desarrollo de antracnosis ocasionada por este hongo. La enfermedad afecta la calidad y reduce sus posibilidades de comercialización. Se estima que las pérdidas postcosecha por antracnosis en mango fluctúan entre 30 y 60% de total de la producción (Carrillo-Fasio *et al*, 2005). Las características que tiene *Serratia marcescens* sugieren su potencial como agente de control biológico contra el hongo que causa la antracnosis en las

regiones tropicales del mundo (Gutiérrez-Román *et al*, 2012); lo que le daría un valor agregado al mango en su comercialización.

#### **8.5.6.3 FILOTIPO 15 (BANDA 15) *Arthrobacter* sp.**

Son bacterias Gram positivas, aerobias obligadas y con forma de bacilo durante la fase de crecimiento exponencial y de coco durante la fase estacionaria, no forma esporas. Pertenece a la familia *Micrococcaceae*, es un género de bacterias comúnmente encontradas en el suelo y en ambientes extremos como en el hielo del ártico, sitios contaminados por químicos y ambientes radiactivos (Mongodin *et al*, 2006; Osman *et al*, 2008). Dentro del género algunas especies son: *A. giacomelloi*, *A. spp.*, *A. protophormiae*, *A. globiformus*, *A. crystallopoietes*, *A. oxydans*, *A. agilis*, *A. luteolus*, *A. nicotianiae*, *A. húmica*, *A. oryzae*, *A. soli*, *A. aurescens* (O'Loughlin *et al*, 1999; Mongodin *et al*, 2006; Mantilla-Cárdenas, 2007)

Es una rizobacteria ubicua promotora del crecimiento vegetal debido a la producción de reguladores del crecimiento como ácido indol acético (AIA), giberelina, citoquinina y ayuda a la fijación biológica de nitrógeno (Mantilla-Cardenas, 2007). Provoca una mejora de la germinación del desarrollo de la raíz, de la nutrición mineral y de la utilización del agua.

*Arthrobacter* sp. es resistente a la desecación y a la radiación. Cepas de este género son las que prevalecen en tanques que almacenan desechos radiactivos en el Departamento de Energía de Washington USA. Su forma cocoide es la más estable y la que le permite sobrevivir a condiciones de estrés. En su transición hacia la forma cocoide se ha demostrado que requiere de manganeso (II), mineral relacionado con la resistencia a la radiación gamma en *Deinococcus radiodurans* (Mongodin *et al*, 2006; Slade y Rodman, 2011), contiene dos plásmidos que codifican para un gran número de proteínas involucradas en la respuesta ante el estrés oxidante, químico y por desecación (Mongodin *et al*, 2006).

De acuerdo con los resultados (Figura 26), el filotipo 15 correspondiente a *Arthrobacter* sp. se encontró tanto en los mangos control como en los irradiados al tiempo 0 y 24 h; indicando que el filotipo sobrevivió a la radiación gamma. Como ya se mencionó antes, este género se encuentra comúnmente en el suelo, por lo que pudo haber llegado al fruto desde su recolección. Sin embargo, el filotipo 15 desapareció a las 72 h independientemente del tratamiento. Este comportamiento podría deberse a las interacciones interespecie. Un filotipo que se detectó solo en el tiempo 72 h

independientemente del tratamiento y coincidió con la desaparición del filotipo correspondiente a *Arthrobacter* sp.; fue el filotipo 16. Algunas especies de *Arthrobacter* requieren factores de crecimiento como biotina, tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y vitamina B12 (Buchanan y Gibbons, 1974); la pérdida importante de vitaminas no tiene lugar en las frutas irradiadas a dosis toleradas por el producto fresco (Molins, 2003), así que es probable que el crecimiento del filotipo 15 se inhibiera por la presencia de filotipos de competencia que utilicen los mismos factores de crecimiento y que los metabolicen más rápido (Harwood y Buckley, 2008; Fuma *et al*, 2010).

## 9. CONCLUSIONES

La irradiación de mangos Ataulfo con una dosis de 1KGy y almacenados a temperatura ambiente redujo la presencia de *E. coli* O102:H6 en un 97%, sin tener un efecto negativo en los parámetros fisiológicos, fisicoquímicos y sensoriales evaluados, por lo que se considera que es la dosis máxima que puede soportar el mango Ataulfo sin afectar su calidad de exportación y darle al fruto un valor agregado.

Se recomienda la dosis de 1KGy, porque a mayor dosis se modifica el sabor y aspecto característico de los mangos Ataulfo y no serían óptimos para su consumo.

El estado de madurez y calidad del mango son aspectos importantes en la aplicación del tratamiento de radiación gamma para obtener mejores resultados.

Se lograron identificar 3 grupos microbianos: enterobacterias, bacterias ácido lácticas y actinobacterias.

El tratamiento de radiación gamma presentó un efecto directo (daño oxidante) y un efecto indirecto (interacciones interespecie), éste último podría haber predominado sobre el estrés abiótico; por lo que el perfil de la comunidad bacteriana a las 72 h en el mango irradiado fue similar al del control. El efecto final en una comunidad bacteriana, debido al tratamiento de rayos gamma, podría depender de qué microorganismos estén presentes, de la densidad microbiana de cada uno al inicio del tratamiento y de cómo interactúan entre ellos.

## **10. PERSPECTIVAS**

Evaluar las relaciones interespecie en condiciones de estrés (radiación gamma) mediante el estudio de la dinámica de poblaciones. La dinámica de poblaciones es el estudio de los cambios que sufren las comunidades biológicas así como los factores y mecanismos que los regulan. Estos estudios permiten predecir con mayor grado de seguridad los resultados de nuevas introducciones de enemigos naturales en la comunidad microbiana nativa y establecer teorías robustas que sirvan de base para la generación de nuevos programas de control.

## 11. ANEXO I EQUIPO Y MATERIALES

### MATERIAL BIOLÓGICO

- Mango Ataulfo
- Cepa E. coli

### IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA E. coli

- Incubadora
- Cajas Petri de 9 cm de diámetro
- Tubos de ensayo
- Tubos Craige
- Microplacas
- Micropipetas
- VITEK Colorimeter Product No. 52-1210
- Tarjetas VITEK GNI+
- VITEK Red Transfer Tubes
- BioMerieux Vitek 32

### EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD

- Potenciómetro.
- Refractómetro de mano.
- Analizador de gases por infrarrojos.
- Balanza analítica.
- Tabla para picar
- Cuchillo
- 3 Embudos
- 3 Matraces Erlenmeyer de 125 ml
- 3 Vasos de precipitados de 100 ml
- Bureta de 50 ml
- Pinzas para bureta
- Soporte universal
- Pipetas volumétricas de 10 ml
- Probeta graduada 100 ml
- Espátula.
- Piseta
- Agitador de vidrio.

- Gotero o pipeta pasteur
- Papel filtro.
- Contenedores de vidrio.
- Agujas desechables.
- Morteros con pistilo.
- Cronometro.

#### EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN PATÓGENOS

- Disco estéril
- Charolas plásticas
- Incubadora
- Cajas Petri de 9 cm de diámetro
- Centrífuga
- Tubos eppendorf
- Micropipeta
- Refrigerador
- Hisopo estéril
- Viales estériles

#### RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA

- Bolsas de plástico
- Barnsted/Thermolyn Type 50800 Rotomix
- Matraz
- Incubadora.
- Equipo de filtración millipore
- Tubos de centrifuga
- Centrífuga

#### EXTRACCIÓN DE DNA

- Microtubos
- Incubadora
- Centrífuga
- Vórtex

#### PCR

- Termociclador (PERKIN ELMER 2400)

## ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

- Pharmacia Biotech GNA 100 (cámara de electroforesis)
- BIORAD (fuente de poder)
- Fluor-S (BIORAD)

## DGGE

- DCode System (Bio-Rad Laboratories) incluyendo: modulo de electroforesis y control de temperatura, marco sujetador, sistema formador de gradiente, fuente de poder, base de ensamblaje para geles, 1 vidrio de 16 x 16 cm, 1 vidrio de 16 x 14 cm, 1 peine de 16 pozos y 1 mm de espesor, 2 espaciadores de 1 mm de espesor, 2 pinzas de sujeción para vidrios, 2 jeringas de 3 ml, juntas de goma, mangueras, conexiones y adaptadores, aguja y tarjeta de alineamiento.
- Fuente de poder
- Plancha termomagnética
- Parrilla de agitación
- Pipetas automáticas de 1ml, 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l
- Puntas delgadas para electroforesis
- 1 probeta graduada de 100 ml
- 1 probeta graduada de 10 ml
- 1 matraz aforado de 100 ml
- 5 matraces Erlenmeyer
- 2 matraces kitasato
- 3 vasos de precipitados de 200 ml
- 1 recipiente de vidrio para tinción del gel (30 x 30 cm)
- Bomba de vacío
- Filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m
- Microtubos de 1 ml
- Microtubos de 100  $\mu$ l



## 12. ANEXO II REACTIVOS

### IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA E. coli

- Medio semisólido
  - Peptona de caseína 10 g/L
  - Extracto de carne 3 g/L
  - Gelatina 80 g/l
  - Cloruro de sodio 5 g/L
  - Agua 4 g/L
- Formalina 0.06%
  - Cloruro de sodio 8.76 g/L
  - Formaldehido 6 mL
  - Agua destilada 1000 mL
- Biotriptasa 2%
- TSA
- Mac Conkey
- Agar sangre
- Solución salina 0.85%

### EFEECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD

- Solución de NaOH 0.1N 100 ml
- Fenolftaleína al 1% en etanol al 50%
- Buffer pH 4 y pH 7

### EFEECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN PATÓGENOS

- BHI
- Agar nutritivo con ampicilina (50 µg/ml)
- Agua peptonada al 0.1% estéril

### RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA

- Agua bidestilada estéril
- Macerex
- TES 50X
  - Tris HCl 0.05M
  - NaCl 0.05 M
  - EDTA 0.05 M
  - pH 8.0

- TE
  - Tris 10mM
  - EDTA 1mM

#### EXTRACCIÓN DE DNA

- EDTA 5 M
- lizozima (10 mg/μL)
- pronasa (20 mg/μL)
- RNA asa (20 mg/μL) Ribonucleasa A de páncreas de bovino
- SDS 10%
- fenol-cloroformo (1:1).
- EtOH al 100%
- Amortiguador TE
  - Tris-HCl 10 mM
  - EDTA 1mM
  - pH 8.0
  - Incubar a 65°C por 1 hora y colocar a -20°C hasta su uso.

#### PCR

- Agua
- Albúmina
- Amortiguador 10 X
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- DNTP's 10 mM
- Cebador rpoB1698f 1X
- Cebador rpoB2014r 1X
- Taq polimerasa 5U/μL: Invitrogen, \*Platinum® Taq DNA polymerase high fidelity
- DNA

Cebador	Secuencia
Cebador rpoB1698f *	5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3'
Cebador rpoB2014r	5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'

\*Se adicionó una capa de guanina-citosina con la siguiente secuencia:

5'-CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCC-3'

## ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

- Agarosa
- Amortiguador TBE 10X (p/1000mL)
  - TRIS 68 g
  - Ácido Bórico 55.4 g
  - EDTA 0.5 M 40 mL
  - pH 8.0
- TBE 1X
  - 100 mL amortiguador TBE 10X
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidio (5µg/µL)

## DGGE

- Solución de acrilamida/bis-acrilamida 40% (37.5:1) grado Biología molecular
  - Acrilamida 37.9 g
  - Bisacrilamida 1.02 g
  - Aforar a 100 mL de agua
  - Filtrar
  - Almacenar en frasco ámbar a -4°C
- Formamida desionizada grado Biología molecular
- Urea grado Biología molecular
- Persulfato de amonio 10% (p/v) grado Biología molecular
  - Persulfato de amonio 0.11 g
  - Agua 1 mL
- TEMED (N,N,N',N' -tetrametilendiamina) grado Biología molecular
- Buffer de carga (azul de bromofenol 0.25 %, xilen cianol 0.25 % y glicerol 30 %)
- Kit Plus One DNA silver staining (Pharmacia Biotech)
- Amortiguador TAE 50X
  - Tris 245 g
  - Ácido acético glacial 57.1 mL
  - EDTA 0.5M 100 mL
- EDTA 0.5 M pH 8
  - 18.612 g en 100 mL de agua
- Amortiguador TAE 1X
  - TAE 50X 140 mL
  - Agua MilliQ 6 860 L
  - Volumen final 7 L

○ Soluciones para tinción

Solución	Reactivos requeridos del Kit	Disolver en 100 ml de
Solución de fijación	25 ml de solución de fijación 5X	Solución de etanol 24% (v/v)
Solución de tinción	25 ml de solución de tinción 5X	Agua MilliQ
Solución de desarrollo	25 ml de solución de carbonato 5X 125 $\mu$ L de tiosulfato de sodio 125 $\mu$ L de formaldehído	Agua MilliQ
Solución de paro y preservación	25 ml de solución de paro 5X	Agua MilliQ

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- AFF (Alliance for Food and Farming). 2010. Analysis of produce related foodborne illness outbreaks.  
[http://www.foodandfarming.info/docs/386Produce\\_Analysis\\_2010\\_Final.pdf](http://www.foodandfarming.info/docs/386Produce_Analysis_2010_Final.pdf) [Jul 12, 2010]
- Almazán-Mendoza CD. 1998. Tecnología de la preservación de alimentos por irradiación. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alcarde AR, Melges JM, Horii J. 2003. Fermentation of irradiated sugarcane must. *Scientia Agricola*. 60(4): 677-681.
- Allen M. 1996. La importancia para la Salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. Reunión sobre la calidad del Agua Potable. CEPIS. OPS. OMS. Lima, Perú.
- Almeida E, Fuentes JL, Sánchez A, Carro S, Prieto E. 2004. Efecto de la radiación gamma sobre la supervivencia y la inducción de la respuesta SOS en células de *Escherichia coli* deficientes en la reparación por escisión de nucleótidos y por recombinación. *Rev Cubana Invest Biomed* 23(4):242-248.
- Alvarado L. 2009. Actividad práctica No. 8 Biología celular, extracción de ADN. Universidad centrooccidental. Decanato de ciencias de la salud. Disponible en: [http://bibmed.ucla.edu.ve/DB/bmucla/edocs/materialdidactico/micro/biocelular/practica/extraccion\\_adn.pdf](http://bibmed.ucla.edu.ve/DB/bmucla/edocs/materialdidactico/micro/biocelular/practica/extraccion_adn.pdf) [02, febrero 2013]
- Ampe, F, ben Omar N, Guyot J. 1999. Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *J Appl Microbiol*. 87(1): 131-141.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis. Acidity (titratable) of fruit products. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Aprea G. 2006. Evaluation of the causes implicated in fermentation delay and complete fermentation failure during the manufacture of "Mozzarella di Bufala". Tesis de Doctorado. Facultad de medicina veterinaria. Universidad de Nápoles "Federico II". Italia.
- Arévalo-Galarza L, Saucedo-Veloz C, Bustos-Ramírez E, González-Hernández H. 2002. Maduración de frutos de aguacate Hass tratados con radiación gamma. *Agrociencia* 36(6): 667-673.
- Arias-Balderas MJ. 2012. Evaluación sensorial de productos vegetales para el control de calidad en empresas comercializadoras y productoras. Tesis de Licenciatura. UNAM

