



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Facultad de Química

EFFECTO DEL TRATAMIENTO POSTCOSECHA CON UV-C SOBRE LA
MICROBIOTA DE LA SUPERFICIE DEL MANGO Y SU RELACIÓN CON LA
INCIDENCIA DE *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Guadalupe Ramírez Villatoro

T U T O R P R I N C I P A L

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte, Facultad de Química, UNAM

M I E M B R O S D E L C O M I T É T U T O R

Dr. Sergio Sánchez Esquivel, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D. F. AGOSTO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, bajo la tutoría de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte. La autora recibió beca CONACyT de maestría. El proyecto fue financiado por PAPITT IN217807-3.



	Página
Resumen -----	<i>viii</i>
I. Introducción -----	1
II. Antecedentes -----	4
2.1 Generalidades del mango-----	4
2.2 Importancia económica, situación actual y producción nacional-----	4
2.3 Pérdidas postcosecha-----	5
2.4 Enfermedades, plagas y desórdenes fisiológicos del mango-----	5
2.5 Tratamientos postcosecha-----	6
2.5.1 Tratamientos con irradiación-----	7
2.5.1.1 Tratamientos con UV-C-----	8
2.6 Compuestos con acción antimicrobiana-----	9
2.6.1 Compuestos fenólicos-----	10
2.7 Microorganismos presentes en la superficie de frutos-----	11
2.8 Enterobacterias patógenas asociadas con el consumo de frutos-----	12
2.9 Microbiota presente en el mango-----	12
2.10 Importancia del estudio de la microbiota presente en el mango-----	13
2.11 Estudio de las comunidades microbianas en alimentos-----	15
2.11.1 Alternativas para el estudio de las comunidades microbianas en alimentos-----	16
2.12 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) -----	18
2.12.1 Aplicación del DGGE en el estudio de comunidades microbianas en alimentos-----	18
2.12.2 Principio y aspectos técnicos-----	19
2.12.3 Limitaciones de la Técnica-----	22
III. Objetivos e Hipótesis -----	24
Objetivo general-----	24
Objetivos particulares-----	24
Hipótesis-----	25
IV. Materiales y Métodos -----	26
4.1 Material biológico-----	26
4.2 Tratamiento de las muestras-----	26
4.3 Tratamiento con UV-C-----	27
4.4 Efecto de la aplicación del tratamiento con UV-C sobre la microbiota bacteriana de la superficie del mango-----	27
4.4.1 Recuperación de microorganismos de la superficie del mango-----	28
4.4.2 Extracción de ADN-----	28



4.4.3	Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN total de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango-----	29
4.4.4	Visualización del ADN total de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango-----	29
4.4.5	Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S para muestras de mango-----	30
4.4.6	Obtención del gradiente desnaturalizante óptimo para lograr la separación de productos de PCR de muestras de mango mediante un gel perpendicular-----	31
4.4.7	Separación de la mezcla de productos de PCR mediante la técnica de DGGE-----	32
4.4.8	Patrón de bandas generado a partir del ADN de cepas aisladas de la superficie del mango-----	33
4.4.8.1	Activación de las cepas previamente aisladas de la superficie del mango-----	33
4.4.8.2	Extracción de ADN-----	33
4.4.8.3	Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S-----	34
4.4.8.4	Análisis de las cepas mediante DGGE-----	34
4.4.9	Identificación de bandas predominantes a partir del gel paralelo de DGGE-----	34
4.4.9.1	Escisión de bandas-----	34
4.4.9.2	Identificación de bandas por búsqueda de parecidos en base de datos-----	35
4.5	Efecto de la microbiota presente en la superficie del mango sobre la sobrevivencia de <i>E. coli</i> en la superficie del fruto-----	35
4.5.1	Preparación de los frutos-----	35
4.5.2	Preparación del inóculo-----	36
4.5.3	Inoculación de los frutos-----	36
4.5.4	Análisis microbiológicos-----	37
4.6	Actividad antimicrobiana de extractos crudos preparados a partir de piel de mango-----	37
4.6.1	Extracción de compuestos fenólicos-----	38
4.6.2	Determinación de fenoles totales-----	38
4.6.3	Cepas y condiciones de cultivo-----	38
4.6.4	Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar-----	39
4.7	Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos por medio de análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia -----	40
4.7.1	Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia-----	40
4.8	Análisis estadístico-----	40
V.	Análisis de Resultados y Discusión-----	41
5.1	Montaje de las condiciones óptimas de la técnica de DGGE para determinar los cambios en la microbiota que se encuentra en la superficie del mango-----	41
5.1.1	Recuperación de la microbiota superficial, extracción del ADN y amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S-----	41
5.1.2	Obtención del gradiente desnaturalizante óptimo para lograr la separación	



de los productos de PCR de la microbiota bacteriana de la superficie del mango mediante un gel perpendicular-----	43
5.1.3 Consistencia del patrón de bandas en la superficie de frutos tratados con UV-C y frutos control-----	45
5.1.4 Interpretación de los perfiles obtenidos en los geles de DGGE por medio de un patrón de bandas de cepas aisladas previamente de la superficie del mango-----	47
5.1.5 Aplicación de segundo gradiente para corroborar si las bandas corresponde a un solo microorganismo (microheterogeneidad y co-migración)-----	52
5.2 Efecto de la aplicación del tratamiento con UV-C sobre la microbiota superficial de mangos Ataúlfo-----	55
5.3 Efecto del tiempo de almacenamiento de mangos Ataúlfo tratados con UV-C sobre su microbiota superficial-----	57
5.4 Experimentos reto para evaluar la sobrevivencia de <i>E. coli</i> en la superficie de mangos Ataúlfo-----	63
5.5 Efecto de la modificación de la microbiota superficial sobre la sobrevivencia de <i>E. coli</i> en la superficie de mangos con tratamiento UV-C-----	64
5.6 Efecto del tratamiento con UV-C sobre los compuestos fenólicos en la piel de mangos y su actividad antimicrobiana contra cepas aisladas de la superficie del mango-----	72
5.6.1 Concentración de compuestos fenólicos totales-----	72
5.6.2 Actividad antimicrobiana de extractos crudos preparados a partir de la piel de mango atulfo-----	74
5.7 Identificación de los compuestos fenólicos presentes en la piel del mango por medio de HPLC-----	79
 VI. Conclusiones -----	 83
 VII. Recomendaciones -----	 85
 VIII. Referencias -----	 87



Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Principales tratamientos postcosecha aplicados al fruto del mango-----	7
Tabla 2. Géneros predominantes en la superficie de los frutos-----	11
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar la región V3 del gen 16S rARN-----	31
Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar la región V3 del gen 16S rARN-----	31
Tabla 5. Micro heterogeneidad y co-migración de cepas aisladas de la superficie del mango-----	51
Tabla 6. Actividad antimicrobiana de extractos preparados a partir de la piel de mangos con y sin tratamiento UV-C-----	77



Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Aplicación del DGGE al estudio de comunidades microbianas en muestras de alimentos-----	19
Figura 2. Esquematización del principio de la separación de los productos de PCR por DGGE-----	21
Figura 3. Esquema de un gel perpendicular de DGGE-----	22
Figura 4. Diagrama de un gel perpendicular al campo electroforético-----	32
Figura 5. Diagrama de un gel paralelo de DGGE-----	34
Figura 6. Visualización de ADN obtenido en muestras con tratamiento con UV-C de la microbiota superficial del mango-----	42
Figura 7. Visualización de ADN en muestras control de la microbiota superficial del mango-----	43
Figura 8. Visualización de productos de PCR (Región V3 del gen ribosomal 16S) en muestras para el análisis del efecto del tratamiento con UV-C sobre la microbiota superficial del mango-----	43
Figura 9. Gel perpendicular de muestras control y con tratamiento con UV-C de la microbiota superficial del mango-----	44
Figura 10. Patrones de bandas de muestras control en geles paralelos a diferentes intervalos desnaturalizantes-----	45
Figura 11. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C -----	47
Figura 12. Visualización del ADN de cepas aisladas de la superficie del mango-----	49
Figura 13. Visualización de productos de PCR de cepas aisladas de la superficie del mango-----	49
Figura 14. Gel paralelo para análisis de las cepas aisladas de la superficie del mango-----	50
Figura 15. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C-----	54



Figura 16. Patrón obtenido por DGGE a partir de la banda A de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C-----	55
Figura 17. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C-----	56
Figura 18. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y control-----	59
Figura 19. Esquematización del patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y control-----	60
Figura 20. Supervivencia de <i>E. coli</i> en la superficie de mangos con tratamiento UV-C y control-----	66
Figura 21. Comparación del contenido de fenoles totales en la piel de mangos con tratamiento UV-C y sin tratamiento-----	75
Figura 22. Actividad antimicrobiana de extractos fenólicos preparados a partir de la piel de mango tratados con UV-C sobre <i>P. fluorescens</i> -----	76
Figura 23. Cromatograma de compuestos fenólicos de piel de mangos control (sin tratamiento)-----	80
Figura 24. Cromatograma de compuestos fenólicos de piel de mangos con tratamiento (20 min. 254 nm)-----	81
Figura 25. Contenido de (A) ácido cafeico y (B) ácido gálico en piel de mango-----	82
Figura 26. Contenido de ácido clorogénico en piel de mango-----	82



Lista de Abreviaturas

A

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
ARDRA: Análisis de restricción de ADN ribosomal
ARN: Ácido ribonucleico

D

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, del inglés *denaturing gradient gel electrophoresis*

F

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura

I

ICMSF: Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para Alimentos

R

rADN: Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RAPD: Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

T

TAE amortiguador: (Tris, ácido acético y EDTA)
TBE amortiguador: (Tris, borato y EDTA)
TES amortiguador: (Tris, EDTA y Cloruro de sodio)
TGGE: Electroforesis en gel con gradiente de temperatura

B

BHI: infusión cerebro-corazón
BLAST: Herramienta de búsqueda básica de alineamientos locales, del inglés *basic local alignment search tool*
BSA: Albumina sérica bovina, del inglés *Bovine seric albumine*

E

EDTA: Ácido Etilendiamino tetra acético, quelante de cationes divalentes

H

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés *High-performance liquid chromatography*
HR: Humedad relativa

P

PAL: Fenilalanina amonio liasa, del inglés *phenylalanine ammonia lyase*
PCR: Reacción de la cadena polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

S

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SD: Desviación estándar, del inglés *standard deviation*
SDS: Dodecil sulfato sódico
SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

U

UFC: Unidades formadoras de colonia
UV-C: Luz ultravioleta



Resumen

El mango es un fruto tropical de gran importancia debido a su producción y a su popularidad entre consumidores, ya que posee un atractivo color, sabor y tiene múltiples propiedades nutricionales. Se consume principalmente en fresco o mínimamente procesado, sin embargo, en diciembre de 1999, se reportó un brote de salmonelosis (causado por *Salmonella enterica* serotipo Newport) asociado al consumo de mangos provenientes de Brasil. Diversas enfermedades en humanos han sido relacionadas con el consumo de productos vegetales frescos contaminados. Tales enfermedades son producidas principalmente por los géneros *Salmonella* spp. y *E. coli*. Pocos estudios han abordado el efecto de los tratamientos postcosecha en la microbiota bacteriana de la superficie de los frutos. La microbiota asociada a los frutos permanece durante el transporte, procesamiento y almacenamiento por lo que es importante establecer el efecto que tiene el tratamiento postcosecha en la modificación de ésta y particularmente la relación que tiene con la sobrevivencia de patógenos como *E. coli*.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del tratamiento postcosecha por irradiación con luz ultravioleta (UV-C) sobre la microbiota bacteriana que existe en la superficie del mango, mediante la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) utilizando como blanco el dominio variable V3 del ADN ribosomal 16S, para así determinar su posible relación con la sobrevivencia de *E. coli*. Para ello se seleccionaron mangos de la variedad Ataúlfo y se les aplicó el tratamiento con UV-C (20 min.) y posteriormente se obtuvo su huella genética por DGGE. Finalmente se evaluó la sobrevivencia de *E. coli* después de que a los frutos se les aplicó el tratamiento con UV-C.

Con la escisión y la secuenciación de las bandas representativas en el DGGE, se identificaron 12 géneros de los cuales mostraron prevalencia las bacterias Gram-negativas



(75%) correspondientes a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Escherichia*. Asimismo, se identificaron bacterias Gram-positivas en menor proporción (25%).

Después de 8 días de aplicado el tratamiento no se ve afectada la sobrevivencia de *E. coli*, sin embargo, el análisis por DGGE muestra importantes cambios durante el almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C), los más evidentes se presentaron en el día 4. En el día 12 es más evidente la reducción del número de bandas tanto en los frutos control como en los frutos que recibieron el tratamiento con UV-C, probablemente estos cambios permitieron la sobrevivencia de *E. coli*. En conclusión la aplicación del tratamiento postcosecha afecta la diversidad microbiana a lo largo del almacenamiento y con ello probablemente afecta la sobrevivencia de *E. coli* en la superficie del mango Ataúlfo.



I. Introducción

México es uno de los principales exportadores mundiales de mango, siendo el quinto país productor, con una producción anual de 1 632 650 toneladas (FAO, 2012). Así pues, el potencial exportador es de gran importancia. Sin embargo, en los últimos años, productos hortofrutícolas mexicanos se han visto involucrados repetidamente con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, en Estados Unidos y Canadá. Un ejemplo importante es la aparición de un brote de salmonelosis en el 2002, asociado al consumo de melones importados de México, por lo que Estados Unidos suspendió su importación, lo que pone en riesgo el flujo de divisas para México (United States Census Bureau, 2003). Algunos otros brotes atribuidos a productos mexicanos son: con lechuga iceberg (*E. coli* O157:H7 en 1995); con fresas (Hepatitis A en 1997) y con cebollín (Hepatitis A en 2003) (Center for Disease Control, 1997). Resulta esencial garantizar la inocuidad de la industria agroalimentaria mexicana, independientemente del mercado al que sean destinados los productos.

Para el caso específico del mango, en diciembre de 1999 se reportó un brote de salmonelosis (causado por *Salmonella enterica* serotipo Newport) asociado al consumo de mangos provenientes de Brasil, en el que fue identificado como posible punto de contaminación la aplicación del tratamiento hidrotérmico al que fueron sometidos los frutos (Sivapalasingam *et al.*, 2003).

Por otro lado, como muchos otros frutos tropicales, el mango es susceptible a presentar una amplia variedad de desórdenes fisiológicos y enfermedades, por lo que para conservar su calidad es necesario utilizar métodos postcosecha, tales como el tratamiento térmico, que se estableció en 1988 como método de cuarentena para países que pretendan comercializar con Estados Unidos; sin embargo, este método puede ser fuente de contaminación de los frutos con algunos patógenos como *Salmonella* (Penteado *et al.*,



2004). Dado que la problemática relacionada con la inocuidad del mango puede estar asociada al tratamiento postcosecha hidrotérmico, surge la necesidad de implementar nuevas tecnologías que permitan mantener la calidad del fruto y minimizar pérdidas postcosecha pero a su vez garantizar la inocuidad del fruto. La luz UV-C (190-280 nm) ofrece posibilidades interesantes de aplicación debido a que tiene un efecto germicida (Bank *et al.*, 1990) y adicionalmente se ha encontrado que induce una respuesta en los frutos con relación al fenómeno de resistencia contra patógenos (Mercier *et al.*, 2001) debido a la acumulación de compuestos fenólicos y fitoalexinas (Erkan *et al.*, 2001). Se ha reportado repetidamente su eficacia para reducir la carga bacteriana. Yaun *et al.* (2004), demostraron una reducción del 99% de patógenos como *Salmonella* y *E.coli* O157:H7 en la superficie de manzanas, tomates y lechuga.

Se ha reportado que la exposición a radiación con UV-C (254 nm) induce la biosíntesis de sustancias (principalmente fenoles) tóxicos para algunos microorganismos patógenos. También se acumulan compuestos antibacterianos como las fitoalexinas (Erkan *et al.*, 2001); asimismo, se estimula la actividad de enzimas de la pared celular que refuerzan la protección contra la invasión de microorganismos patógenos (Liu *et al.*, 1993). Sin embargo, existe poca información disponible del uso de UV-C como método alternativo para el tratamiento del mango. Este método, además de eliminar algunas enterobacterias patógenas para humanos y patógenos para el fruto, también podría afectar y provocar cambios importantes en la microbiota que se encuentra en la superficie del fruto, existiendo así, la posibilidad de destruir microorganismos capaces de combatir a las bacterias patógenas.

Por otro lado, durante la última década se han desarrollado nuevas y poderosas herramientas moleculares para detectar e identificar de forma rápida y directa microorganismos presentes en una muestra, sin necesidad de cultivarlos. Una de las técnicas más utilizadas ha sido la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de urea y formamida (DGGE, por sus siglas en inglés). El DGGE es una técnica independiente



de cultivo que se usa generalmente para el estudio de la dinámica de comunidades bacterianas en diferentes entornos, permite el estudio de la estructura de la comunidad y su comportamiento. Los cambios en la diversidad microbiana pueden observarse a partir de la identificación de diferentes patrones de bandas que propiamente pueden indicar cambios en la riqueza de las especies. Los cambios en la intensidad de las bandas pueden indicar cambios en la abundancia. Para el análisis de los patrones de bandas de DGGE se asume que cada banda representa un grupo en particular de miembros (Nakatsu *et al.*, 2000). Con el DGGE, se puede obtener una “huella digital” de los microorganismos presentes en la superficie del mango a partir de la amplificación de la región V3 del gen rADN 16S. Además, de su posterior identificación por medio de la secuenciación de las bandas predominantes.

Por lo expuesto anteriormente, la finalidad de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto que tiene el tratamiento con UV-C sobre la microbiota superficial del mango para evaluar si su modificación puede favorecer el crecimiento de microorganismos patógenos para el humano los cuales podrían provenir de una contaminación posterior a la aplicación del tratamiento postcosecha. De esta manera, sentar precedentes para prevenir la sobrevivencia de patógenos para humanos en la superficie del mango y emitir algunas recomendaciones que permitan conservar su inocuidad.



II. Antecedentes

2.1 Generalidades del Mango

El mango (*Mangifera indica* L., familia Anacardiaceae) es originario del sur y sureste de Asia. Es uno de los frutos tropicales más importantes en cuanto a producción y a popularidad, ya que posee un color atractivo y sabor agradable, además de múltiples propiedades nutricionales (Jagtiani *et al.*, 1988).

El árbol de mango generalmente crece a una altura de 15-18 metros, las hojas son lanceoladas de color verde oscuro y tiene flores pequeñas de color amarillo. El fruto consta de piel externa (8-22%), una parte comestible (55-75%) y una semilla (7-23%). El tamaño, forma, color y sabor varían dependiendo de la variedad. La forma va de redonda a ovalada, la pulpa es de color amarillo a naranja y la piel es normalmente amarilla, pero en algunas variedades se presenta de rojo a verde (Shaw *et al.*, 1998).

Se cultiva en climas tropicales y subtropicales, requiere de un área cuya precipitación pluvial anual exceda de los 750 mm³, con una estación seca de 4-5 meses entre noviembre y marzo. No tiene requerimientos especiales en cuanto al suelo y crece a altitudes menores a 600 metros (Galán-Saúco, 1999).

2.2 Importancia Económica, Situación Actual y Producción Nacional

El mango es el tercer fruto tropical en cuanto a producción e importación a nivel mundial. La producción mundial en el 2010 fue de 38 665 809 toneladas y dentro de los mayores productores se encontraron India, China, Tailandia, Pakistán y México (FAO, 2012).



En 2010, México tuvo una producción de 1 632 650 toneladas, de las cuales se exportaron 232 643 toneladas, cubriendo con esto una cuarta parte del total mundial (FAO, 2012). Los principales destinos de los mangos mexicanos fueron: Estados Unidos (91. 8%), Canadá (6%) y Francia (1.2%). La producción nacional se concentra en los estados de Guerrero, Sinaloa, Veracruz, Nayarit y Michoacán (SIAP /SAGARPA, 2007).

2.3 Pérdidas Postcosecha

En el mundo se registran pérdidas de entre el 25 al 50% de la producción de mango después de la cosecha, como resultado de los procesos de descomposición, infestación por insectos y ataque de microorganismos, debido principalmente a un manejo y manipulación defectuosos. Estas pérdidas suelen ser mayores en zonas tropicales y subtropicales debido a las condiciones climáticas, además de que existe un escaso desarrollo de tecnologías que se puedan aplicar fácilmente a estos (Yahía y Flores, 2001).

Se sabe que la principal causa de las pérdidas postcosecha en mango es producto de las enfermedades, las cuales suelen ocasionar serias pérdidas del fruto tanto en términos de cantidad, como de calidad, debido a que los frutos infectados con alguna plaga o enfermedad pierden su valor comercial (Wilson *et al.*, 1994).

2.4 Enfermedades, Plagas y Desórdenes Fisiológicos del Mango

El fruto del mango es afectado por un sinnúmero de enfermedades, plagas y desórdenes fisiológicos que reducen la cantidad y calidad de estos ocasionando cuantiosas pérdidas (Ploetz, 2003).

El mango es atacado por unos 90 patógenos y más de 350 especies de insectos (Galán-Saúco, 1999). Las principales enfermedades que afectan a los frutos de mango son: antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* Petz, *C.gloesporioides* Minor Simmonds),



podrición de la punta (*Dothiorella dominicana*, *Dothiorella mangifera*, *Lasiodiplodia theobromae*), mancha negra (*Alternaria alternata* keisler) y mancha negra bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferaeindicae*). Otras enfermedades que atacan al fruto del mango son: oidio, costras (*scab*), ennegrecimiento por moho (*sooty mould*), gomosis y moho negro (*black mildew*) (Ploetz, 2003).

Dentro de las principales plagas que afectan al mango se encuentran: la mosca de la fruta (*Bactrocera phillippensis*, *Bactrocera occipitalis*), el gorgojo del mango (*Sternochaetus frigidus*), el insecto harinoso (*Ferrisia virgata* y *Planococcus lilacinus*) y el taladrador de la semilla (*Sternochetus Mangifera fabricius*). El número de insectos que infestan al fruto del mango es muy alto (Ploetz, 2003).

Los desórdenes fisiológicos se refieren al colapso del tejido del fruto que no es causado ni por la invasión de patógenos, ni por daños mecánicos. Los principales desórdenes fisiológicos que puede presentar el mango son: descomposición interna, daño por frío (*chilling injury*), quemadura por látex (*sap burn*), punta negra (*black tip*), tejido esponjoso (*spongy tissue*) nariz blanda (*soft-nose*), semilla gelatinosa (*jelly seed*) y pepita negra (Ploetz, 2003).

2.5 Tratamientos Postcosecha

Como resultado del incremento en la demanda de frutos de mango y el aumento de su producción a nivel mundial (FAO, 2012), se han desarrollado diversos métodos postcosecha, cuya finalidad principal es su conservación, manteniendo así la calidad del fruto en respuesta a las necesidades de los consumidores (Yahia y Flores, 2001).

Debido a que las principales causas de las pérdidas postcosecha son de orden fisiológico y patológico, para controlarlas se recurre en general a prácticas de manejo del fruto durante la cosecha y el almacenamiento. Todas estas medidas sin embargo, no son suficientes



para controlar el desarrollo de patógenos, por lo que se recurre entonces a la aplicación de diversos tratamientos postcosecha. Existe un mayor interés por desarrollar tecnologías basadas en el uso de tratamientos físicos, los que han sido utilizados en el mango se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Principales tratamientos postcosecha aplicados al fruto del mango.

Tratamiento	Referencia
Almacenamiento a bajas temperaturas	Medlicot <i>et al.</i> , 1990
Almacenamiento en atmósferas controladas	Ortega-Zaleta y Yahía, 2000; Rattanapanone <i>et al.</i> , 2001
Almacenamiento con atmósferas modificadas	Yahia y Vázquez-Moreno, 1993
Almacenamiento hipobárico	Mitra y Baldwin, 1997
Tratamientos térmicos	McCollum <i>et al.</i> , 1993; Jacobi <i>et al.</i> , 2001
Irradiación gamma	Frylinck <i>et al.</i> , 1987; Youssef <i>et al.</i> , 2002
Irradiación con luz UV	González-Aguilar <i>et al.</i> , 2001b
Control biológico	Korsten <i>et al.</i> , 1991; Koomen y Jeffries, 1993
Uso de películas	Díaz-Sobac <i>et al.</i> , 1997
Uso de ceras	Zambrano <i>et al.</i> , 1995
Tratamientos químicos	González-Aguilar <i>et al.</i> , 2001a
Tratamientos con sales de calcio	Joyce <i>et al.</i> , 2001

También se aplica la combinación de dos o más tratamientos (tabla 1). Sin embargo, el más utilizado es el tratamiento hidrotérmico, dado que es requisito para la exportación del mango a Estados Unidos. La luz UV-C ofrece interesantes posibilidades de aplicación debido a que tiene un efecto germicida y además, se ha encontrado que induce una respuesta en los frutos con relación a la resistencia contra patógenos.

2.5.1 Tratamientos con Irradiación

El término de irradiación se refiere a varios sistemas entre los que destacan: microondas, visible, ultravioleta, electrones, rayos X, rayos gamma, entre otros. Las irradiaciones tienen varias limitaciones, incluyendo diversos daños a los productos, dentro de los cuales están el desarrollo de fitotoxicidad, quemaduras, ablandamiento, pérdida del contenido



de algunos nutrientes como la vitamina C, además de que se liberan radicales libres que pueden causar daños celulares. Por otro lado, el uso de esta tecnología (radiación gamma y rayos X) no se encuentra totalmente aceptada por parte del consumidor (Yahía y Flores, 2001). Este no es el caso para la aplicación de irradiaciones no ionizantes, como la luz UV y de hecho, el código de normas federales de Estados Unidos (Titulo 21, parte 179) permite el uso de irradiación UV (longitud de onda de 220-300 nm con 90% de emisión a 253.7 nm) en productos alimenticios para el control de microorganismos en su superficie (Allende y Artés, 2003).

