

Efecto de luz ultravioleta (UV-C) y *Bacillus subtilis* sobre el combate del moho y calidad fisicoquímica de la piña (*Ananas comosus* L. Merr.)
cv MD-2 en poscosecha

Stephanie Mayorga Arce

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2021

Efecto de luz ultravioleta (UV-C) y *Bacillus subtilis* sobre el combate del moho y calidad fisicoquímica de la piña (*Ananas comosus* L. Merr.) cv MD-2 en poscosecha

Stephanie Mayorga Arce

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA



Ph.D. Gerardina Umaña Rojas

DIRECTOR DE TESIS



Ph. D. Paula Calvo Brenes

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



M.Sc. Óscar Castro Zúñiga

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ph. D. Mauricio Serrano Porras

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ph.D. Luis Gómez Alpizar

DIRECTOR DE ESCUELA



Ing. Agr. Stephanie Mayorga Arce

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial que me dio las fuerzas y la perseverancia para culminar este largo camino, gracias porque nunca me dejó a pesar de las dificultades. Gracias a Él por sus múltiples bendiciones durante este trayecto (1 Crónicas 16:34).

A mi abuelita María Esther Vargas Monge, por ser una mujer trabajadora, esforzada y llenarme de amor. Te amo abuelita, aunque ya no estés con nosotros.

A mi madre Luz Marina Arce Vargas y a mi padre Celestino Mayorga Suazo por su paciencia, por ser los pilares de mi vida, por su amor y por mostrarme siempre su apoyo incondicional.

A mis hermanos que me han apoyado durante esta etapa de mi vida Esteban, Magdiel, Sarita, a mi cuñada Carolin y María, y a mis dos hermosos sobrinos que me llenan de felicidad Benji y Brianna.

A mi amiga Jeimy Yax Sánchez por siempre estar hombro a hombro apoyándome con sus palabras y consejos, por siempre motivarme a no darme por vencida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón la elaboración y culminación de la tesis a la doctora Gerardina Umaña Rojas a la cual admiro como profesional y persona. Gracias por su conocimiento, su orientación, su manera de trabajar, su paciencia y motivación, por mostrar su simpatía desde que llegue al laboratorio. Gracias por las enseñanzas que me brindaron crecimiento profesional como personal. Por su apoyo y confianza durante todo el tiempo que estuve en el laboratorio.

Al M.Sc Marco Vinicio Sáez por hacerme sentir parte de la familia del Laboratorio, por su amistad, consejos, por sus enseñanzas y paciencia.

A la Dra. Paula Calvo Brenes por aceptar ser miembro del comité Asesor, por estar dispuesta a enseñarme y orientarme durante la tesis, por su paciencia, sus observaciones y amistad.

Al M.Sc. Óscar Castro Zúñiga por su apoyo en mis primeros años de universidad, por ser miembro del Comité Asesor gracias por su conocimiento, observaciones y consejos.

Al Dr. Mauricio Serrano Porrás por su apoyo como parte del Comité Asesor, por su orientación con las dudas en la parte estadística que se presentaron durante la investigación, por sus observaciones, consejos y aportes de conocimiento.

A todo el personal del Laboratorio de Tecnología Poscosecha la Dra. Mari Cruz Ramírez y M SC. Juan Roberto Mora. A mis compañeros del Laboratorio por su amistad y apoyo durante este proceso Estefanía Ortiz, Jessica Hidalgo, Kelly Salinas, Daniel Sánchez, Diego Fallas y Marco Vinicio Corrales por ser mi compañero de tesis.

A mis colegas de generación y amigos más cercanos por hacer de mi vida universitaria toda una aventura, por su apoyo en todo momento en especial a Fabiola Carranza, Kelly Salinas, Cristian Fallas, Steven Quirós y Grettel Picado gracias por recibirme en tu casa siempre con los brazos abiertos y por tu apoyo en todo el proceso. A mis amigas Cristina Mora y Katherine Arce.

A la Familia Yax Sánchez, Don Alberto, Doña Edilma, Jeimy y Ronny que me abrieron las puertas de su casa para lograr terminar la tesis, gracias por su hospitalidad, apoyo y amistad.

Un eterno agradecimiento a la Universidad de Costa Rica la cual me abrió sus puertas me brindó una beca y me ayudó a prepararme para un futuro competitivo.

A todos aquellos que de alguna manera mostraron su apoyo en este proceso.

A todos ustedes gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. La piña en Costa Rica	3
2.2. Requerimientos y calidad poscosecha de la piña	4
2.3. Principales hongos poscosecha en piña	5
2.4. Combate de enfermedades poscosecha en piña	7
2.5. Uso de luz ultravioleta	7
2.6. Uso de controladores biológicos	10
2.7. <i>Bacillus</i> sp. y el combate biológico.....	12
2.8. Efecto de la combinación de tratamientos poscosecha.....	14
3. Objetivos.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Localización	17
4.2. Equipo utilizado para la aplicación de tratamientos con irradiación UV-C y a la fruta.....	18
4.3. Almacenamiento y Momentos de evaluación	20
4.4. Ensayo 1: Determinación de la mejor dosis de UVC para el control del desarrollo del moho en frutos de piña y variables de calidad.....	21
4.5. Ensayo 2: Efecto de la aplicación de la mejor dosis de luz ultravioleta (UV-C) en combinación con el controlador biológico <i>Bacillus subtilis</i> y cera sobre el control de moho y variables de calidad en frutos de piña	22
4.6. Ensayo 3: Efecto de una dosis de luz ultravioleta en combinación con un controlador biológico en el combate del moho en comparación con el tratamiento comercial poscosecha de frutas de piña	24

4.7.	Descripción de las variables y metodología de medición	25
4.7.1.	Firmeza de la cáscara y pulpa	27
4.7.2.	Porcentaje de sólidos solubles (Brix)	27
4.7.3.	Color externo visual (escala comercial)	28
4.7.4.	Color externo con colorímetro (escala CIELAB)	29
4.7.5.	Acidez titulable.....	29
4.7.6.	Contenido de fenoles de cáscara, pedúnculo, pulpa y corona de frutos de piña	29
4.7.7.	Deshidratación parcial de las aristas (DPA)	32
4.7.8.	Incidencia y severidad de moho en corona	33
4.7.9.	Incidencia y severidad de moho peduncular.....	33
4.7.10.	Incidencia y severidad de quema de corona	35
4.8.	Aislamiento de microorganismos a partir de diferentes tejidos de piña	36
4.9.	Análisis estadístico de datos	39
5.	RESULTADOS	40
5.1.	Ensayo 1. Determinación de la mejor dosis de UVC sobre el control del desarrollo del moho en frutos de piña y variables de calidad.....	40
5.1.1.	Variables de incidencia, severidad de moho en pedúnculo, corona y quema de corona en frutos de piña	40
5.1.2.	Variables de calidad de firmeza externa, interna, brix y acidez	43
5.1.3.	Variables de color CIELAB con colorímetro, color escala visual y DPA	44
5.2.	Ensayo 2: Efecto de la aplicación de la mejor dosis de luz ultravioleta (UV-C) en combinación con <i>Bacillus subtilis</i> y cera sobre el control de moho y variables de calidad en frutos de piña.....	46
5.2.1.	Variables de incidencia, severidad de moho en pedúnculo, corona y quema de corona en frutos de piña.	46

5.2.2.	Variables de calidad: firmeza interna, externa y brix	50
5.2.3.	Variables de color CIELAB con colorímetro, color visual con escala, acidez y DPA.	52
5.3.	Aislamientos de poblaciones de hongos, levaduras y bacterias.	56
5.3.1.	Segundo ensayo.....	56
5.4.	Ensayo 3. Efecto de UV-C sola y en combinación con controlador biológico <i>Bacillus subtilis</i> en el combate del moho en el pedúnculo en comparación con el tratamiento comercial en poscosecha de frutos de piña. Tratamiento seleccionado en el segundo ensayo.	59
5.4.1.	Variables de incidencia, severidad de moho en pedúnculo, corona y quema en la corona en frutos de piña	59
5.4.2.	Variables de calidad: firmeza externa, interna, brix y acidez de frutos de piña.	63
5.4.3.	Variables de calidad de color CIELAB, color visual evaluado con escala y DPA.	65
5.5.	Aislamientos de hongos, levaduras y bacterias	70
5.5.1.	Tercer ensayo.....	70
6.	DISCUSIÓN.....	74
6.1.	Ensayo 1. Determinación de la mejor dosis de UVC sobre el control del desarrollo del moho en frutos de piña y variables de calidad.....	74
6.1.1.	Efecto de diferentes dosis de radiación UVC sobre el desarrollo de moho en corona y pedúnculo en frutos de piña.	74
6.1.2.	Primer Ensayo – Calidad	76
6.2.	Ensayo 2 y 3	79
6.2.1.	Efecto de una dosis de radiación UVC y dos dosis de <i>Bacillus subtilis</i> sobre el desarrollo de moho en corona y pedúnculo en frutos de piña.....	79
6.2.2.	Segundo Ensayo- Calidad	83

