

Efecto de la Aplicación de *Bacillus subtilis* Sobre Propiedades Físico-Químicas de Frutos de Arándano (*Vaccinium corymbosum*) Almacenados en Refrigeración.

Martínez Jaime O.A.^a, Abraham Juárez M.R.^{b,*}, Saldaña Robles A.^c, Cervantes Díaz, E.^b, Ozuna López C.^b, Pérez Becerra L.^b

- a Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Agronomía. Ex-Hacienda “El Copal”, Km 9 carretera Irapuato-Silao, A.P. 311, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.
- b Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. Ex-Hda. “El Copal”, Km 9 carretera Irapuato-Silao, A.P. 311, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.
- c Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Mecánica Agrícola. Ex-Hacienda “El Copal”, Km 9 carretera Irapuato-Silao, A.P. 311, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.* mabraham@ugto.mx

RESUMEN

Cuando los frutos de arándano alcanzan la madurez fisiológica, comienzan a producirse cambios de color, firmeza y sabor durante su manejo postcosecha, la velocidad con la que ocurren estos cambios está relacionada principalmente con la temperatura. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de una biopelícula de *B. subtilis* sobre el color, la firmeza, el pH, la acidez y el contenido de sólidos solubles totales de frutos de *V. corymbosum* de la variedad Biloxi, durante su almacenamiento bajo refrigeración a 9.3 °C. Estas características fisicoquímicas se midieron al inicio y al final del almacenamiento, la lectura final de cada variable respuesta se analizó bajo un diseño completamente al azar (DCA) con ajuste por covarianza, donde la lectura inicial se consideró como covariable. El recubrimiento bacteriano influyó solamente sobre las propiedades químicas de pH y porcentaje de acidez titulable de los frutos, ya que redujo el pH e incrementó la acidez, lo cual a su vez posiblemente provocó un aumento en la vida útil, ya que dichos frutos se mantuvieron en buen estado durante dos días más cuando se aplicó la biopelícula, comparados con los frutos donde no se aplicó (control de referencia)..

Palabras clave: Arándano, almacenamiento, *Bacillus subtilis*, biopelícula, temperatura, propiedades fisicoquímicas.

ABSTRACT

When blueberry fruits reach physiological maturity, changes in color, firmness and flavor begin to occur during their postharvest handling, the speed with which these changes occur is mainly related to temperature. The objective of this work was to evaluate the effect of the application of a biofilm of *B. subtilis* on the color, the firmness, the pH, the acidity and the content of total soluble solids of fruits of *V. corymbosum* of the Biloxi variety, during its storage under refrigeration at 9.3 °C. These physicochemical characteristics were measured at the beginning and at the end of storage, the final reading of each response variable was analyzed under a completely randomized design (DCA) with adjustment for covariance, where the initial reading was considered like covariate. The bacterial coating only influenced the chemical properties of pH and percentage of titratable acidity of the fruits, since it reduced the pH and increased the acidity, which in turn possibly caused an increase in the useful life, since said fruits they remained in good condition for two more days when the biofilm was applied, compared with the fruits where it was not applied (control treatment)..

Keywords: Blueberry, storage, *Bacillus subtilis*, biofilm, temperature, physicochemical properties.

Área: Frutas y hortalizas.

INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) se ha cultivado en México por más de 30 años en superficies pequeñas del estado de Puebla, en los últimos cinco años ha tomado gran impulso en los estados de Jalisco, Colima y Michoacán (Escalera, 2009), siendo la variedad Biloxi de crecimiento erecto y vigoroso, la más utilizada en esta región por su alta productividad (Spiers *et al.*, 2002).

Por su alto contenido de agua y piel delgada, los frutos de arándano son altamente susceptibles de sufrir daños mecánicos durante su manejo postcosecha, aunado a los cambios fisiológicos provocados por la maduración (Mitra,

1997). El índice de cosecha se basa en el color de la superficie del fruto, el cual se torna rojizo y luego azul cuando madura completamente, a causa de la formación de antocianinas, fenoles, flavonoides y vitaminas (Figueroa *et al.*, 2010), los cuales tienen poder antibiótico (contra *Escherichia coli*) y gran potencial antioxidante, por lo que su consumo protege de enfermedades cardiovasculares, e incluso cáncer (Ostrolucka *et al.*, 2007).