2.5.1.1 Tratamientos con UV-C

La luz ultravioleta que se encuentra entre 200-280 nm, es clasificada como UV-C, este rango del espectro UV tiene efecto germicida para virus y bacterias. Es producida por lámparas de mercurio, que operan de forma similar a las lámparas fluorescentes. Se usa un flujo de electrones a través de vapor de mercurio ionizado para producir la radiación. Las lámparas UV no tienen un recubrimiento de fósforo y por lo tanto solo emiten radiación UV (Bintsis *et al.*, 2000). Generalmente se utiliza la luz UV-C para desinfectar material de empaques, debido a que su aplicación en alimentos está limitada por la baja penetración en los productos y el hecho de que la geometría y hendiduras propias de las muestras pueden llegar a albergar a las bacterias. Debido a esto el tratamiento con UV-C, preferentemente, se debe de aplicar a productos que tengan la piel lisa libres de huecos que puedan mantener a resguardo a los patógenos (ICMSF, 1980).

La radiación con UV-C actúa de dos formas sobre los microorganismos, directamente, causando daño a los que se encuentran en la superficie de los frutos e indirectamente al inducir la síntesis de compuestos relacionados con la resistencia a enfermedades (Marquenie *et al.*, 2002). Se ha señalado que la inactivación directa de microorganismos por UV-C, se basa en el daño que ésta provoca a los ácidos nucleicos, ya que la energía UV altera los enlaces dentro de la hélice de ADN produciendo mutaciones o muerte de las



células. Se ha reportado la eliminación de enterobacterias patógenas para el hombre que se encuentran en productos vegetales frescos, Yaun *et al.* (2004), hallaron la reducción del 99% de patógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 en la superficie de manzanas, tomates y lechuga al aplicar luz UV-C.

2.6 Compuestos con Acción Antimicrobiana

En los tejidos de los frutos existen una gran cantidad de compuestos cuyas propiedades antimicrobianas han sido poco estudiadas y que pueden ser una alternativa para controlar la incidencia del ataque por patógenos (Özkan *et al.*, 2004).

Los frutos utilizan una amplia gama de estrategias físicas y bioquímicas para defenderse del ataque de microorganismos patógenos. Entre estas, se incluyen la acumulación de fitoalexinas, la modificación de las paredes celulares y la síntesis de hidrolasas antifúngicas (Mari y Guizzardi, 1998). Además, se ha encontrado que estas respuestas pueden ser inducidas por factores externos, se han obtenido interesantes resultados utilizando dosis bajas de UV-C, las cuales estimulan diversos procesos bioquímicos, como la biosíntesis de flavonoides y fitoalexinas (Lamikanra y Richard, 2004).

En el mango se identificó una mezcla de dos compuestos que funciona como agente fúngico [5-(12-cis heptadenecil) y 5- pentadecil resorcinol], presentes en mayor concentración en el fruto verde que en el maduro (Cojocarú *et al.*, 1986), además, se logró inducir la síntesis de estos compuestos al quitar la piel del fruto (Droby *et al.*, 1987). También, se han encontrado compuestos, principalmente fenoles, con acción antimicrobiana en extractos de harina de las semillas de mango, los cuales presentaron efecto sobre 43 cepas de 18 especies, entre ellas algunas enterobacterias patógenas como *Salmonella* (Kabuki *et al.*, 2000).



2.6.1 Compuestos Fenólicos

Los fenoles están representados en los frutos, por más de 8000 estructuras químicas. Se caracterizan por la presencia de un núcleo aromático de benceno, sustituido como mínimo con una función hidroxilo (Palazón *et al.*, 2001).

Son metabolitos secundarios de las plantas, y su biosíntesis se lleva a cabo a través de la ruta del ácido shikímico. Cuando se aplican algunos tratamientos postcosecha en los frutos, estos tienen un impacto en la composición de los fenoles ya que se activa la acción de la PAL (Fenilalanina amonio liasa; enzima fundamental en la biosíntesis de compuestos fenólicos) debido al estrés que se le somete al fruto por medio de radiaciones UV o temperatura (Palazón *et al.*, 2001).

Los fenoles suelen acumularse en las capas más superficiales de los frutos y desempeñan importantes funciones fisiológicas. En general, debido a su condición de polifenoles que se oxidan con mucha facilidad actúan como antioxidantes. También, protegen a los frutos generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables (Palazón *et al.*, 2001). De esta manera, los frutos se defienden del ataque de patógenos, sintetizando fitoalexinas, que mayoritariamente son polifenoles, tóxicos para los microorganismos y su presencia evita las enfermedades de los frutos (Palazón *et al.*, 2001).

Por otro lado, los ácidos fenólicos poseen propiedades antimicrobianas y antimicóticas, como el ácido gálico y sus derivados, los cuales poseen actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. El ácido cinámico, proporciona protección contra infecciones gastrointestinales causadas por microorganismos patógenos (Champbel *et al.*, 1999, citado por Singh *et al.*, 2004).



Para el caso del mango en particular, se sabe que es rico en ácidos fenólicos, Singh *et al.* (2004) encontraron en la porción comestible, ácido tánico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido cinámico, ácido cafeico y ácido clorogénico en concentraciones que van desde 1 mg hasta 3550 mg, predominando, el ácido tánico.

2.7 Microorganismos Presentes en la Superficie de Frutos

Los frutos son nichos ecológicos para una diversa y cambiante microbiota. Las poblaciones microbianas en la superficie de los frutos fluctúan entre 10^5 y 10^7 cm^{-2} , dependiendo de las condiciones ambientales, como la época de cultivo y cosecha. Se sabe que estos factores también están relacionados con el tipo de microorganismos que predominan en la superficie del fruto (Postmaster *et al.*, 1997).

Debido a la naturaleza ácida de los frutos ($\text{pH} = 4.6$ o inferior) y su contenido de ácidos orgánicos, generalmente sobreviven bacterias como las ácido lácticas. Debido a esto, los microorganismos predominantes en la superficie de los frutos son mayoritariamente hongos. En la tabla 2, se muestran algunos de los géneros predominantes en los frutos.

Tabla 2. Géneros predominantes en la superficie de los frutos.

Levaduras	Mohos	Bacterias
<i>Saccharomyces</i>	<i>Aspergillum</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Hanseniasspora</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Pichia</i>	<i>Mucor</i>	
<i>Kloeckera</i>	<i>Alternaria</i>	
<i>Candida</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Rhodotorula</i>	<i>Botrytis</i>	

Fuente: ICMSF, 1980.



2.8 Enterobacterias Patógenas Asociadas con el Consumo de Frutos

Los vegetales y frutos frescos son parte esencial en la alimentación del hombre alrededor del mundo, sin embargo, la presencia de numerosos géneros de bacterias, levaduras, mohos y ocasionalmente bacterias patógenas para el hombre, disminuyen el consumo de este tipo de productos debido principalmente al incremento de los brotes de enfermedades transmitidas por su consumo (Beuchat, 1996).

Diversas enfermedades en humanos, como la gastroenteritis han sido relacionadas con el consumo de productos vegetales frescos contaminados. Tales enfermedades son producidas principalmente por los géneros *Salmonella* spp. y *E. coli* (Beuchat, 1996).

Para el caso específico del mango, en diciembre de 1999, en Estados Unidos reportó un brote de salmonelosis (causada por *Salmonella enterica* serotipo Newport) asociado al consumo de mangos provenientes de Brasil, en el que fue identificado como posible punto de contaminación la aplicación del tratamiento hidrotérmico al que fueron sometidos los frutos (Sivapalasingam *et al.*, 2003).

2.9 Microbiota Presente en el Mango

No se conoce mucho sobre los microorganismos que se encuentran presentes en la superficie del mango de manera natural. Existen algunos estudios, que se enfocaron principalmente a evaluar la presencia de enterobacterias. Tal es el caso de O'Connor *et al.* (1995) quienes cuantificaron coliformes presentes en mangos frescos y rebanados. Se identificaron cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter agglomerans* y *Rahnella aquatilis*. De igual modo, Poubol e Izumi (2005), encontraron que bacterias aisladas de la superficie de mangos precortados fueron predominantemente Gram-negativas, que además, el 60% fueron *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella pneumoniae*



rhinoscleromatis, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea stewartii indologenes*, y algunas Gram-positivas como *Curtobacterium citreum*.

En nuestro grupo de trabajo, se llevaron a cabo dos estudios a fin de caracterizar la microbiota de la superficie del mango, utilizando métodos tradicionales de cultivo. En el primer estudio, Sassi (2003), aisló de la superficie de mangos manila provenientes de distintas zonas productoras de mango, las siguientes especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus xylosus* y *Pantoea agglomerans*. Posteriormente, se aisló e identificó de la superficie de mangos Ataúlfo, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Enterbacter cancerogenus*, *Enterobacter aerogenus*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas stutzeri*.

Salmonella y *E. coli* no forman parte de la microbiota presente de manera natural en la superficie del mango, sin embargo se encontró *Salmonella* sp. en pulpa de mango (Acharya y Shan, 1999) ésta pudo originarse de diferentes fuentes tales como el suelo, agua, equipo, humanos y animales, pudiendo contaminar los frutos durante el manejo postcosecha, el empaque, transporte, distribución o en el destino final. Asimismo, se ha demostrado que este grupo de bacterias posee sistemas de sobrevivencia a la acidez inducidos por valores bajos de pH (Bearson *et al.*, 1997; Foster y Spector, 1995). Se demostró que *Salmonella* puede sobrevivir a pesar de valores de pH bajos (aproximadamente 3.65). Adicionalmente, Penteadó *et al.* (2004), mostraron evidencia de que *Salmonella* puede internalizarse en mango durante la aplicación de los tratamientos hidrotérmicos.

2.10 Importancia del Estudio de la Microbiota Presente en el Mango

La superficie de los frutos ofrece un microambiente único para la colonización de ciertas especies o grupos específicos de bacterias, levaduras y mohos, así como para su permanencia. Si bien es cierto que la presencia y el número de bacterias, levaduras y



mohos depende de prácticas agronómicas, área geográfica de producción y las condiciones ambientales antes de la cosecha, está demostrado que algunos de los microorganismos son predominantes y permanecen con el tiempo (Beuchat, 2002).

En la última década, se han realizado estudios que demuestran que existe un equilibrio entre los microorganismos que se desarrollan en la superficie de los frutos, esto resulta de suma importancia, ya que en la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no se desarrollen enfermedades en la mayoría de los casos (Cook y Baker, 1983). En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de los frutos. La disminución de la microbiota de competencia por prácticas agrícolas como lavado de frutos, aplicación de fungicidas, y desinfección de suelos entre otras, favorecen el desarrollo de los patógenos (Rollán *et al.*, 1998).

Así, la aplicación de tratamientos postcosecha que contribuyen a prolongar la conservación del mango, reduciendo las pérdidas postcosecha, a su vez, pueden provocar cambios importantes en el ambiente microbiano natural del fruto, contribuyendo al crecimiento menos restringido de algún patógeno oportunista. Aunque los mecanismos por los cuales sucede esto no son del todo claros. Carlin *et al.* (1996) encontraron que con la reducción de la microbiota natural de la superficie de hojas de escarola, se permitía un mayor crecimiento de *Listeria monocytogenes*, ya que compite con ésta.

Se ha demostrado que existen bacterias que pueden inhibir microorganismos indeseables. Koomen y Jeffries (1993) encontraron dentro de la microbiota del mango cepas de *Bacillus cereus* y *Pseudomonas fluorescens*, con actividad antagonista contra *Colletotrichum gleosporioides*, causante de la antracnosis. Así como los microorganismos que han sido aislados e identificados de la superficie de los frutos se emplean como antagonistas a patógenos postcosecha, también pueden servir como antagonistas contra patógenos humanos. De hecho, Schuenzel y Harrison (2002) encontraron que *Pseudomonas* spp.



presenta actividad antagónica contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* Montevideo, hecho que resulta interesante ya que *Pseudomonas* forma parte de la microbiota de la superficie del mango, como se mencionó anteriormente.

El estudio de estos microambientes es de vital importancia, ya que una mejor comprensión de los ecosistemas microbianos en la superficie de los frutos puede ser de gran utilidad, tanto para evaluar el impacto de la aplicación de tratamientos postcosecha, como para determinar qué poblaciones microbianas pueden estar implicadas en la competencia con patógenos para humanos.

La Academia Americana de Microbiología (2005) reconoce que para asegurar la inocuidad de los alimentos frescos, es necesario realizar estudios ecológicos para lograr una mejor comprensión de las comunidades microbianas.

2.11 Estudio de las Comunidades Microbianas en Alimentos

El conocimiento de la composición de las comunidades microbianas, las diferentes poblaciones y el potencial de interacciones de estas en los alimentos es crucial para la producción de alimentos seguros. La presencia de ciertos microorganismos está dada por el ambiente o las condiciones en el manejo y esto se ha estudiado por métodos basados en el cultivo, pero dadas las limitaciones que presentan dichos métodos se ha propiciado el desarrollo de técnicas independientes del cultivo; los cuales en su mayoría están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en los que la detección de ácidos nucleicos son las más abundantes. Los métodos moleculares suelen ser más rápidos, más específicos, más sensibles y más precisos.

Ahora bien, en la actualidad se reconoce la importancia del estudio de los microorganismos en alimentos con un enfoque ecológico ya que el crecimiento,



sobrevivencia y actividad de cualquier especie pueden estar determinados por la presencia de otras especies (Díaz y Wachter, 2003).

Recientemente, una gran variedad de nuevos métodos se han desarrollado, con el fin de caracterizar a los microorganismos en su ambiente natural sin la necesidad del cultivo, el enriquecimiento o el aislamiento. Típicamente estas estrategias se basan en la extracción del ADN de la población total derivada de una mezcla de microorganismos permitiendo la identificación de cada uno de los constituyentes. Esto elimina la necesidad del aislamiento de las cepas.

2.11.1 Alternativas para el estudio de las comunidades microbianas en alimentos

Como se ha señalado, los estudios llevados a cabo para caracterizar la microbiota en la superficie del mango se han limitado al uso de métodos dependientes del cultivo. Sin embargo, desde hace tiempo se ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar métodos que no requieran un paso previo de cultivo, dado que la proporción de células cultivables en medios convencionales tiende a ser de apenas 0.1 al 10% de la población total, por lo que se obtiene una visión incompleta de la diversidad en una muestra (Amann, 1995).

A pesar de que los métodos tradicionales de cultivo bacteriano se han caracterizado por ser simples económicos y relativamente rápidos, la proporción de células cultivables en medios convencionales tiende a ser reducida. Por estos motivos los métodos tradicionales se complementan con los métodos moleculares para el estudio y el análisis de comunidades microbianas.

Las aproximaciones basadas en el análisis del ARN ribosómico, ya sea mediante la construcción de bibliotecas genéticas, la hibridación *in situ* o la electroforesis en geles de gradiente desnaturante a partir de rADN amplificado mediante PCR (PCR-DGGE) han revelado una enorme diversidad en los ambientes naturales (Amann *et al.*, 1995; Torsvik *et al.*, 1998). Estos, han permitido detectar numerosas bacterias no cultivables, algunas de



las cuales constituyen poblaciones dominantes, debido a que estas técnicas son rápidas y proveen un perfil más completo de la diversidad genética de una comunidad microbiana.

Las técnicas moleculares son rápidas y proveen un perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana. Además, existen diferentes alternativas para la determinación de la estructura microbiana de los alimentos. Una de estas alternativas consiste en aislar a los microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el ADN. Se pueden destacar algunas de las técnicas más utilizadas para tal propósito:

- **RFLP** (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).
- Ribotipificación.
- **AFLP** (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados).
- **ARDRA** (Análisis de restricción de ADN ribosomal).
- **RAPD** (Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar).

Otra alternativa de estudio es utilizar métodos que no dependen del cultivo, en los que se extraen los ácidos nucleicos directamente del alimento. El primer paso es la extracción y purificación del ADN de las muestras. Posteriormente, se amplifican, mediante PCR, ciertas regiones del gen ribosomal 16S. Dependiendo del grupo de microorganismos que se deseen estudiar, se usan cebadores muy generales o muy específicos (Díaz y Wachter, 2003).

Posteriormente, para la separación de los fragmentos de rADN 16S amplificados, es posible:

- Construir bibliotecas de clonas de rADN 16S.
- La obtención de “huellas digitales” mediante la aplicación de electroforesis en geles con gradientes desnaturizantes como el DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) y TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura).



La obtención de “huellas digitales”, que constituyen un patrón o un perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana, son los más utilizados hoy en día.

2.12 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

2.12.1 Aplicación del DGGE en el estudio de comunidades microbianas en alimentos

La electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE), es una técnica que se desarrolló para detectar mutaciones puntuales en las secuencias de ADN. Actualmente, esta técnica ha sido adaptada y se utiliza como herramienta para el estudio de comunidades microbianas complejas, a partir de trabajos propuestos por Muyzer *et al.* (1993). El DGGE se ha utilizado en muchos campos de la ecología microbiana porque es capaz de proporcionar una huella digital de la comunidad bacteriana en su ambiente natural por extracción directa de ADN. Adicionalmente, se emplea para determinar la dinámica de la comunidad en respuesta a variaciones ambientales (Ercolini, 2004). Resulta ser una técnica versátil, debido a que es posible detectar e identificar de forma rápida microorganismos presentes en una muestra sin necesidad de cultivarlos (Ercolini, 2004).

Recientemente el uso del DGGE se ha incorporado a la microbiología de alimentos debido a su gran potencial ya que permite el análisis de muestras directamente del alimento. La primera aplicación en microbiología de alimentos fue en 1999, cuando Ampe *et al.* publicaron su trabajo sobre la distribución espacial de las comunidades microbianas en bolas del pozol, una pasta de maíz fermentado de origen mexicano. La principal aplicación en microbiología de alimentos es el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados (Ercolini, 2004). La estrategia para la aplicación del DGGE en la obtención de una huella digital de la comunidad bacteriana en microbiología de alimentos se resume en la figura 1.

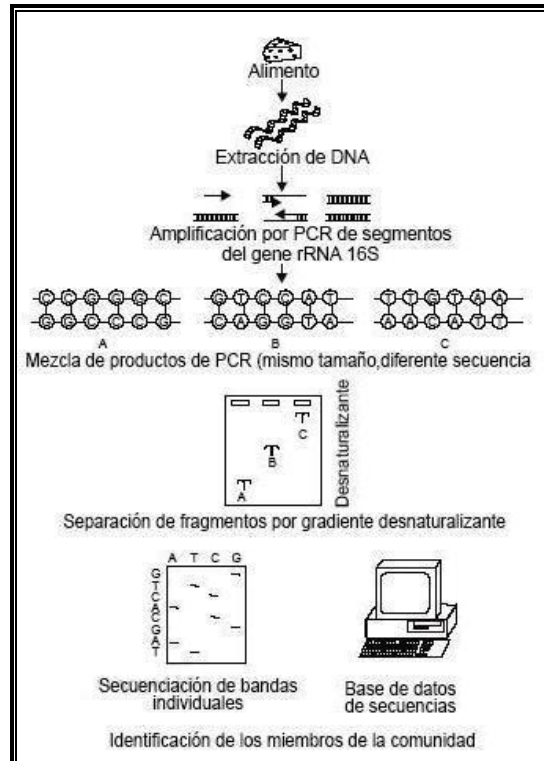


Figura 1. Aplicación del DGGE al estudio de comunidades microbianas en muestras de alimentos. Fuente: Díaz y Wachter (2003).

El método requiere de la extracción del ADN y su posterior amplificación por PCR con cebadores específicos para un fragmento del 16S rADN bacteriano. Después, la electroforesis de los productos amplificados en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante permite separar los fragmentos de ADN que son de un mismo tamaño pero de diferente secuencia. A continuación, se puede llevar a cabo la identificación de las especies presentes en el patrón de bandas por medio de su purificación y secuenciación.

2.12.2 Principio y aspectos técnicos

El DGGE se basa la separación electroforética de productos de PCR de igual tamaño y separados de manera secuencia-específica, utilizando geles de poliacrilamida que contiene concentraciones crecientes de agente desnaturalizante (mezcla de urea 7M y 40% formamida), lo que provoca la separación de las cadenas de ADN. Estas contienen dominios con puntos de fusión característicos, de manera que cuando se alcanza una



determinada concentración de desnaturalizante, la molécula se funde total o parcialmente y disminuye su velocidad de migración en el gel. Los puntos de fusión de estos dominios dependen de variaciones en las secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (fig. 2).

Para evitar la separación completa de las dos cadenas, se une una secuencia de 30-40 bp rica en GC (que requiere condiciones más drásticas de desnaturalización), llamada grapa-GC, en el extremo 5' de uno de los cebadores, que se coamplifica con el segmento de ADN. El patrón de bandas se visualiza generalmente tiñendo con bromuro de etidio pero resulta más sensible si se utiliza una solución de plata (Ercolini, 2004).

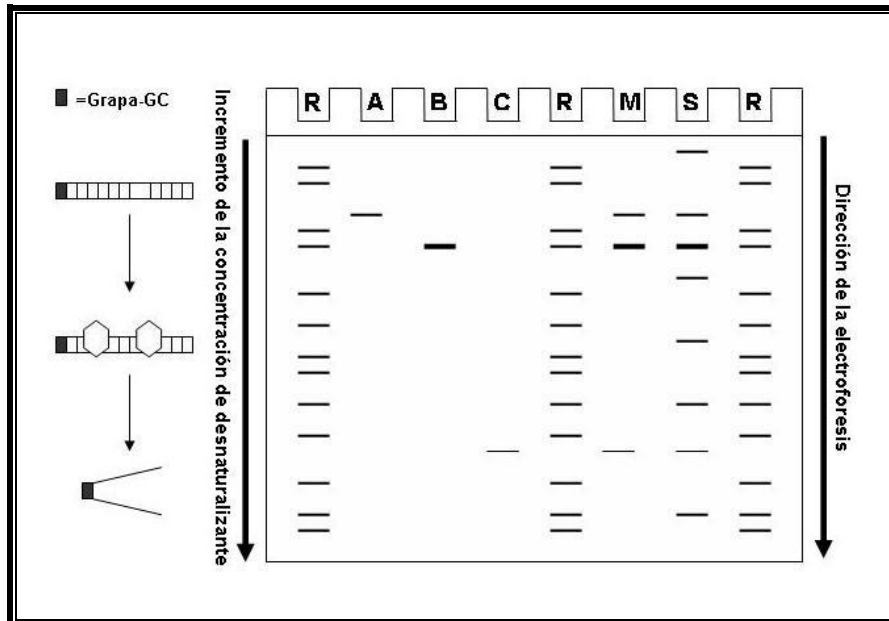


Figura 2. Esquematización del principio de la separación de los productos de PCR por DGGE. R=Patrón de referencia; A= Organismo 1; B= Organismo 2; C= organismo 3; Mezcla de organismos 1,2 y 3; S= Muestra problema. Fuente: Temmerman *et al.* (2004).

Es necesario determinar cuál de las regiones variables de los genes ribosomales permiten separar los microorganismos presentes, así como optimizar el gradiente y la duración de la electroforesis para obtener la mejor separación de las bandas. Para optimizar el gradiente se realiza un gel con gradiente perpendicular (fig. 3), en el cual se obtiene una curva de forma sigmoidea, en la que a baja concentración del desnaturalizante los fragmentos



migran como dobles cadenas y a concentraciones altas como cadena sencilla. Las condiciones útiles son las intermedias en las que las moléculas se funden parcialmente. El tiempo óptimo se obtiene realizando electroforesis con gradiente paralelo.

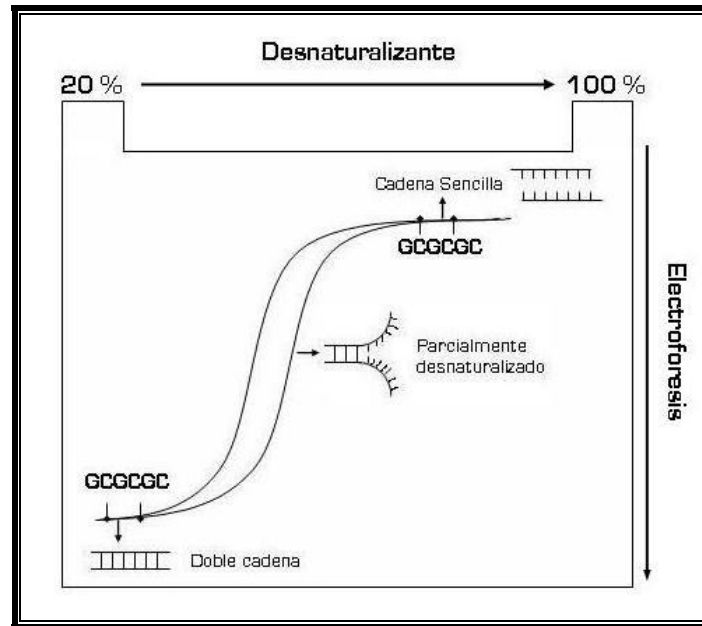


Figura 3. Esquema de un gel perpendicular de DGGE.