6.3. Tercer Ensayo- Calidad.....	86
6.4. Aislamientos.....	88
6.4.1. Aislamientos de cáscara y pedúnculo del segundo ensayo.....	88
6.4.2. Aislamientos en pedúnculo y cáscara del tercer ensayo.	90
7. CONCLUSIONES	92
8. RECOMENDACIONES.....	93
9. LITERATURA CITADA	94
10. ANEXOS.....	105
10.1. Primer ensayo- resultados.	105
10.2. Segundo ensayo- resultados.....	107
10.3. Tercer ensayo- resultados.....	111

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dosis, intensidad de luz y tiempo de exposición correspondiente a tratamientos UV-C aplicados sobre frutos de piña variedad Dorado Extra-Dulce evaluados en el primer ensayo.	21
Cuadro 2. Tratamientos aplicados a frutos de piña con luz ultravioleta combinados con dos dosis de <i>Bacillus subtilis</i> con y sin cera utilizados en el segundo ensayo.	23
Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el tercer ensayo un testigo, combinado y químico comercial, los tres con cera.....	25
Cuadro 4. Resumen de variables evaluadas en cada uno de los ensayos desarrollados	26

Cuadro 5. Escala para evaluar DPA en frutos de piña.	32
Cuadro 6. Escala guía para estimar el porcentaje del área de afectación del moho peduncular en frutos de piña.	34
Cuadro 7. Escala para evaluar quema de corona en frutos de piña.....	35
Cuadro 8. Momentos de muestreos y conteos de microorganismos aislados a partir de cáscara y pedúnculo de frutos de piña para los ensayos dos y tres.....	36
Cuadro 9. Incidencia y severidad de quema en corona en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.....	42
Cuadro 10. Incidencia y severidad de DPA en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.	44
Cuadro 11. Fenoles correspondientes a cuatro tejidos de frutos de piña con tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días).....	45
Cuadro 12. Incidencia de moho en la corona con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m ² de UV-C más <i>B. subtilis</i> (<i>B.s</i>) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, <i>B.s</i> m = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s</i> a = <i>B. subtilis</i> alta.....	48
Cuadro 13. Incidencia y severidad del DPA de tratamientos con 5 kJ/m ² de UV-C y el controlador biológico <i>Bacillus subtilis</i> (<i>B.s</i>) en dos diferentes dosis después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, <i>B.s</i> m = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s</i> a = <i>B. subtilis</i> alta.	54
Cuadro 14. Contenido de fenoles correspondientes a cuatro tejidos de frutos de piña en combinación con 5 kJ/m ² de UV-C y el controlador biológico <i>Bacillus subtilis</i> (<i>B.s</i>) en dos diferentes dosis. Ce = cera, <i>B.s</i> m = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s</i> a = <i>B. subtilis</i> alta.....	55

- Cuadro 15.** Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en el pedúnculo de frutos de piña en diferentes momentos de evaluación. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta..... 57
- Cuadro 16.** Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en la cáscara de frutas de piña en diferentes momentos de evaluación. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta..... 58
- Cuadro 17.** Incidencia de DPA en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. 69
- Cuadro 18.** Fenoles totales correspondientes a cuatro diferentes tejidos de frutos de piña expuestos a tres tratamientos. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. 70
- Cuadro 19.** Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en el pedúnculo de frutos de piña en diferentes momentos de evaluación. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. 71
- Cuadro 20.** Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en la cáscara de frutos de piña en diferentes momentos de evaluación. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. 73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cámara hermética de desinfección con lámparas ultravioleta tipo UVC marca Techno Lite (modelo GR30T8) compuesta de material reflectivo con una compuerta superior con 3 lámparas de mercurio de baja presión de radiación.	19
Figura 2. Piñas colocadas en bases de madera para la aplicación de luz ultravioleta directo al pedúnculo. Las lámparas generadoras de la radiación se encontraban a 20 cm de la fruta.	20
Figura 3. Almacenamiento de frutos de piña en cajas de cartón cubiertas con papel Kraft y dentro de la cámara fría a 7°C.	21
Figura 4. Evaluación de la firmeza externa en el ecuador de los frutos de piña (A). Puntos alrededor del eje central de la piña en donde se realizó la medición de firmeza interna (B)	27
Figura 5. Porción de piña evaluada para la evaluación de brix (A) y bolsa plástica para obtener el jugo (B).	28
Figura 6. Escala comercial para evaluar el avance de la maduración en el fruto. Fuente Banacol, s.f.	28
Figura 7. Procedimiento para la extracción y determinación de fenoles. A partir del paso 4) se utilizó el mismo procedimiento para la determinación del contenido de fenoles para las muestras de los ensayos 2 y 3.	30
Figura 8. A. Cuadrícula de 10x10 cm utilizada para demarcar área para conteo de incidencia de DPA en diez frutículos en frutos de piña. B. Síntoma de DPA o “pitting” (flechas negras señalan síntoma de DPA.	32
Figura 9. Síntomas de moho en corona de piña (flechas negras señalan síntoma de moho en la corona).	33

Figura 10. Escala gráfica del grado de desarrollo del moho en la zona del pedúnculo en los frutos de piña.....	34
Figura 11. Síntoma de daño de quema en hojas de la corona en frutos de piña..	35
Figura 12. Discos de zona del pedúnculo extraídos con sacabocados (A y B) y cortados en segmentos para obtener aislamientos a partir de la técnica de dilución seriada (C).....	37
Figura 13. Disco de cáscara de piña tomados con sacabocados (A y B) y cortados en segmentos para obtener aislamientos a partir de la técnica de dilución seriada (C).....	38
Figura 14. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de luz ultravioleta (UV-C) sobre la incidencia (A) e índice de severidad (B) de moho en el pedúnculo después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Barras con error estándar, medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).....	41
Figura 15. Efecto de la aplicación de luz ultravioleta (UV-C) en diferentes dosis sobre la firmeza externa evaluada a salida de anaquel en frutos de piña. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).	43
Figura 16. Porcentaje de incidencia (A) e índice de severidad (B) de moho en pedúnculo con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m ² de UV-C más <i>B. subtilis</i> (<i>B.s</i>) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, <i>B.s</i> m = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s</i> a = <i>B. subtilis</i> alta. Medias con una letra distinta en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).....	47

Figura 17. Número de hojas de la corona afectadas por moho con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C y más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con una letra distinta entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba DGC ($p < 0,05$)..... 49

Figura 18. Firmeza externa con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias ($p < 0,05$)..... 50

Figura 19. Firmeza interna con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C) más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$)..... 51

Figura 20. Porcentaje de sólidos solubles con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² UV-C más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con una letra distintas son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$). 52

Figura 21. Efecto de la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta sobre el índice de color escala después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis*

alta. Barras con error estándar, Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).....	53
Figura 22. Incidencia (A) e índice de severidad (B) de moho en pedúnculo a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (3 días a 18°C) de frutos de piña. Testigo: solo cera, UV + <i>B.s m</i> = UV + <i>B. subtilis</i> dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente entre si según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).....	60
Figura 23. Incidencia (A) y número de hojas afectadas (B) por moho en corona a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C) de frutos de piña. Testigo: solo cera, UV + <i>B.s m</i> = UV + <i>B. subtilis</i> dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente entre si según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).....	62
Figura 24. Firmeza externa de frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + <i>B.s m</i> = UV + <i>B. subtilis</i> dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).	64
Figura 25. Firmeza interna en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + <i>B.s m</i> = UV + <i>B. subtilis</i> dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con una letra distinta en cada etapa son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).	65

- Figura 26.** Variable a^* en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$). 66
- Figura 27.** Variable L^* de frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$). 67
- Figura 28.** Porcentaje de índice de color evaluado con escala de frutos de piña los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$)..... 68

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Incidencia y número de hojas afectadas por moho en la corona en frutos de piña de tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel..... 105
- Anexo 2.** Firmeza interna, acidez titulable y brix en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel. 105

Anexo 3. Color con colorímetro en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.	106
Anexo 4. Índice de color escala en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.	106
Anexo 5. Quema de corona con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m ² de UV-C más <i>B. subtilis</i> (<i>B.s</i>) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, <i>B.s m</i> = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s a</i> = <i>B. subtilis</i> alta.....	107
Anexo 6. Porcentaje de acidez titulable con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m ² de UV-C más <i>B. subtilis</i> (<i>B.s</i>) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, <i>B.s m</i> = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s a</i> = <i>B. subtilis</i> alta.....	108
Anexo 7. Variables de color *L, *a y *b con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m ² de UV-C más <i>B. subtilis</i> (<i>B.s</i>) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, <i>B.s m</i> = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s a</i> = <i>B. subtilis</i> alta después del almacenamiento en frío de frutos de piña con cuatro tratamientos combinados UV-C, <i>B.s</i> y cera.....	108
Anexo 8. <i>Bacillus</i> recuperado en el ensayo dos del tratamiento UVC+ <i>B.s a</i> + Ce a salida de cámara fría (SC).	109
Anexo 9. Contenido de fenoles correspondientes a cuatro tejidos de frutos de piña en combinación con 5 kJ/m ² de UV-C y el controlador biológico <i>Bacillus subtilis</i> (<i>B.s</i>) en dos diferentes dosis. Ce = cera, <i>B.s m</i> = <i>B. subtilis</i> media, <i>B.s a</i> = <i>B. subtilis</i> alta.	109
Anexo 10. Presentación comercial de Serenade 1,34 SC fungicida bilógico, <i>Bacillus subtilis</i> cepa QST 713 usada para los ensayos dos y tres.....	110

- Anexo 11.** Quema de corona en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a 111
- Anexo 12.** Sólidos solubles y acidez titulable en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a..... 111
- Anexo 13.** Variable de color *b en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. 112
- Anexo 14.** Fenoles totales correspondientes a cuatro diferentes tejidos de frutos de piña expuestos a tres tratamientos. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. 112
- Anexo 15.** Variables de Calidad inicial de diferentes frutos de piña evaluadas el día cero de llegada al laboratorio de poscosecha correspondiente a los tres ensayos. 113

RESUMEN

Este estudio se planteó con el objetivo de determinar la eficacia de la luz ultravioleta de onda corta (UV-C) sola o en combinación con el controlador biológico *Bacillus subtilis* sobre la calidad y el combate del moho en frutos de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en poscosecha.