- Arpaia ML, Van Rooyen Z, Boer JP, Hofman PJ, Woolf AB. 2004. 2° Seminario Internacional de Paltos. Las prácticas culturales influyen sobre la calidad de la fruta en post cosecha. Sociedad Gardiazabal y Magdahl Ltda. Quillota, Chile.
- Aruscavage D, Lee K, Miller S, LeJeune JT. 2006. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *J. Food Sci.* 71(8):R89-R99.
- Ayala-Garay AV, Almaguer-Vargas G, De la Trinidad-Pérez NK, Caamal-Cauich I. 2009. Competitividad de la producción de mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán. *Rev. Chapingo Ser.Hortic.* 15 (2): 133-140.
- Baker, A.G. 1952. The vapor-heat process. USDA Yearbook, U.S. Gov. Print. Off., Wash. DC
- Balkwill DL, Reeves RH, Drake GR, Reeves JY, Crocker FH, Baldwin-King M, Boone DR. 1997. Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection ( $\mu$ g). *FEMS Microbiology Reviews.* 20(3-4):201-216.
- Barreiro-Méndez JA, Sandoval-Briceño AJ. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. 1° edición. Venezuela: Equinoccio.
- Beatty ME, LaPorte TN, Phan Q, Van Duyne SV, Braden C. 2004. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Saintpaul infections linked to mango consumption: a recurrent theme. *Clin Infect Dis.* 38(9):1337-8.
- Benfari-Ferraro MJ, Edelbet MA, Kunz LJ. 1981. Accurate automated identification of selected *Enterobacteriaceae* at four hours. *J Clin Microbiol.* 13(1):151-157.
- Benites-Vílchez J, Díaz-García R, López-Vivar J, Gajardo-Solari S, Kusch-Fuschlocher F, Rojas-Arredondo M. 2011. Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *BIOFARBO.* 19(1):1-7.
- Bernal-Gómez ME, de Mendonca-Junior CX, Manini-Filho J. 2003. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 39(4):425-432.
- Beuchat LR, Ryu JH. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis.* 3(4): 459–465.
- Beutelspacher-Santiago y Calderón-Ancona. 2005. Diseño y construcción de un generador de ozono para aplicaciones de purificación de agua. Tesis de maestría. Ciencias en ingeniería mecatrónica. Centro Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Cuernavaca, Morelos.

- Bhagwat AA. 2006. Microbiological safety of fresh-cut produce: Where are we now?. Washington, DC: American Society for Microbiology Press. p. 121-165.
- Blakey R, van Rooyen Z, de Graaf J. 2011. Semi-commercial gamma-irradiation of mangoes for market access. SA Mango Growers' Association Yearbook. 31: 13-17.
- Blandón-Navarro S. 2012. Fisiología de Poscosecha. [en línea]. Disponible en: [http://slbn.files.wordpress.com/2008/08/folleto-2\\_poscosecha-ii\\_fisiologia-de-frutas-y-hortalizas.pdf](http://slbn.files.wordpress.com/2008/08/folleto-2_poscosecha-ii_fisiologia-de-frutas-y-hortalizas.pdf) [2013, 20 de diciembre]
- Bolívar-Fernández N, Saucedo-Veloz C, Sauri-Duch E. 2011a. Respiración y parámetros relacionados durante la maduración del chicozapote cosechado en la península de Yucatán. Rev. Bras. Frutic. 33(spe1): 261-266.
- Bolívar-Fernández N, Saucedo-Veloz C, Sauri-Duch E. 2011b. Respiración y parámetros relacionados durante la maduración del Chicozapote cosechado en la Península de Yucatán. Rev. Bras. Frutic. 33(spe1):261-266.
- Brandl MT. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. Annu. Rev. Phytopathol. 44:367–92
- Briseño-Contreras CI, Vargas-Solano Z. 2008. Efecto de la aplicación de tratamientos con irradiación UV-C sobre la actividad de la polifenol oxidasa y peroxidada en mangos variedad "Ataulfo" almacenados en bajas temperaturas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Buchanan RE y Gibbons NE. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Burnett SL, Chen J, Beuchat LR. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. Appl Environ Microbiol. 66(11):4679-87.
- Bushong ST. 1999. Manual de radiología para técnicos física, biología y protección radiológica. 6° Edición. España: Harcourt.
- CAC/GL 21-1997. Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos a los alimentos.
- Camacho-Pérez I, González-Hernández VA, Molina-Moreno JC, Ayala-Garay OJ, Peña-Lomelí A. 2008. Efecto de desarrollo y secado de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot en germinación, vigor y contenido de azúcares. México Interciencia. 33(10): 762-766.
- Cárdenas LP, Sastoque AM, Peña MR. 2003. Métodos moleculares en muestras ambientales: una alternativa para establecer la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y la operación del sistema. Seminario

internacional sobre métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales. Universidad del Valle. Instituto Cinara. Colombia.