Es posible caracterizar los patrones de bandas del DGGE por el número, posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas, donde cada banda representa una especie diferente, por lo que este método no solo permite la identificación de los microorganismos, sino también pudiera servir para la cuantificación relativa de las mismas en la muestra. Los patrones de bandas también pueden ser utilizados para análisis estadísticos que permiten determinar dominancia, frecuencia, proporciones relativas entre otros indicadores de diversidad de la comunidad microbiana. Del mismo modo, estos indicadores pueden ser utilizados en estudios de dinámica poblacional (Ampe y Miambi, 2000).



2.12.3 Limitaciones de la Técnica

Existen opiniones encontradas sobre la conveniencia del uso de técnicas basadas en métodos moleculares debido a que presentan ventajas sobre los métodos tradicionales, sin embargo también pueden tener ciertas limitaciones que se deben tomar en cuenta. Para la técnica de PCR-DGGE se tiene conocimiento de las siguientes:

- 1) Debido al ambiente complejo que son los alimentos, los métodos de extracción de ácidos nucleicos de las muestras no siempre aseguran la lisis de todos los microorganismos presentes y la recuperación de los ácidos nucleicos intactos. Además, es importante purificar los ácidos nucleicos obtenidos para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR (Wilson, 1997).
- 2) La reacción de PCR puede introducir errores, ya que pueden ocurrir amplificaciones preferenciales por reasociación del ADN molde con lo cual se compromete la unión de los cebadores (Reysenbach *et al.*, 1992; Susuki y Giovannoni, 1996).
- 3) La formación de moléculas quiméricas, es decir moléculas de rADN híbridas que se forman cuando una molécula de ADN parcialmente elongada sirve como cebador en el siguiente ciclo de PCR, lo que puede afectar el patrón de bandas en el DGGE (Liesack *et al.*, 1991).
- 4) La formación de moléculas heteroduplex (asociación de cadenas sencillas de moléculas diferentes de ADN) durante la amplificación dificulta la interpretación del patrón de bandas en el DGGE (Muyzer y Smalla, 1998).
- 5) Sólo pueden separarse por DGGE fragmentos pequeños (200-500 pb) lo que limita el análisis filogenético de las secuencias (Muyzer y Smalla, 1998). También se ha



reportado la dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 ó 3 bases (Díaz y Wachter, 2003).

- 6) El número máximo de fragmentos de ADN que pueden separarse, ya que puede mostrar solamente fragmentos de rADN obtenidos de las especies predominantes en la comunidad, no obstante se ha reportado que se pueden detectar bacterias que componen el 1% de la comunidad (Muyzer *et al.*, 1993; Murria *et al.*, 1998).
- 7) Es posible que ocurra co-migración de secuencias de 16S rADN que tienen el mismo comportamiento de desnaturalización y por lo tanto la misma posición en el gel, lo que provoca la subestimación de la diversidad microbiana y la dificultad para extraer secuencias para su identificación (Muyzer y Smalla, 1998).
- 8) La presencia de más de una banda en el DGGE de cultivos puros, debido al fenómeno de micro-heterogeneidad en los diferentes operones de rARN presentes en diferentes especies, con lo que sobreestima la diversidad microbiana (Nubel *et al.*, 1996).

Aunque no está exento de limitaciones, el método PCR-DGGE es ideal para determinar las diferencias en las comunidades microbianas de la superficie del mango después del tratamiento propuesto, mediante la comparación de los patrones de bandas de cada muestra.



III. Objetivos e Hipótesis

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto del tratamiento postcosecha por irradiación con luz ultravioleta (UV-C) sobre la microbiota bacteriana natural en la superficie del mango, mediante la aplicación de la técnica molecular de DGGE a fin de determinar su posible relación con la incidencia y la sobrevivencia de *Escherichia coli* en la superficie de mangos de la variedad Ataúlfo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Objetivo particular 1:

Establecer las condiciones óptimas de la técnica de DGGE que permita conocer los cambios en la microbiota bacteriana de la superficie del mango.

Objetivo particular 2:

Establecer el efecto del tratamiento postcosecha con UV-C sobre los cambios en la microbiota bacteriana presente en la superficie del mango utilizando la técnica de DGGE.

Objetivo particular 3:

Evaluar el efecto de las modificaciones de la microbiota bacteriana del mango sobre el crecimiento y sobrevivencia de *E. coli* en la superficie del fruto a través de métodos de cultivo.

Objetivo particular 4:

Analizar el efecto del tratamiento postcosecha con UV-C sobre los niveles de compuestos fenólicos que se sintetizan en la piel del mango y evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos en bacterias aisladas de la superficie del mango.



HIPÓTESIS

Debido a que el tratamiento postcosecha con irradiación por luz ultravioleta (UV-C) tiene un efecto germicida, modificará la microbiota bacteriana presente en la superficie del mango, con lo cual se favorecerá el crecimiento de *E. coli* proveniente de una contaminación posterior a la aplicación del tratamiento.



IV. Materiales y Métodos

4.1 Material biológico

Se utilizaron mangos de la variedad 'Ataúlfo', cultivados en Nayarit y cosechados en el período de agosto a octubre de 2005, recolectados en el estadio preclimatérico. Fueron transportados a la Ciudad de México por vía aérea en cajas de cartón, posteriormente, fueron trasladados al laboratorio L-324 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, para su estudio.

4.2 Tratamiento de las muestras

Para contar con lotes homogéneos y con el mismo desarrollo fisiológico, los frutos fueron seleccionados cuidadosamente de acuerdo al peso, color, tamaño, ausencia de daño mecánico y libre de daño por insectos.

Los lotes fueron divididos de acuerdo con cada experimento de la siguiente manera:

Para evaluar el efecto de la aplicación del tratamiento con UV-C sobre los cambios de las comunidades bacterianas en la superficie del mango, se tomaron 35 frutos para el grupo control (no recibió tratamiento alguno), cada muestra de trabajo se conformó de cinco frutos por lo que se obtuvieron siete réplicas. Para el grupo con tratamiento, se seleccionaron 35 frutos que recibieron tratamiento con luz UV-C (20 minutos). Cada muestra de trabajo se conformó por cinco frutos por lo que se obtuvieron de igual manera siete réplicas.

En los experimentos para evaluar la sobrevivencia de *E. coli* en la superficie del mango, el tamaño de la muestra se estableció de acuerdo con el método de muestreo del ICMSF (International Commission for the Microbiological Specifications for Foods) (ICMSF, 2002).



Para el experimento de sobrevivencia se utilizaron 122 frutos que se dividieron en dos lotes cada uno con 66 frutos. Estos experimentos se realizaron por triplicado. En este caso uno de estos lotes recibió tratamiento con UV-C bajo las condiciones descritas en el apartado 4.3, el otro lote no recibió tratamiento alguno (control).

4.3 Tratamiento con UV-C

Los frutos fueron colocados en bandejas de plástico y posteriormente se colocaron en la cámara de UV, a una distancia de 10 cm de una lámpara fluorescente germicida de UV (Sankyo Penky, modelo 615T8), para ser expuestos a la irradiación. Cada fruto fue rotado manualmente después de la mitad del tiempo de exposición para asegurarse que toda la superficie del fruto fuera expuesta a la luz UV. Después del tratamiento fueron colocados en una campana de extracción por 30 minutos para eliminar todo el ozono producido y se almacenaron a 25 °C y 90-95% de humedad relativa (HR) las primeras 24 horas el almacenamiento fue en completa oscuridad, para evitar posibles efectos de fotorreacción debido al tratamiento.

4.4 Efecto de la aplicación del tratamiento con UV-C sobre la microbiota bacteriana de la superficie del mango

Para evaluar el efecto del tratamiento con UV-C sobre la microbiota bacteriana de la superficie del mango utilizando DGGE.

Los lotes mencionados en el apartado 2 fueron almacenados a 25 °C (HR 90-92%) durante 12 días después de recibir el tratamiento y a lo largo de estos se fueron tomando muestras los días 0 (inmediatamente después al tratamiento), 4 y 12.

Los frutos se muestrearon de la siguiente manera el día 0, se tomaron 15 frutos de cada lote (frutos con y sin tratamiento) con lo cual se obtuvieron tres réplicas por cada condición, el día 4 se tomaron 10 frutos de cada lote con lo que se obtuvieron dos réplicas



para cada condición, finalmente el día 12 se tomaron los 10 frutos restantes de cada lote por lo que también se obtuvieron dos réplicas para cada condición.

4.4.1 Recuperación de los microorganismos de la superficie del mango

Para la recuperación de los microorganismos de la superficie del mango se utilizó la metodología propuesta por Barak *et al.* (2003) para la recuperación de poblaciones bacterianas en la superficie de melón. Además, se retomaron trabajos de investigación en el análisis de comunidades microbianas con muestras ambientales acuosas (Kostrzynska *et al.*, 1999; Merk *et al.*, 2001; La Montagne *et al.*, 2002; Lyautey *et al.*, 2005).

Bajo condiciones asépticas, cada uno de los frutos fue colocado en una bolsa de plástico resellable y se le adicionaron 80 ml de agua bidestilada estéril, después, se colocó en un agitador orbital y se agitó a 190 rpm durante 45 minutos, se recuperó el líquido de lavado de 5 frutos en un matraz al que se le agregaron 50 μ L de Macerex (mezcla de pectinasa y celulasa) y se incubó a 35 °C por 1 hora, finalmente el líquido obtenido se pasó por una membrana estéril de nitrocelulosa de 0.45 μ m en un equipo de filtración Millipore. La mezcla de microorganismos retenida en la membrana fue recuperada con 2 mL de amortiguador TES (0.05M Tris, 0.05M NaCl, 0.05M EDTA, pH 8) estéril.

4.4.2 Extracción de ADN

Se llevó a cabo utilizando el procedimiento modificado por Lawson *et al.* (1993). 500 μ L de la mezcla de microorganismos recuperados se colocaron en microtubos, se les adicionó 20 μ L de una solución de lisozima (10 mg/ μ L), se agitó suavemente la muestra y se incubó a 37 °C por un período de 1 hora. Posteriormente, se le agregaron 8 μ L de pronasa (20 mg/ μ L) y 8 μ L de RNAsa (20 mg/ μ L), se agitó suavemente la muestra y se incubó a 65 °C por 1 hora. A continuación, se le adicionaron 120 μ L de SDS (Dodecil sulfato sódico, por sus siglas en inglés) al 10%, incubándose nuevamente a 65 °C por 30 minutos, después de este tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se le añadieron 600 μ L de una



mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó hasta formar una emulsión, posterior a esto se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm, se obtuvieron tres fases de las cuales se recuperó la fase superior (que contiene el ADN) transfiriéndose a un microtubo limpio, a este se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto a -20 °C, agitando suavemente, después se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante por decantación y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente por 24 horas. Por último, se resuspendió el precipitado en 50 µL de amortiguador TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8) estéril y se incubó a 55 °C por 1 hora. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.4.3 Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN total de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango

Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Para calcular la concentración de ADN, se tomó en cuenta que cada unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, así como el factor de dilución y el factor de corrección para una celda de cuarzo de 15 µL. La pureza del ADN se valoró midiendo la absorbancia a 280 nm con la misma muestra para obtener el coeficiente $\lambda_{260}/\lambda_{280}$, que debe de ser cercano a 1.8 (Ausubel *et al.*, 2005).

4.4.4 Visualización del ADN total de la mezcla de los microorganismos recuperados de la superficie del mango

Se visualizó el ADN extraído de la superficie de los mangos mediante una electroforesis (70 V, 60 min) en gel de agarosa al 2% (p/v) y amortiguador TBE 1X (Tris base 0.05M, ácido bórico 0.01M, EDTA 0.001M pH8) (Ausubel *et al.*, 2005). Para ello, los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta en el equipo Fluor-S (Bio-Rad).



4.4.5 Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S para muestras de mango

La región V3 (aproximadamente 220 pb) del gen 16S rARN se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando el cebador hacia delante con la grapa GC, GC-338f y el cebador hacia atrás 518r para bacterias (tabla 3) (Muyzer *et al.*, 1993). La amplificación por PCR se llevó a cabo en 50 μ L de la mezcla de reacción compuesta por 10 mM de dNTP's, 20 pmol de cada cebador, 1 U de *Taq* polimerasa, 400 μ g de albúmina sérica bovina (BSA) y 75 ng de ADN molde, agregando agua desionizada estéril hasta el volumen final de 50 μ L. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador (Biometra, Tpersonal) bajo las condiciones mostradas en la tabla 2 (Ampe *et al.*, 1999).

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar la región V3 del gen 16S rARN.

Cebador	Posición	Secuencia	Objetivo
338 hacia adelante	338–357	5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	Bacteria, 16S rDNA región-V3
518 hacia atrás	518–534	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG	Universal, 16S rDNA región- V3
Grapa de GC		5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	

Fuente: Ampe *et al.* (1999)

Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar la región V3 del gen 16S rARN

	Número de ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (min.)
Desnaturalización	1	94	5
Desnaturalización		94	1
Alineamiento	20	65	1
Elongación		72	3
Desnaturalización		94	1
Alineamiento	10	55	1
Elongación		72	3
Elongación	1	72	10

Fuente: Ampe *et al.* (1999)



La detección de los productos de PCR, se llevó a cabo por electroforesis (80V; 60 min) en gel de agarosa al 2% (p/v) y TBE 1X (base, ácido bórico, EDTA 0.001M pH8) los cuales fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (10 mg / mL) y visualizados por iluminación con luz ultravioleta en el equipo Fluor-S (Bio-Rad).

4.4.6 Obtención del gradiente desnaturalizante óptimo para lograr la separación de productos de PCR de muestras de mango mediante un gel perpendicular

Con el fin de obtener el gradiente óptimo para la separación de la mezcla de productos de PCR, se realizó una electroforesis en un gel con gradiente desnaturalizante perpendicular al campo electroforético (fig. 4). La finalidad de ésta fue establecer el intervalo de desnaturalizante en el cual los productos de PCR forman una sigmoide, que represente la zona de desnaturalización del ADN de las muestras (Muyzer y Smalla, 1998).

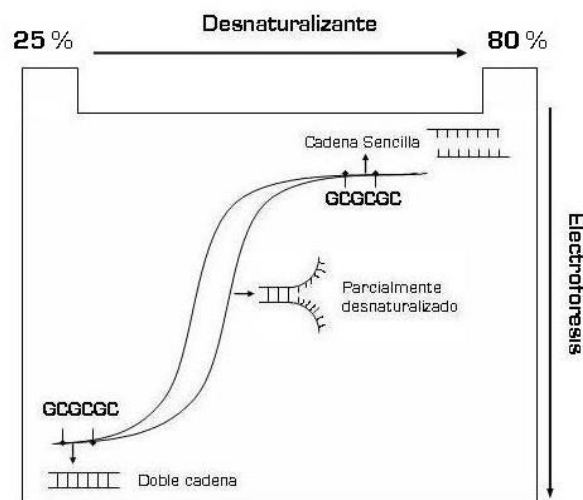


Figura 4. Diagrama de un gel perpendicular al campo electroforético.

Se preparó una mezcla de productos de PCR a partir de las muestras control, así como de las muestras del tratamiento, de tal modo que se incluyeron la mayor parte de los microorganismos que pudieran estar presentes en las muestras a analizar posteriormente. Se cargaron 40 μ L de cada una de 8 muestras para obtener un volumen total de la mezcla de 360 μ L, se le adicionó 100 μ L de amortiguador de carga (glicerol /azul de bromofenol/ xileno cianol).



La electroforesis se llevó a cabo como lo describe Muyzer *et al.* (1993). Los productos de PCR fueron separados en un gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un gradiente desnaturante de urea y formamida de 25% (p/v) a 80% (p/v). Para la electroforesis se utilizó el sistema Dcode™ Universal Mutation de BIORAD a una temperatura de 60 °C durante 2 horas a 130 V, en amortiguador TAE 1X (Tris base 0.04M, ácido acético glacial 0.02M, EDTA 0,001M pH 8).

Después de la electroforesis el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio [50 µg/mL] durante 20 minutos y se lavó con amortiguador TAE [1X] durante 1 hora. Finalmente, se visualizó por iluminación con luz ultravioleta utilizando el equipo Fluor-S (Bio-Rad).

4.4.7 Separación de la mezcla de productos de PCR mediante la técnica de DGGE

Los productos de PCR de cada muestra (40 µL más 20 µL de tinte de carga) se analizaron mediante un DGGE en un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente desnaturante del 15 al 60% (p/v) de urea y formamida (fig. 5), el gradiente se estableció a partir del gel perpendicular. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el método establecido por Muyzer *et al.*, 1993 y se usó el sistema Dcode™ Universal Mutation de Bio-Rad a una temperatura de 65 °C durante 17 horas a 85 V en amortiguador TAE 1X (Tris base 0.04M, ácido acético glacial 0.02M, EDTA 0.001M pH 8).

Posteriormente, los geles fueron teñidos con el *Kit Plus One DNA silver staining* (Pharmacia Biotech) y digitalizados con el equipo Fluor-S (Bio-Rad).

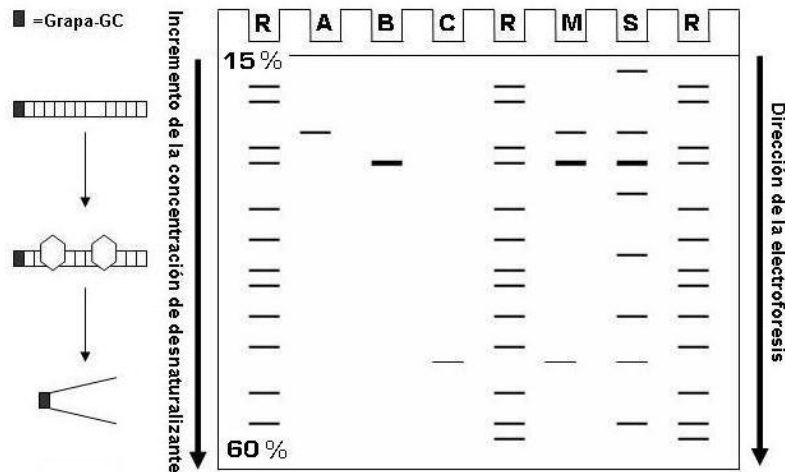


Figura 5. Diagrama de un gel paralelo de DGGE.

4.4.8 Patrón de bandas generados a partir del ADN de cepas aisladas de la superficie del mango

4.4.8.1 Activación de las cepa previamente aisladas de la superficie del mango

De una colección de cepas aisladas de la superficie del mango, se seleccionaron 14 cepas representativas (*P. stutzeri*, *Enterob. cancerogenus*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *K. ornithinolytica*, *Enterob. cloacae*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Enterob. hormanechei*, *Enterob. aerogenes*, *Samonella* sp., *K. pneumoniae*, *C. freundii* complex y *E. coli*) previamente identificadas por el grupo de trabajo.

Las cepas conservadas, se reactivaron en caldo nutritivo incubándose durante 24 horas, a 37 °C. Posteriormente, se sembraron por estrías en agar nutritivo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Adicionalmente se realizaron tinciones de Gram.

4.4.8.2 Extracción de ADN

Se colocaron 500 μ L de amortiguador TES (Tris base 0.05M, EDTA 0.005M pH8, NaCl 0.05M) estéril en un microtubo, posteriormente se tomó una muestra con asa estéril (aproximadamente del tamaño de un grano de arroz) de cada una de las cepas puras,



depositándose en su tubo correspondiente. A continuación, se siguió el protocolo de Lawson *et al.* (1993), para extracción de ADN descrito previamente en el apartado 4.4.2. Para la cuantificación y visualización del ADN obtenido se siguieron los protocolos también descritos en los apartados 4.4.3 y 4.4.4.

4.4.8.3 Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.4.5.

4.4.8.4 Análisis de las cepas mediante DGGE

Los productos de PCR de cada cepa (35 μ L más 15 μ L de amortiguador de carga) se analizaron mediante DGGE en un gel de poliacrilamida al 8% con un gradiente desnaturante de 15 a 60% (p/v) de urea y formamida, este gradiente fue determinado a partir del gel perpendicular. La electroforesis se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.4.7. Adicionalmente, se preparó una mezcla de productos de PCR de cepas a partir de 15 μ L de cada cepa, para obtener un volumen total de mezcla de 210 μ L, a la cual se le adicionó 100 μ L de amortiguador de carga. De dicha mezcla, se tomaron 40 μ L mismos que se corrieron en el gel para obtener el patrón de bandas de las cepas. Posteriormente, los geles fueron teñidos con el *Kit Plus One DNA silver staining* (Pharmacia Biotech) y digitalizados con el equipo Fluor-S (Bio-Rad).

4.4.9 Identificación de bandas predominantes a partir del gel paralelo de DGGE

4.4.9.1 Escisión de bandas

Se seleccionaron 20 bandas para que se identificaran por medio de secuenciación, a partir del gel paralelo fueron cortadas estas bandas, utilizando el procedimiento sugerido por Hovda *et al.* (2007). Con una cuchilla estéril, se cortó la banda de interés en el gel paralelo y fue transferida a un tubo de microcentrífuga estéril y se le adicionaron 50 μ L de agua desionizada estéril, se colocó 24 horas a 4 °C, tiempo en el que mediante difusión pasiva se recuperó el ADN atrapado en el gel. De esta solución se tomaron 10 μ L, que se



utilizaron como templado y se reamplificaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.5, sin embargo, en esta ocasión se utilizó el cebador 338 hacia atrás pero sin la grapa de GC. Estos productos de PCR fueron purificados utilizando el kit de limpieza de QIAGEN (QIAquick *PCR purification kit*) a fin de eliminar los contaminantes ($MgSO_4$, cebadores y dNTP's) de los amplificados.

4.4.9.2 Identificación de bandas por búsqueda de parecidos en base de datos

La identificación de las secuencias se hizo utilizando la herramienta *Basical Local Alignment Search Tool* (BLAST, por sus siglas en inglés) que se encuentra disponible en GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) a fin de encontrar secuencias parecidas.

4.5 Efecto de la microbiota presente en la superficie del mango sobre la sobrevivencia de *E. coli* en la superficie del fruto

Para evaluar la sobrevivencia de *E. coli* en la superficie del mango se llevaron a cabo las siguientes actividades previas para establecer las condiciones óptimas para realizar dichos experimentos.

- La selección de la cepa de *E. coli*, resistente a ampicilina, con el fin de distinguirlas de otras que pudieran estar presentes en el mango.
- Se estableció el intervalo de tiempo para la toma de muestras.

Estas actividades se realizaron con mangos que no recibieron tratamiento con UV-C, fue utilizada la metodología que a continuación se describe.

4.5.1 Preparación de los frutos

Una vez seleccionados los frutos y divididos en lotes, se marcó en estos círculos con un área de 6.8 cm^2 en un costado, se realizaron con un disco de plástico estéril, posteriormente, se colocaron en charolas plásticas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su inoculación.



4.5.2 Preparación del inóculo

Se utilizaron cuatro cepas de *E. coli* (109289-B, 108412, 109274-13 y 108413) que fueron proporcionadas por el grupo de trabajo, dichas cepas fueron aisladas en trabajos previos de la superficie de mangos Ataúlfo, además, presentaron resistencia a la ampicilina.

Las cepas fueron reactivadas en infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) incubándose a 37 °C durante 24 horas, posteriormente, fueron sembradas por estrías en cajas de *Petri* de 9 cm de diámetro que contenían 20 mL de agar nutritivo con ampicilina (50 µg/mL) se incubaron a 37 °C por 24 horas, transcurrido ese tiempo se tomó una colonia aislada y se colocó en BHI (infusión cerebro-corazón) incubándose a 37 °C durante 16 horas.

Para la preparación del inóculo, la suspensión con microorganismos se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C a continuación se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 5mL de agua peptonada al 0.1% estéril para volverse a centrifugar a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, de igual manera se descarto el sobrenadante y el *pellet* finalmente se resuspendió en agua peptonada al 0.1%. Se ajustó la concentración al tubo 0.5 de la escala de *Mc Farland* (equivalente a una concentración de 1×10^8 UFC/mL aproximadamente).

4.5.3 Inoculación de los frutos

Los frutos fueron colocados bajo condiciones asépticas y se inocularon a temperatura ambiente de la siguiente manera; se tomaron 100 µL del inóculo que contenía 10^8 UFC/mL. Se inocularon en las áreas previamente marcadas, el inóculo se aplicó mediante pequeñas gotas en toda la superficie marcada y se dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente los frutos se almacenaron a una temperatura de 25 °C (HR 90-95%) durante 8 días.



4.5.4 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 al 0.1% estéril, se frotó la superficie inoculada, posteriormente, el hisopo se colocó en un vial con agua peptonada al 0.1% estéril, una vez tomada la muestra, se agitó por espacio de 1 minuto para recuperar los microorganismos que se encontraban en el hisopo y se realizaron las diluciones seriales de la mezcla recuperada, de estas diluciones se tomaron 100 μ L y se sembraron en agar nutritivo que contenía 50 μ g/mL de ampicilina, se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se realizó la cuenta de las UFC/mL. Las muestras fueron tomadas por triplicado y a las 0, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas después de inocular a los frutos, como control negativo se tomó un área de igual magnitud a la inoculada pero sin inocular de cada fruto y como control positivo se tomaron 100 μ L del inóculo diluido en 5mL de agua peptonada al 0.1% y se sembraron de igual manera en agar nutritivo con ampicilina.

4.6 Actividad antimicrobiana de extractos crudos preparados a partir de piel de mango

Para establecer una posible actividad antimicrobiana de algunos compuestos fenólicos que pudieran sintetizarse después de la aplicación del tratamiento con UV-C, primeramente se evaluó si dichos compuestos cuantificados como fenoles totales, presentaban actividad antimicrobiana contra algunas cepas que fueron aisladas de la superficie del mango, además, se evaluó si existía diferencia de esta actividad antimicrobiana entre mangos con y sin tratamiento.