Para lograr el objetivo se realizaron tres ensayos en el Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agrícolas: en el primero se evaluó la eficacia de la aplicación de luz ultravioleta C (UV-C) sobre frutos de piña con tres dosis 5,15,25 kJ/m² y un testigo (0). Se encontró que las dosis de 5 kJ/m² y 25 kJ/m² redujeron el índice de severidad de moho en el pedúnculo y el tratamiento con la primera dosis no afectó las variables de calidad de la fruta: firmeza externa e interna, brix, acidez y color. Se seleccionó la dosis de 5 kJ/m² para un segundo ensayo en el que se evaluó aplicándola sola o en combinación con dos dosis del controlador biológico *Bacillus subtilis* (dosis media comercial recomendada con 37,5 ml/l del producto comercial y la dosis alta correspondiente a 50 ml/l) con y sin cera. Los principales resultados mostraron que el tratamiento en que se combinó 5 kJ/m² con 37,5 ml más cera del producto comercial conteniendo al controlador biológico permitió una reducción del moho en el pedúnculo durante un periodo de 21 días de almacenamiento a 7°C y tres días en anaquel a 18°C. La calidad de la fruta presentó diferencias entre tratamientos en firmeza externa e interna, deshidratación y color evaluado con escala comercial. Este tratamiento fue seleccionado para un tercer ensayo en el que se comparó contra el tratamiento químico comercial y un testigo. Este ensayo estuvo en almacenamiento casi el doble de tiempo en comparación con los dos primeros ensayos alcanzando 40 días de almacenamiento a 7°C, en este estudio el tratamiento químico comercial presentó el menor índice de severidad para moho en corona y en pedúnculo. Además, se realizaron aislamientos de microorganismos para determinar qué poblaciones sobrevivían a la aplicación de los tratamientos en cáscara y pedúnculo, a las 24 horas luego de aplicados los tratamientos y a salida de cámara fría. Las levaduras fueron las poblaciones más frecuentes, seguido de hongos, *Bacillus* y otras bacterias.

1. INTRODUCCIÓN

La piña, el banano y el melón son frutas con alta demanda en el mercado internacional, lo que ha incrementado en Costa Rica las exportaciones hacia otros países; la cámara de productores y exportadores de piña registró para el año 2020 una ganancia de \$889,64 millones de dólares en venta de piña fresca (CANAPEP, 2021). El aumento en las exportaciones ha llevado a la necesidad de investigar mejores métodos poscosecha que permitan prolongar la vida útil de las frutas durante su traslado para que puedan llegar bien hasta su destino.

Los métodos más comunes para una adecuada conservación de la calidad de los frutos en poscosecha son: el almacenamiento, el transporte a bajas temperaturas y aplicaciones de fungicidas (Matamoros, 2017). Sin embargo, el uso de los fungicidas químicos se ha restringido debido a sus efectos carcinógenos, teratogénicos, residualidad alta y aguda, periodo largo de degradación, contaminación ambiental, así como, la selección de microorganismos patógenos con resistencia debido a la intensa aplicación de productos sintéticos (Baños, 2006). Ante esto la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos y la Unión Europea vetaron fungicidas muy usados a nivel mundial como el captan, benomil, metil tiofanato, maneb, y clorotalonil, siendo reemplazados por fungicidas menos residuales como el fludioxonil, el prochloraz (Droby *et al.* 1992, Wisniewski *et al.* 2016).

A raíz de lo anterior, las exigencias del mercado cada día son más demandantes, lo que hace necesario retomar métodos investigados en décadas pasadas como la luz ultravioleta, uso de controladores biológicos (Droby *et al.* 1992), sustancias químicas añadidas a los alimentos consideradas seguras por los expertos conocidas como GRAS (Conway *et al.* 2004), así como desarrollar nuevos métodos físicos y biológicos con el objetivo de disminuir la carga de residuos sobre los productos alimenticios. Una de las alternativas al uso de fungicidas es la aplicación de luz ultravioleta, la cual ha sido eficaz para prolongar la vida útil de los productos. Esta

requiere de una baja inversión, cortos tiempos de exposición y no afecta significativamente las características fisicoquímicas y sensoriales de las frutas frescas (Villarreal *et al.* 2014). Además, la radiación UV-C es una tecnología de intervención no térmica- no química que emplea energía de luz física de una longitud de onda específica para inactivar microorganismos, cuyo rango va de entre 200 y 290 nm (Fan *et al.* 2017), el cual es capaz de dañar el ADN o ARN eliminando con eficacia a los microorganismos, incluidas las bacterias y los virus patógenos.

Se sabe que la aplicación de UV-C en frutos de piña y melón pueden sustituir una desinfección (Lara, 2015), sin embargo, no es tan eficiente como un tratamiento químico. Este tipo de tecnología se ha utilizado en tajadas de piña recién cortadas y se observó que la luz UV-C no disminuyó la carga microbiana inicial de las rebanadas de piña, no obstante, en los tratamientos expuestos a UVC- C se evidenció que las levaduras se desarrollaron con mayor lentitud y se dio el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (Manzocco *et al.* 2016).

De acuerdo con investigaciones realizadas la luz UV-C al ser una forma de radiación electromagnética relativamente no penetrante limita su aplicación solo para la descontaminación de la superficie de los productos alimenticios. Este método físico se ha combinado con aceites esenciales, ácidos orgánicos, irradiación gama, y peróxido de hidrógeno, con lo cual se han observado respuestas más efectivas, que cuando se aplica solo (Fan *et al.* 2017).

Estudios con controladores biológicos de cepas de *Bacillus subtilis*, así como de *Pichia caribbica* evaluados a nivel *in vitro* en frutos de piña muestran que estos tienen capacidad para el control de micelio en el pedúnculo de la piña y de los principales patógenos relacionados con esta enfermedad (Soto, 2017). Inclusive se comprobó que el uso de estas cepas, tanto solos como en mezcla, logran disminuir la severidad de la enfermedad y pueden sobrevivir a bajas temperaturas, condiciones necesarias en procesos de poscosecha de frutos frescos.

Debido a lo mencionado anteriormente, el desarrollo de investigación dirigida a tratamientos que permitan bajar la carga química de fungicidas resulta clave para mejorar las condiciones de exportaciones de piña fresca, siendo las aplicaciones de luz ultravioleta y controladores biológicos, una alternativa para mantener la calidad poscosecha. Si bien es cierto ya se han hecho investigaciones en el país con luz ultravioleta (Velásquez, 2018) y con controladores biológicos por separado (Soto, 2017) es importante poder afinar más la dosis e ir más allá y combinar ambos métodos de control para mejorar el combate de patógenos poscosecha, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la eficacia de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) en combinación con el controlador biológico *Bacillus subtilis* sobre el combate del moho en frutos de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en poscosecha.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La piña en Costa Rica

De acuerdo con Arias (2019) el cultivo de la piña se ha sembrado en el país desde el tiempo de la colonia para consumo interno. En la década de los setenta las exportaciones de piña no representaban un impacto económico significativo. Sin embargo, a finales de esta época, la compañía Pindeco comienza sus operaciones en la zona Sur del país y su desarrollo agroindustrial. Para 1986 inician las exportaciones con la variedad Cayenna lisa y a partir del 2011 la variedad Golden pasó a ser la preferida por los compradores (CANAPEP, 2021).

En el año 2014 se reportaron cifras de casi US\$900 millones en ganancias, dando paso a un crecimiento exponencial del cultivo, colocando a Costa Rica como el primer país productor de piña fresca a nivel mundial (Arias, 2019). Con esto se evidenció una alta demanda en mercados internacionales, logrando que la fruticultura se convirtiera en una alta divisa para el país (Lara, 2015).

Según la Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP) los principales mercados para este cultivo en el año 2020 fueron: Norteamérica en donde se exportó un 52% de la fruta, Unión Europea con un 43%, otros países europeos un 4,2% y otros destinos con un 0,8%. El crecimiento de exportaciones de piña desde 1980 hasta el 2016 ha sido superior a 26% (Arias, 2019).