- Carrasco-García. 2010. Estudio comparativo del perfil sensorial del huitlacoche (*Ustilago maydis*) y otros hongos comestibles. Tesis de Licenciatura. UNAM
- Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Muy-Rangel MD, Sañudo-Barajas A, Márquez-Zaquera I, Allende-Molar R. 2005. Control biológico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y su efecto en la calidad postcosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. Rev. Mex. Fitopatol. 23 (1): 24-32.
- Cáseras I, Mulkay T, Rodríguez J, Paumier A, Sisino A, Castro-López T, Alonso O, Bango G, Gutiérrez P. 2003. Influencia del encerado y tratamiento térmico en la calidad post-cosecha del mango. Simiente. 73(1-2): 25-29.
- Castillo A, Mercado I, Lucia LM, Martínez-Ruiz Y, Ponce de León J, Murano EA, Acuff GR. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. J Food Prot. 67(4):713-20.
- CDC. 2008. Frequently Asked Questions.  
[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/foodborne\\_illness\\_FAQ.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/foodborne_illness_FAQ.pdf)  
[2010, 19 de marzo]
- CSPI (Center for Science in the Public Interest). 2005. Outbreak Alert! Closing the gaps in our federal foodsafety. Washington, DC. Disponible en: [http://www.cspinet.org/reports/outbreak\\_report.pdf](http://www.cspinet.org/reports/outbreak_report.pdf) [2010, 20 de marzo]
- Chambel L, Chelo IM, Zé-Zé L, Pedro LG, Santos MZ, Tenrerio R. 2006. *Leuconostoc pseudoficulmeun* sp. nov., isolated from a ripe fig. Int J Syst Evol Microbiol. 56(6):1375-1381.
- Clavero, M.R.S., J.D. Monk, L.R. Beuchat, M.P. Doyle, and R.E. Brackett. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7, *salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. Appl. Environ. Microbiol. 60(6):2069–2075.
- CNEA. 2009. Irradiación de alimentos: situación en 2009. Año 9(33-34). Disponible en: [http://www.cnea.gov.ar/pdfs/revista\\_cnea/33/narvaiz.pdf](http://www.cnea.gov.ar/pdfs/revista_cnea/33/narvaiz.pdf) [2013, de mayo]
- CNP. 2001. Rol de la temperatura en el almacenamiento de productos frescos. Guía Técnica poscosecha N° 5. Disponible en: <http://slbn.files.wordpress.com/2008/08/almacenamiento.pdf> [2010, 20 de marzo]



- Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W5975E/W5975E00.htm> [2010, 20 de marzo]
- CONASPROMANGO. 2011. Manejo postcosecha del mango. Manual de “Mejores prácticas poscosecha para el manejo del mango” (español/nmb) Disponible en: <http://mangomexicano.com.mx/sistema-producto-mango/mejorando-la-calidad-e-inocuidad/manejo-postcosecha-del-mango/> [2012, 17 de mayo]
- Cooley MB, Miller WG, Mandrell RE. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl Environ Microbiol.* 69(8): 4915-4926.
- Cortés-Lara MC. 2003. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la franja litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *Rev Biomed.* 14(2): 121-123.
- Critzer FJ, Doyle MP. 2010. Microbial Ecology of Foodborne Pathogens Associates with Produce. *Curr Opin Biotechnol.* 21(2):125-30.
- Cuesta-Amat G. 2004. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Tesis doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Delaquis P, Bach S, Dinu LD. 2007. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in Leafy Vegetables. *J Food Prot.* 70(8):1966-1974.
- EMEX. 2011a. México: A Estados Unidos, 80% de la producción de mango. Disponible en: [http://www.freshplaza.es/news\\_detail.asp?id=51989](http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=51989) [2012, 15 de mayo]
- EMEX. 2011b. Principales razones por rechazos de importaciones a los Estados Unidos. [http://www.freshplaza.es/news\\_detail.asp?id=50281](http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=50281) [2012, 15 de mayo]
- Escalante AE. 2007. Capítulo 12. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (compiladores). 1° ed. *Ecología molecular*. pp. 393-424. México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Coordinación editorial, diseño de interiores y tipografía: Raúl Marcó del Pont Lalli

- Estévez-Tapia EJ. 2013. Estudio de la utilización de radiación gamma como tratamiento para la disminución de la carga microbiana (*Escherichia coli* y coliformes totales) presente en carne molida de res destinada a la preparación de hamburguesas. Proyecto previo para la obtención del título de ingeniero agroindustrial. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional
- EUROATOM. 2008. Radiation-specific DNA non-double strand break lesions: repair mechanisms and biological effects (Non-DSB Lesions). Work performed as part of the European Atomic Energy Community's research and training programme in the field of nuclear energy 1998-2002.
- FAO. 1987. Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas (PARTE I) Disponible en:  
<http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055s00.htm> [2011, 4 de mayo]
- FAO. 1989. Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos. Disponible en:  
<http://www.fao.org/docrep/T0073S/T0073S00.htm> [2011, 4 de mayo]
- FAO. 2003. Técnicas de manejo poscosecha a pequeña escala: manual para los productos hortofrutícolas (4ª Edición)  
[http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ae075s/ae075s00.htm](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae075s/ae075s00.htm) [2010, 1 de octubre]
- FAO. 2005. Post-harvest handling losses. Disponible en:  
<http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j5778e.htm> [2010, 18 de septiembre]
- FAO. 2009. Tropical fruits review of recent world market situation for bananas and tropical fruits.  
<http://www.fao.org/docrep/012/ak341e/ak341e14.htm> [2011, 14 de abril]
- FAO. 2013. Tabla de composición de alimentos de América Latina. Disponible en:  
<http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimentos/busqueda/?clave=C321> [2011, 9 de febrero]
- FDA. 2001. FDA Survey of imported fresh produce. Cent. Food Saf. Appl. Nutr.  
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm118884.htm> [2011, 9 de febrero]
- FDA. 2003. Outbreaks Tied to FDA-Regulated Foods, 1990-2003  
[www.cspinet.org/new/pdf/outbreakalertlinelisting2004.pdf](http://www.cspinet.org/new/pdf/outbreakalertlinelisting2004.pdf) [2011, 9 de febrero]
- FDA. 2011. Información sobre alimentos de la administración de medicamentos y alimentos de los EE.UU. La irradiación de alimentos. Lo que usted debe

saber.

<http://www.fda.gov/downloads/Food/ResourcesForYou/Consumers/UCM262298.pdf> [2012, 3 de enero]

- FDA, 2012. FDA warns consumers against eating mangoes from Agricola Daniella of Mexico. Farm's mangoes contain strains of *Salmonella*. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm319464.htm> [2013, 21 de enero]
- Fernández-Amaro ALL. 2012. Modulation of aroma volatiles and phytochemical quality of fresh-cut melon (*Cucumis Melo L.*) by oxygen levels, 1-methylcyclopropene and lysophosphatidylethanolamine. Tesis de Doctorado. Universidad Católica Portuguesa. Escuela Superior de Biotecnología.
- Fernandez A. 1992. Alimentos Irradiados. Ciencia Y Sociedad. XVIII(1):44-51.
- Flores-González T, Herrera-Rojas RA. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública de Mé. 47(5): 388-390.
- Food and Water Watch. 2006. Status of food irradiation around the world. Disponible en: <http://documents.foodandwaterwatch.org/doc/World%20Irradiation%20Report.pdf> [2011, 1 de agosto]
- Fuma S, Takeda H, Miyamoto K, Yanagisawa K, Inoue Y, Sato N, Hirano M, Kawabata Z. 1998. Effects of g-rays on the populations of the steady-state ecological microcosm. Int. J. Radiat. Biol. 74(1): 145-150.
- Fuma S, Ishii N, Takeda H, Doi K, Kawaguchi I, Shikano S, Tanaka N, Inamori Y. 2010. Effects of acute g-irradiation on community structure of the aquatic microbial microcosm. J Environ Radioact. 101(11): 915-922.
- García-Guerrero A, Mora-Peñaflor N. 2007. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Garrido G, Valdés M. 2012. Avances en las investigaciones farmacológicas y toxicológicas con el extracto acuoso de la corteza del árbol de mango (*Mangifera indica L.*). Rev. Farmacol. Chile 5(2): 63-93.
- Gasull E, Becerra D. 2006. Caracterización de polifenoloxidasas extraídas de pera (cv. Packam's Triumph) y manzana (cv. Red Delicious). Inf. tecnol. 17(6):69-74.
- Gil A., Duarte I., Delgadillo I., Colquhoun J., Casuscelli F., Humper E., & Spraul M. 2000. Study of the compositional changes of mango during ripening by use