Asimismo, se identificaron algunos de estos compuestos fenólicos en la piel de los frutos. Se utilizaron las pieles de los mangos de los cuales se recuperaron los microorganismos de la superficie, por lo que se prepararon extractos en los días 0, 4 y 12, en mangos que recibieron tratamiento con UV-C y los frutos control que fueron almacenados a 25 °C.



4.6.1 Extracción de compuestos fenólicos

Los extractos fueron preparados de acuerdo a la metodología propuesta por Ajila *et al.* (2006). La extracción se realizó con metanol al 80% (v/v). 20 g de piel de mango fue pesada, después fue triturada en mortero utilizando nitrógeno líquido, posteriormente, se le adicionaron 100 ml de metanol al 80%(v/v), se agitó en vortex por 1 minuto, después de lo cual se mantuvo en un baño a 70 °C durante 2 horas, tras lo cual se filtró con papel filtro *Whatman* no. 4, finalmente, se determinó la concentración de fenoles totales.

4.6.2 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, la absorbancia del desarrollo del color fue determinada a 765 nm, método usado por Slinkard y Singleton (1977) expresado como mg/g de tejido fresco. Utilizando como estándar una solución de ácido gálico (ALDRICH, Milwaukee).

Para la determinación, se tomó una alícuota de 200 μ L del extracto que se colocó en tubo de ensaye, se le agregaron 1500 μ L de agua destilada y 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 minutos se le adicionaron 200 μ L de Na_2CO_3 al 20% agitándose a velocidad constante, dejándose reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (marca TERMO SPECTRONIC, mod. GÉNESIS 10 UV) a 765 nm.

4.6.3 Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron un total de 14 cepas todas Gram-negativas de los siguientes géneros: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. sutzeri*, *Salmonella* sp., *E. aerogenus*, *C. freundii*, *C. freundii* complex, *E. cloacae*, *E. cancerogenus*, *E. hormanechei*, *K. ornithinolytica* y *S. marcescens*, fueron proporcionadas por el grupo de trabajo, estas cepas fueron aisladas anteriormente de la superficie del mango.



Las cepas se activaron en caldo nutritivo durante 24 h a 37 °C, posteriormente, fueron sembradas por estrías en cajas de *Petri* de 9 cm de diámetro que contenían 20 mL de agar nutritivo, se incubaron a 37 °C por 24 horas, transcurrido ese tiempo, se tomó una colonia aislada y se colocó en caldo nutritivo incubándose a 37 °C durante 24 horas. A continuación, la concentración de cada microorganismo fue ajustada al tubo 0.5 de la escala de *Mc Farland* (equivalente a una concentración de 1×10^8 UFC/mL aproximadamente).

4.6.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la piel de mango utilizando el método de difusión en agar

Se utilizó el método de difusión en agar con discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y 0.6 mm de espesor. Se utilizaron cajas de *Petri* de 9 cm de diámetro que contenían 20 mL de agar nutritivo. La suspensión de cada uno de los microorganismo fue inoculada separadamente en la superficie del medio de cultivo, las cajas se dejaron secar a temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente, se colocaron 4 discos distribuidos de manera equidistantemente en los que se depositaron 50 µL de extracto crudo, uno de los discos se utilizó como control negativo, este contenía metanol al 80% y como control positivo se utilizó una solución de ácido acético al 1%, después de la distribución de los extractos las cajas se dejaron secar a 8 °C durante 30 minutos, a fin de permitir la difusión de los extractos, más adelante fueron incubadas en posición invertida a 37 °C durante 24 horas, a continuación, se procedió con la lectura de las zonas de inhibición. La lectura fue realizada por medición del diámetro del halo de la zona de inhibición, considerando inclusive el diámetro del disco.



4.7 Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos por medio de análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés)

4.7.1 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia

El análisis cuantitativo se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Singh *et al.* (2004). En un sistema HPLC (Waters, modelo 1525) equipado con dos bombas binarias unido a una columna Symmetry C 18 (partícula de 5 μ m de 3.9 x 150 mm, Waters). Se utilizó un gradiente con la fase móvil compuesta por (A) Metanol y (B) ácido acético al 0.4% (v/v) con gradiente 20: 80, 40:60, 80:20 y 20:80 a un flujo de 1mL/min a temperatura ambiente con un *loop* de inyección de 20 μ L. Los compuestos fueron detectados a 290 nm en un detector dual λ absorbancia (Waters 2487).

Como estándares se utilizaron ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido cumárico (Sigma Aldrich). Fueron identificados cada uno de los ácidos fenólicos presentes en las muestras por comparación de los picos y tiempos de retención de los estándares de manera individual. Para calcular la concentración de cada uno de los compuestos, se calculó el área de los picos utilizando el software Breeze (Waters).

4.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos experimentales mostrados son el promedio de estos con su respectiva Desviación Estándar (SD, por sus siglas en inglés). Los datos fueron analizados mediante análisis de variancia (ANOVA) y pruebas de rango múltiple de Duncan con una $P \leq 0.05$ para determinar la diferencia estadística entre las medias. Para ello se utilizó el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versión 14.0, Student). El análisis de ANOVA se realizó para evaluar el efecto de la sobrevivencia de *E. coli* y para evaluar el efecto del tratamiento en los niveles de los compuestos fenólicos.



V. Análisis de Resultados y Discusión

5.1. MONTAJE DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA TÉCNICA DE DGGE PARA DETERMINAR LOS CAMBIOS EN LA MICROBIOTA QUE SE ENCUENTRA EN LA SUPERFICIE DEL MANGO

5.1.1 Recuperación de la microbiota superficial, extracción del ADN y amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S

Se sabe que la extracción del ADN es un paso crítico para la aplicación del DGGE, ya que de ello depende en gran medida la fiabilidad del método, debido a que se debe contar con la cantidad de ADN que represente a la comunidad en estudio (Lyauteyn *et al.*, 2005). Por ello, la recuperación de la microbiota superficial del mango, fue un paso crítico para el éxito del estudio. De esta manera, la metodología experimental empleada para este fin fue exitosa para todas las muestras de trabajo, debido a que permitió tener la cantidad de ADN suficiente para llevar a cabo el estudio.

En lo que respecta a las muestras para el análisis del efecto del tratamiento con UV-C sobre la microbiota superficial del mango, en la figura 6, se observa que se obtuvo suficiente cantidad de ADN (1500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en promedio) con la estrategia propuesta: juntar en una muestra la recuperación de la microbiota de 5 frutos (lo que constituyó una unidad de muestra).

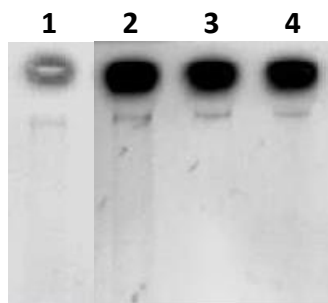


Figura 6. Visualización de ADN obtenido en muestras con tratamiento con UV-C de la microbiota superficial del mango.



Esto permitió el manejo correcto de las muestras sin necesidad de algún tipo de enriquecimiento, con lo que se hubiera incluido un sesgo en los resultados, debido a la modificación del patrón de microorganismos y por lo tanto no se obtendría una visión real de las comunidades bacterianas, en este caso, de la superficie del mango.

Por otro lado, la obtención de amplicones es una parte fundamental en el uso del DGGE, debido a que la reacción de PCR es la base de un gran número de las técnicas independientes de cultivo como lo es el DGGE. La reacción de PCR implica la amplificación de genes diana utilizando oligonucleótidos iniciadores o cebadores que permiten examinar directamente las comunidades de la superficie del mango en su totalidad. De acuerdo con muchos autores, se necesita de 1 ng de ADN molde para que la reacción de PCR sea exitosa con ADN bacteriano (Sambrook y Russell, 2001). Además, la sensibilidad del DGGE posee altas tasas de detección y se ha descrito que en los geles se visualizan poblaciones presentes entre el 0.1 al 1% (Schramm y Amann, 1999). En la figura 8, se observan los productos de PCR (región V3 del gen ribosomal 16S) obtenidos a partir de las muestras con y tratamiento, para su posterior análisis mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).

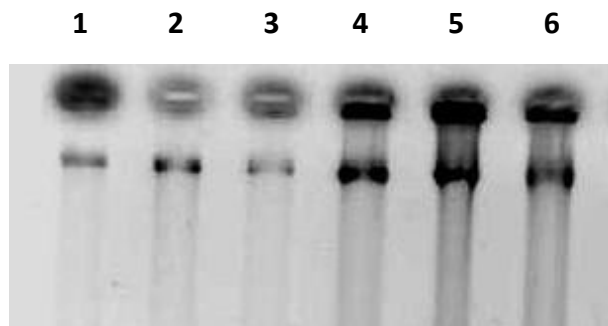


Figura 7. Visualización de ADN en muestras control de la microbiota superficial del mango.

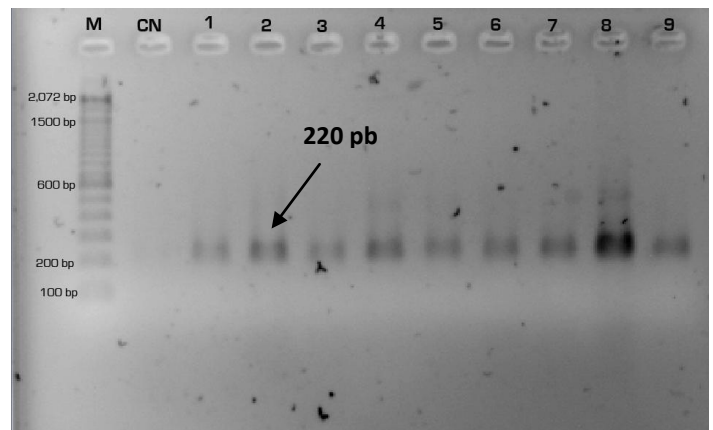


Figura 8. Visualización de productos de PCR (Región V3 del gen ribosomal 16S) en muestras para el análisis del efecto del tratamiento con UV-C sobre la microbiota superficial del mango. **Carriles 1-3:** Control (mangos sin tratamiento), **Carriles 4-9:** Tratamiento con UV-C (20 min); **CN:** Control negativo.



5.1.2 Obtención del gradiente desnaturalizante óptimo para lograr la separación de los productos de PCR de la microbiota bacteriana de la superficie del mango mediante un gel perpendicular

Para la adecuada separación de los productos de PCR de la región V3 del gen ribosomal 16S, el gradiente desnaturalizante es otro de los parámetros de importancia para así obtener una adecuada interpretación en el patrón de bandas que representa a la microbiota en estudio. Por lo que, se realizó un gel perpendicular (la dirección de la electroforesis fue perpendicular al gradiente del desnaturalizante) con este se determinó el gradiente de desnaturalizante necesario para la separación de los fragmentos de ADN (productos de PCR) obtenidos de la microbiota en estudio. Para ello, se utilizaron productos de PCR de muestras control y con tratamiento, los cuales fueron representativos de la microbiota bacteriana de la superficie del mango.



Figura 9. Gel perpendicular de muestras control y con tratamiento con UV-C de la microbiota superficial del mango. Gradiente utilizado: 5% - 55%. Condiciones de electroforesis: 130 V, 2 h, 60 °C.

A partir de la figura 9, se determinó el intervalo de desnaturalizante en el cual los productos de PCR forman una *sigmoide* (zona de desnaturalización del ADN), que resultó estar comprendido entre el 15% y el 60% de desnaturalizante. Según se observa en la figura 9, la determinación del límite mínimo fue claro, no así el del límite máximo. Por lo que posteriormente se probó con otros intervalos de gradiente (20%-70%, 12%-60% y



15%-60%) para así determinar con cuál de estos se obtenía una mejor separación de los amplicones de la microbiota superficial, por lo que se realizaron geles paralelos con cada uno de estos gradientes (fig. 10).

El gradiente desnaturante que mostró una adecuada separación de las bandas fue del 15% al 60%. Este se definió a partir de un análisis de muestras de los frutos en un gel de DGGE (fig. 10C) con este intervalo del desnaturante, seguido de una inspección visual del área de migración de las bandas, por lo que se estableció este gradiente para el estudio de la microbiota bacteriana de la superficie del mango. Finalmente las condiciones adecuadas se establecieron con este intervalo desnaturante y un tiempo de 17 horas bajo 85 Voltios.

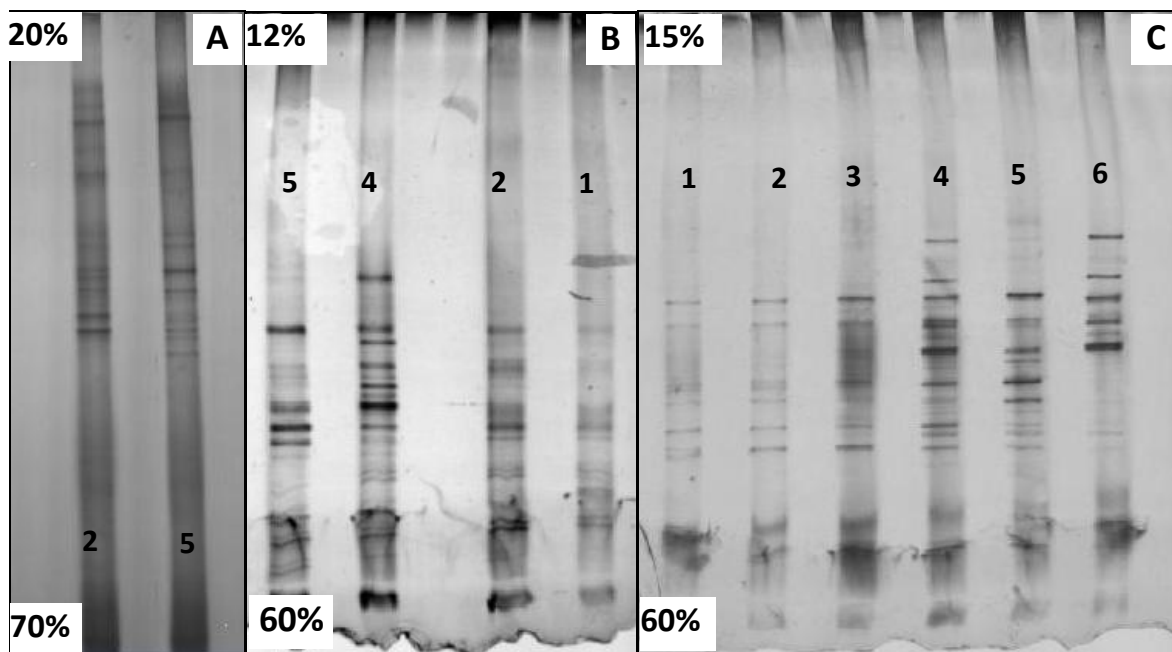


Figura 10. Patrones de bandas de muestras control en geles paralelos a diferentes intervalos desnaturantes .A: 20-70%; B: 12-60% y C: 15-60%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.



5.1.3 Consistencia del patrón de bandas en la superficie de frutos tratados con UV-C y frutos control

Para una correcta interpretación de los perfiles de bandas representativas de la microbiota que se encuentra en la superficie del mango y para la identificación de los cambios de ésta, fue necesario tener la certeza de que los patrones de bandas fueran representativos y consistentes, es decir que no variaran entre cada muestra de un mismo lote. Para ello se realizó una electroforesis con gradiente desnaturante de muestras compuestas de cinco frutos cada una. En la figura 11, se muestran los patrones de bandas obtenidos para las muestras control, las réplicas (1, 2 y 3) de estos presentan un perfil de bandas similar, lo que sugiere que los mangos de un mismo lote tienen una microbiota similar. De igual manera Randazzo *et al.* (2009) reportaron que en lechuga, calabacines, zanahorias y rábanos observaron la presencia de patrones de bandas representativos en todas las muestras analizadas, con lo que sugieren la similitud en la composición microbiana de los productos.

El patrón de bandas de la microbiota bacteriana de la superficie de los mangos control (fig. 11) no difiere mucho del que presentan los mangos que recibieron el tratamiento con UV-C (fig. 11) y por lo tanto se puede decir que la diversidad microbiana en la superficie de los mangos inmediatamente después de aplicado el tratamiento es la misma ya que no se observan cambios en cuanto al número de bandas que presentan todas las muestras. Además, se observan pocas diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas entre las distintas muestras (fig. 11 A y B).

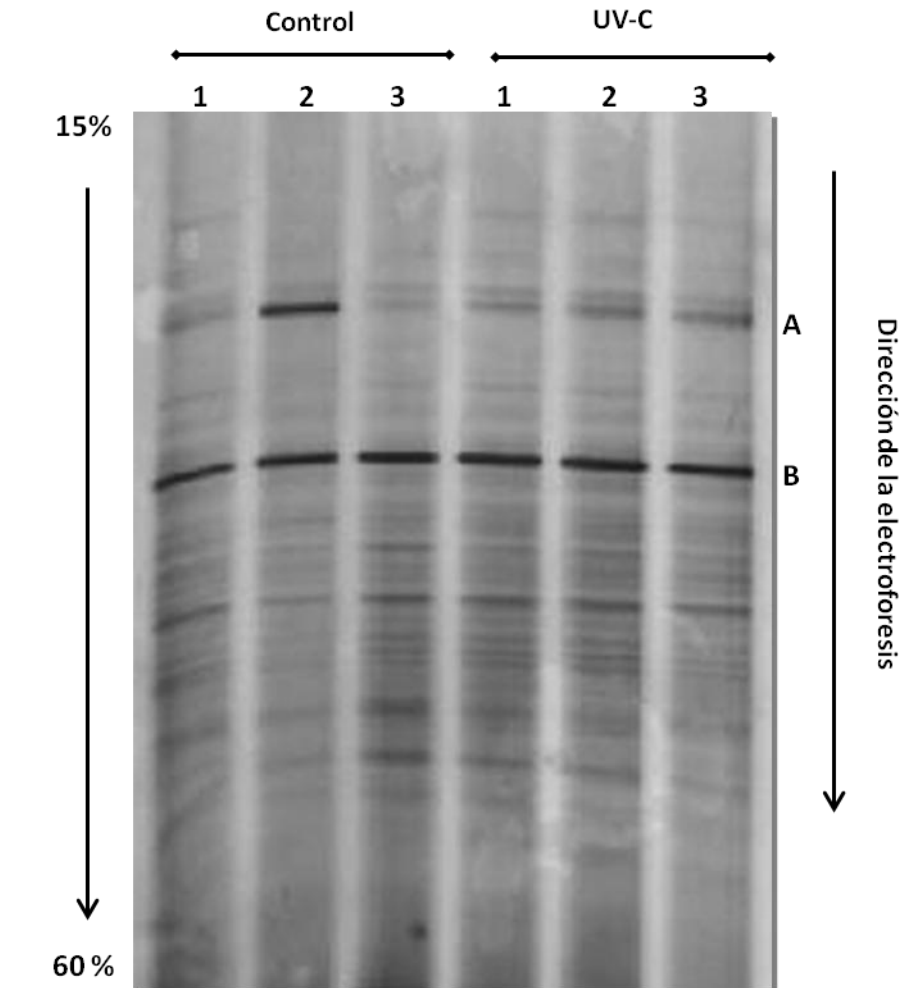


Figura 11. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos **(A)** sin tratamiento (control) y **(B)** sometidos a tratamientos con UV-C inmediatamente después de recibir el tratamiento. **Gradiente utilizado:** 15% - 60%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.

La obtención de bandas con intensidad relativa mayor (fig. 11) probablemente puede ser indicativo de que existen especies dominantes y que ecológicamente se encuentran mejor adaptadas a la superficie del mango, además de que seguramente perduraran a lo largo del tiempo de almacenamiento del fruto. Asimismo, la complejidad de los patrones obtenidos, dado que presentan numerosas bandas en todas las muestras, pueden indicar la presencia de muchas bacterias por lo que podríamos suponer una comunidad con un nivel alto de diversidad en la superficie del mango Ataúlfo.



5.1.4 Interpretación de los perfiles obtenidos en los geles de DGGE por medio de un patrón de bandas de cepas aisladas previamente de la superficie del mango

El DGGE es una técnica independiente de cultivo que se usa generalmente para el estudio de la dinámica de comunidades bacterianas en diferentes entornos, permite el estudio de la estructura de la comunidad y de su comportamiento. Los cambios en la diversidad microbiana pueden observarse a partir de la identificación de diferentes patrones de bandas, que propiamente pueden indicar cambios en la riqueza de las especies. Los cambios en la intensidad de las bandas pueden indicar cambios en la abundancia. Para el análisis de los patrones de bandas de DGGE se asume que cada banda representa un grupo en particular de miembros (Nakatsu *et al.*, 2000).

La interpretación de los patrones de bandas obtenidos en los geles de DGGE puede ser rápida y fácil, si se considera que cada banda representa a un microorganismo miembro de la comunidad. Considerando esto, buscando identificar a estos miembros de primera instancia se planteó como estrategia tener un patrón de bandas de cepas aisladas previamente por el grupo de trabajo de la superficie de mangos de la variedad 'manila'.

Para ello, se utilizaron 14 cepas de bacterias aisladas de la superficie del mango previamente identificadas y caracterizadas mediante el uso del equipo Vitek (Velez Sotres, 2004). Se llevó a cabo la extracción de ADN y la posterior amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S (fig. 12 y 13) a los cuales se les aplicó un DGGE. Los resultados obtenidos para cada cepa se muestran en la figura 14.



Figura 12. Visualización de ADN de cepas aisladas del mango. **Carril 1:** *P. stutzeri*, **Carril 2:** *Enterob. cancerogenus*, **Carril 3:** *C. freundii*, **Carril 4:** *S. marcescens*, **Carril 5:** *K. ornithinolytica*, **Carril 6:** *Enterob. cloacae*, **Carril 7:** *B. cereus*, **Carril 8:** *P. aeruginosa*, **Carril 9:** *Enterob. hormanechei*, **Carril 10:** *Enterob. aerogenes*, **Carril 11:** *Salmonella* sp., **Carril 12:** *K. pneumoniae*, **Carril 13:** *C. freundii* complex y **Carril 14:** *E. coli*.



Figura 13. Visualización de productos de PCR de cepas aisladas del mango. **Carril 1:** *P. stutzeri*, **Carril 2:** *Enterob. cancerogenus*, **Carril 3:** *C. freundii*, **Carril 4:** *S. marcescens*, **Carril 5:** *K. ornithinolytica*, **Carril 6:** *Enterob. cloacae*, **Carril 7:** *B. cereus*, **Carril 8:** *P. aeruginosa*, **Carril 9:** *Enterob. hormanechei*, **Carril 10:** *Enterob. aerogenes*, **Carril 11:** *Salmonella* sp., **Carril 12:** *K. pneumoniae*, **Carril 13:** *C. freundii* complex y **Carril 14:** *E. coli*.

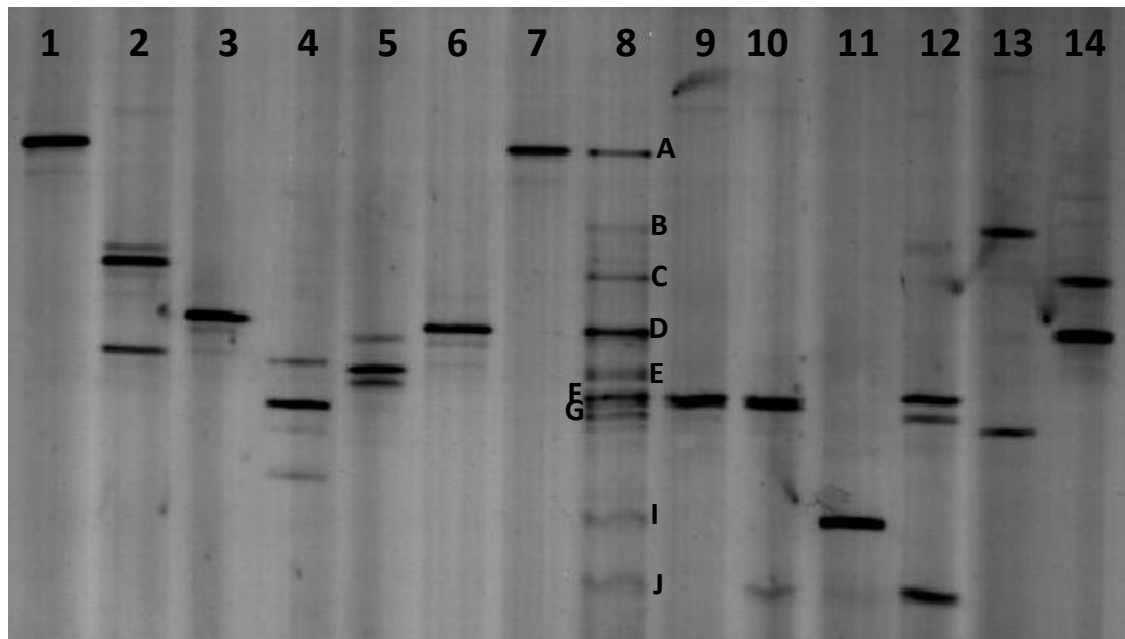


Figura 14. Gel paralelo para análisis de las cepas aisladas del mango. **Carril 1:** *P. stutzeri*, **Carril 2:** *Enterob. cancerogenus*, **Carril 3:** *C. freundii*, **Carril 4:** *S. marcescens*, **Carril 5:** *Enterob. cloacae*, **Carril 6:** *B. cereus*, **Carril 7:** *P. aeruginosa*, **Carril 8:** Mezcla de todas las cepas, **Carril 9:** *Enterob. hormanechei*, **Carril 10:** *Enterob. aerogenes*, **Carril 11:** *Salmonella sp.*, **Carril 12:** *K. pneumoniae*, **Carril 13:** *C. freundii* complex y **Carril 14:** *E. coli*. **Gradiente utilizado:** 15% - 60%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.