El cultivo cuenta con más de 40 000 hectáreas, esto según la Cámara de Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP, 2021). Cabe destacar que del total de piña sembrada al menos un 75% de esta es para exportación, el resto es fruta de rechazo que no cumple con las características requeridas, por lo que se comercializa a nivel nacional (Maglianesi, 2013). Dentro del sector agrícola costarricense la actividad piñera produjo las mayores entradas económicas para el país en los últimos años, además que su siembra genera 28.000 mil empleos directos y 105.000 indirectos, y es fuente de nuevos mercados de exportación, recientemente se encuentra en proceso la exportación a China. A sí mismo la piña dejó atrás al banano y al café en ventas externas por primera vez en el 2018 con un crecimiento del 5% en las exportaciones (Arias, 2019).

2.2. Requerimientos y calidad poscosecha de la piña

Los productores del sector piñero deben de cumplir con ciertas características de calidad en el fruto, entre estas, que los frutos estén sanos y limpios, sin daños en la corona, sin manchas oscuras en cáscara o pulpa, sin daños mecánicos por quema de sol o daños por frío, que estén libres de plagas y enfermedades, y sin pudriciones o presencia de moho peduncular (Soto, 2017).

Ante dicha situación el proceso poscosecha en piña es riguroso, consiste en una desinfección con sustancias, como cloro, ácido peracético o detergentes. Luego se aplica una cera en combinación con el fungicida. El encerado debe ser bien realizado, ya que este proceso ayuda con la reducción de la disponibilidad de oxígeno, y por ende reduce el metabolismo catabólico de las células (envejecimiento), prolongando la vida útil en poscosecha (Demerutis, 2010).

2.3. Principales hongos poscosecha en piña

La presencia de mohos en la zona del pedúnculo y corona de los frutos de piña es un inconveniente para muchas empresas en Costa Rica, esto de acuerdo con el Dr Óscar Arias¹ Moreira gerente de Finca Once S.A. ubicada en Los Chiles, Alajuela, siendo el principal problema de afectación en la etapa poscosecha. Además, estos mohos se incrementan al dejar a los frutos de piña en exportación expuestos durante periodos más largos de almacenamiento, ya que los mercados demandan frutos con mayor color amarillo, y ante un mayor almacenamiento se tiende a favorecer la frecuencia y desarrollo del moho (comunicación personal, Arias, 2019)

De acuerdo con investigaciones realizadas en Costa Rica en frutos de piña, los principales microorganismos que se encuentran en cáscara y en la zona peduncular son hongos de los géneros *Penicillium* spp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. (López, 2012), especies como *Penicillium diversum*, *P. purpureogenum* (Castro y Umaña, 2015), *Taloromyces* sp., *Phoma* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Trichoderma* sp., (Soto, 2017), los cuales fueron encontrados con mayor frecuencia tanto en frutos como en empacadoras. La determinación de este complejo de hongos se obtuvo como resultado de la identificación de los principales microorganismos asociados al corte del pedúnculo de piña después de realizar muestreos en diferentes etapas operacionales de una empacadora de piña (López, 2012; Castro y Umaña, 2015),

De los organismos recuperados con mayor frecuencia se realizaron pruebas de patogenicidad en las hojas de la corona, en donde al inocular el hongo *Penicillium* sin color o sin pigmentación y *Penicillium* con pigmentación roja obtenidos de la planta empacadora se observaron lesiones en las hojas, lo mismo que con los

¹ Arias, M. O. 2019. Comunicación personal. Laboratorio de Tecnología Poscosecha, Universidad de Costa Rica

microorganismos aislados del corte del pedúnculo *Penicillium* sin pigmentación, *Aspergillus* sp., *Fusarium* spp. y *Trichoderma* sp. los cuales también ocasionaron lesiones en las hojas de la corona (López, 2012).

Los hongos que ocasionaron lesiones en hojas de la corona se seleccionaron y se inocularon en el corte del pedúnculo para determinar su efecto en la severidad del moho del pedúnculo. Los que presentaron una mayor severidad en el pedúnculo fueron *Aspergillus* sp. y *Penicillium* los cuales fueron aislados de la planta empacadora y *Fusarium* spp., *Penicillium* con pigmentación amarilla y *Penicillium* sin pigmentación aislados directamente del pedúnculo (López, 2012). En ninguna de las inoculaciones se obtuvo un 100% de severidad en el corte del pedúnculo, lo que corrobora que son varios géneros de hongos los que crecen en la superficie del corte del pedúnculo tal como se observa en los frutos, compitiendo por espacio, afectando la apariencia y cubriendo el área del corte. (López, 2012).

En otra investigación Castro (2015) tomó mensualmente durante un año muestras en agua de lavado, cera, zona de recibimiento de la piña, empaque, enfriamiento, almacenamiento y en frutos procesados en las zonas productoras de piña de Puntarenas y Sarapiquí. Este autor encontró que *Penicillium*, *Taloromyces* y un grupo de hongos de micelio blanco y oscuro destacaron en todas las muestras procesadas, mientras en fruta procesada, estos mismos sobresalieron menos el hongo de micelio oscuro. Estos resultados sugieren que especies como *Penicillium* y el grupo de hongos de micelio blanco pueden permanecer en el pedúnculo de la piña e ir avanzado en crecimiento cuando la fruta se coloca en anaquel, además los géneros antes mencionados son los que coinciden con los encontrados en el corte del pedúnculo de la piña, causando problemas en el proceso de exportación (Castro, 2015).

El desarrollo de microorganismos en el pedúnculo de la piña se debe a que este provee mejores condiciones para el crecimiento del micelio en comparación con la cáscara, posiblemente esto se deba a la disponibilidad de sustancias nutritivas y

azúcares cuando se realiza el corte de la fruta (Castro y Umaña, 2015). Estos patógenos que aparecen en el pedúnculo son causantes de grandes pérdidas económicas entre los productores, ya que los mercados internacionales realizan reclamos y devuelven contenedores (Castro y Umaña, 2015). Cabe destacar que la aparición de este moho en la mayoría de los casos no es visible a la salida del almacenamiento en frío, sino que suele desarrollarse cuando la fruta está en periodo de anaquel, en los mercados y ante la aparición del moho es rechazada (Soto, 2017).

2.4. Combate de enfermedades poscosecha en piña

La aplicación de fungicidas y cera en conjunto con el almacenamiento en frío de la fruta son los métodos de control que más utilizan los agroexportadores para mantener la vida poscosecha del producto. Entre los fungicidas más usados en piña en poscosecha está el triadimefon cuya acción es inhibir el crecimiento de los patógenos (Alvarado, 2006); algunos de los fungicidas usados en poscosecha están limitados en su uso o incluso prohibidos en mercados europeos (Wisniewski *et al.* 2016). Debido a lo anterior en los últimos años se ha estado desarrollando investigación de otros métodos tales como: métodos físicos, tratamientos con agua caliente aplicados en frutas y hortalizas, el uso de sustancias GRAS, entre otros (Usall *et al.* 2016), que puedan sustituir los tratamientos químicos.

2.5. Uso de luz ultravioleta

Existen tecnologías emergentes para el manejo de enfermedades poscosecha. entre ellas el uso de luz ultravioleta. Esta se utiliza en muchos productos de la industria alimentaria, ya que sus aplicaciones permiten el acceso a productos en su estado más natural, aumentan la vida en anaquel, además de ofrecer productos inocuos al reducir significativamente la cuenta total microbiana, principalmente la de patógenos que causan pudriciones en los frutos (Villarreal *et al.* 2014).

La luz ultravioleta en su forma natural proviene del sol, esta corresponde a la radiación electromagnética con longitud de onda más corta que la luz visible y más larga que los rayos X (Haro y Guerrero, 2013; Villarroel *et al.* 2014). Esta se divide de acuerdo con rangos de longitud de onda en UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320), UV-C (200-280) y Vacío -UV (100-200 nm) (Shama y Alderson, 2005)

Existen estudios desde décadas atrás, hasta investigaciones más recientes que estudian la efectividad de la aplicación de luz ultravioleta a los alimentos. Las variables que han sido investigadas para mejorar la eficacia son: el tiempo de exposición, la intensidad de la fuente de radiación, la rugosidad de la superficie a tratar, el tipo de tratamiento o forma de aplicación, entre otros, ya que cada alimento requiere de una dosis específica o incluso algunos están entre un rango de dosis que puede variar mucho, por lo que se deben de realizar varias pruebas para lograr dar con la dosis más eficiente (Haro y Guerrero, 2013). De acuerdo con Severo *et al.* (2015) esta tecnología puede sustituir o ayudar a disminuir la aplicación de químicos, ya que es una alternativa de bajo costo, más amigable con el ambiente, y que junto con otros tratamientos físicos ayudan a reducir la aplicación de fungicidas.

A diferencia de otros tratamientos físicos, la aplicación de luz ultravioleta no altera las características sensoriales de los alimentos siempre y cuando se determine las dosis adecuadas para cada alimento (Villarroel *et al.* 2014). Asimismo, otro de los tratamientos químicos como los basados con agua caliente si no se aplican adecuadamente en comparación con la aplicación de UV, pueden provocar daño externo como pardeamiento de la piel, hundimientos (pitting), manchas negras de la cáscara y pardeamiento del tallo; además, de posible daño interno al fruto, como oscurecimiento de la pulpa, pérdida de agua, entre otros (Usall *et al.* 2016).