- of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal Agric. Food Chem.* 48 (5): 1524-1536.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants Review. *Plant Physiol Biochem.* 48(12): 909-930.
  - González-Aguilar, G.A., Ayala-Zavala, J.F., Rivera-López, J., Zavaleta-Gatica, R., Villegas-Ochoa, M.A., Tejedor-Espinosa, W. 2004. Reducción de deterioro en frutos de mango, durazno y nectarina utilizando irradiación ultravioleta (UV-C). *Ciencia de la Frontera* 3(1): 49-57.
  - González-Aguilar GA, Villegas-Ochoa MA, Cruz-Valenzuela MR, Vázquez F, Ayala-Zavala JF. 2007. Irradiación (UV-C) de mango fresco cortado y su efecto en la capacidad antioxidante. *Innovaciones fisiológicas y tecnológicas de la maduración y postrecolección de frutas y hortalizas.* Orihuela, España. (Memorias de Congreso).
  - González-de la Cruz JU, Delfín-González H, Cruz-Leyva MC, Rojas-Herrera R A, Zamudio-Maya M. 2011. Protocolo para la extracción de ADN metagenómico bacteriano del langostino *Macrobrachium carcinus* L. *Trop. subtrop. Agroecosyt.* 14(3): 875-883.
  - Govender V, Korsten L, Sivakumar D. 2005. Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biol Technol.* 38(1): 57-65.
  - Grompe M. 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet.* 5(2): 111-117.
  - Guadarrama-Orozco KD. 2009. Tipificación de cepas de *Enterobacter* aisladas de la superficie del mango y de su proceso post-cosecha, en una planta empacadora de Nayarit, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
  - Guevara MY, Rondón A, Arnal E, Solórzano R. 1985. Bacteriosis del mango (*Mangifera Indica* L.) en Venezuela li. distribución, perpetuación, diseminación y evaluación de la resistencia de variedades. *Agronomía Tropical.* 35(4-6):63-75.
  - Gutiérrez-Román MI, Holguín-Meléndez F, Bello-Mendoza R, Guillén-Navarro K, Dunn MF, Huerta-Palacios G. 2012. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potencial to control plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(1): 145-53.

- Guzmán-Estrada C, Alcalde-Blanco S, Mosqueda-Vázquez R, Martínez-Garza A. 1996. Contenido y extracción de algunos nutrimentos por el fruto de mango cv. Manila. *Agronomía Tropical* 46(4):431-446.
- Harwood C. Buckley M. 2008. *The Uncharted Microbial World: Microbes and their activities in the environment*. United States: American Academy of Microbiology.
- Hernández MM, Martínez MA, Alia TE, Hernández HLU, Osorio OR, Colinas LM, López MV, Bautista BS, Valle GS. 2008. Impact stress in sapote mamaey (*Pouteria sapota*) fruits during postharvest handling. *Rev. Fototec. Mex.* 31 (Núm. Especial 3):61-66.
- Hidalgo FJ, Zamora R, Alaiz M. 1992. Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. II. Mecanismos conocidos de la interacción lípido (oxidado)- proteína. Instituto de la Grasa y sus Derivados. *Grasas y Aceites*. 43(fasc. 2): 31- 38.
- Hodges DM, Toivonen PMA. 2008. Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress Review. *Postharvest Biol Technol.* 4(2): 155-162.
- Hsin-Yi, Cheng-Chun C. 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E.coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *Int J Food Microbiol.* 70(1-2):189-95.
- Hsin-Yi C, Roch-Chui Y, Cheng-Chun C. 2002. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Res Int.* 36(1): 49-56.
- Hyun-Myung Oh, Yong-Joon C, Byung KK, Jun-Hye R, Sa-Ouk K, Baek HN, Gajin J, Hong-Ui H, Jonsik C. 2010. Complete genome sequence analysis of *Leuconostoc kimchii* IMSNU 11154. *J Bacteriol.* 192(14): 3844-3845.
- ICMSF. 1986. *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2nd Edition. Blackwell Science, Oxford. Disponible en: <http://www.icmsf.org/pdf/icmsf2.pdf> [2011, 15 de mayo]
- ICMSF. 2002. *Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management*. New York:Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- INFOAGRO. El Cultivo del mango. Disponible en: [http://www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/mango2.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/mango2.htm) [2011, 11 de mayo]
- INFOAGRO. 2008. México entra al uso de la irradiación para la exportación de frutas: Acj. Disponible en:

- [http://www.infoagro.com/noticias/2008/10/4078\\_mexico\\_entra\\_al\\_uso\\_irradiacion\\_exportacion\\_frutas.asp](http://www.infoagro.com/noticias/2008/10/4078_mexico_entra_al_uso_irradiacion_exportacion_frutas.asp) [2011, 11 de mayo]
- INFOAGRO. 2009. Técnica de desesterilización favorece la exportación de productos del campo. Disponible en: [http://www.infoagro.com/noticias/2009/2/4993\\_tecnica\\_desesterilizacion\\_favorece\\_exportacion\\_pro.asp](http://www.infoagro.com/noticias/2009/2/4993_tecnica_desesterilizacion_favorece_exportacion_pro.asp) [2011, 11 de mayo]
  - ININ. 2011a. Beneficios de la irradiación gamma. Disponible en: <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/Beneficios.pdf> [2012, 4 de enero]
  - ININ. 2011b. Preguntas más frecuentes sobre la irradiación gamma. Por Miguel Alcérreca Sánchez. Jefe de la Planta de Irradiación Gamma, ININ. Disponible en: <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/Preguntas.pdf> [2012, 4 de enero]
  - Isaacs S, Aramini J, Ciebin B, Farrar JA, Ahmed R, et al. 2005. An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a phage type of *Salmonella enteritidis*. J. Food Prot. 68(1):191–98
  - Jacobi KK, MacRae EA, Hetherington SE. 2001. Postharvest heat disinfestation treatments of mango fruit. Scientia Horticulturae. 89(3): 171-193.
  - Jaiswal P, Jha SN, Narsaiah K, Bhardwaj R, Sharma R, Kumar R, Singh AK, Kaur P. 2011. Microbial diversity on major Indian mango cultivar. Submitted (13-JUN-2011) AS & EC, Cipheth, PAU Cipheth Campus, Ludhiana, Punjab 141004, India.
  - Jara-Ramírez M. 2004. Análisis de la composición del regulón LexA en el dominio *Bacteri*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología.
  - Jordán M, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. Capítulo XVI. Fisiología Vegetal. Chile: Ediciones Universidad de La Serena.
  - Juárez-Calderón JM, Ramos-Bernal S, Negrón-Mendoza A. 2006. El sistema sulfato ferroso amoniacal sólido como dosímetro para procesos a bajas temperaturas y altas dosis de radiación gamma. Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Memorias de XXV Congreso Nacional de Educación Química.
  - Kaye V. McWatters, Kay H., Beuchat, Larry R. 2005. Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, yeasts, and molds on blueberries, strawberries, and raspberries. J Food Prot. 68(6):1165-1175