En la Figura 14 puede notarse que en la mayor parte de los patrones de bandas para las cepas, se obtuvo más de una banda. A este fenómeno se le conoce como microheterogeneidad y se debe a que las cepas presentan varias copias del gen ribosomal 16S cada una con una secuencia diferente. Esto complica la identificación del patrón de bandas de las muestras. Asimismo, se observa que algunas bandas de cepas diferentes presentaron migraciones muy parecidas en el gel de DGGE (co-migración). En la tabla 5, se especifica el número de copias del gen ribosomal 16S (número de bandas) que presenta cada cepa y también se hace un listado de las bandas que son compartidas con otras cepas.


Tabla 5. Microheterogeneidad y co-migración de cepas aisladas de la superficie del mango.

Cepa	Microheterogeneidad (no. De bandas por cada cepa)	Co-migración (microorganismos que comparten bandas)
<i>P. stutzeri</i>	2	<i>P. aeruginosa</i> (2)
<i>Enterob. cancerogenus</i>	6	<i>S. marcescens</i> (1) <i>E. coli</i> (1)
<i>C. freundii</i>	3	<i>B. cereus</i> (1) <i>E. coli</i> (1)
<i>S. marcescens</i>	5	<i>Enterob. cancerogenus</i> (4) <i>C. freundii</i> (1) <i>K. ornithinolytica</i> (1) <i>Enterob. cloacae</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1)
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	5	<i>S. marcescens</i> (1) <i>Salmonella</i> sp. (1) <i>K. pneumoniae</i> (1)
<i>Enterob. Cloacae</i>	5	<i>Enterob. cancerogenus</i> (1) <i>S. marcescens</i> (1) <i>E. coli</i> (1)
<i>B. cereus</i>	1	<i>C. freundii</i> (1) <i>E. coli</i> (1)
<i>P. aeruginosa</i>	1	
<i>Enterob. hormanechei</i>	2	<i>Enterob. aerogenes</i> (2) <i>K. pneumoniae</i> (2)
<i>Enterob. Aerogenes</i>	4	<i>Enterob. hormanechei</i> (2) <i>Enterob. cancerogenus</i> (2) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>E. coli</i> (1)
<i>Salmonella</i> sp.	2	<i>S. marcescens</i> (1) <i>K. ornithinolytica</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	<i>Enterob. hormanechei</i> (2) <i>Enterob. aerogenes</i> (2) <i>S. marcescens</i> (1) <i>K. ornithinolytica</i> (1)
<i>C. freundii</i> complex	3	<i>E. coli</i> (1)
<i>E. coli</i>	6	<i>Enterob. cancerogenus</i> (2) <i>S. marcescens</i> (1) <i>Enterob. aerogenes</i> (1) <i>C. freundii</i> complex (1)



El fenómeno de microheterogeneidad asociado al gen ribosomal 16S no es extraño. En estudios recientes se menciona que al utilizar técnicas moleculares muy sensibles tales como el DGGE, se detecta que un microorganismo podría estar representado por un grupo de bandas (Dhllöf *et al.*, 2000). Este fenómeno está asociado con la heterogeneidad intra-específica, que es el resultado de múltiples copias de genes ribosomales que involucran diferencias en su secuencia, es decir, cistrones que codifican el gen ribosomal 16S con diferentes secuencias en un solo genoma (Cilia *et al.*, 1996; Clayton *et al.*, 1995). Cilia *et al.* (1996) reportan que el número de operones de genes ribosomales por genoma de bacteria puede variar desde 1 hasta 15 copias, como es el caso de la bacteria patógena *Rickettsia prowazkeii*, mientras que *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium posee hasta siete copias. Cilia *et al.* (1996) utilizan como modelo de estudio algunas enterobacterias, sugiriendo que el fenómeno de microheterogeneidad es común en esta familia. Esta observación es importante si se considera que muchas de las bacterias que se han aislado de la superficie del mango son enterobacterias. Se piensa que la variación en el número de operones de genes ribosomales por genoma de bacteria está dada como un indicador genético de la estrategia general ecológica de una especie de bacteria para la explotación de nutrientes. Se ha propuesto también que la duplicación de cromosomas es un mecanismo para incrementar el número de ciertos genes particulares que se encienden bajo estrés nutricional (Cilia *et al.*, 1996).

El problema asociado al fenómeno de microheterogeneidad radica en la dificultad del análisis de huellas de las comunidades microbianas en una muestra dada. Así, si se observa la figura 14, aunque existen bandas que son predominantes para cada cepa, puede resultar difícil asignar una banda representativa para cada microorganismo, lo que dificulta la elaboración de un patrón real. En este sentido, el establecimiento de una posible relación entre el patrón de cepas aisladas previamente con el de las huellas de las comunidades microbianas en la superficie del mango para la identificación de microorganismos, sólo sería aproximado.



Por otra parte, como se observa en la figura 14 y en la tabla 5 existen cepas que están relacionadas dos y hasta cuatro veces con bandas diferentes (co-migración). Estas observaciones no resultan absurdas si se considera, por ejemplo, que *E. hormanechei* y *E. aerogenes* que comparten la banda más característica para ambas cepas, guardan una relación estrecha al ser especies que pertenecen a un mismo género, el otro caso sería el de *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* que comparte la migración de la banda característica lo que si se utilizara un patrón de bandas de cepas puras, este sólo permitiría identificar que la cepa presente pertenece al género *Pseudomonas*.

Sin embargo, a pesar de que existe microheterogeneidad y co-migración en las cepas, es posible identificar algunas bandas como representativas de las bacterias aisladas de la superficie del mango, en el carril de la mezcla total de todas las cepas (fig. 14) se obtuvieron 13 bandas que corresponden a las cepas de la siguiente manera: **A)** *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*; **B)** *C. freundii* complex; **C)** *E. cancerogenus*; *E. coli*; **D)** *E. coli*; *C. freundii*; *B. cereus*; **E)** *E. cloacae*; **F)** *E. hormanechei*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*; **G)** *K. pneumoniae*; **H)** *C. freundii* complex; **I)** *Salmonella*; **J)** *K. pneumoniae*.

Aún cuando resulta ser aproximada la identificación de las cepas que puedan encontrarse en las muestras, este patrón de bandas hace posible una identificación rápida de los géneros que probablemente están presentes en las muestras problema, sin embargo se decidió no utilizarlo e identificar las bacterias presentes a través de la secuenciación del patrón de bandas.

5.1.4 Aplicación de un segundo gradiente para corroborar si las bandas corresponde a un solo microorganismo (microheterogeneidad y co-migración)

Dado los resultados encontrados respecto a la microheterogeneidad y co-migración para las cepas aisladas previamente de la superficie del mango y con la finalidad de identificar si las bandas corresponden a un solo microorganismo, se propuso aplicar un segundo



gradiente a las bandas seleccionadas (que siempre está presente y la de mayor intensidad en mangos con y sin tratamiento). Para ello, se cortó del gel de DGGE la banda A (fig. 15) y se amplificó la región V3 del gen ribosomal 16S, posteriormente, se aplicó un DGGE con un nuevo gradiente (con una variación de $\pm 5\%$ del gradiente desnaturizante dependiendo la posición de la banda en el primer gel de DGGE), finalmente, se mandó a secuenciar las bandas resultantes de la aplicación de este segundo gradiente a fin de identificar si correspondían a diferentes especies o si corresponden a un solo microorganismo.

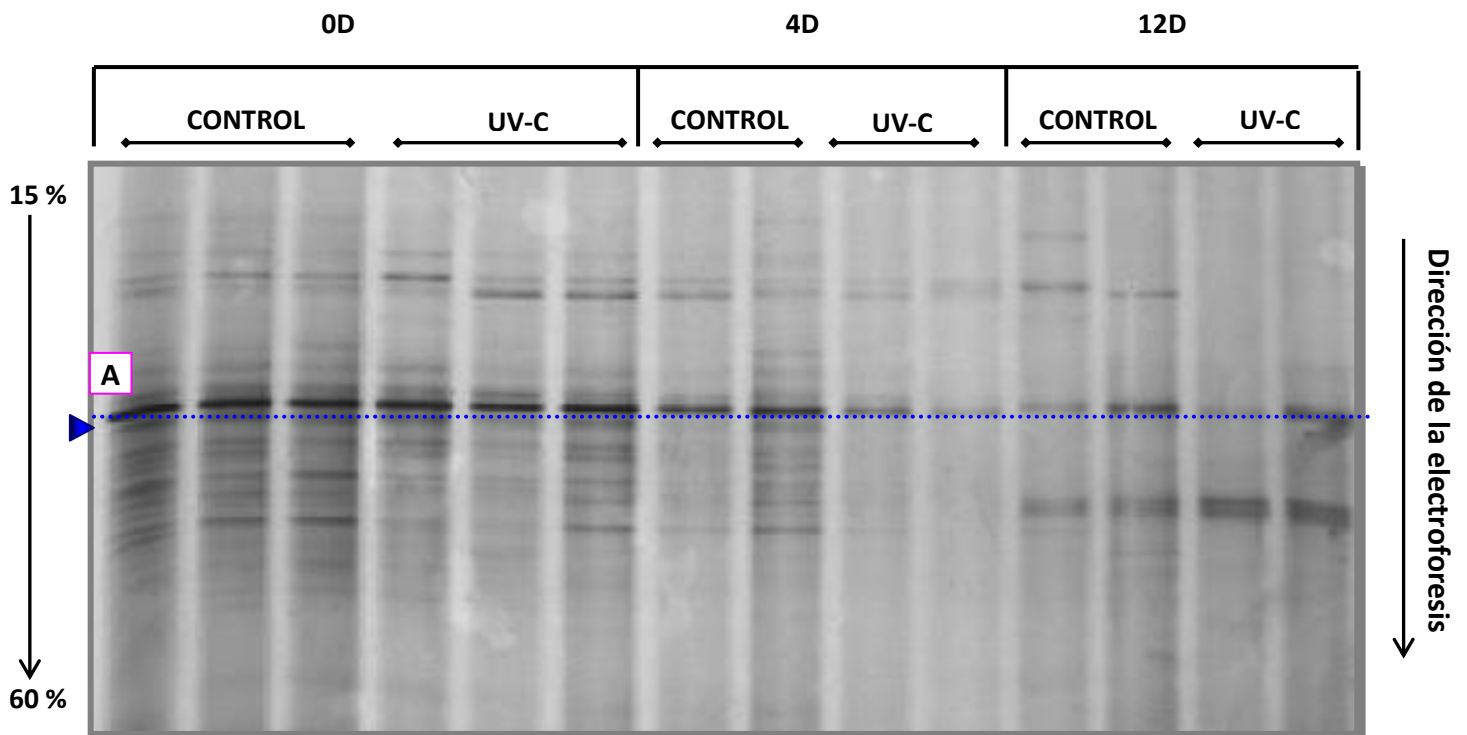


Figura 15. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y sin tratamiento (control) **0D**: inmediatamente después del tratamiento; **4D**: después de 4 días de recibir el tratamiento; **12D**: 12 días después de recibir el tratamiento. **Gradiente utilizado:** 15% - 60%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.

En la figura 16 se muestra el patrón que se obtuvo al aplicar un segundo gradiente a la banda A (fig. 15), se observa una banda predominante para el caso de mangos control y para los mangos que recibieron tratamiento con UV-C que aparece en todo el tiempo de almacenamiento, cabe señalar que para el día 12, aparecen unas bandas superiores de menor intensidad tanto en los frutos control como en los frutos que recibieron tratamiento con UV-C, fue necesario identificar todas estas bandas. A través de la secuenciación de dichas bandas, se identificó que tanto para los mangos tratados como



para los mangos del grupo control, la banda que se observa de mayor intensidad se identificó como *Pantoea agglomerans*, *Erwinia* sp. y *Enterobacter cloacae* con un 95% de identidad. Asimismo, a partir de la secuenciación de las bandas superiores que aparecen al día 12. Estas se identificaron como miembros de los géneros *Pantoea*, *Enterobacter* y *Erwinia* con una identidad del 99%. Por lo que para el propósito de este estudio puede considerarse que las bandas que aparecen al aplicar el segundo gradiente a la banda A (fig. 15) representan al mismo género presente en la superficie del mango. A raíz de estos resultados se determinó continuar los experimentos posteriores, asumiendo que las bandas presentes corresponden a un microorganismo ya que al aplicar un segundo gradiente, las bandas que se encuentran en la misma posición en las diferentes muestras presentaron secuencias para la identificación de los mismos géneros.

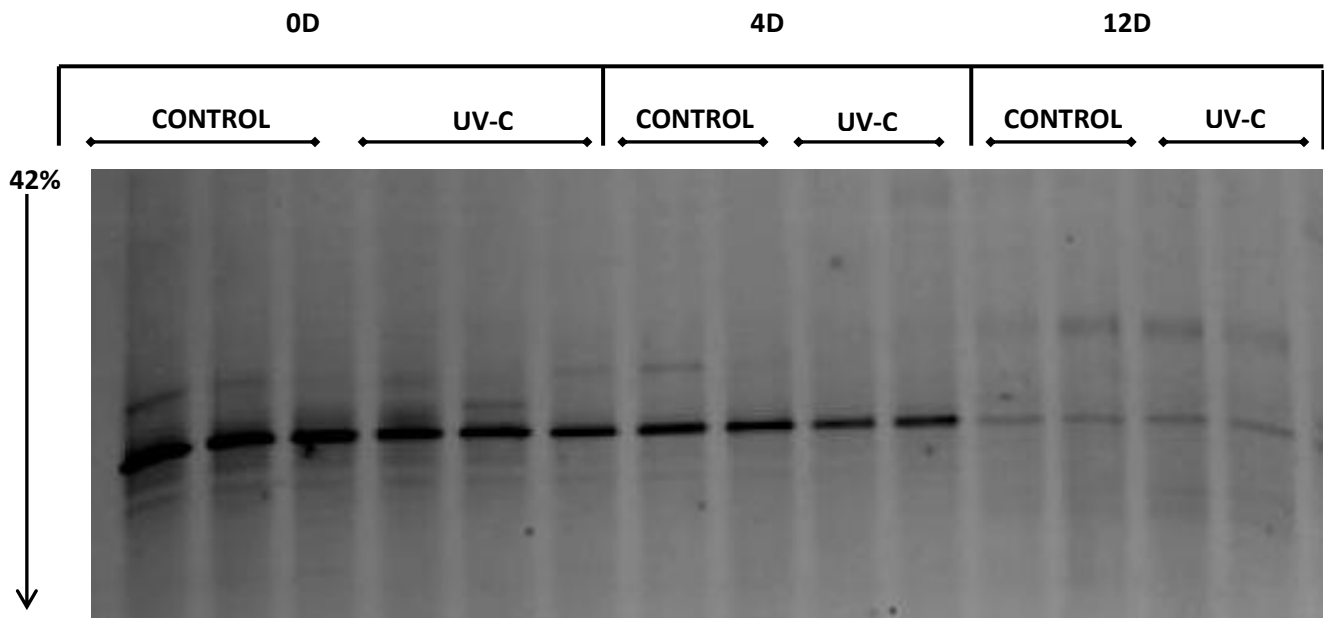


Figura 16. Patrón obtenido por DGGE a partir de la banda A de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y sin tratamiento (control) **0D**: inmediatamente después del tratamiento; **4D**: después de 4 días de recibir el tratamiento; **12D**: 12 días después de recibir el tratamiento. **Gradiente utilizado**: 42% - 46%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.



5.2 EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO CON UV-C SOBRE LA MICROBIOTA SUPERFICIAL DE MANGOS ATAÚLFO

En los geles obtenidos por DGGE derivados de la microbiota superficial de los frutos control y los tratados con UV-C (OD: inmediatamente después de la aplicación del tratamiento), no se encontraron diferencias de los patrones de bandas entre las réplicas obtenidas de este punto de muestreo (fig. 17).

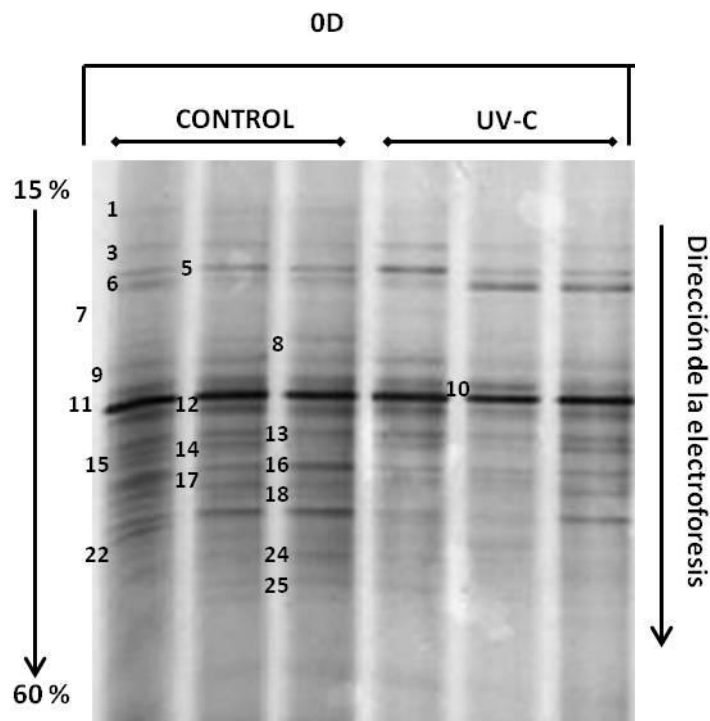


Figura 17. Patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y sin tratamiento (control) **Día 0:** inmediatamente después del tratamiento; **Gradiente utilizado:** 15% - 60%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.

Comparando los perfiles de bandas obtenidos por DGGE de las muestras control y las muestras con tratamiento con UV-C se detectaron 25 bandas en promedio para cada muestra, lo que sugiere una alta similitud en las poblaciones microbianas de la superficie de los frutos.



La diversidad microbiana en la superficie de mangos control no difiere mucho con los de los tratamientos inmediatamente después de la aplicación de estos, únicamente en cuanto a abundancia ya que se observa muy poca variación en cuanto al número de bandas que presentan pero se observa diferentes intensidades de éstas. La intensidad relativa de las bandas puede al menos ser utilizada para inferir los cambios generales en la abundancia relativa de los miembros dominantes de la comunidad (Lyautey *et al.*, 2005). Lyauttey *et al.* (2005) confirmaron que el DGGE es un método adecuado y confiable para evaluar la huella genética de las comunidades bacterianas.

Fueron identificados 12 géneros a partir del patrón de bandas. El género más común fue *Enterobacter* representado en el 50% del total de bandas secuenciadas para frutos control y con tratamiento en el día cero (fig. 19). Este resultado coincide con lo reportado por Oliveira *et al.* (2012) que encontraron que los productos vegetales son colonizados generalmente por una amplia variedad de microorganismos predominantemente por bacterias Gram-negativas en particular miembros de la familia *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*.

A partir de la figura 19, se puede observar que en los frutos control como en los frutos que recibieron tratamiento comparten la mayoría de las bandas en el día cero, no obstante las bandas 8 y 19 sólo se encuentran presentes en los frutos control, dichas bandas corresponden a bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Weisella* que probablemente dada la naturaleza ácida de los mangos es común encontrar a estas bacterias en la superficie de estos.



5.3 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE MANGOS ATAÚLFO TRATADOS CON UV-C SOBRE SU MICROBIOTA SUPERFICIAL

El estudio de las huellas genéticas se considera una herramienta adecuada para el análisis rápido y comparativo de las comunidades naturales desconocidas (Amann *et al.*, 1995). La huella genética fue usada para caracterizar los cambios en la microbiota superficial del mango Ataúlfo durante su almacenamiento a 25°C. Se cortaron un total de 20 bandas del patrón obtenido de la microbiota de la superficie de frutos tratados y frutos control que posteriormente, se mandaron a secuenciar.

De acuerdo al patrón de bandas (fig. 18) en el día cero se observan una mayor riqueza (número de bandas presentes) en la microbiota de la superficie del mango, tanto para los frutos control (23 bandas) y los frutos con tratamiento (15 bandas) y al transcurrir los días de almacenamiento ésta disminuye progresivamente en cada caso, hasta el día 12. De acuerdo con estos resultados las diferencias más marcadas en el patrón de bandas (fig.18) se encuentran a partir del día 4, tanto en los frutos control como en los frutos tratados por lo que probablemente a partir de este día ocurren los mayores cambios en la comunidad bacteriana de la superficie del mango. El patrón de bandas cambia durante el tiempo de almacenamiento de los frutos principalmente por influencia del tratamiento con UV-C y otros factores intrínsecos como la composición del fruto, los cambios en los compuestos fenólicos y el pH.

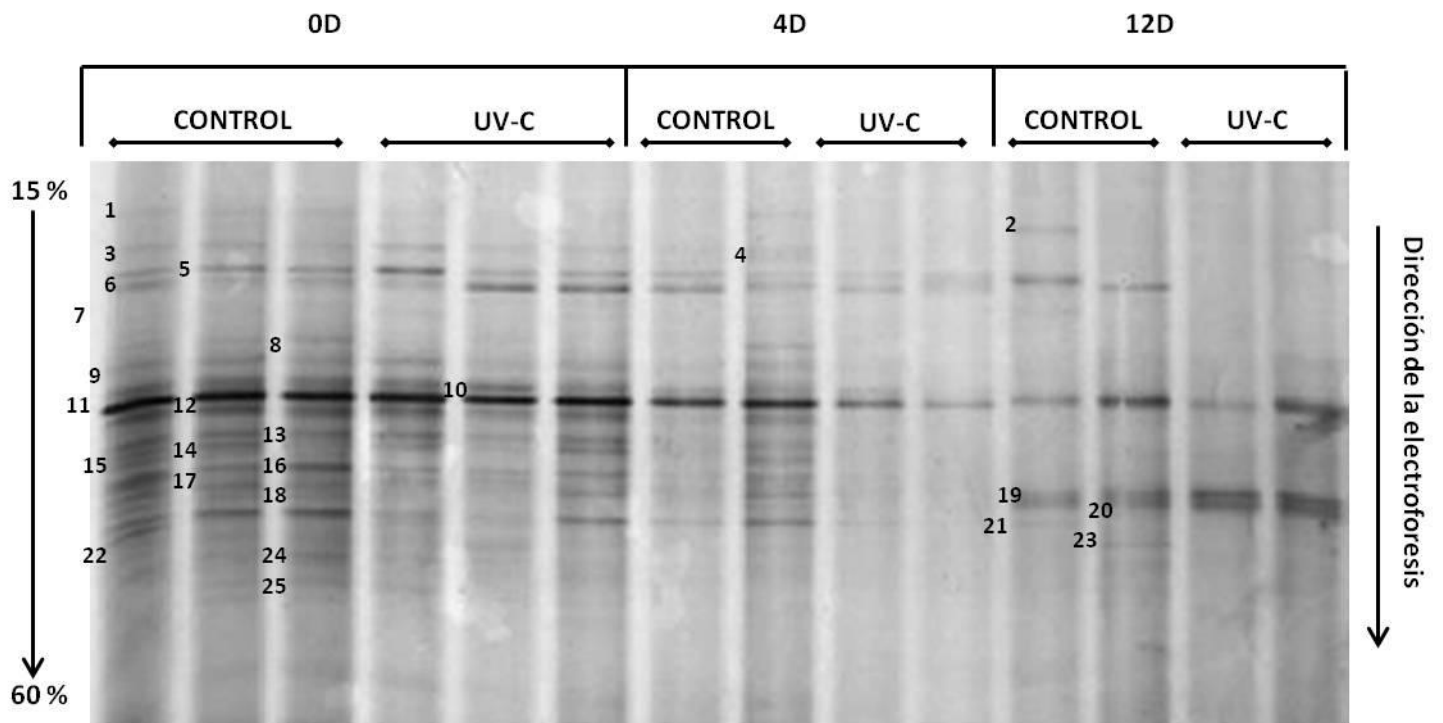


Figura 18. Patrón de bandas obtenido por DGGG de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y sin tratamiento (control) **Día 0:** inmediatamente después del tratamiento; **Día 4:** después de 4 días de recibir el tratamiento; **Día 12:** 12 días después de recibir el tratamiento. **Gradiente utilizado:** 15% - 60%. Condiciones de electroforesis: 85 V, 17 h, 65 °C.

Por otro lado, del análisis de la identificación por secuenciación las bandas representativas de la microbiota bacteriana de la superficie del mango (fig.19) se identificaron 12 géneros de los cuales muestran prevalencia las bacterias Gram-negativas (75%) sobre las bacterias Gram-positivas (25%) identificadas. Además, se encontró que 9 de ellas están relacionadas con el género *Enterobacter*, 6 con el género *Pantoea*, 4 con *Klebsiella* y 3 con el género *Escherichia* con lo que podría considerarse que estos fueron los géneros predominantes en la microbiota de la superficie del mango Ataúlfo. Los géneros que se encontraron en menor proporción fueron *Erwinia*, *Salmonella*, *Lactococcus*, *Weisella*, *Lactobacillus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Schuenzel y Harrison (2002) demostraron que el 92% de las cepas aisladas de la microbiota natural de productos vegetales (zanahorias, chiles, lechuga, calabazas, cilantro y cebollas) son Gram negativas.