En tomate y fresa se observó que los tratamientos con luz ultravioleta además de disminuir el impacto de microorganismos que causan daño en poscosecha, también reducen las pérdidas retrasando la madurez y la senescencia, y mejorando la

capacidad antioxidante de la fruta, así como la acumulación de fenoles (Cote *et al.* 2013), lo que dependerá de la dosis de aplicación.

La luz UV-C es la que presenta efecto germicida, específicamente el rango entre 250 y 270 nm (Villaruel *et al.* 2014, Sari *et al.* 2016). Esta radiación específica puede actuar directamente sobre las esporas de hongos y bacterias mediante la reticulación del ADN, o induciendo la producción *in vivo* de metabolitos secundarios de las plantas que efectivamente bloquean o retardan la germinación de esporas en tejidos vegetales (Perkins *et al.* 2008, Haro y Guerrero, 2013). Según la investigación de Severo *et al.* (2015) los mecanismos de la radiación UV-C son varios entre estos el antimicrobiano que provoca un impacto en el metabolismo de la fruta, particularmente en el metabolismo de la pared celular, previniendo el ablandamiento de la pared, efecto observado por Bu *et al.* (2013) en frutos de tomate cherry. Otro de los efectos es la activación de sistemas enzimáticos antioxidantes como mecanismo de resistencia, mediante la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PR), biosíntesis de compuestos antioxidantes y antifúngicos como terpenoides, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, folatos y poliaminas (Severo *et al.* 2015, Rivera *et al.* 2007).

De acuerdo con Shama y Alderson (2005) las dosis bajas de UV pueden generar el efecto de hormesis en los frutos. Hormesis es la aplicación de agentes potencialmente dañinos en dosis bajas a los organismos vivos para inducir respuestas de estrés. Se ha evidenciado que ante la aplicación de dosis bajas de UVC estas pueden infligir daños reparables al ADN y este efecto desencadena mecanismos de reparación del ADN inducido por radiación. Esto sugiere que la radiación subletal puede estimular procesos vitales dentro de las células y crear un cambio positivo en la homeostasis de una planta. Ante las aplicaciones estas pueden inactivar de forma directa las poblaciones de microorganismos en la superficie de la fruta, además de una síntesis en la fruta de compuestos antifúngicos. Por ejemplo, en cítricos para el control de *Penicillium digitatum* se ha registrado la acumulación de fitoalexinas, inducción de enzimas fenilalanina amonía

liasa (PAL) y peroxidasa, además de la inducción de proteínas relacionadas con la patogenia (PR) (quitinasas y β -1,3-endoglucanasas) (Shama y Alderson ,2005), lo cual sería un mecanismo de resistencia inducida.

El uso de luz UV, se ha investigado en Costa Rica en frutas tropicales como banano, melón y piña, para determinar la reducción de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua* y *Fusarium* sp. (Lara, 2015), y en países como Tailandia también se ha investigado en frutos de piña logrando buenos resultados en calidad poscosecha. En la investigación de Lara (2015) los resultados mostraron que la aplicación de UV-C durante 90 segundos no afectó el sabor, ni la firmeza en frutas como banano, melón y piña. Además, se encontró que el recuento de mohos y levaduras a los 12 días de almacenamiento fue menor en las frutas tratadas en comparación con la fruta control (Lara, 2015). Asimismo, la investigación de Velázquez (2018) en piña mostró que dosis bajas y dosis altas presentaron buena eficacia en el control de mohos poscosecha. Este tratamiento también se ha aplicado en arándano (Perkins *et al.* 2008), fresa (Nigro *et al.* 2000), mango (Sripong *et al.* 2015, George *et al.* 2015), manzana, durazno, limón, uva de mesa (Villarroel *et al.* 2014), tomate (Bu *et al.* 2013, Haro y Guerrero *et al.* 2013, Usall *et al.* 2016), entre otros, dando como resultado un sistema efectivo para aumentar la vida útil de los productos.

2.6. Uso de controladores biológicos

El ambiente poscosecha debido a sus características proporciona un entorno especial para el uso de sistemas de combate biológico, dado que permite mayor control del ambiente y de las aplicaciones de microorganismos. De acuerdo con Di Francesco *et al.* (2016) hay mayor efectividad de agentes de control biológico debido a la temperatura constante, alta humedad y ausencia de radiación UV, ofreciendo más posibilidades que incrementan su actividad antifúngica.

El éxito de un controlador biológico dependerá de las interacciones entre el patógeno fúngico, el hospedante y el antagonista. Patrones como estrés oxidativo, la composición de oxígeno y la actividad del agua son vitales en las interacciones de los tres componentes antes mencionados (Di Francesco *et al.* 2016). Parte del éxito de un controlador corresponde a su modo de acción o mecanismos que ejercen ante microorganismos microbianos, sin embargo, estos no han sido completamente dilucidados hasta el día de hoy. Según Sharma *et al.* (2009) los antagonistas pueden mostrar una amplia gama de modos de acción, en diferentes etapas de su actividad, en relación con diferentes anfitriones y patógenos, incluso a veces diferentes modos actúan simultáneamente y por lo tanto hace difícil establecer el mecanismo individual que ha contribuido a un antifúngico específico.

Entre los mecanismos más estudiados está la antibiosis, el cual es un proceso biológico que se da cuando antagonistas producen sustancias que inhiben o matan los patógenos potenciales (bacterias u hongos) que ocurren en proximidad. Entre los antagonistas más estudiados está *Bacillus* spp., el cual produce sustancias antibióticas como la iturina (Dimkic *et al.* 2013), *Pseudomonas* spp. con pirrolnitrina y *P. jeringas* la cual produce siringomicina (Di Francesco *et al.* 2016). Otro de los mecanismos es el de competencia por nutrientes, ya que los microorganismos compiten por macro y micronutrientes como azúcares, vitaminas y minerales, o también por espacio. Este modo de acción es un factor clave en donde los controladores biológicos suprimen los patógenos poscosecha. En el caso de la levadura *Pichia guillermondi* se ha determinado que principalmente compite por espacio y por nutrientes, lo que provoca que el antagonista tenga un efecto de inhibición de esporas del hongo (Sharma, 2009; Di Francesco *et al.* 2016).

Otro de los efectos que algunos microorganismos antagonistas pueden promover es la resistencia inducida activando proteínas o enzimas relacionadas con la defensa. De acuerdo con Spadaro y Gullino (2004) los controladores biológicos también pueden ejercer parasitismo directo, esto según el contacto cercano,

reconocimiento sobre la secreción enzimática lítica y sobre el desarrollo activo del antagonista en el patógeno fúngico.

Para escoger un controlador biológico adecuado se deben tener en cuenta características como la capacidad para colonizar la superficie de la fruta y persistencia en la misma, capacidad de sobrevivir y desarrollarse en una amplia variedad de condiciones ambientales incluyendo almacenamiento y refrigeración, además, de superar al organismo patógeno a la hora de competir por nutrientes (Soto, 2017).

2.7. *Bacillus* sp. y el combate biológico

Dentro del combate biológico las bacterias son muy utilizadas como agentes para el control de patógenos en cultivos, tanto a nivel de raíz, foliar como en fase poscosecha. Los géneros considerados más eficaces son *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.

Bacillus sp. cuenta con una alta diversidad genética, esto debido a que son microorganismos saprófitos naturales ubicuos que se recuperan comúnmente del suelo, el agua, el aire, y la descomposición de material vegetal, lo que hace que colonice con facilidad en diferentes sustratos (Fernández, 2001; Rahman, 2016). De acuerdo con estudios realizados (Rahman, 2016), una de las ventajas que hace de *Bacillus* sp. un controlador biológico eficaz es que puede producir endosporas, lo que le permite sobrevivir a condiciones ambientales adversas tales como radiación ultravioleta, la desecación, la alta temperatura, la congelación extrema, los desinfectantes químicos y la escasez de nutrientes, permitiendo que los bacilos se conserven durante largos periodos.

Son muchos los modos de acción que pueden presentar las cepas de *Bacillus* sp., incluso puede variar según sea para aplicaciones de suelo en la protección de raíces, a nivel foliar o para poscosecha, esto porque existen muchas cepas

identificadas que producen una mayor eficacia en ciertas condiciones de los cultivos. Se reportó que *Bacillus subtilis* presenta un potencial microbiano para el combate poscosecha en cítricos desde 1953 (Nunes, 2012). De acuerdo con investigaciones realizadas por Stein (2005), el combate logrado con estas bacterias está ligado principalmente a la producción de compuestos antifúngicos, en donde predominan lipopéptidos de surfactina, iturina y gramicidina. Con respecto a esto estudios para el combate del moho verde (*Penicillium digitatum*) en la mandarina mediante *Bacillus subtilis* ABS-S14 se identificó la producción de tres diferentes tipos de lipopéptidos en el filtrado de cultivo *in vitro* (Waewethongrak *et al.* 2015). Existen diferentes cepas de *Bacillus*, siendo la antibiosis uno de los principales mecanismos de acción. Los lipopéptidos o también llamados biosurfactantes pueden permeabilizar la membrana de la célula diana, pueden afectar la motilidad celular y la adhesión para formar biopelículas; pueden estimular la respuesta inmunitaria de las plantas y participar en la detección de quórum (Patel *et al.* 2011).