- Kim J, Chun J, Han-Ui H. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50(5): 1789-1795.
- Kumari S, Harjai K, Chhibber S. 2010. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. *J Med Microbiol.* 60(2): 205-210.
- Lawless HT, Heymann H. 1998. Sensory evaluation of food. Principles and practices. USA: International Thomson Publishing. pp. 27-34.
- Liao, CH. 2007. Inhibition of foodborne pathogens by native microflora recovered from fresh peeled baby carrot and propagated in cultures. *J Food Sci.* 72(4):M134-9.
- Liao CH. 2009. Control of foodborne pathogens and soft-rot bacteria on bell pepper by three strains of bacterial antagonist. *J Food Sci.* 72(1):85-92(8)
- Little JB. 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21(3): 397-404.
- López-Tomás LA. 2004. Actividad aminopeptidásica ligada a membrana de bacterias Gram-negativas: prueba de la p-nitroanilina para la estimulación de la carga bacteriana de carne picada. Madrid. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria.
- López-Gazcón Zamudio Areli. 2005. Estudio de la vía Keap1/Nrf2/ARE en la inducción de la proteína citoprotectora hemo oxigenasa-1 por ácido nordihidroguayarático. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química.
- López VG. 2006. Estudio de la variabilidad microbiológica del pozol mediante PCR-DGGE con el gen rpoB. Tesis de Licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- López-Martínez NJ, Sañudo-Barajas JA, Noé-Aguilar C, Rodríguez-Herrera R, Contreras-Esquivel JC. 2011. Pectina de mango: perspectivas para su extracción. CIENCIACIERTA No. 27. Disponible: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC27/7.html> [2012, 4 de mayo]
- Luz-Alves WC, de Sousa-Gorayeb I, Brito Loureiro EC. 2010. Bacterias aisladas de culícidos (Diptera: Nematocera) hematófagos en Belém, Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 1(1):131-142
- Manatchaya N, Pasacal D, Peter T, Tipvanna N, Buncha O, Mazza G. 2006. Antimicrobial activity of vanillin against spoilage microorganisms in stored fresh-cut mangoes. *J Food Prot.* 69(7):1724-1727.
- Mantilla-Cardenas ME. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Yoko ono) en

periodo de enraizamiento. Bogotá. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

- McGuire RG. 1992. Reporting of objective color measurements. HortScience. 27(12): 1254-1255.
- McNamara, NP, Griffiths RI, Tabouret A, Beresford NA, Bailey MJ, Whiteley AS. 2007. The sensitivity of a forest soil microbial community to acute gamma-irradiation. Appl. Soil Ecol. 37(1-2): 1-9.
- Mendoza R. y Herrera A. 2012. Cinética de inactivación de la enzima peroxidasa, color y textura en Papa Criolla (*Solanum tuberosum* Grupo *phureja*) sometida a tres condiciones de escaldado. Inf. tecnol. 23(4): 73-82
- Molins R. 2003. Irradiación de alimentos. Principios y aplicaciones. Ed. Acribia. 1° edición. Pp. 490.
- Mongodin EF, Shapir N, Daugherty SA, DeBoy RT, Emerson JB, Shvartzbeyn A, Radune D, Vamathevan J, Riggs F, Grinberg V, Khouri H, Wackett LP, Nelson KE, Sadowsky MJ. 2006. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. PLoS Genetics. 2(12): 2094-2106.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 1999. Manual of clinical microbiology (7° Ed.). Capítulos dedicados a las enterobacterias:27 a 30. ASM Press, Washington, USA. Pp. 442-496.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 59(3):695-700.
- Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek. 73(1): 127–141.
- Nakuma-González JA. 2010. Estudio de las comunidades bacterianas de un biofiltro acoplado a un digestor anaerobio por electrophoresis en gel con gradient desnaturizante (DGGE). Estancia de titulación. Instituto Politécnico Nacional. Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología.
- Nagar V, Bandekar JR. 2011. Effectiveness of radiation processing in elimination of *Aeromonas* from food. Radiat Phys Chem. 80(8): 911–916
- NAPPO. 2008. Irradiación como tratamiento fitosanitario de poscosecha / Irradiation as a post-harvest phytosanitary treatment. Disponible en:



<http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=3886&IdUrl=6805> [2011, 21 de mayo].

- Nelson DL, Cox MM. 2000. Lehninger principles of biochemistry, 3rd ed. New York: Worth Publishers.
- Niemira BA, Solomon EB. 2004. Sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Salmonella* spp. to ionizing radiation. Appl. Environ. Microbiol. 71(5): 2732-2735.
- NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Métodos para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- NMX-FF-058-SCFI-2006 Productos Alimenticios No Industrializados Para Consumo Humano – Fruta Fresca – Mango (*Mangifera Indica L.*) – Especificaciones.
- NOM-075-FITO-1997 Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la movilización de frutos hospederos de moscas de la fruta.
- NOM-093-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.
- NOM\_120-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos. Bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
- NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano – Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”.
- Nübel U, García-Pichel F, Kül M, Muyzer G. 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. App Environ Microbiol. 65(2): 422-430.
- O'Loughlin EJ, Sims GK, Traina SJ. 1999. Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment. Biodegradation 10(2):93-104.
- Orskov F, Orskov I. 1984. Serotyping of *E. coli*. In: methods in microbiology. Vol. 14. Edited by T. Bergan. Academic Press, London. 43-112
- Osman S, Peeters Z, La Duc MT, Mancinelli R, Ehrenfreund P, Venkateswaran K. 2008. Effect of shadowing on survival of bacteria under conditions simulating the martian atmosphere and UV radiation. Applied and Environmental Microbiology. 74(4): 959-970.
- Osuna-García JA, Guzmán-Robles ML, Tovar-Gómez B, Montes de Oca MM, Vidal-Mártinez VA. 2002. Calidad del mango Ataulfo producido en Nayarit. Rev. Fitotec. Mex. 25(4):367-374.

- Osuna-García JA, Morales-Loredo A, Álvarez-Ojeda G. 2007. Manual de buenas prácticas de manejo y procedimiento de operación estándar de sanitización en empaques de mango para exportación adecuada a las condiciones de Nayarit. México. Instituto de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Publicación Técnica No.1.
- Parra-Lopez C, Baer MT, Groisman EA. 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* 12(11):4053–4062.
- Pabón-Calderón LA. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflor edulis* Sim var *edulis*). Trabajo de investigación en Ciencias en Biología- línea Genética. Colombia.
- Patiño-Vera M, Jiménez B, Balceras K, Ortiz M, Allende R, Carrillo A, Galindo E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *J Appl Microbiol.* 99(3):540-550.
- Peixoto RS, da Costa C HL, Rumjanek NG, Macrae A, Rosado AS. 2002. Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett Appl Microbiol.* 35(4):316–320.
- Peleg M, Cole MB. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 38 (5):353-380.
- Péluquin L, Greer CW. 1993. Cloning and expression of the polychlorinated biphenyl-degradation gene cluster from *Arthrobacter* M5 and comparison to analogous genes from Gram-negative bacteria. *Gene.* 125(1):35-40.
- Penteadó AL, Eblen BS, Millar AJ. 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect desinfectations procedures. *Journal of Food Protection.* 67: 181-184.
- Pérez-Barraza MH, Vázquez-Valdivia V, Urías-López MA. 2007. Contenido nutrimental en frutos normales y partenocárpicos (*Mangifera indica* Lin.) 'Ataulfo' en Nayarit, México. Memorias del II Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical. 17-21 de septiembre, La Habana, Cuba. 6 p.
- Pérez-Barraza MH, Osuna-García JA, Sánchez-Lucio R, Vázquez-Valdivia V. 2011. El paclobutrazol como promotor de la floración en mango 'manila', aún sin condiciones ambientales inductivas. *Revista Chapingo. Serie horticultura,* 17(spe1): 47-52.