La calidad de la fruta cosechada depende en gran medida del manejo a que sea sometida desde el momento en que se cosecha y de la temperatura a la que sea almacenada. Sin duda, los daños mecánicos y su preservación en condiciones de temperatura ambiental, incrementan rápidamente el deterioro de los frutos de arándano, propiciando pérdidas de su firmeza (NeSmith *et al.*, 2002).

Por su delicadeza, los frutos de arándano se deben cosechar y colocar directamente en sus contenedores finales, lo que implica su clasificación y selección simultánea, ya que a consecuencia de su alta tasa de respiración y transpiración, son muy susceptibles de sufrir ataque de hongos, lo que a su vez acorta su vida útil (Stivers y Fonseca, 2015); una alternativa para subsanar en parte esta problemática y que funciona además como agente de control biológico, la constituyen microorganismos rizosféricos que promueven el crecimiento vegetal, que se suministran en precosecha para mejorar la calidad de algunos frutos (Olalde y Mena, 2008). Particularmente, las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas que forman endosporas termorresistentes, susceptibles de aplicarse a través de una biopelícula que recubre las plantas, a fin de proteger los frutos de infecciones que pudieran provocar algunos microorganismos fitopatógenos antes de la cosecha (Todar, 2003), específicamente *Bacillus subtilis* se ha empleado en pre y postcosecha para controlar con éxito la enfermedad conocida como pudrición gris en arándano, causada por el hongo *Botrytis cinerea*, ayudando además a mantener las propiedades organolépticas de los frutos. Asimismo, Mena y Olalde (2007) encontraron efectos positivos sobre la calidad de frutos de tomate (*Physalis ixocarpa*), particularmente sobre la textura, cuando se las plantas se trataron con una cepa de *B. subtilis*.

Por lo anteriormente expuesto, y debido a la importancia que actualmente ha adquirido el arándano en nuestro país como cultivo y como alimento con potencial antioxidante, se planteó el presente trabajo con el propósito de evaluar el efecto de la aplicación de una biopelícula de *B. subtilis* sobre algunas características físico-químicas de frutos de la variedad Biloxi de *V. corymbosum*, durante su almacenamiento en condiciones de refrigeración (vida útil).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de arándano utilizados en la presente investigación, correspondieron a la variedad Biloxi, y fueron cosechados del Rancho “Los Espinos”, perteneciente a la población Ario de Rayón, municipio de Zamora, Michoacán. La cepa de *B. subtilis* empleada, se cultivó a 28 °C por 12 h, en medio líquido papa-dextrosa-agar modificado (MPDA).

El ensayo consistió en utilizar frutos frescos almacenados en condiciones de refrigeración a 9.3 °C, destinando 50 arándanos para cada tratamiento (sin y con biopelícula de *B. subtilis*), los cuales fueron colocados en contenedores de plástico transparente tipo poliéster. Las variables dependientes fueron las características físicas: color y firmeza, y las propiedades químicas: pH, acidez y sólidos solubles totales (SST), las cuales fueron cuantificadas por triplicado al inicio (antes de la aplicación de la biopelícula) y al final del almacenamiento (vida útil).

En cuanto a la colorimetría, se consideraron los valores amarillo/azul de la coordenada b* del espacio de color del sistema CIE, mediante el empleo de un espectrofotómetro marca Color Flex EZ, donde las lecturas positivas indican color amarillo y las negativas colores azules. Para determinar la firmeza o fuerza requerida para penetrar los frutos, se utilizó un penetrómetro modelo TA-XT2 equipado con una probeta cilíndrica de un milímetro de diámetro, con una velocidad de cabezal de cinco milímetros por segundo a una distancia de penetración de cuatro milímetros, obteniendo el dato en kgf, para luego transformarlo a Newtons (N).

El pH se registró con un potenciómetro marca Hanna Instruments, mientras que para valorar la acidez se pesaron diez gramos de arándanos previamente molidos, los cuales se aforaron con 50 mL de agua destilada, luego se realizó una titulación con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.1; por su parte, el contenido de SST se cuantificó en grados Brix (°Brix), mediante un refractómetro manual marca Atago previamente calibrado con agua destilada.