Número de banda	Día 0		Día 4		Día 12		Identificación BLAST
	Control	UV-C	Control	UV-C	Control	UV-C	
1				No fue posible su identificación
2					—		No fue posible su identificación
3	—				<i>Pantoea</i> sp., <i>P. ananatis</i> , <i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Klebsiella</i> sp. con 97% de identidad
4						
5	—	—		<i>Enterobacter sakazakii</i> , <i>Pantoea</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus</i> sp., con 97% de identidad
6	—	—		<i>Lactococcus lactis</i> con 96% de identidad
7	—				
8				<i>Enterobacter</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>P. dispersa</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>P. stewartii</i> , <i>Erwinia</i> sp., <i>E. stewartii</i> con 96% de identidad
9	—				
10	—	—			<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>P. dispersa</i> , <i>Erwinia</i> sp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia hermannii</i> , <i>E. coli</i> , con 95% de identidad
11	■ ■ ■	—	■ ■ ■	—	■ ■ ■	—	
12	—	—		<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. pyrinus</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i> con 94% de identidad
13	—				<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. hormaechei</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> con 99% de identidad
14	—				<i>Citrobacter</i> sp., <i>C. farmeri</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>S. enterica</i> subsp. <i>Indica</i> con 95% de identidad
15						<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. cloacae</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> con 98% de identidad
16	—				<i>Weissella</i> sp., <i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. confusus</i> , <i>L. viridescens</i> con 90% de identidad
17	—				
18	—				<i>Klebsiella</i> sp., <i>K. pneumonia</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>E. aerogenes</i> con 99% de identidad
19	—	
20	—	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> con 90% de identidad
21	—		
22						<i>Pantoea</i> sp. con 98% de identidad
23	—				No arrojó resultados No arrojó resultados
24						
25						

Figura 19. Esquematación del patrón de bandas obtenido por DGGE de muestras de mangos sometidos a tratamientos con UV-C y sin tratamiento (control) **Día 0:** inmediatamente después del tratamiento; **Día 4:** después de 4 días de recibir el tratamiento; **Día 12:** 12 días después de recibir el tratamiento.



Asimismo, *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp., y algunas bacterias ácido lácticas tienden a dominar las poblaciones cultivables en la superficie de los vegetales (López-Velasco *et al.*, 2010), aunque, muchas de estas bacterias se han reportado como responsables del deterioro de vegetales frescos, sin embargo, también han sido reportadas por la capacidad que presentan para inhibir el crecimiento de enterobacterias patógenas tales como *Salmonella* sp., *E. coli* y *Listeria monocytogenes* (Liao, 2007; Schuenzel y Harrison, 2002).

Ahora bien, de la identificación por secuenciación de algunas de las bandas de los frutos control (fig. 19) se observó que la banda 22 identificada como *Pantoea* sp. está presente en grupo control al día cero y desaparece posteriormente. Asimismo, la banda 4 identificada probablemente como *Pantoea* sp., *P. ananatis*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella* sp. sólo aparece en los frutos control al día 4 y posteriormente desaparece. De igual forma, la banda 15 que se identificó como *Enterobacter* sp., *E. cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella oxytoca* sólo está presente en los frutos control en el día cero.

Bacterias ácido lácticas, como *Lactococcus lactis* (banda 8) sólo se hicieron presente en los frutos control los días cero y cuatro, sin embargo, no apareció en el día 12. Por otro lado, *Weissella* sp., *W. confusa*, *W. cibaria*, *Lactobacillus* sp., *L. confusus*, *L. viridescens*, está presente a lo largo del tiempo en los frutos control y sólo se hace presente el día 12 en los frutos con tratamiento (banda 19). Diversos estudios han demostrado que la presencia de una microbiota natural, particularmente las bacterias ácido lácticas, son capaces de controlar el excesivo crecimiento de patógenos en la superficie de los vegetales (Liao y Fett, 2001; Parish *et al.*, 2003). Sin embargo, para el caso del mango Ataúlfo no se observó esto ya que no existió diferencia significativa en la sobrevivencia de *E. coli* en la superficie de frutos del grupo control y frutos que recibieron tratamiento con UV-C.

La banda 11 identificada como *Pantoea agglomerans*, *P. dispersa*, *Erwinia* sp., *Enterobacter cloacae*, *Escherichia hermannii*, *E. coli* siempre está presente tanto en el



tratamiento como en el control, es la única banda que está presente durante todo el tiempo de almacenamiento. *Pantoea agglomerans*, está reportada como antagonista de *Penicillium digitatum* en limones (Plaza *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que *Pantoea agglomerans* puede agregarse con *Salmonella* en la superficie de las hojas de cilantro y con ello *Salmonella* puede persistir hasta por 100 días con lo que puede ser una fuente importante para la proliferación de este patógeno, si es que se diera el caso de que se encontrara en la superficie del mango (Aruscavage *et al.*, 2006).

Pseudomonas fue uno de los géneros aislados de la superficie del mango (banda 21) está presente siempre, en los frutos control, sin embargo, en los frutos con tratamiento sólo se encontró en el día cero. Martins *et al.* (2012) reportaron que en uvas, *Pseudomonas* tiende a descender cuando el fruto madura. Miembros de este género están típicamente presentes en el suelo y en las plantas. Muchas especies de este género se han aislado de muestras cultivadas en el campo, tales como los vegetales que se utilizan en las ensaladas. Estas bacterias están estrechamente asociadas con las matrices de las plantas y presenta la capacidad de producir exopolisacáridos, además de que no se eliminan fácilmente durante los procedimientos de lavado. Un miembro de la familia *Pseudomonaceae*, es el usualmente reconocido como patógeno oportunista, *P. fluorescens* (Randazzo *et al.*, 2009). Por otro lado, Schuenzel y Harrison (2002), obtuvieron aislados de la microbiota natural de vegetales como zanahorias, lechugas, cilantro entre otros que inhibieron el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Montevideo y *Staphylococcus aureus*. De estos, el 67.5% fueron *Pseudomonas* spp. No obstante, el mecanismo de acción antimicrobiana que ejerce la microbiota natural sobre los microorganismos patógenos no fue dilucidado, pero especularon que la actividad antagonista que presentó la microbiota natural sobre *Listeria monocytogenes* se debió a la producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas*.

Enterobacter sakazakii, *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., (banda 5) está presente en los frutos control y con tratamiento, sin embargo, no se encuentra



presente en el día 12 en los frutos que recibieron tratamiento. La banda 12 identificada como *Enterobacter* sp., *E. pyrinus*, *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. agglomerans*, *E. hormaechei*, *E. hermannii*, *Klebsiella* sp., *Salmonella enterica subsp. Arizonae*, al igual que la banda 5 aparece en los frutos control siempre y en los frutos con tratamiento desaparece hacia día 12. Randazo *et al.* (2009), encontraron que miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son los miembros dominantes en vegetales frescos. Harris *et al.* (2003) identificaron en vegetales precortados a los géneros *Erwinia*, *Enterobacter* y *Pantoea*. Algunos de los miembros de *Enterobacteriaceae* como el género *Erwinia* integran al grupo de patógenos de las plantas, pero algunos otros géneros como *Enterobacter*, se han reconocido como patógenos importantes para el hombre y han estado implicados en síndromes clínicos en los últimos años.

La banda 10 identificada como *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *P. dispersa*, *P. agglomerans*, *P. stewartii*, *Erwinia* sp., *E. stewartii* se encuentra presente en frutos control y con tratamiento hasta el día 4 pero cuando los frutos control llegan al día 12 no se encuentra presente. *Erwinia* sp. es un fitopatógeno causante de mancha negra bacteriana en el mango por lo que podría esperarse su presencia en la superficie del mismo.

La banda 20 que se identificó como *Klebsiella* sp., *K. pneumonia*, *K. oxytoca*, *Enterobacter asburiae*, *E. aerogenes* está presente en los frutos control al inicio (día cero) y al final (día 12) y aparece en los frutos con tratamiento hasta el día 12. Se ha reportado que la presencia de algunos microorganismos en la superficie de productos vegetales pueden contribuir a la reducción de enterobacterias patógenas (Oliveira *et al.*, 2012). Así pues, se ha reportado que *Enterobacter asburiae* utiliza de manera más eficiente muchas de las fuentes de carbono y de nitrógeno que utilizan los microorganismos patógenos como *E. coli* O157:H7 (Cooley *et al.*, 2006), esto sugiere que *E. asburiae* es capaz de competir por los nutrientes disponibles en la superficie del mango con lo que podría afectar claramente la sobrevivencia de otros microorganismos, entre ellos, las enterobacterias patógenas. Generalmente en la superficie de productos vegetales intactos, los nutrientes están



presentes en pequeñas cantidades y limitan el crecimiento bacteriano (Brandl, 2006); asimismo, se ha reportado que *S. enterica* y otras enterobacterias patógenas no están bien adaptadas para utilizar completamente todo el espectro de nutrientes presentes en la superficie de las plantas y por lo tanto están limitados por la cantidad y el tipo de nutrientes disponibles que pueden asimilar para crecer. Brandl (2006) reportó que *E. coli* y *S. enterica* son incapaces de utilizar la sacarosa, uno de los principales azúcares presentes en los exudados de las plantas. En los frutos como el mango, las fuentes de carbono y energía provienen de ácidos orgánicos (cítrico, málico, succínico, tartárico) y de sacarosa, aunque también contiene almidón (Strawn y Danyluk 2010). Al inicio de la maduración del fruto, la sacarosa es predominante pero se ha reportado que al final de la madurez de los mangos, la glucosa y fructuosa se encuentran en mayor concentración y los ácidos orgánicos disminuyen conforme el fruto madura (González-Aguilar *et al.*, 2001).

En conclusión, la aplicación de técnicas independientes del cultivo permitió conocer los cambios en la microbiota bacteriana de la superficie del mango después de aplicar el tratamiento con UV-C, además, permitió monitorear los cambios de ésta, a lo largo del tiempo de almacenamiento del fruto. Estos resultados revelan que algunos géneros están presentes inicialmente en la superficie de los frutos y otros se encuentran de manera constante a través del tiempo de almacenamiento de los frutos. Por lo tanto, estos resultados podrían contribuir en la industria procesadora de frutos para obtener una visión más clara en la mejora de las prácticas de higiene durante el manejo de los frutos en fresco, a fin de preservar la calidad microbiológica de los productos hasta llegar al consumidor y con ello poder satisfacer los requerimientos cada vez más exigentes por parte de los mismos.

5.4 EXPERIMENTOS RETO PARA EVALUAR LA SOBREVIVENCIA DE *E. coli* EN LA SUPERFICIE DE MANGOS ATAÚLFO

El consumo de frutas y vegetales es visto como un factor de riesgo para los brotes de infecciones causadas por enterobacterias patógenas tales como *Salmonella* y *E. coli*, por lo



que un mejor entendimiento del comportamiento de estas enterobacterias en la superficie de los frutos, contribuirá en la prevención de la contaminación inicial y la persistencia de estos patógenos. Comprender la ecología de los enteropatógenos en los productos vegetales resulta importante para el desarrollo de métodos de control con los que se podría contribuir con la prevención de la contaminación (Aruscavage, 2006). Asimismo, existen microorganismos que pueden presentar actividad inhibitoria sobre microorganismos patógenos para humanos por lo que muchas veces es posible que microorganismos patógenos para humanos presentes en los alimentos sean inhibidos o eliminados por acción de microorganismos antagonistas presentes de manera natural en estos productos (Schuenzel y Harrison, 2002).

5.5 Efecto de la modificación de la microbiota superficial sobre la sobrevivencia de *E. coli* en la superficie de mangos con tratamiento UV-C

Tal como otros productos vegetales que se consumen en fresco, el mango Ataúlfo puede ser vehículo potencial para que las enterobacterias patógenas como *E. coli*, las enterobacterias patógenas fueron responsables del 60% de los brotes asociados al consumo de frutas y verduras frescos, en los que se identificó al agente etiológico causante (Berger *et al.*, 2010). La prevención de la contaminación es vital para evitar brotes de enfermedades gastrointestinales pero también es importante conocer el potencial de *E. coli* para sobrevivir y crecer en ambientes específicos, en este caso la superficie del mango Ataúlfo. Por lo tanto, un mejor entendimiento del ecosistema microbiano de la superficie de los frutos puede ser extremadamente útil para prevenir el crecimiento de enterobacterias patógenas, así como para reducir la contaminación por estas mismas, en las diferentes etapas del manejo postcosecha y el almacenamiento hasta su consumo.

Para la selección de la cepa adecuada se inocularon en la superficie del mango 4 cepas de *E. coli* (aisladas previamente por el grupo de trabajo de la superficie del mango y que presentaban la característica de ser resistentes a ampicilina). Se evaluó su sobrevivencia



(datos no mostrados). La sobrevivencia fue definida en este trabajo como la capacidad que tiene el microorganismo para sobrevivir en la superficie del fruto a 25 °C.

En lo que respecta al efecto que tiene la modificación de la microbiota bacteriana de la superficie del mango, puede favorecer el crecimiento de *E. coli*, se observa que tanto en los frutos con tratamiento como en los que no fueron tratados, las cuentas de *E. coli* disminuyen (fig. 20) conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. De las 24 hasta las 84 horas en los frutos que recibieron tratamiento con UV-C se observan cuentas mayores en comparación con los frutos control; sin embargo, no existen diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre estos puntos.

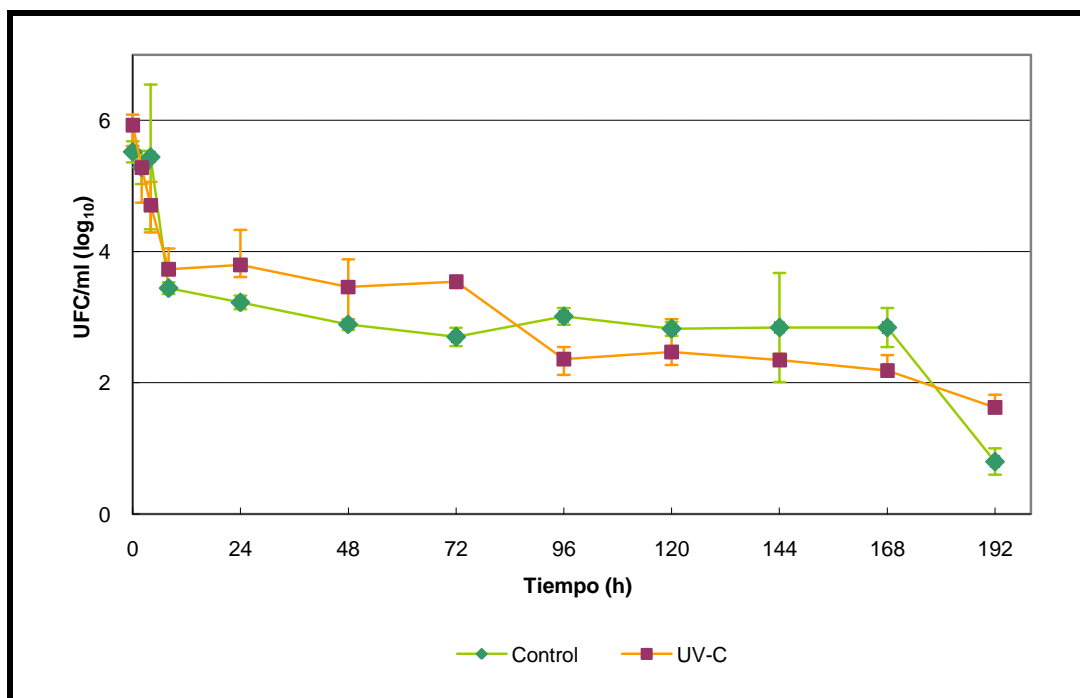


Figura 20. Sobrevivencia de *E. coli* en la superficie de mangos con tratamiento UV-C y sin tratamiento (control).

Las cuentas de *E. coli* en los mangos control fue de un poco más de 5 log₁₀ durante las primeras 4 horas, sin embargo, a partir de las 8 horas de inoculados los frutos, se observa un descenso importante en la sobrevivencia de *E. coli* las poblaciones son de alrededor de



3 \log_{10} lo que permanece de manera casi constante hasta las 168 horas (7 días). Para las 192 horas (8 días) la sobrevivencia desciende de manera drástica hasta menos de un ciclo \log_{10} . Cooley *et al.* (2006) demostraron que *E. coli*, puede limitar su sobrevivencia en la superficie de lechuga hasta 10 veces por la acción de *Enterobacter asburiae*. Cabe destacar que fue identificada como posible miembro de la microbiota de la superficie del mango Ataúlfo a *E. asburiae*, al final del tiempo de almacenamiento, por lo que estos resultados sugieren la posibilidad de que la microbiota natural presente en la superficie del mango puede evitar que las enterobacterias patógenas se establezcan en su superficie.

Por otro lado, en los frutos que recibieron tratamiento con UV-C, se observó que *E. coli* no crece, sin embargo, sobrevive, la cuenta inicial disminuye hasta por dos ciclos \log_{10} las primeras 24 horas, pero conforme transcurren los días la tendencia de las poblaciones permanece casi constante hasta por 8 días después. Esto parece apuntar a que las bacterias que sobreviven después de las 24 horas, son las que presentan una mayor capacidad para sobrevivir en la superficie del mango. Aunque, es por demás preocupante el hecho de que logren sobrevivir durante este tiempo debido al riesgo de un brote por consumo de los frutos contaminados por *E. coli*.

Hoy en día, hay poca información respecto a la interacción entre patógenos humanos con la microbiota natural de los mangos. La microbiota natural puede tener ventajas competitivas que pueden contribuir con la supresión de microorganismos indeseables. Schuenzel y Harrison (2002) demostraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* tienen efecto antagónico sobre *L. monocytogenes*, sin embargo, el mecanismo por el cual inhibe a esta, no ha sido descrito todavía, la competencia por los nutrientes parece ser el mecanismo más importante. De igual forma, Babic *et al.* (1997) demostraron que el género *Pseudomonas* predomina en productos vegetales y que tiene la habilidad de limitar el crecimiento de patógenos tales como *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7, asimismo, en combinación con *Candida sake* puede restringir el crecimiento de *Penicillium expansum*. Esto resulta por demás interesante ya que se identificó la probable presencia



de *Pseudomonas* en la superficie del mango Ataúlfo como se mencionó en un apartado anterior. En otro estudio, Johnston *et al.* (2009), aislaron cepas de los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia* y *Serratia* que presentaron actividad inhibitoria contra cepas de *E. coli* O157:H7, en estos géneros aproximadamente el 17% de las cepas produjo péptidos con actividad antimicrobiana como parte de su estrategia inhibitoria y el 16% de estas cepas produjo ácido como parte de ésta. Así pues, existen diversos mecanismos de acción por lo que las bacterias presentan actividad inhibitoria contra otros microorganismos.

Por otro lado, algunas interacciones de enterobacterias con integrantes de la microbiota natural pueden ser benéficas o neutrales para el crecimiento y la sobrevivencia de estos patógenos después de que llegan al producto vegetal (Aruscavage *et al.*, 2006). Miembros de algunos géneros de los hongos *Cladosporium* sp., pueden promover el crecimiento de los patógenos debido al cambio de un pH más favorable, es decir cambian las características fisicoquímicas en el medio haciéndolas más adecuadas para el crecimiento de los patógenos (Brandl, 2006).

Critzer y Doyle (2010) reportan que miembros de los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* y *Burkholderia*, tienen capacidad para inhibir a *E. coli* O157:H7 en hojas de lechuga y espinaca. Sin embargo, estos géneros sólo se aislaron antes del tratamiento de desinfección; lo cual sugiere que aunque la desinfección puede ser un tratamiento benéfico en la reducción de enterobacterias patógenas, también puede disminuir a la microbiota natural y con ello los beneficios antagonistas de esta. Los mangos a los que se les aplicó el tratamiento con UV-C mostraron importantes modificaciones en la microbiota presente en su superficie a partir del día 4, sin embargo, en la figura 20, no existen diferencia de la sobrevivencia de *E. coli* entre los frutos control y los frutos que recibieron tratamiento con UV-C, por lo nos indica que los miembros de la microbiota natural que perduran a lo largo del tiempo de almacenamiento en los mangos



control y los que recibieron el tratamiento con UV-C pudieran ser los que permiten la sobrevivencia pero no el crecimiento de *E. coli* en la superficie del mango Ataúlfo.

Existen factores que permiten el establecimiento y la colonización de las enterobacterias patógenas en la superficie de las plantas. Diversos mecanismos han sido relacionados con la colonización de las bacterias en las plantas incluyendo la producción de lipopolisacáridos y exopolisacáridos, motilidad y quimiotaxis (Brandl, 2006).

Para que la colonización por enterobacterias patógenas se lleve a cabo en la superficie del mango Ataúlfo, la adhesión es un proceso vital, la cual es un proceso fisicoquímico que ocurre cuando la bacteria es capaz de superar las fuerzas repulsivas presentes entre ella y la superficie de la planta. Este proceso garantiza que las bacterias no se desprenderán de la superficie una vez que los mecanismos de colonización se han activado. Las bacterias se adhieren por medio de exopolisacáridos; una vez que esto ocurre, son capaces de formar microcolonias que promueven la sobrevivencia (Collignon y Korsten, 2010). La fimbria curli parece estar involucrada en la adherencia de las bacterias en la superficie de las plantas pero las cepas de *E. coli* patógenas (Critzler y Doyle, 2010), además, cuentan con otros mecanismos por los cuales se adhieren a las plantas; los polímeros bacterianos, celulosa, poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina y ácido colánico, además de fimbrias agregativas están involucradas en la adhesión de *E. coli* y *Salmonella* en la superficie de las plantas similares a las usadas por las bacterias de la microbiota natural o patógenas de las plantas que también usan celulosa (Teplitski *et al.*, 2009). *Salmonella enterica* y *E. coli* tienen genes para la producción de celulosa, un rasgo que está involucrado en su habilidad para formar biopelículas *in vitro*. Con la formación de agregados, las células bacterianas pueden protegerse del efecto de los frecuentes flujos de actividad de agua en plantas por un tiempo (Brandl, 2006). *Salmonella enterica* forma agregados con *Pantoea agglomerans* en la superficie de las hojas de cilantro (Brandl y Mandrell, 2002).



Para que las enterobacterias patógenas puedan sobrevivir en la superficie de los frutos, además, deben de transportar y utilizar los nutrientes disponibles. Fett (2000) (citado por Collignon y Korsten, 2010) sugiere que las enterobacterias patógenas pueden incorporarse a las biopelículas de la superficie, estas amortiguan las fluctuaciones ambientales y se encuentran a menudo asociadas con las fuentes de nutrientes, tales como las venas de las hojas, estomas, lenticelas, entre otros. Collignon y Korsten (2010), encontraron que cepas de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. monocytogenes* se adhieren preferentemente cerca de los tricomas en duraznos y en ciruelas, asimismo, se adhieren preferentemente en las zonas cercanas a las lenticelas. Después de la interacción inicial entre la superficie del fruto y los microorganismos, la colonización ocurre si el microorganismo es capaz de utilizar los nutrientes de la superficie del fruto. Collignon y Korsten (2010) encontraron que *E. coli* y *Salmonella* fueron capaces de utilizar los nutrientes disponibles en la superficie de duraznos y ciruelas al presentar crecimiento, sin embargo, después las poblaciones decrecieron con el tiempo debido a las condiciones inhóspitas de la superficie de los frutos.

Otro de los factores que limita la sobrevivencia de las enterobacterias patógenas en la superficie de las plantas es la competencia por los nutrientes. Altas concentraciones de *P. syringae* actúan como antagonistas de *E. coli* O157:H7, ya que posiblemente compiten por las mismas fuentes de carbono y energía (Dingman, 2000). En este sentido, se demostró que *Enterobacter asburiae* utiliza muchas de las mismas fuentes de carbono y de nitrógeno que *E. coli* y el hecho que inhibe el crecimiento, sugiere que *E. asburiae* es capaz de utilizar y por tanto competir de manera más eficientemente por los nutrientes disponibles en el producto, lo que afecta claramente la sobrevivencia de *E. coli* (Cooley *et al.*, 2003). Por otro lado, Matos y Garland (2005) reportaron que en alfalfa la competencia con *Salmonella* fue mayor en comunidades no caracterizadas y compuestas de varias especies que con las cepas individuales, lo que puede indicar posibles efectos sinérgicos entre las especies de los miembros de la microbiota natural. Cepas de *E. cloacae* reducen las poblaciones de *E. coli* O157:H7 y de *L. monocytogenes* hasta por un ciclo logarítmico



pero *Salmonella* Typhimurium no resulta afectada por la presencia de estas cepas (Jablasone *et al.*, 2005). En este trabajo, el género *Enterobacter* fue identificado como miembro mayoritario de la microbiota bacteriana de la superficie del mango Ataúlfo tanto en frutos control como los que recibieron tratamiento, por lo que se puede suponer que compiten por las mismas fuentes de carbono con los miembros de la microbiota natural de la superficie del mango. En este trabajo *E. coli* fue capaz de sobrevivir por 8 días en la superficie de los mangos Ataúlfo, lo que indica que probablemente la fuente de nutrientes está disponible para estos patógenos, aún cuando tengan que competir por estos con miembros de la microbiota natural. Por lo anterior, la sobrevivencia de *E. coli* puede representar un riesgo sanitario para los consumidores de mango en fresco, aún cuando la dosis infectiva de *E. coli* es en promedio de 10^6 células presentes (FDA, 2009), además, esta reportado que los eventos de crecimiento hasta esas concentraciones son poco comunes, sin embargo, existe el riesgo de que estas enterobacterias patógenas en las condiciones propicias puedan alcanzar sus dosis infecciosas durante la postcosecha, durante el almacenamiento o mientras el producto es procesado para su consumo (Brandl, 2006). En general las enterobacterias patógenas pueden sobrevivir pero no crecer en la superficie intacta de las frutas o vegetales debido en parte al carácter protector de las barreras naturales del producto vegetal (pared celular y la cutícula) (Harris *et al.*, 2003). El fruto del mango al igual que todas las partes aéreas de las plantas posee barreras estructurales que tienen como papel fisiológico, la protección contra patógenos y daños mecánicos. Entre ellas, se encuentran la pared celular, la cutícula y las aperturas naturales (estomas, lenticelas, entre otras) (Burnett *et al.*, 2000). Para traspasar estas barreras, las bacterias necesitan de enzimas hidrolíticas que destruyan dichas barreras, las enterobacterias patógenas no pueden producir estas enzimas, lo que limita la disponibilidad de los nutrientes y de la humedad (Harris *et al.*, 2003). La mayoría de las bacterias fitopatógenas y endófitas se ayudan a sí mismas produciendo enzimas hemicelulasas y pectinasas que degradan los polímeros en la pared celular de las plantas, otros producen cutinasas que pueden alterar la cutícula y con ello propiciar un aumento en la liberación de nutrientes (Wells y Butterfield, 1999). Además, los productos vegetales



a su vez acumulan metabolitos secundarios, que en algunos casos poseen propiedades antimicrobianas (Teplitski *et al.*, 2009). Algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* pueden producir tales enzimas, sin embargo, *E. coli*, pertenece a la misma familia y no es capaz de producirlas y su genoma no codifica homólogos conocidos de pectinasas o hemicelulasas (Teplitski *et al.*, 2009). Asimismo, la sobrevivencia de enterobacterias patógenas en la superficie de los productos vegetales aumenta significativamente una vez que las barreras protectoras se rompen, ya sea por daño físico o por degradación de éstas por fitopatógenos (bacterias y hongos). Sin embargo, en algunos casos, como en los frutos mínimamente procesados, estas barreras externas son rotas, de este modo se crea la oportunidad para la colonización de las bacterias (Janisiewicz *et al.*, 1999). También, la infiltración de las enterobacterias patógenas puede ocurrir cuando las bacterias están presentes en el agua o en la superficie de los frutos y durante el procesamiento de los productos vegetales existe un diferencial negativo de temperaturas (Buchanan *et al.*, 1999).