La cepa QST-713 la cual es parte de la formulación de Serenade 1,34 SC, produce lipopéptidos como la iturina y la surfactina los cuales funcionan como antibióticos, estos fueron detectados en la rizosfera de tratamientos con pepino formando biopelículas en las raíces (Kinsella *et al.* 2009). La surfactina producida por *B. subtilis* QST713 también puede actuar como poderoso agente tensoactivo y pueden lisar una amplia variedad de tipos de células (Lahlali *et al.* 2011). De acuerdo con Kinsella *et al.* (2009) se ha registrado que la surfactina se produce hacia el final de la fase de crecimiento exponencial temprano de la bacteria, mientras que la iturina se produce más tarde, durante la fase de crecimiento lento y estacionario.

Fernández (2001) señala que las iturinas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos, ayudando a que *Bacillus* sp. supere a otros microorganismos ya sea matándolos o reduciendo su tasa de crecimiento, siendo mejor antibiótico que la surfactina. Además, también se ha visto que las iturinas pueden tener actividad antifúngica directa sobre patógenos a través de la inhibición de la germinación de las esporas y la interrupción del crecimiento del tubo

germinativo (Rahman, 2016). Otro de los lipopéptidos cíclicos que puede generar la cepa QST713 son las fengycinas, estas forman micelas y reducen la tensión superficial del agua, por lo que tienen fuertes efectos sobre la membrana lipídica de los hongos que controla *Bacillus* (Patel *et al.* 2011).

Tratamientos con solo *Bacillus* o en combinación con bicarbonato de sodio, se han utilizado para el combate de enfermedades como la pudrición del anillo en pera, causada por *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, en donde se determinó que los tratamientos redujeron significativamente el crecimiento del hongo, el tratamiento combinado mejoró significativamente el combate de la pudrición del anillo (Liu *et al.* 2011). Asimismo, ha sido probado en aguacate con buenos resultados incluso comparables a los fungicidas comerciales utilizados. En el caso de patógenos del aguacate como *Colletotrichum gloeosporioides*, que también afecta frutos como plátano (*Musa paradisiaca* L.), mango (*Mangifera indica* L.) y papaya (*Carica papaya* L.) se hicieron análisis *in vitro* obteniendo hasta 88,87% y 80,07% de inhibición del crecimiento de micelio (Ragazzo, 2011, Zheng *et al.* 2013). En cítricos la enfermedad poscosecha causada por *Penicillium digitatum* (Leelasuphakul *et al.* 2008, Waewethongrak *et al.* 2015) se ha controlado en la fruta con cepas de *Bacillus subtilis* más la aplicación de quitosano.

2.8. Efecto de la combinación de tratamientos poscosecha

Existen investigaciones de diferentes estrategias para disminuir las pérdidas de calidad poscosecha, principalmente con la aplicación de un solo tratamiento (ya sea físico o químico), sin embargo, muchas veces estos no han mostrado el mejor resultado por lo que se ha señalado la necesidad de investigar en la integración de diferentes métodos de control para una mayor eficacia en el mantenimiento de las características de los productos agrícolas durante el almacenamiento (Wisniewski *et al.* 2016).

Estudios realizados con controladores biológicos han demostrado que estos pueden combatir enfermedades poscosecha por varios modos de acción, sin embargo, a menudo no pueden proporcionar por sí mismos el combate consistente o de amplio espectro en comparación con los fungicidas sintéticos y a la vez han mostrado una gran variabilidad en su eficacia (Liu *et al.* 2011).

Una posible solución para asegurar una mejor vida útil en frutas en etapa poscosecha con aplicaciones de controladores biológicos, es la combinación de estos con otros tratamientos, lo que puede potenciar la eficacia (Baños, 2006). Por ejemplo, hay evidencia de que la eficacia del bicarbonato de sodio y el carbonato para el combate del moho verde de los cítricos, mejoró significativamente cuando el tratamiento fue seguido por la aplicación de diferentes agentes de control biológico entre ellos *Pseudomonas syringae* y *Pantoea agglomerans* (Usall *et al.* 2008), así como el uso en conjunto de *Bacillus subtilis* con bicarbonato de sodio para la inhibición de *Botryosphaeria berengeriana* en pera a nivel *in vitro* la combinación de cepas de *Bacillus* con 2% de bicarbonato de sodio dieron como resultado una tasa de reducción de *B. berengeriana* de 83 a 90.23% (Liu *et al.* 2011), lo que mostró un efecto de control aditivo.

Otra de las opciones para reducir la carga química es la combinación de tratamientos físicos y biológicos. Así, por ejemplo, en manzana, para combatir las enfermedades causadas por *Colletotrichum acutatum* y *Penicillium expansum*, se aplicó la levadura *Metchnikowia pulcherrima* y bicarbonato de sodio combinados con calor a 38° C, se obtuvieron mejores resultados al combinar los tratamientos con calor y los antagonistas, en comparación con la aplicación por separado (Conway *et al.* 2004). Investigaciones similares desarrolladas con cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* para combatir mohos verdes y azules en cítricos, combinadas con bicarbonato y tratamiento de agua caliente, resultaron ser tan efectivas como el tratamiento con fungicida, reduciendo de un 80% a un 100% la descomposición en mandarina y naranja manteniendo la calidad de la fruta (Obagwu y Korsten, 2003 y Hong *et al.* 2014). También en mango se combinó la

aplicación de radiación UV-C con tratamientos de calor lográndose suprimir significativamente la antracnosis en comparación cuando se aplicaron de forma individual (Sripong *et al.* 2015).

En el cultivo de piña se encontró que aplicaciones de luz UVC con dosis de 13 a 40 kJ/m² fueron efectivas en cuanto a la conservación de buenas características de calidad poscosecha (Sari *et al.* 2016), asimismo Velásquez (2018) encontró una buena respuesta del fruto de la piña para combatir la severidad de moho en el corte del pedúnculo. La combinación de un controlador biológico con otros tratamientos podría contribuir a disminuir enfermedades poscosecha, ya que un antagonista por sí solo o de UV-C no pueden prevenir completamente la actividad contra una amplia gama de patógenos.

3. Objetivos

General

- Evaluar la eficacia de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) en combinación con el controlador biológico *Bacillus subtilis* como tratamiento poscosecha para el combate de moho en frutos de piña (*Ananas comosus* L. Merr.).

Objetivos específicos

- Determinar la eficacia de la luz ultravioleta en combinación con *Bacillus subtilis* en diferentes momentos del proceso poscosecha, en el combate de moho en frutos de piña.
- Determinar el efecto de la aplicación de luz ultravioleta en combinación con *Bacillus subtilis* en la calidad de frutos de piña (*Ananas comosus* L. Merr.).
- Definir el efecto de los tratamientos de luz ultravioleta en combinación a un controlador biológico sobre las poblaciones de hongos, levaduras y bacterias en poscosecha de frutos piña.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación constó de tres ensayos, en el primero se expusieron frutos de piña a tres diferentes dosis de luz UV-C seleccionadas de investigaciones anteriores y un testigo, para determinar la mejor respuesta en el combate de moho en la fruta sin quemaduras de la corona y superficie de la cáscara de piña. Para el segundo ensayo se seleccionó la mejor dosis de luz ultravioleta del primer ensayo y se evaluó sola o en combinación con el controlador biológico *Bacillus subtilis* y con o sin cera. En la tercera etapa se seleccionó el mejor tratamiento del segundo ensayo y se incluyó un testigo y el tratamiento químico comercial, para determinar el efecto de los tratamientos sobre el control de moho, levaduras y variables de calidad poscosecha. Además, con el objetivo de observar el comportamiento de las poblaciones de microorganismos después de los tratamientos se montaron aislamientos de pedúnculo y cáscara, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se clasificaron por tipo de microorganismo: bacteria, hongo o levadura.

4.1. Localización

Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Tecnología Poscosecha (LTP) del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, San Pedro, Costa Rica.

El material que se utilizó para los ensayos fue piña (*Ananas comosus* L. Merr.) Híbrido MD-2 Dorado Extra-Dulce con corona, proporcionada por Ananas Export Company S.A ubicada en Río Cuarto de Alajuela. Para cada ensayo la fruta se seleccionó manualmente de los bins de la planta empaadora, con un calibre 6 (caja de empaque con 6 frutas), fruta con calidad de exportación, uniforme, sin daños ni malformaciones y sin ningún tratamiento aplicado. Una vez seleccionada la fruta se colocó en cajas de cartón y se transportó al laboratorio de poscosecha.

Para los tres ensayos se procedió primero a lavar la fruta con agua y desinfectarla con cloro a una concentración de 100 mg/l, sumergiendo la piña en recipientes con la solución durante un minuto. Pasado el tiempo se colocaron sobre papel Kraft para escurrir y secar, para posteriormente aplicar los tratamientos. Para cada ensayo se tomaron 10 frutas a las que se les realizó una evaluación de calidad inicial, en donde se estableció grado de color externo con colorímetro y escala de color comercial, firmeza interna y externa, acidez y brix.