- Pérez-Gómez M. 2010. Efecto del tratamiento por irradiación gamma en los parámetros de calidad de mango manila para exportación. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Perez-Jimenez A. 2007. Determinación de la fuente de contaminación con enterobacterias en el tratamiento post-cosecha del mango. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pérez-Luyo AG. 2005. La Biopelícula: una nueva visión de la placa dental. Rev. Estomatol. Herediana. 15(1): 82-85.
- Poubol J, e Izumi H. 2005. Shelf life and microbial quality of fresh-cut mango cubes stored in high CO<sub>2</sub> atmospheres. Journal of Food Science. 70:M69–M74.
- Primo-Yúfera E. 1997. Química de los alimentos. Editorial Síntesis. Madrid, España. pp 237- 2245.
- Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. 2010. Enterobacterias. Medicine. 10(51): 3426-31.
- Rajkowski KT, Boyd G, Thayer DW. 2003. Irradiation *D*-values for *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* sp. on inoculated broccoli seeds and effects of irradiation on broccoli sprout keeping quality and seed viability. J Food Protect. 66(5):760–766.
- Ramírez-Barrera GA. 2007. Serotipificación y detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes muestras obtenidas en una empresa avícola integrada. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México.
- Ramírez-Santos J, Contreras-Ferrat G, Gómez-Eichelmann M. 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 47(3-4): 92-101
- Ramírez-Villatoro G. 2012 (en revision). Efecto del tratamiento post-cosecha con UV-C sobre la microbiota de la superficie del mango y su relación con la incidencia de *E.coli*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de México.
- Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A. 2006. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. Food Microbiol. 23(2):136–145.
- Rivera-López J, Vázquez-Ortiz FA, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. 2005. Efecto del corte y la temperatura de almacenamiento en la calidad de papaya fresca cortada (*Carica Papaya* L. cV. “Maradol”). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 6(002): 83-94.

- Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 44(5): 464-475.
- Rodríguez-Ramírez MB, Romo-Escartín RM. 2010. Desarrollo del protocolo para aplicar tratamientos por irradiación gamma en mango "Ataulfo" para exportación. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roginskaya M, Razskazovskiy Y. 2009. Selective radiation-induced generation of 2-deoxyribonolactone lesions in DNA mediated by aromatic iodonium derivatives. Radiat Res.171(3):342-348.
- Rossi L, Watson D, Escandarani S, Miranda A, Troncoso A. 2009. La radiación a la mesa. Rev Chil Infect. 26 (4): 318-330.
- Ruíz-Hernández J, Ruíz-Montial LF. 2001. Efecto de la irradiación gamma de cobalto 60 en el deterioro químico de la pulpa de aguacate congelada. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Química.
- SAGARPA. 2004. Diagnóstico del sistema producto mango del estado de Oaxaca. Disponible en:  
[http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Mango/Attachments/10/pr\\_oax.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Mango/Attachments/10/pr_oax.pdf) [2011, 21 de agosto]
- SAGARPA. 2005. Plan rector del sistema producto mango. Diagnóstico del sistema producto mango ene el estado de Nayarit. Disponible en:  
[http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Mango/Attachments/9/pr\\_nay.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Publicaciones/SistemaProducto/Lists/Mango/Attachments/9/pr_nay.pdf) [2011, 21 de agosto]
- SAGARPA-SIAP. 2008. Sistema producto mango Disponible en:  
<http://www.mango.gob.mx/index.php?portal=mango> [2011, 21 de agosto]
- SAGARPA. 2009. México exporta exporta 300,000 toneladas de cítricos a estados unidos al año, además 160,000 toneladas de mangos, tratados con agua caliente. Disponible en:  
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/veracruz/Lists/Boletines/Attachments/61/BOLETIN%20Xalapa%2010%2002%2009.pdf> [2011, 21 de agosto]
- SAGARPA. 2010. Integra SAGARPA nuevo padrón de exportadores de mango para cumplir con requisitos de mercados internacionales. Disponible en:  
<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2010-B010.aspx> [2011, 21 de agosto]
- SAGARPA, 2011a. Refuerzan SAGARPA y SEDENA medidas de control para el tránsito de productos agroalimentario.

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2011/marzo/Documents/2011B150.pdf> [2012, 4 de enero]

- SAGARPA. 2011b. Inauguran moderna planta de tratamiento fitosanitario; permitirá aumentar exportaciones de frutas y hortalizas. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2011B407.aspx> [2012, 4 de enero]
- SAGARPA, 2012. Aumenta exportación de mango 33.3 por ciento durante 2012. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/delegaciones/Chiapas/boletines/2012/octubre/Documents/BO162012.pdf> [2012, 14 de noviembre]
- Sánchez-Castro I. 2009. Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Granada.
- Sapers GM, Gorny JR, Yousef AE. 2005. Microbiology of fruit and vegetables. USA. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL. 634 p.
- Schieber A, Ullrich W, Carle R. 2000. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Inn Food Sci Emerg Technol.* 1(2):161-166.
- Schieber A, Berardini N, Carle R. 2003. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 13;51(17):5006-11.
- Senasica. 2008. Plan de Trabajo para un Acuerdo General de Equivalencia Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=3582> [2011, 21 de mayo]
- Senasica, 2009. Anexo al plan de trabajo operativo para la exportación de mango fresco (*Mangifera indica*) irradiado de México a los Estados Unidos de América. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=3582&IdUrl=6418> [2011, 21 de mayo]
- Senasica, 2010. Detección de Planeación. Sanidad e inocuidad para la competitividad (resumen). Disponible en: <http://senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=19060&IdUrl=28106> [2011, 21 de mayo]
- Senasica, 2012a. Plan de acción. Medidas para prevenir y reducir los riesgos de contaminación microbiológica en mango fresco. Disponible en:

<http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=24155&IdUrl=50317> [2012, 21 de noviembre]