Por otro lado, existen factores intrínsecos de los frutos pueden afectar la sobrevivencia de los microorganismos, como lo es el caso del pH, que en la piel de mangos Ataúlfo fue en promedio de 3.3 a 3.9 y esta reportado que el intervalo mínimo de pH en el que *E. coli* puede crecer es de 4 a 4.5 (Strawn y Daniluk, 2010). Collignon y Korsten (2010) observaron que *Salmonella* creció en mangos y que *E. coli* sólo sobrevivió en estos, debido a que *Salmonella* tiene el sistema RPOS, un sistema de adaptación al ácido (Foster y Spector, 1995) y puede jugar un papel en esta diferencia. El sistema de respuesta al ácido, encontrado en *Salmonella*, puede contribuir a su crecimiento en mangos mínimamente procesados. Este sistema de respuesta al ácido es activado bajo condiciones de estrés (Foster y Spector, 1995), incluyendo ambientes de bajo pH (aproximadamente a pH 4) presente en la superficie de mangos frescos mínimamente procesados. La expresión de *rpoS* puede ser la causa principal de la sobrevivencia en condiciones de estrés, tales como las bajas temperaturas, incremento de la acidez y la oxidación, permitiendo que las cepas persistan hasta la transmisión en humanos o en otros huéspedes. El sistema *rpoS* también



contribuye en la capacidad de *S. enterica* y posiblemente en otras enterobacterias patógenas para sobrevivir en la superficie de las plantas (López-Velasco *et al.*, 2010). Asimismo, Brandl (2006) reporta que la inducción del operon *sap* promueve en *S. enterica* la resistencia al ácido y por lo tanto su sobrevivencia en las condiciones ácidas del intestino; y sugiere que por lo tanto un período de residencia en la filosfera puede inducir un incremento en la viruencia de las enterobacterias patógenas.

Adicionalmente, Collignon y Korsten (2010) reportan que *E. coli* sobrevivió por 28 días a 12 °C, ellos destacan la importancia de prevenir la contaminación de productos en fresco por enterobacterias patógenas, implementando estrategias tales como Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura, además del Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCAP, por sus siglas en inglés) durante el manejo postcosecha. Esto resulta ser esencial para la seguridad en el consumo de mangos Ataúlfo.

5.6 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UV-C SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PIEL DE MANGOS Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS AISLADAS DE LA SUPERFICIE DEL MANGO

5.6.1 Concentración de compuestos fenólicos totales

La exposición de las plantas a diversas condiciones de estrés, puede inducir la producción de metabolitos secundarios, como la síntesis de compuestos fenólicos, especialmente por modulación de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés). Esta enzima, sin embargo, puede ser activada de maneras diferentes de acuerdo a la especie, a variaciones genéticas o dependiendo del papel que juega en el metabolismo y fisiología de la planta.

En general la radiación con UV-C retrasa la maduración de los frutos (Barka *et al.*, 2000), pero principalmente ha sido relacionada con la actividad germicida y la inducción de resistencia a enfermedades por medio de compuestos involucrados en las respuestas de defensa, tales como la formación de fitoalexinas y los compuestos fenólicos (Lemoine *et*



al., 2007). Se ha reportado que la aplicación de dosis de UV-C, es capaz de promover la acción de la enzima PAL relacionada con la producción de compuestos fenólicos, esta enzima juega un papel importante en la biosíntesis de compuestos fenólicos, muchos de los cuales, se ha comprobado tiene actividad antimicrobiana (Nigro *et al.*, 2000).

El mango es fuente de diversos compuestos fenólicos (Masibo y He, 2008). Durante el desarrollo del fruto del mango, la concentración de fenoles totales es más alta en la piel que en la pulpa (Lakshminarayana *et al.*, 1970), en promedio el contenido de fenoles totales en la piel es de 4066 mg /kg (Berardini *et al.*, 2005).

Además, diferentes estudios muestran que la determinación del contenido de compuestos fenólicos difiere de acuerdo con la polaridad de los solventes utilizados para su extracción. Trabelsi *et al.* (2010) reportaron que la adición de un 20% de agua destilada al solvente de extracción puede influenciar considerablemente su capacidad de la misma, cuando ellos utilizaron mezclas acuosas de etanol y acetona, la extracción fue 1.5 veces más alta comparadas con los solventes puros. Por lo que para la determinación de los fenoles totales se realizaron pruebas preliminares con diferentes mezclas acuosas con dos solventes, metanol y acetona (datos no mostrados), finalmente se seleccionó la mezcla de extracción de metanol al 80% con el que se trabajo para todas las muestras.

En la figura 21, se muestra el contenido de fenoles totales para los extractos crudos de pieles de mangos control y mangos con tratamiento UV-C. Al día cero, se obtuvo una concentración de 375mg/g de fenoles totales en los extractos crudos de la piel de mangos control, sin embargo no se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$) con los frutos que recibieron tratamiento con UV-C. Se observa que en el día 12, la concentración de fenoles totales fue muy similar en mangos control y los tratados con UV-C, por lo que el tratamiento en este caso, no tiene un efecto en lo que respecta a la inducción de la síntesis de compuestos fenólicos como se ha reportado anteriormente (González-Aguilar *et al.*, 2002). González-Aguilar *et al.* (2007) reportan que mangos de la variedad 'Tommy



Atkins' tratados por 10 min. con UV-C 10 presentaron un continuo incremento en los fenoles totales durante el tiempo de almacenamiento. A pesar de estos resultados se decidió evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos de la piel de mango Ataúlfo, debido a que la concentración de fenoles totales no es indicativo del tipo de compuesto fenólico que se encuentra presente y en que concentraciones, lo que puede tener influencia en la cantidad y el tipo de bacterias que pueden colonizar la superficie del mango Ataúlfo.

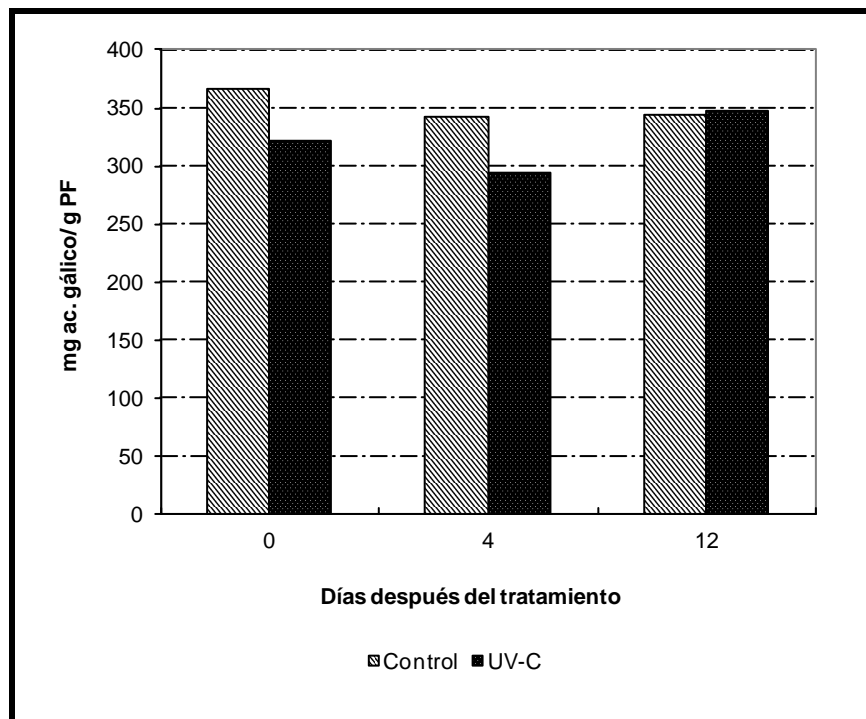


Figura 21. Comparación del contenido de fenoles totales en la piel de mangos con tratamiento UV-C y sin tratamiento.

5.6.2 Actividad antimicrobiana de extractos crudos preparados a partir de la piel de mango Ataúlfo

Kabuki *et al.* (2000) reportaron actividad antimicrobiana de extractos preparados a partir de semillas y hojas de mango sobre 18 especies diferentes entre las cuales estaban *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella aerogenes* y *Bacillus cereus*, teniendo este antecedente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de la piel de mango, los



extractos inhibieron el crecimiento de algunos microorganismos. Los extractos crudos de los mango control presentaron actividad antimicrobiana sobre 3 de las 14 especies en que se probaron. Entre ellas, *P. fluorescens* presentó la mayor sensibilidad (fig. 22, tabla 6) y se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la actividad antimicrobiana (medida como el diámetro de inhibición) para esta cepa, entre los días 4 y 12.



Figura 22. Actividad antimicrobiana de extractos fenólicos preparados a partir de la piel de mango tratados con UV-C sobre *P. fluorescens*.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 6, *P. fluorescens* y *P. sutszeri* resultaron ser las más sensibles a la actividad antimicrobiana de los extractos de piel de mango con y sin tratamiento. Rodríguez *et al.* (2007) encontraron que algunos compuestos fenólicos como el ácido vainillínico y el ácido gálico fueron menos efectivos contra *E. coli* y *P. aureginosa* en comparación con la catequina. Para los extractos crudos de mangos Ataúlfo, es probable que ocurra lo mismo en relación a la actividad antimicrobiana del ácido gálico debido a que en el día cero presenta su mayor concentración (fig. 25 B) y no se ve efecto en la actividad antimicrobiana contra las cepas de la superficie del mango (tabla 6).



Tabla 6. Actividad antimicrobiana de extractos preparados a partir de la piel de mangos con y sin tratamiento UV-C.

Bacteria	Días	Diámetro de la zona de inhibición (mm)*	
		Control	Tratamiento
<i>P. Fluorescens</i>	0	36	35
	4	31	45
	12	37	45
<i>P.sutzeri</i>	0	30	40
	4	32	40
	12	35	35
<i>P. aeruginosa</i>	0	N	22
	4	N	22
	12	N	16
<i>E. cancerogenus</i>	0	N	N
	4	N	N
	12	N	N
<i>E. hormanechei</i>	0	22	24
	4	N	23
	12	N	25
<i>E.cloacae</i>	0	N	N
	4	N	18
	12	N	N
<i>E.aerogenus</i>	0	N	N
	4	N	18
	12	N	N
<i>K. pneumoniae</i>	0	N	N
	4	N	N
	12	N	N
<i>K.ornithinolytica</i>	0	N	N
	4	N	16
	12	N	18
<i>C. freundii</i>	0	N	N
	4	N	16
	12	N	20
<i>C.amalonatus</i>	0	N	N
	4	N	N
	12	N	N
<i>S.marcescens</i>	0	N	N
	4	N	N
	12	N	N
<i>Salmonella sp.</i>	0	N	N
	4	N	12
	12	N	15
<i>E.coli</i>	0	N	N
	4	N	15
	12	N	18

N = Negativo; * Con discos de papel filtro 6mm

Asimismo, los extractos crudos de piel de mangos que recibieron tratamiento con UV-C presentaron actividad antimicrobiana en 10 de las 14 cepas probadas, lo que probablemente es debido a algún componente que se puede sintetizar después de aplicar



el tratamiento con UV-C. Dentro de las cepas que presentaron sensibilidad destacan *E. coli* y *Samonella*, los agentes causales más comúnmente asociadas con enfermedades causadas por el consumo de frutas y verduras (Aruscavage *et al.*, 2006; Brandl, 2006; Heaton y Jones, 2007).

Otro de los compuestos fenólicos que fue encontrado en los extractos de la piel del mango Ataúlfo fue el ácido clorogénico (fig. 23-1), respecto a este compuesto y de acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 6, se puede decir que *P. aeruginosa*, *E. hormanechei*, *E. cloacae* y *E. aerogenus* presentaron sensibilidad al ácido clorogénico, ya que este se encontró en una concentración mayor en los mangos tratados en el día 4 (fig. 26).

Binutu y Cordel, 2000 reportaron que el ácido gálico y sus derivados tienen actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Para el caso de los extractos crudos del mango Ataúlfo, estos tuvieron actividad antimicrobiana en *P. fluorescens*, *P.sutzeri* y *E. hormanechei* en el día cero en los frutos control (tabla 6) que es cuando se determinó la mayor concentración de ácido gálico (fig.25B) pero para el resto de las cepas no, por lo que el ácido gálico parece no tener actividad antimicrobiana sobre las cepas aisladas de la superficie del mango Ataúlfo.

El mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana de algunos compuestos fenólicos no está del todo determinado, sin embargo, se cree que la degradación de la pared celular, el daño a la membrana citoplasmática y a las proteínas de membrana, la filtración del contenido intracelular y la coagulación del citoplasma pueden ser los mecanismos que causan la muerte celular, también se cree que la alteración del material genético por parte de las cumarinas y alcaloides puede ser otro mecanismo (Singh, 2012).

Por otro lado, los galotaninos de la semilla de mango muestran actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de los alimentos, se sabe que los taninos desnaturalizan a las proteínas por lo que se ha sugerido que esto puede contribuir con su actividad



antibacteriana y también puede afectar la disminución de la adherencia de las bacterias. Engels *et al.* (2012) reportaron que *E. coli* presentó mayor resistencia a los galotaninos en comparación con *L. monocytogenes*. Adicionalmente, Singh (2012) reporta que la difusión de los compuestos fenólicos está relacionada con la temperatura por lo que la temperatura de almacenamiento puede influir en la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos. Asimismo, el tipo de compuesto que los productos vegetales filtran a través de sus barreras influye en la cantidad y el tipo de bacterias que pueden colonizar la superficie de un producto vegetal, tal como ocurre en las manzanas Macintosh que se inhibió la proliferación de cepas de *E. coli* O157:H7. Reinders *et al.* (2001) demostraron que el ácido cafeico presente en las manzanas, inhibe la proliferación de *E. coli* O157:H7. Asimismo, Heaton y Jones (2008), encontraron que una amplia variedad de ácidos fenólicos incluyendo el cafeico inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes in vitro*. Los resultados obtenidos para el mango Ataúlfo sugieren que los compuestos fenólicos pueden jugar un papel importante para limitar la sobrevivencia de las enterobacterias patógenas en los frutos. Además, pudiera ser posible que los compuestos fenólicos purificados se utilicen como antimicrobianos naturales en sistemas alimenticios o bien para extender la vida útil de estos productos previniendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Cabe destacar que en los resultados obtenidos con los extractos de mangos tratados con UV-C, se observa un incremento de la actividad antimicrobiana en el día 12 (tabla 6) cuando decae la concentración de todos los compuestos fenólicos cuantificados, lo que podría indicar que existe algún otro compuesto no identificado en este estudio que está contribuyendo a que se presente la actividad antimicrobiana en los extractos crudos de mangos tratados con UV-C. En conclusión, se ha demostrado que diferentes tipos de compuestos fenólicos muestran diferente actividad antimicrobiana contra algunas bacterias que pudieran ser patógenas; la sensibilidad de las bacterias hacia los diferentes compuestos fenólicos depende además del tipo de compuesto y de su concentración, por lo que también se hace necesario establecer la concentración mínima inhibitoria para



cada una de las especies que se encontraron en la superficie del mango y las enterobacterias patógenas que pudieran contaminar al fruto. La eficiencia de los compuestos antimicrobianos depende del tipo de compuesto, del género y especie del microorganismo, además de factores ambientales tales como el pH, la actividad de agua y la temperatura (Singh, 2012).

5.6.3 Identificación de los compuestos fenólicos presentes en la piel del mango por medio de HPLC (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia)

Los compuestos fenolicos que se encuentran en la piel del mango incluyen al ácido gálico, el ácido cafeico, el ácido clorogénico, el ácido elágico, mangiferin, quercetina, ramnetina, kaempferol entre otros. También se han identificado antocianinas y se estima se encuentran en concentraciones de 203 a 565 mg/100 g dependiendo de la variedad y estado de madurez del mango (Berardini *et al.*, 2005).

Los cromatogramas (fig. 23 y 24) muestran tres compuestos fenólicos que fueron exitosamente identificados en la piel del mango de acuerdo al tiempo de retención y las características espectrales de cada pico. El análisis por HPLC de los extractos crudos de las pieles de mango con y sin tratamiento muestra la presencia del ácido clorogénico, el ácido gálico y el ácido cafeico. Se observan diferencias en los picos (algunos no identificados) hacia el final del análisis, estos desaparecen en las muestras de mangos tratados (fig. 23 y 24).

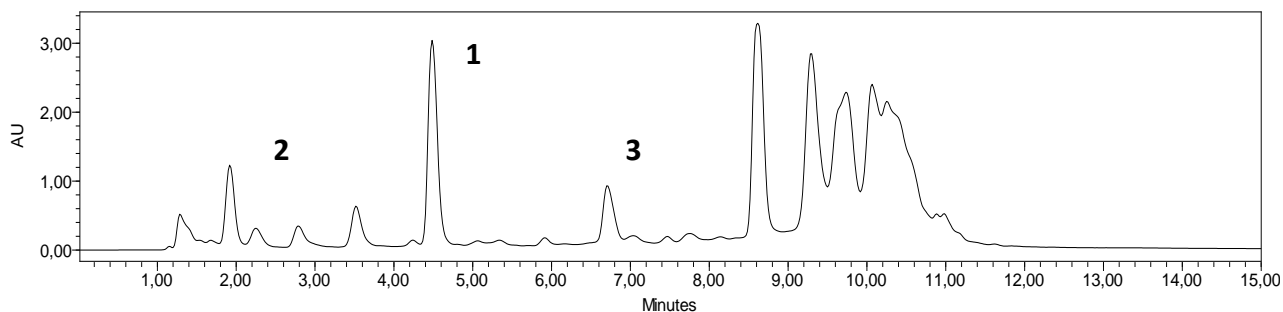


Figura 23. Cromatograma de compuestos fenólicos de piel de mangos control (sin tratamiento). **1)** Ácido clorogénico, **2)** Ácido gálico y **3)** Ácido cafeico.

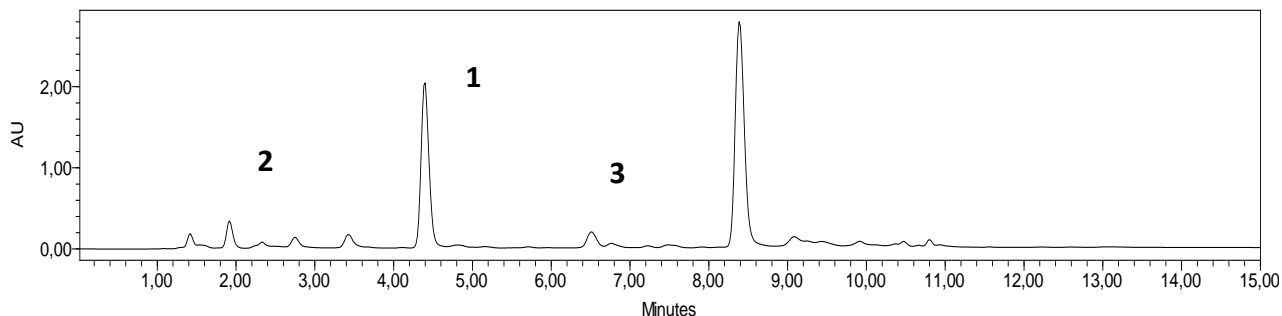


Figura 24. Cromatograma de compuestos fenólicos de piel de mangos con tratamiento (20 min. 254 nm). **1)** Ácido clorogénico, **2)** Ácido gálico y **3)** Ácido cafeico.

En lo que se refiere a la concentración de cada uno de los compuestos identificados, se encontraron resultados por demás interesantes. En la figura 25A, se muestran los resultados obtenidos para el ácido cafeico, se observa que en los frutos control las concentraciones oscilan entre 1 a 1.5 mg durante el tiempo de almacenamiento de los frutos, la concentración más alta para esta condición se reporta cuando los frutos han alcanzado el día 12. Para el caso de los frutos que recibieron tratamiento con UV-C las concentraciones obtenidas fueron desde 0.5 mg hasta 0.7 mg, sin embargo, las concentraciones más altas se observan en los días 4 y 12.

En la figura 25B se muestran los resultados con respecto al ácido gálico, en los frutos control se observa que la mayor concentración (2.3 mg) la presenta al día cero, posteriormente desciende drásticamente a cero y se incrementa hasta 1.8 mg en el día 12. Con respecto a los extractos crudos de los mangos con tratamiento (fig. 25B) al día cero no se detectó concentración de ácido gálico, la cual al día 4 se incrementa hasta 0.3 mg, finalmente al alcanzar el día 12 la concentración de ácido gálico llega a 1.8 mg.

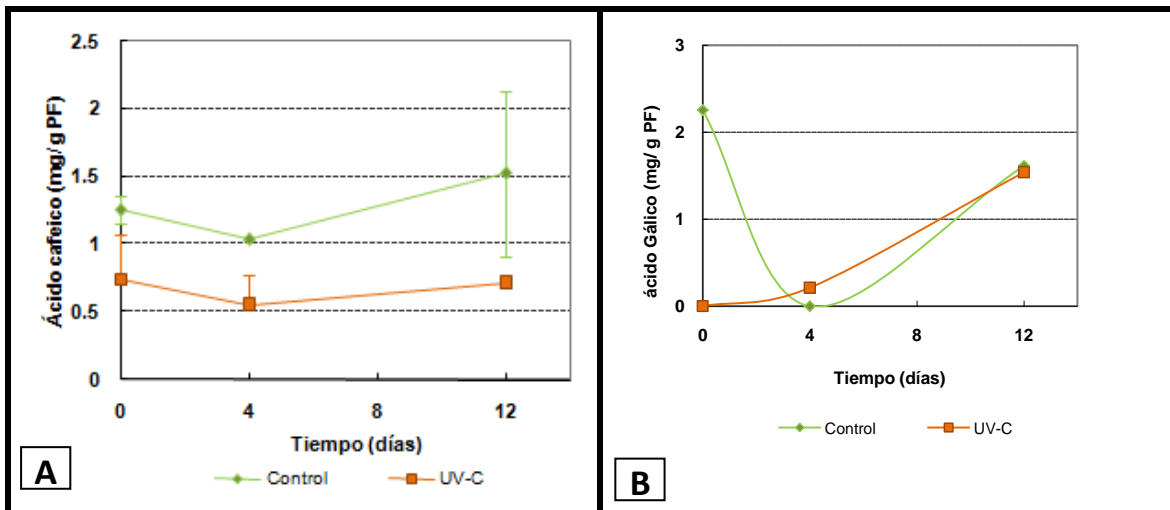


Figura 25. Contenido de (A) ácido cafeico y (B) ácido gálico en piel de mango

Respecto al ácido clorogénico (fig. 26) los frutos control, al día cero presentaron una concentración de 9 mg, que desciende hasta 6 mg en el día 4, y se incrementa hasta 7 mg al alcanzar el día 12. En el caso de los frutos que recibieron tratamiento al día cero presentan una concentración de 6 mg, que aumenta hasta 10 mg al día 4 y finalmente la concentración desciende hasta 9 mg en el día 12.

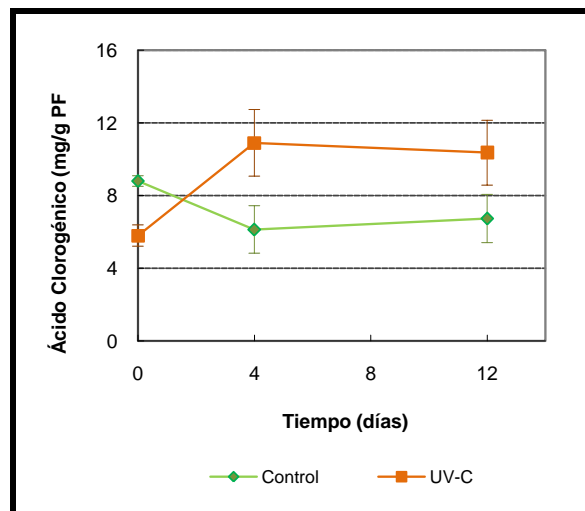


Figura 26. Contenido de ácido clorogénico en piel de mango.