Para evaluar el efecto de la aplicación de la bacteria sobre cada una de las características de calidad de los frutos almacenados en refrigeración, se recurrió al análisis de varianza de una vía corregido por covarianza, analizando la lectura final de cada variable dependiente y considerando como covariables cada una de las lecturas iniciales, para lo cual se usó el paquete estadístico Statgraphics (Statgraphics Plus Ver. 5.1 Professional, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizada la prueba de F con corrección por covarianza, no se observó efecto alguno del uso de *B. subtilis* sobre las cualidades físicas evaluadas en los frutos de arándano. Para el caso del color, se obtuvo un valor del estadístico de prueba $F=0.01$ con una probabilidad de $P=0.9466$, lo que permitió no rechazar la hipótesis nula, la cual establece que las medias de la coordenada b^* fueron estadísticamente iguales para el tratamiento y el control, es decir, los valores de las medias ajustadas fueron -5.21 para el tratamiento de referencia y -5.25 para el tratamiento con la presencia de la bacteria, indicando que la síntesis de pigmentos antocianicos que determinan el color de maduración azul (Lee *et al.*, 2002) en los frutos, no es afectada por el recubrimiento bacteriano durante el almacenaje en refrigeración. En forma similar, el valor del estadístico de prueba para la firmeza fue $F=0.46$, con una probabilidad $P=0.5449$, por lo que la resistencia a la penetración en los frutos de arándano fue la misma estadísticamente con y sin la aplicación de los microorganismos procarióticos, siendo de 0.88 N la media ajustada para el testigo y de 1.05 N para el tratamiento donde se aplicó la biopelícula con el bacilo; en este sentido, se sabe que el ablandamiento del tejido se debe a la degradación de pectinas y hemicelulosas de la pared celular por acción de diferentes enzimas hidrolíticas (Karakurt, 2007), las cuales no sufrieron ningún tipo de alteración por la presencia de *B. subtilis*; además, en ambos tratamientos se detectó una progresiva pérdida de turgencia en los frutos, lo cual coincidió con la reducción gradual de los valores de firmeza, a medida que avanzaba el período de almacenamiento, lo cual concuerda con lo obtenido en otro estudio realizado por Allan *et al.* (2001), quienes lo atribuyeron precisamente a la pérdida de agua.

Las características químicas relacionadas con el potencial de hidrógeno y acidez de los frutos de arándano, se vieron influenciadas por la aplicación del recubrimiento bacteriano. En el caso del pH, los valores del estadístico de prueba y probabilidad fueron $F=10.30$ y $P=0.0490^*$, respectivamente, por lo que se rechazó la hipótesis nula, lo que indicó que las medias fueron estadísticamente diferentes, es decir, la media ajustada de pH para el testigo fue de 3.02 y para el tratamiento con la bacteria de 2.08 , lo cual además se corroboró, mediante la aplicación de la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) con $P=0.05$; al inicio del experimento se determinaron valores de pH en la lectura inicial del orden de 2.5 , confiriéndole a los frutos un marcado carácter ácido, valor parecido al que reportaron Sapers *et al.* (1984) en la variedad Elliot que fue de 2.9 ; posteriormente, el pH se elevó en la lectura final del testigo, tal como lo sugirió Perkins (1995) al observar este comportamiento en cinco variedades de arándano, en cambio, el cubrimiento bacteriano provocó claramente una unidad de disminución en el pH. Asimismo, el porcentaje de acidez titulable de los frutos registró un valor de estadístico $F=15.51$ y una probabilidad de $P=0.0292^*$, por lo tanto, las medias fueron estadísticamente distintas, ya que los promedios ajustados fueron 0.32 % para el control y 0.35 % para el tratamiento con biopelícula, confirmándolo con la prueba DMS con $P=0.05$; adicionalmente, el testigo presentó una disminución gradual de acidez durante el almacenamiento, al respecto Kalt y McDonald (1996), determinaron que la concentración de ácido cítrico disminuye conforme la fruta madura, siendo este el principal ácido orgánico presente en arándano. Por otra parte, la aplicación de este bacilo tampoco afectó el contenido de SST presentes en los frutos, ya que los valores obtenidos del estadístico de prueba fue $F=1.56$ con una probabilidad $P=0.3000$, y los promedio ajustados fueron 21.7 °Brix para el tratamiento con la biopelícula y 21.6 °Brix para el tratamiento de referencia sin la aplicación de este microorganismo, registrándose en este último caso una lectura inicial de aproximadamente de 15.1 °Brix en promedio, aumentando gradualmente hacia la lectura final, tal como lo propuso Moggia (1991) en su estudio donde el almacenamiento ocurrió en condiciones de temperatura ambiental.