4.2. Equipo utilizado para la aplicación de tratamientos con irradiación UV-C y a la fruta

Para la aplicación de radiación sobre la fruta en los diferentes ensayos se utilizó una cámara hermética de desinfección con lámparas ultravioleta tipo UV-C marca Techno Lite (modelo GR30T8). La cámara está compuesta de material reflectivo con una compuerta superior con 3 lámparas de mercurio de baja presión de radiación de luz ultravioleta con una potencia de 30 Watts, además una longitud de onda de 254 nm. Dicha cámara cuenta con un soporte de rejilla donde se colocó la fruta, igualmente tiene una palanca para ajustar la altura (Figura 1).

Las dosis de radiación UVC fueron seleccionadas según los mejores resultados obtenidos por Velásquez (2018) y conforme a literatura consultada. Para la aplicación de los tratamientos se utilizó la ecuación 1, se contaba con dosis y tiempos fijos.

Dosis (kJ/m²) = Intensidad de la lámpara (KW/m²) x Tiempo (s)
(Ecuación 1).

- **Intensidad de la lámpara UV (I):** para la determinación de esta se utilizó un radiómetro marca TIF 3710, el cual fue introducido dentro de la cámara dando un lapso de 20 minutos para estabilizarlo. Con este se verificó la intensidad

de energía irradiada por la lámpara de luz UV-C en unidades mW/cm^2 . La altura de exposición de la fruta con respecto a las lámparas fue de 20 cm.

- **Tiempo (T):** De acuerdo con la anterior fórmula $T = D/I = T/60$ se determinó el tiempo de exposición de las frutas para lograr la dosis que estaba definida para cada tratamiento.

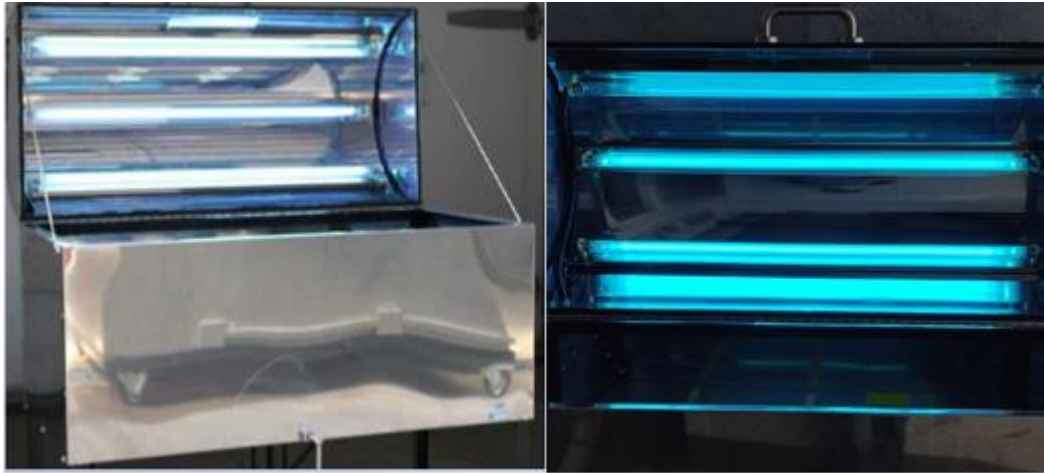


Figura 1. Cámara hermética de desinfección con lámparas ultravioleta tipo UVC marca Techno Lite (modelo GR30T8) compuesta de material reflectivo con una compuerta superior con 3 lámparas de mercurio de baja presión de radiación.

Aplicación de los tratamientos con UV-C a la fruta

Para la aplicación de los tratamientos se colocaron cuatro piñas sobre la rejilla de la cámara UVC de forma horizontal y se irradió primero una cara para posteriormente darle la vuelta e irradiar la otra cara y con esto cubrir toda la superficie de la piña, además de asegurar que ambas caras del fruto recibieran el mismo tiempo y dosis de exposición. Posteriormente se aplicó el tratamiento en la zona del pedúnculo para lo que la fruta fue colocada con la corona hacia abajo en bases de madera ajustables, estas bases se colocaron dentro de la cámara y así lograr una exposición directa a la principal zona afectada por mohos (Figura 2). Las frutas fueron irradiadas tres veces, dos en las caras de la fruta y una en el

pedúnculo, el tiempo varió de acuerdo con la dosis y el tratamiento. Tanto la cáscara como el pedúnculo fueron irradiados a 20 cm de la fuente de luz.



Figura 2. Piñas colocadas en bases de madera para la aplicación de luz ultravioleta directo al pedúnculo. Las lámparas generadoras de la radiación se encontraban a 20 cm de la fruta.

4.3. Almacenamiento y Momentos de evaluación

Después de aplicados los tratamientos en cada ensayo las frutas se colocaron en cajas de cartón con papel Kraft en la parte de abajo y arriba de la fruta, a manera de tapa para evitar la deshidratación (Figura 3), se ubicaron 6 frutas en cada caja y estas se estivarón y se almacenaron en cámaras de refrigeración.

En cada ensayo se simuló el transporte y manejo comercial que corresponde a 21 días en cámara fría a 7 °C y luego tres días a 18 °C correspondiente al final de vida en anaquel. Las evaluaciones se realizaron el primer día de la aplicación de tratamientos (calidad inicial 0 días), el día 21 a la salida de cámara y 3 días después (anaquel).



Figura 3. Almacenamiento de frutos de piña en cajas de cartón cubiertas con papel Kraft y dentro de la cámara fría a 7°C.

4.4. Ensayo 1: Determinación de la mejor dosis de UVC para el control del desarrollo del moho en frutos de piña y variables de calidad.

Para determinar la mejor dosis de UVC a utilizar en pruebas posteriores, se evaluó el efecto de tres dosis diferentes (Cuadro 1) de radiación ultravioleta, y la dosis de 0 kJ/m² como tratamiento testigo.

Cuadro 1. Dosis, intensidad de luz y tiempo de exposición correspondiente a tratamientos UV-C aplicados sobre frutos de piña variedad Dorado Extra-Dulce evaluados en el primer ensayo.

Tratamientos	Intensidad	Tiempo de
Dosis	(kW/m²) de la	exposición (min)
(kJ/m²)	lámpara	
0	0,0208	0
5		4
15		12
25		20

Después de lavadas y desinfectadas las piñas, se procedió a aplicarles las dosis respectivas de UV-C (Cuadro 1) de acuerdo con el procedimiento descrito en el inciso 4.2. Seguidamente se preparó cera al 4% a base de trial gliceroles hidrogenados (Frutiver 6.1 SC) y se asperjó a temperatura ambiente a la fruta de todos los tratamientos incluido el testigo con ayuda de una bomba manual manteniendo una presión constante, realizando una aplicación en cada cara de la piña y un refuerzo (aplicación localizada al pedúnculo) en el corte del pedúnculo.

Concluidas las aplicaciones, se empacaron las piñas en cajas de cartón y se almacenaron por 21 días dentro de cámaras de enfriamiento a 7°C y tres días correspondiente a vida en anaquel a 18°C.

En el apartado 4.7 se detalla el procedimiento que se realizó para evaluar las diferentes variables que fueron consideradas en los tres ensayos.

Para este ensayo uno, se evaluaron cuatro tratamientos, con 15 repeticiones cada uno, tomando como unidad experimental una piña. Se utilizó un diseño irrestricto al azar.

4.5. Ensayo 2: Efecto de la aplicación de la mejor dosis de luz ultravioleta (UV-C) en combinación con el controlador biológico *Bacillus subtilis* y cera sobre el control de moho y variables de calidad en frutos de piña

De acuerdo con los resultados obtenidos el primer ensayo, se escogió la mejor dosis correspondiente a 5 kJ/m² de UVC con un tiempo de aplicación de aproximadamente cuatro minutos para el segundo ensayo.

Después del lavado, desinfección y secado se procedió a aplicar la UV-C tal como se describe en el apartado 4.2 para luego complementar inmediatamente con la aplicación de diferentes tratamientos de *B.subtillis* y seguido de la cera (Cuadro 2). La cepa que se utilizó fue *Bacillus subtilis* QST 713 presentación líquida (Serenade 1,34 SC, Anexo 10), evaluando dos dosis 37,5 ml/l dosis media y la alta 50 ml/l, seleccionadas con base en trabajos anteriores en los que se evidenció que estas

fueron eficaces en el combate de mohos (Soto, 2017). La aplicación se realizó con una bomba manual y se asperjó cada fruta primero en una de las caras de la superficie del fruto, posteriormente se le dio vuelta a la piña y se aplicó a la otra cara, además de un refuerzo al pedúnculo. Con este mismo método se asperjó la cera al 4% a temperatura ambiente a los tratamientos que la incluían. Una vez finalizados los tratamientos las frutas se colocaron en cajas de cartón dentro de una cámara fría a 7°C durante 21 días, tres días a 18°C para vida en anaquel, simulando el transporte comercial.