Por otro lado, algunos compuestos fenólicos que están localizados en los productos vegetales se encuentran presentes como agliconas o glicosidados y como esteres o están unidos a la pared celular (Soong y Barlow, 2006). La reducción de la efectividad antimicrobiana puede ser atribuida al uso de extractos crudos, ya que estos generalmente contienen flavonoides en su forma glicosidada, en la cual el azúcar presente disminuye la eficacia contra algunas bacterias (Singh, 2012). Se recomienda entonces, realizar una hidrólisis ácida para liberar estos compuestos glicosidados que pudieran estar presentes en los extractos crudos de la piel del mango Ataúlfo.



VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se implementaron de manera exitosa las condiciones óptimas de la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) para conocer los cambios en la microbiota superficial del mango Ataúlfo. Se demostró que los frutos de un mismo lote presentan una patrón de bandas similar y por lo tanto una similitud de la composición bacteriana de la superficie del mango Ataúlfo.

Para el caso de la microbiota bacteriana de la superficie del mango Ataúlfo, la aplicación de técnicas independientes del cultivo como el DGGE permitió conocer los cambios en la microbiota bacteriana derivados de la aplicación del tratamiento con UV-C, asimismo, permitió monitorear los cambios a lo largo del tiempo de almacenamiento de los frutos. Se encontró que algunos géneros están presentes inicialmente en la superficie de los frutos y otros se encuentran de manera constante a través del tiempo de almacenamiento de los frutos. Estos resultados podrían utilizarse en la industria procesadora de frutos para obtener una visión más clara en la mejora de las prácticas de higiene durante el manejo de los frutos en fresco, a fin de preservar la calidad microbiológica de los productos hasta llegar al consumidor.

A partir de la secuenciación de las bandas de la microbiota superficial del mango, se identificaron 12 géneros prevalenciado las bacterias Gram-negativas, el género que se identificó como prevalente fue *Enterobacter*. También se encontraron bacterias Gram-positivas, algunos géneros se identificaron como bacterias ácido lácticas.

En el patrón de bandas de la superficie del mango se identificaron bacterias que han sido reportadas por su capacidad para inhibir el crecimiento de enterobacterias patógenas para los humanos, asimismo, se identificaron bacterias de los géneros que se han



identificado como patógenos importantes para el hombre y que han estado implicados en síndromes clínicos.

Se determinó el potencial que tiene *E. coli* para sobrevivir en la superficie del mango Ataúlfo y se demostró que esta enterobacteria patógena no crece en la superficie del mango Ataúlfo pero puede sobrevivir hasta por 8 días, con lo que se destaca la importancia de prevenir la contaminación por patógenos en estos frutos. Los resultados obtenidos podrían recomendar a la industria procesadora de frutos, el control más estricto en las prácticas de higiene durante la manipulación después de la aplicación de los tratamientos postcosecha con el fin de preservar la calidad microbiológica de los frutos hasta llegar al consumidor final y así garantizar la inocuidad de los mismos.

La concentración de fenoles totales no se vió afectada por la aplicación del tratamiento con UV-C pero la concentración de los 3 compuestos fenólicos identificados si mostró cambios importantes en su concentración.

Los extractos crudos preparados del las pieles de los mangos control presentaron actividad antimicrobiana sobre tres cepas en las que se probaron, *P. fluorescens* resultó ser la más sensible, mientras que los frutos con tratamiento presentaron actividad antimicrobiana sobre 10 cepas. Los resultados obtenidos para el mango Ataúlfo sugieren que los compuestos fenólicos pueden jugar un papel importante para limitar la sobrevivencia de las enterobacterias patógenas en los frutos.

Se demostró que los compuestos fenólicos identificados en la piel del mango Ataúlfo tienen actividad antimicrobiana contra algunas bacterias que pudieran ser patógenas, sin embargo mostraron diferentes comportamientos con los extractos.



VII. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda realizar estudios en los que se evalúe la formación de biopelículas por parte de *Salmonella* sp. y *E.coli* que pudieran contaminar la superficie del mango y con ello determinar el efecto que tienen estas biopelículas en la inocuidad de frutas como el mango.

Asimismo evaluar las potenciales fuentes de contaminación del mango Ataúlfo durante cada una de las etapas postcosecha para mejorar el control de los microorganismos patógenos, manteniendo así la calidad y la seguridad de los productos en fresco para el consumo humano.

Se sugieren estudios adicionales para una mejor elucidación del comportamiento de *E. coli* durante su sobrevivencia en la superficie del mango Ataúlfo, como por ejemplo evaluar por medio de DGGE la presencia de *E. coli* como miembro de la comunidad bacteriana de la superficie del mango. Además, se necesitan dilucidar los mecanismos por los cuales las enterobacterias patógenas pueden ser controladas por la microbiota natural. Estos puntos de vista pueden ser útiles en el desarrollo de la inhibición competitiva de la microbiota que mitiguen la colonización y sobrevivencia de enterobacterias patógenas.

Se recomienda identificar los mecanismos para que los compuestos que presentaron potencial de actividad antimicrobiana estén disponibles en la superficie del fruto, así como la determinación de su concentración mínima inhibitoria en diferentes enterobacterias patógenas.

Dado que se tienen reportes de que algunos compuestos fenólicos se encuentran como agliconas, compuestos glicosidados y que esto contribuye en la reducción de su actividad antimicrobiana, entonces se recomienda, realizar una hidrólisis ácida para liberar estos

Recomendaciones



compuestos glicosidados que pudieran estar presentes en los extractos crudos de la piel del mango Ataúlfo.

Se propone el estudio que permita evaluar si patógenos como *Salmonella* sp. y *E. coli* pueden penetrar en el fruto del mango y bajo que condiciones podrían llevarlo a cabo, asimismo, la evaluación de la sobrevivencia de estas bacterias en condiciones ácidas que pudiera presentar el mango.



VIII. Referencias

- Acharya, M. R.; Shan, R.K. (1999). Some microbiological and chemical attributes of mango pulp samples. *Journal of Food Science and Techonology India*, **56**(4):339-341.
- Ajila, C.M.; Bhat, S.G.; Prasada Rao, U.J.S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, **102**(4): 1006-1011.
- Allende, A. y Artés, F. (2003). UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. *Food Research International*, **36**: 739-746.
- Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**: 143-169.
- American Academy of Microbiology. (2005). Research Opportunities in Food & Agricultural Microbiology, a report, American Academic of Microbiology, Washington, D.C. Disponible en: <http://www.asm.org>
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrate the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(12): 5464-5473.
- Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C.; Guyot, J.P. (1999). Polyphasic study of the special distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 5464-5473.
- Ampe, F.; Miambi, E. (2000). Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrates that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. *International Journal of Food Microbiology*, **60**: 91-97.
- Aruscavage, D.; Lees, K.; Miller, S.; Lejeune, J.T. (2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of Food Science*, **71**: R89–R99.
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Seidman, J.G. (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2 John Wiley & Sons, 3.5.3-3.5.6 pp.



- Babic, I.; Watada, A.E. y Buta, J.G. (1997). Growth of *Listeria monocytogenes* restricted by native microorganisms and other properties of fresh-cut spinach. *Journal of Food Protection*, **60**: 912-917.
- Bank, H.L.; John, J.; Schmehl, M.K. y Dratch, R.J. (1990). Bactericidal effectiveness of modulated UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 3888-3889.
- Barak, J.D.; Chue, B.; Mills D.C. (2003). Recovery of surface bacteria from and surface sanitization of cantaloupes. *Journal of Food Protection*, **66**(10): 1805-1810.
- Berardini, N.; Knodler, M.; Schieber, A.; Carle, R., (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6** (4): 442-452.
- Berger C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P. y Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens- a mini review. *Environmental Microbiology*, **12**(9): 2385–2397.
- Beuchat, L.R. (1996). Pathogenic microorganisms associated whit fresh produce. *Journal of Food Protection*, **59**: 204-216.
- Beuchat, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, **4**: 413-423.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R.K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 637-645.
- Brandl, M.T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, **44**: 367-392.
- Brandl, M.T. y Mandrell, R.E. (2002). Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:3614-3621.
- Carlin, F.; Nguyen-the, C. y Morris, C.E. (1996). The influence of the background microflora on the fate of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad leaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Journal of Food Protection*, **59**: 698–703.
- Centers for disease control, (1997). Hepatitis A associated with consumption of frozen strawberries- Michigan, March 1997. *Morbilidad and Mortality Weekley Report*, **46** (13): 288-295.



- Cilia, V.; Lafay, B.; Christen, R. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*, **13**(3): 451-461.
- Clayton, R.A.; Sutton, G.; Hinkle, P.S.; Bult, C.; Fields, C. (1995). Intraespecific variation in small-subunit rRNA sequences in GeneBank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(3): 595-599.
- Cojocar, M., Droby, S., Glotter, E., Goldman, A. Gottlieb, H.E. Jacoby, B. y Prusky, D. (1986). 5-(12-heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry*, **25**(5): 1093-1095.
- Collingnon, S. y Korsten, L. (2010). Attachment and colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on stone fruit and survival through a simulated commercial export chain. *Journal of Food Protection*, **73**(7): 1247-1256.
- Cook, J.R. & Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press 539 pp.
- Cooley, M.B.; Chao, D. y Mandrell, R.E. (2006). *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection*, **69**: 2329–2335.
- Cooley, M.B.; Miller, W.G.; Mandrell, R.E. (2003). Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(8): 4915–26.
- Crecchio, C.; Curci, M.; Pizzigallo, M.D.R.; Ricciuti, P.; Ruggiero, P. (2004). Effect of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biology & Biochemistry*, **36**: 1595–1605.
- Critzer, F.J. y Doyle, M.P. (2010). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**(2): 125-130.
- Dahllöf, I.; Baillie, H. y Kjelleberg, S. (2000). *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rDNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3376–3380.
- Díaz, G., Wachter, C. (2003). “Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados”. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **45**(1-2): 30-40. Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2003/mi03-1_2e.pdf



- Díaz-Sobac, R; De la Cruz, J; Vázquez-Luna, A; Berinstain, C.I. y García, H.S. (1997). Evaluation of softening and associated enzyme activities during the ripening of coated 'Manila' mangoes. *Journal of Horticultural Science*. **72**(5): 749-753.
- Dingman, D.W. (2000). Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(3): 1077-83.
- Droby, S., Prusky, D., Jacoby, B. y Goldman, A. (1987). Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **30**: 285-292.
- Engels, C., Weiss, A., Carle, R., Schmidt, H., Schieber, A. y Gänzle, M.G. (2012). Effects of gallotannin treatment on attachment, growth, and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on spinach and lettuce. *European Food Research and Technology*, **234**(6): 1081-1090.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, **56**: 297-314.
- Erkan, M. Wang, CY. Y Krizek DT. (2001). UV-C irradiation reduces microbial populations and deterioration in *Cucurbita pepo* fruit tissue. *Environmental and Experimental Botany*, **45**: 1-9.
- FDA, (2009). Bad Bug Book: Introduction Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins>
- Fett, W.F. (2000). Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *Journal of Food Protection*, **63**: 625-632.
- Food and Agricultural Organization, FAO. (2012). Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Mango. Disponible en: [www.fao.org](http://apps.fao.org/faostat)
<http://apps.fao.org/faostat>
- Foster, J.W. y Spector, M.P. (1995). How *Salmonella* survive against the odds. *Annual Review of Microbiology*, **49**: 145-174.
- Frylinck, L., Dubery, I.A. y Schabort, J.C. (1987). Biochemical changes involved in stress response and ripening behavior of γ -irradiated mango fruit. *Phytochemistry* **26**: 681-686.
- Galán-Saucó, V. (1999) *El Cultivo del Mango*, Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona, España, 298pp.



- González-Aguilar G.A., Wang C.Y., Buta J.G. (2001b). Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe “Tommy Atkins” mangos. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**:775–82.
- González-Aguilar G.A., Wang C.Y., Buta J.G. (2004). UV-C irradiation reduces breakdown and chilling injury of peaches during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**:415–422.
- González-Aguilar G.A.; Buta J.G. y Wang C.Y. (2001a) Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances colour development of ‘Kent’ mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**:1244-1249.
- González-Aguilar GA; Buta J.G. y Wang CY.(2001a) Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances colour development of ‘Kent’ mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **81**:1244-1249.
- González-Aguilar GA; Wang C.Y., Buta J.G. y Krizek, D.T. (2001b). Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe ‘Tommy Atkins’ mangoes. *International Journal of Food Science and Technology*. **36**:767-773.
- González-Aguilar, G.A., Villegas-Ochoa, M.A., Martínez-Tellez, M.A., Gardea, A.A. y Ayala-Zavala, J.F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, **72**: S197-202.
- Harris, L.J.; Farber, J.N.; Beuchat, L.R.; Parish, M.E.; Suslow, T.V.; Garrett, E.H. y Busta, F.F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**(Issue Supplement): 78–141.
- Heaton, J.C., y Jones, K., (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere—a review. *Journal of Applied Microbiology*, **104**(3): 613-626.
- Hovda, M.B.; Lunestad; B.T.; Fontanillas, R.; Rosnes J.T. (2007). Molecular Characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **272**: 581-588.
- ICMSF (Internacional Comisión for the Microbiological Specifications for Foods). (2002). *Microorganisms in Foods 7. Microbiological testing in food safety management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.



- ICMSF (International Commission for the Microbiological Specifications for Foods). (1980). *Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos*. Volumen I. Editorial Acribia, España. pp. 332.
- Jablasone, J.; Warriner, K.; y Griffiths, M. (2005). Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology*, **99**: 7–18.
- Jacobi, K.K., MacRae, E.A. y Hetherington, S.E. (2001). Postharvest heat disinfestation treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae*, **89**(3): 171-193.
- Jagtiani, J. Chan, H.T. y Sakai W. (1988) *Tropical fruit processing*. Academic Press Inc. New York EUA, 45-104 pp.
- Johnston, M.A.; Harrison, M.A. y Morrow, R.A. (2009). Microbial antagonists of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut lettuce and spinach. *Journal of Food Protection*, **72**: 1569–1575.
- Joyce, D.C., Shorter, A.J. y Hockings, P.D. (2001). Mango fruit calcium levels and the effect of postharvest calcium infiltration at different maturities. *Scientia Horticulturae*, **91**(1): 81-89.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., y Dosako, S. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry*, **71**: 61-66.
- Koomen I., Jeffries, P. (1993) Effects of antagonistic microorganisms on the post-harvest development of *Colletotrichum gleosporioides* on mango. *Plant Pathology* **42**(2), 230-237.
- Korsten, L., Harmelen, M.W., Heitmann, A., Villiers, E., Jager, E. (1991). Biological control of postharvest mango fruit diseases. *South African Mango Growers' Yearbook*, **11**: 65-67.
- Kostrzynska M., Sankey M., Haack E., Power C., Aldom J. E., Chagla A. H., Unger S., Palmateer G., Lee H., Trevors J. T. y De Grandis S. A. (1999). Three sample preparation protocols for polymerase chain reaction based detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, **35**(1): 65–71.
- Lakshminarayana, S., Subhadra, N.V., Subramanyam, H., (1970). Some aspects of developmental physiology of mango fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **45**: 133–142.
- Lamikanra, O. y Richard, O.A. (2004). Storage and ultraviolet-induced tissue stress effects on fresh-cut pineapple. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**: 1812-1816.



- Lawson, P.A., Llop-Pérez P., Hutson, R.A., Hippe, H., Collins, M.D. (1993). Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, **113**(1): 87-92.
- Lemoine, M.L., Civello, P.M.; Martínez, G.A. y Chaves, A.R., (2007). Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of the Science of Food Agriculture*, **87**: 1132-1139.
- Liao, C. y Fett, W.F. (2001). Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, **64**(8): 1110-1115.
- Liesack, W.; Weyland, H. y Stackebrandt, E. (1991). Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, **21**: 191–198.
- Liu J, Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J Y.C., Wilson, L., Adeyeye, O., Kabwe, M.K., Pusey, P.L., Chalutz, E., Sultana, T., Droby, S. (1993). Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*, **56**:868-872.
- Lyautey, E.; Lacoste, B.; Ten-Hage, L.; Rols, J.L.; Garabetian, F. (2005). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*, **39**: 380–388.
- Mari, M. y Guizzardi, M. (1998). The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*, **26**(1): 59-66.
- Marquenie, D., C.W. Michiels, J.F. van Impe, E. Schrevels and B.N. Nicolai, (2003). Pulsed white light in combinations with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, **28**: 455-461.
- Marquenie, D.; Michiels, C.W.; Geeraerd, A.H.; Schenk, A.; Soontjens, C.; Van Impe, J.F.; Nicolai, B.M. (2002). Using survival analysis to investigate the effect of UVC and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, **73**: 187-196.
- Marquenie, D., Geeraerd, A.H., Lammertyn, J., Soontjens, C., Van Impe, J.F., Michiels, C.W. y Nicolai, B.M. (2003). Combinations of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia fructigena*. *International Journal of Food Microbiology*, **85**: 185-196.
- Masibo, M. y He, Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, **7**: 309–319.



- Matos, A. y Garland, J. L. (2005). The effects of community versus single strain inoculants on the biocontrol of *Salmonella* and microbial community dynamics in alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*, **68**: 40-48.
- McCollum, T. G ; D'Aquino, S. y Mc Donald, R.E. (1993). Heat treatment inhibits mango chilling injury. *HortScience*. **28** (3): 197-198.
- Medlicott, A.P; Sigrist, J.M.M. y Sy, O. (1990). Ripening of mangos fruit following low-temperature storage. *Journal of the American Society of the Horticultural Science*. **115**(3): 430-434.
- Mercier, J., Baka, M., Reddy, B., Corcuff, R. y Arul, J. (2001). Shorwave ultraviolet irradiation for control of decay caused by *Botrytis cinerea* in bell pepper: induced resistance and germicidal effects. *Journal of the American Society of the Horticultural Science*, **126**(1): 128-133.
- Merk S., Neubauer H., Meyer H., Greiser-Wilke I. (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **204** (2-3):127-131
- Mitra, S. K. y Baldwin, E. A.(1997) Mango. En: *Postharvest Physiology and storage of Tropical and subtropical fruit*, CAB International 85-120 pp.
- Murray, A.E., Preston, C.M., Massana, R., Taylor, L.T., Blakis, A., Wu, K., y De Long, E.F. (1998). Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 2585–2595.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek*, **73**: 127-141.
- Nakatsu, C.H., V. Torsvik y L. Ovreas. (2000). Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, **64**: 1382-1388.
- Nigro, F., Ippolito, A., Lattanzio, V., Di Venere, D. y Salerno, M. (2000). Effect of ultraviolet-C lighth on postharvest decay of strawberry. *Journal of Plant Pathology*, **82**: 29-37.



- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwing, W. y Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature-gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, **178**: 5636–5643.
- O'Connor-Shaaw, R.E, Guthrie, J.A., Dunlop, K.J. y Roberts, R. (1995). Coliforms in processed mango: Significance and control. *International Journal of Food Microbiology*, **25**: 51-61.
- Oliveira, M., Viñas, I., Anguera, M. y Abadias, M., (2012). Fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of natural background microbiota on conventional and organic lettuce. *Food Control*, **25**: 678-683.
- Ortega-Zaleta, D. y Yahia, E.M. (2000). Tolerance and quality of mango fruit exposed to controlled atmospheres at high temperatures. *Postharvest Biology and technology*, **20**(2): 195-201.
- Özkan, G., Sagdic, O., Baydar, N.G. y Kurumahmutoglu, Z. (2004). Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**: 1807-1811.
- Palazón, J., Cusidó, R.M. y Morales, C. (2001). Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. *ACE Revista de enología*, No. 9. Disponible en: www.acenologia.com/scripts.asp
- Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**:161– 173.
- Penteado, A.L., Shawn-Eblen, B. y Miller, A.J. (2004). Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangoes during simulated postharvest insect disinfestation procedures. *Journal of food protection*, **67**(1): 181-184.
- Plaza P., Usall J., Smilanick J.L., Lamarca N. (2004). Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection*, **67**(4): 781-786.
- Ploetz, R.C. (2003). Diseases of mango. En: *Diseases of Tropical Fruits Crops*, CABI Publishing, CAB international, UK, USA, 327-363 pp.
- Postmaster, A., Sivasithamparam, K. y Turner, D.W. (1997) Enumeration and identity of microorganisms isolated from the surface of banana fruits at three developmental stages. *Scientia Horticulturae*, **69**: 189-197.



- Poubol, J. y Izumi, H. (2005). Shelf life and microbial quality of fresh-cut mango cubes stored in high CO₂ atmospheres. *Journal of Food Science*, **70**: M69–M74.
- Randazzo, C.L., Scifó, G.O., Tomaselli, F. y Caggia, C. (2009). Polyphasic characterization of bacterial community in fresh cut salads. *International Journal of Food Microbiology*, **128**: 484–490.
- Rattanapanone, N., Lee, Y., Wu, T. y Watada, A.E. (2001). Quality and microbial changes of fresh-cut mango cubes held in controlled atmosphere. *HortScience*, **36**(6): 1091-1095.
- Reinders, R.D., Biesterveld, S., Bijker, P.G.H., (2001). Survival of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 in a model apple juice medium with different concentrations of proline and caffeic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2863–2866.
- Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S. y Pace, N.R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3417-3418.
- Rodríguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, **18**: 93-101.
- Rollán, M., Mónaco, C. Lampugnani, G. y Arteta, N. (1998). Variación de la población de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* en el suelo por la aplicación de agroquímicos, p 27 en Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes. Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina.
- Sambrook, Joseph, y Russel, David W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, Ney York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sassi, A. (2003). Diversidade microbiana presente em manga (*Mangifera indica* L.) Tesis de Maestría, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Schramm, A. and Amann, R. (1999). Nucleic acid-based techniques for analyzing the diversity, structure, and dynamics of microbial communities in wastewater treatment. En: *Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise*, (H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P.I.W. Stadler, eds.), Vol. 11a. *Environmental Processes I - Wastewater Treatment*, (J. Winter, ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 85-108 pp.
- Schuenzel, K. M., y Harrison, M. A. (2002). Microbial antagonists of food borne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection*, **65**:1909-1915.
- Schuenzel, K.M. y Harrison, M.A. (2002) Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables, *Journal or food protection*, **65**(12): 1909-1915.



- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA (2012). Consulta de Indicadores de Producción Nacional y Márgenes de Comercialización de Mango (2003). Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx
- Shaw, P.E; Chang Jr. H. T. y Nagy, S. (1998). Mango En: *Tropical and Subtropical Fruits*, A.G. Science Inc., USA, 1-77pp.
- Singh, N.P., (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, **156**: 7-17.
- Singh, U.P; Singh, D.P; Singh, M; Maurya, S; Srivastava, R. S; Singh, R.B. y Singh, S. P.(2004). Characterization of phenolic compounds in some Indian mango cultivars. *International Journal of Food Science and Nutrition*. **55**(2): 163-169.
- Sivapalasingam S, Barrett E, Kimura A, S. Van Duyne, W. De Witt, M. Ying, A. Frisch, Q. Phan, E. Gould, P. Shillam, V. Reddy, T. Cooper, M. Hoekstra, C. Higgins, J. P. Sanders, R. V. Tauxe, y L. Slutsker. (2003). A multistate outbreak of Salmonella enterica serotype Newport infections linked to mango consumption: impact of water dip disinfection technology. *Clinical Infectious Diseases*, **37**:1585-90.
- Slinkard, K. y Singlento, V.L, (1977) Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**: 49-55.
- Soong Y.Y. y Barlow P.J. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, **97**: 524-530.
- Suzuki, M. T. y Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental of Microbiology*, **62**: 625-630.
- Temmerman R., Huys G., Swings J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends of Food Science and Technology*, **15**: 348-359.
- Teplitski, M., Barak, J.D., y Schneider, K.R. (2009). Human enteric pathogens in produce: Unanswered ecological questions with direct implications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**:166-171.
- Torsvik, V.; Daae, F.L.; Sandaa, R.A.; Qvrees, L. (1998). Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, **64**: 53-62.
- Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Soumaya B., Hajlaoui H., Abdelly C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, **43**: 632–639.



- United States Census Bureau. 2004. U.S. Imports from Mexico from 1999 to 2003. United States Department of Commerce. Foreign Trade Statistics. Disponible en: <http://www.census.gov/foreigntrade/statistics/product/enduse/imports/c2010.html>
- Wells, J.M. y Butterfield, J.E. (1999). Incidence of *Salmonella* on fresh fruits and vegetables affected by fungal rots or physical injury. *Plant Disease*, **83**: 722-726.
- Wilson, C.L., Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Khan, V. and Arul, J. (1994). Potencial of induced Resistance to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Plant Disease* **78**(9): 837- 844.
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3741–3751.
- Yahia, E.M. y Flores-Araiza, R., G. (2001). Tratamientos físicos en poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Horticultura*, **160**: 80-88.
- Yahia, E.M., Vázquez-Moreno, L. (1993). Responses of mango to insecticidal oxygen and carbon dioxide atmosphere. *Lebensmittel-Wissenschaft U-Technologies*, **26**: 42-48.
- Yaun, B.R., Summer, S.S., Eifert, J.D. y Marcy, J.E. (2004) Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. *International Journal of Food Microbiology*, **90**: 1-8.
- Zambrano, J., Briceño, S., Méndez, C., Manzano, J. y Castellanos, E. (1995). Cambios en la maduración de frutos del mango cubiertos con ceras durante el almacenamiento. *Agronomía Tropical*, **47**(1): 5-15.