Finalmente, también se registró el tiempo total del almacenamiento (vida útil) en ambos tratamientos, y se observó que los frutos tratados con *B. subtilis* alcanzaron 16 días manteniendo muy poco afectadas sus características organolépticas bajo refrigeración, mientras que el tratamiento control solo llegó a 14 días en estas mismas condiciones.

CONCLUSIÓN

La aplicación de una biopelícula de *B. subtilis* como recubrimiento de frutos de la variedad Biloxi de *V. corymbosum*, almacenados en condiciones de refrigeración, no tuvo efecto sobre las características físicas de color y firmeza, ni sobre la propiedad química de SST, pero si influye sobre el pH y la acidez titulable de los frutos, dado que la presencia de la bacteria reduce el pH e incrementa la acidez, lo cual tal vez repercuta en la vida útil, ya que la calidad de los arándanos se mantuvo en buen estado almacenados a 9.3 °C durante dos días más, comparados con aquellos frutos que no fueron tratados con la bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, W.P.M., Forney, C.F., Carbyn, S.E., & Nicholas, K.U.K.G. (2001). Microstructural indicators of quality-related characteristics of blueberries: an integrated approach. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 34 (1), 23-32.
- Escalera, V.J.C. (2009). Propagación vegetativa de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en Los Reyes, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agrobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 34 p.
- Figuroa, S.D., Guerrero, C.J., & Bensch, T.E. (2010). Effect of time to harvest and permanence in the orchard on postharvest quality in high blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), cvs. Berkeley, Brigitta Elliott during the season 2005-2006. *Iesia*, 28 (1), 79-84.
- Karakurt, Y. (2007). Fruit cell wall polysaccharides and their modification during ripening. *Journal of the Faculty Agriculture HR.*, 11 (1-2), 13-19.
- Kalt, W., & McDonald, J.E. (1996). Chemical composition of lowbush blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (1), 142-146.
- Lee, J., Durst, R.W., & Wrolstad, R.E. (2002). Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolic: comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*, 67, 1660-1667.
- Mitra, S.K. (1997). Postharvest Physiology and storage of tropical and subtropical fruits. CAB International, Wallingford, UK. 423 p.
- Mena, V.H.G., & V. Olalde, P. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113, 103-106.
- Moggia, C. (1991). Aspectos de cosecha y postcosecha de arándanos. En Seminario Internacional: arándano, producción comercial y perspectivas económicas, Editado por Retamales, J., Moggia, C., Lolas, M., & Román, H. Universidad de Talca, Talca, Chile; pp. 80-92.
- NeSmith, D.S., Prussia, S., Tetteeh, M., & Krewer, G. (2002). Firmness losses of rabbiteye blueberries (*Vaccinium ashei*) during harvesting and handling. *Acta Horticulturae*, 574, 287-293.
- Olalde, P.V., & Mena, V.H.G. (2008). Symbiotic associations with bacteria and fungi and its effect on fruit quality. En Postharvest Biology and Technology of Fruits, vegetables and Flowers, Editado por Paliyath, G., Murr, D.P., Handa, A.K., & Lurie, S. Wiley-BlackWell, Canada.
- Ostrolucka, M., Gajdosova, A., Libiakova, G., Hrubikova, K., & Bezo, M. (2007). Protocol for micropropagation of select *Vaccinium spp.* En Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, Editado por Jain, S.M., & Hangman, H. Springer; pp. 445-455.
- Perkins, V.P., Clark, J.R., Collins, J.K., & Magee, J. (1995). Southern highbush blueberry clones differ in postharvest fruit quality. *Fruit Varieties Journal*, 49 (1), 46-52.
- Sapers, G.M., Burgher, A.M., Phillips, J.G., & Jones, S.B. (1984). Color and composition of highbush blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109 (1), 105-111.

Stivers, L. & Fonseca, E.M. (2015). Manejo en la postcosecha de bayas. PennState Extension. <https://extension.psu.edu/manejo-en-la-postcosecha-de-bayas> (Consulta: Octubre 15, 2017).

Spiers, J.M., Stringer, S.J., Draper, A.D., & Gupton, C.L. (2002). Biloxi southern highbush blueberry. *Acta Horticulturae*, 274, 153-155.

Statgraphics Plus Ver. 5.1 Professional. (2001). STSC and Statistical Graphics Corporation. Bakersville Maryland. USA.

Todar, K. (2003). The genus *Bacillus*. Department of Bacteriology. University of Wisconsin. Madison, Wisconsin, USA. 35 p.