- Senasica, 2012b. Anexo 1. Requisitos técnicos para reducir los riesgos de contaminación microbiológica durante la producción primaria de mango: unidad de producción. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=5157> [2012, 21 de noviembre]
- Senasica, 2012c. Anexo 2. Requisitos técnicos para reducir los riesgos de contaminación microbiológica durante la producción primaria de mango: unidad de empaque. <http://www.senasica.gob.mx/?id=5157> [2012, 21 de noviembre]
- Senasica, 2012d. Anexo 3. Requisitos técnicos para reducir los riesgos de contaminación microbiológica durante el transporte y almacenamiento de frutos de mango. <http://www.senasica.gob.mx/?id=5157> [2012, 21 de noviembre]
- Senasica, 2012e. Anexo 4. Manual técnico de muestreo de productos agrícolas y fuentes de agua para la detección de organismos patógenos. <http://www.senasica.gob.mx/?id=5157> [2012, 21 de noviembre]
- Senasica. 2012f. Plan de trabajo para el tratamiento y certificación de mangos mexicanos. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=13256&IdUrl=43527> [2012, 21 de noviembre]
- Serbolisca L, de Ferra F, Margaril I. 1999. Manipulation of the DNA coding for the desulphurizing activity in a new isolate of *Arthrobacter* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(1): 122-126.
- SIAP, 2004. Plan rector del sistema producto mango. Disponible en: [http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/PRector/14\\_JAL/AG\\_Mango.pdf](http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/PRector/14_JAL/AG_Mango.pdf) [2011, 4 de enero]
- SIAP, 2012. Estadísticas del sector agroalimentario y pesquero. Uno de cada 5 mangos mexicanos se consumen en el extranjero. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/opt/123/77/76.html> [2012, 21 de noviembre]
- Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. Nature 163:688.
- SINAIS. 2005. Principales causas de mortalidad general. Disponible en: [www.sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m\\_005.xls](http://www.sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_005.xls) [2011, 17 de abril]
- Slade D, Rodman M. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. Microbiol Mol Biol R. 75(1):133–191.
- Slaughter DC. 2009. Methods for management of ripening in mango: a review of literature. University of California. Disponible en:

[http://www.mango.org/media/55737/methods\\_for\\_management\\_of\\_ripening.pdf](http://www.mango.org/media/55737/methods_for_management_of_ripening.pdf)  
[2012, 4 de febrero]

- Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S. 2007. In Vivo PCR-DGGE Analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Curr Microbiol.* 54(1):9–13
- Stone H, Sidel J. 1993. Sensory evolution practices. New York: Academic Press. pp 338.
- Suárez R. 2001. Conservación de alimentos por irradiación. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. 4(006): 85-124.
- Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S. 2010. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *Chembiochem.* 11(1): 35-45.
- Szczesniak, A. S. 2006. Classification of textural characteristics. *J. Food Sci.* 28(4): 385-409.
- Teplitski M, Warriner K, Bartz J, Schneider KR. 2010. Untangling metabolic and communication networks: interactions of enteric with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiol.* 19(3): 121-127.
- Thanaraj T, Terry LA, Bessant C. (2009). Chemometric profiling of pre-climacteric Sri Lankan mango fruit (*Mangifera indica L.*). *Food Chem.* 112(4): 786-794.
- Thayer, D.W., and G. Boyd. 2001. Effect of irradiation temperature on inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Protect.* 64(10):1624–1626.
- Trejo MA, Pascual SB, Pérez MA. 2010. Práctica 1. Evaluación de los principales parámetros de madurez y calidad de frutos. Taller Multidisciplinario de Procesos Tecnológicos de Frutas y Hortalizas. Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM Cuautitlán.
- Tsuji K. 1983. Low-dose cobalt 60 irradiation for reduction of microbial contamination in raw materials for animal health products. *Food Technol.* 37(2):48–54.
- Tyurina YY, Tyurin VA, Kapralova VI, Wasserloos K, Mosher M, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR, Kagan VE. 2011. Oxidative lipidomics of  $\gamma$ -radiation-induced lung injury: mass spectrometric characterization of cardiolipin and phosphatidylserine peroxidation. *Radiat Res.* 175(5):610-21.
- Ukuku DO. 2005. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. *Food Microbiol.* 23(3):289-93.

- USDA. 2003. Food and Agricultural Import Regulations and Standards. <http://www.fas.usda.gov/gainfiles/200308/145985863.pdf> [2011, 15 de enero]
- US Department of Agriculture. 2004. Microbial data program. Progress update and 2002 data summary. Disponible en: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=MDPSUMM02> [2011, 15 de enero]
- Umbelino DC. 2005. Sensory characterization by descriptive quantitative analysis juice time-intensity and mango pulp (*Mangifera indica* L.) sweeteners with edulcorants differentes. Tesis de Doctorado en Alimentos y Nutrición. Facultad de Ingeniería de Alimentos. Universidad Estatal de Campinas.
- Vargas-Simón G, Soto-Hernández RM, Rodríguez-González MT. 2002. Análisis preliminar de antocianinas en fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). Rev. Fitotec. Mex. 25(3): 261 – 264.
- Vasek OM, Hebert EM, de Giori SG, Raya R, Fusco AJ. 2001. Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cepas constituyentes de un fermento para la elaboración de Queso Artesanal de Corrientes. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-051.pdf>. [2012, 30 de enero]
- Vásquez-Hidalgo A. 2011. Extracto acuoso de propiedades naturales de *Mangifera indica* L. para el uso en la industria de superficies inanimadas como desinfectante, saponificador, desengrasador, limpiador natural. Universidad de El Salvador. Facultad de Medicina.
- Vázquez-Valdivia V, Pérez-Barraza MH, Osuna-García JA, Urías-López MA. 2009. Manejo integral de huertos de mango 'Ataulfo' con altas densidades de plantación. Revista Chapingo Serie Horticultura 15(2):155-160.
- Vélez-Sotres A, Ramos-Ramírez L, Calderón M, Wachter C, Eslava C. 2001. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas del mango. XI Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. Mérida Yucatán.
- Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P. 2009. An Insightful overview on microbial pigment, pProdigiousin. Electronic J. Biol. 5(3): 49-61.
- Vibha V, Ailes E, Wolyniak C, Angulo F, Klontz K. 2006. Recalls of spices due to bacterial contamination monitored by the U.S. Food and Drug Administration: the predominance of *Salmonellae*. J. Food Prot. 69(1):233–37
- Villalpando-Guzmán JL. 2010. Aprovechamiento de la pulpa, cáscara de mango (*Mangifera Indica* L.) y bagazo de caña para la obtención de productos



de interés Agroindustrial. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nayarit. Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias.

- Villanueva-Tiburcio JE, Condezo-Hoyos LA, Ramirez-Asquieri E. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). *Food Sci Technol* (Campinas). 30(Suppl. 1): 151-160.
- Warriner K, Huber A, Namvar A, Fan W, Dunfield K. 2009. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv Food Nutr Res.* 57:155-208.
- Yanagimoto K, Lee KG, Ochi H, Shibamoto T. 2002. Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. *J Agric Food Chem.* 50(19): 5480-5484.
- Zakeri F, Sadeghizadeh M, Reza Kardan M, Shahbani Zahiri H, Ahmadian G, Masoumi F, Sharafi H, Rigi G, Vali H, Akbari Noghabi K. 2012. Differential proteome analysis of a selected bacterial strain isolated from a high background radiation area in response to radium stress. *J Proteomics.* 75(15):4820-32.
- Zeng K, Cao J, Jiang W. 2006. Enhancing disease resistance in harvested mango (*Mangifera indica* L) fruit by salicylic acid. *J Sci Food Agric.* 86(5):694 – 698.
- Zhuang RY, Beuchat LR, Angulo FJ. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6):2127-2131.