Para este segundo ensayo se evaluaron cinco tratamientos (Cuadro 2), cada tratamiento constó de cuatro cajas o repeticiones con 5 piñas cada una, y un total de 100 frutas. Se usó un diseño irrestricto al azar.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados a frutos de piña con luz ultravioleta combinados con dos dosis de *Bacillus subtilis* con y sin cera utilizados en el segundo ensayo.

Tratamientos		Siglas
Dosis UVC	Combinaciones	
	Cera	Ce
5 (kJ/m ²) +	<i>Bacillus subtilis</i> 37,5 ml/l dosis media (m)	B.s m
	<i>Bacillus subtilis</i> 37,5 ml/l dosis media + Cera (m)	B.s m + Ce
	<i>Bacillus subtilis</i> 50 ml dosis alta (a)	B.s a
	<i>Bacillus subtilis</i> 50 ml dosis alta + Cera (a)	B.s a +Ce

4.6. Ensayo 3: Efecto de una dosis de luz ultravioleta en combinación con un controlador biológico en el combate del moho en comparación con el tratamiento comercial poscosecha de frutas de piña

Se seleccionó la mejor combinación de tratamientos obtenida en el segundo ensayo, la cual fue $5 \text{ kJ/m}^2 + \text{Bacillus subtilis } 37,5 \text{ ml} + \text{cera (B.s m + Ce)}$. A partir de esto se estableció este ensayo con tres tratamientos (Cuadro 3), el tratamiento combinado (proveniente del mejor tratamiento del ensayo 2), el tratamiento químico comercial, el cual correspondió a la aplicación de cera más el fungicida fludioxonil (Scholar 23 SC), más un testigo con solo aplicación de cera.

Para el tratamiento combinado se expuso la piña a la dosis de 5 kJ/m^2 de radiación UVC siguiendo el procedimiento que se utilizó en el primer y segundo ensayo (inciso 4.2), después se aplicó con una bomba manual de aspersion manteniendo presión constante la solución de *B. subtilis* con 37,5 ml por litro del producto comercial tal como se describió para el ensayo dos, y de inmediato la aplicación de cera al 4% también mediante aspersion, el pedúnculo recibió un refuerzo de *Bacillus* y otro de cera. Para el tratamiento químico se preparó una solución de fludioxonil equivalente a 600 mg/l i.a aplicado con el mismo método del *B. subtilis* a la fruta, seguido de aplicación de cera y refuerzo al pedúnculo.

Este ensayo se estableció para darle un tiempo similar de almacenamiento al de los dos ensayos anteriores 21 días en cámara fría a 7°C y tres días en anaquel a 18°C , sin embargo, debido a las restricciones de trabajo presencial por la emergencia sanitaria del Covid-19 el mes marzo del año 2020 se adelantó la evaluación para el día quince de entrada a cámara fría. Luego la fruta estuvo hasta el día 40 en almacenamiento a 7°C , ese día se evaluó y se dejó tres días más para simular vida en anaquel, por lo que se sacó la fruta a los 43 días, cantidad de días acumulados que alcanzó la fruta en almacenamiento.

En la prueba, se seleccionaron 180 frutas, cada tratamiento constó de nueve cajas o repeticiones con 6 piñas cada una, para un total de 54 frutos por tratamiento. Se utilizó un diseño irrestricto al azar.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el tercer ensayo un testigo, combinado y químico comercial, los tres con cera.

Tratamientos	Siglas
Testigo (solo cera)	Testigo
5 kJ/m ² UVC + <i>Bacillus subtilis</i> 37,5 ml/l dosis media (m) + Cera	UVC + <i>B.s</i>
Químico comercial (fludioxonil 600 ppm + cera)	Químico

4.7. Descripción de las variables y metodología de medición

En el cuadro 4 se especifican las variables que se evaluaron en los tres diferentes ensayos.

Cuadro 4. Resumen de variables evaluadas en cada uno de los ensayos desarrollados

Variable	Unidad de medición	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3
Firmeza interna y externa	Newton (N)	✓	✓	✓
Brix o sólidos solubles	Porcentaje de sólidos solubles (%)	✓	✓	✓
Color externo (escala comercial)	Grado de maduración	✓	✓	✓
Color externo con colorímetro	Parámetros L* a* y b*	✓	✓	✓
Acidez titulable	Porcentaje de ácido cítrico (%)	✓	✓	✓
Contenido de fenoles en pulpa, cáscara, pedúnculo y corona	mg AG/100 gpf	✓	✓	✓
DPA o Pitting	Frutículos totales y afectados y grado de severidad (%)	✓	✓	✓
Moho en corona	Incidencia y grado de severidad (%)	✓	✓	✓
Moho en pedúnculo	Incidencia y grado de severidad (%)	✓	✓	✓
Quema de corona	Incidencia y grado de severidad (%)	✓	✓	✓
Conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC) en medio de cultivo	Log natural (x-1)	x	✓	✓

4.7.1. Firmeza de la cáscara y pulpa

Se utilizó el penetrómetro Chatillón DPPH 100 con punta con muesca en V. En el caso de la firmeza externa se seleccionaron tres puntos ecuatoriales sobre la cáscara de la fruta, evitando las hendiduras de los frutículos. Así mismo, se midió la firmeza interna, para la cual se partió la piña por la mitad de manera transversal y se midió en tres puntos diferentes alrededor del eje central (Figura 4). Se tomaron tres puntos por fruta.

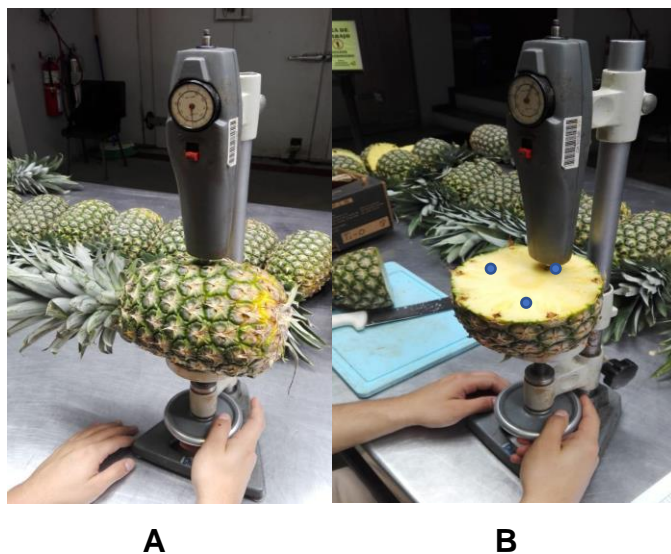


Figura 4. Evaluación de la firmeza externa en el ecuador de los frutos de piña (A). Puntos alrededor del eje central de la piña en donde se realizó la medición de firmeza interna (B)

4.7.2. Porcentaje de sólidos solubles (Brix)

Se extrajo una sección longitudinal del total la piña, se le quitó la cáscara, se cortó en pedazos y se maceró dentro de una bolsa plástica para obtener jugo (Figura 5), posteriormente se colocaron gotas de jugo en un refractómetro digital marca Atago modelo Pal-1, se realizó una medición por fruta evaluada.



A

B

Figura 5. Porción de piña evaluada para la evaluación de brix (A) y bolsa plástica para obtener el jugo (B).

4.7.3. Color externo visual (escala comercial)

Para la evaluación de color externo, en relación con el avance del color amarillo del fruto se utilizó una escala comercial (Banacol, s.f.) que va de 0 verde a 3 más amarillo (Figura 6).



Figura 6. Escala comercial para evaluar el avance de la maduración en el fruto. Fuente Banacol, s.f.

4.7.4. Color externo con colorímetro (escala CIELAB)

Se midió el color externo sobre la cáscara de los frutos de piña utilizando un colorímetro electrónico, Marca IWAVE WR-10.

Se realizaron tres mediciones en la zona ecuatorial de la fruta para obtener los parámetros L^*a^*b que se presentaron en una escala CIELAB, cada parámetro se analizó de manera individual.

4.7.5. Acidez titulable

Para determinar la acidez titulable se tomó una sección longitudinal de la pulpa, se trituró para sacar el jugo y se pesaron aproximadamente 5 gramos de jugo en un beaker y a este se le agregaron 25 ml de agua destilada. A la solución se le agregaron tres gotas de fenolftaleína, se procedió a realizar titulaciones con NaOH a una concentración de (0,09524 mol/l) y se promediaron los datos. Para la determinación de la acidez se utilizó la fórmula:

$\%AC = \frac{\text{ml de NaOH} \cdot C_n \text{ de NaOH} \cdot 0,064 \text{ equivalente de ácido cítrico} \cdot 100}{\text{peso de la muestra}}$

4.7.6. Contenido de fenoles de cáscara, pedúnculo, pulpa y corona de frutos de piña

Con ayuda de un pelador de frutas se tomaron muestras de cáscara de la zona cercana al pedúnculo de la piña, para la corona se utilizó la parte basal de esta, se cortó la parte más externa de las hojas y se seleccionó el tejido más interno. En cuanto a la muestra de pedúnculo se tomó completo de cada fruto y para la muestra de la pulpa se utilizó una sección longitudinal del total de la piña, posteriormente cada muestra se pesó. Para los tres ensayos las muestras se almacenaron a -80° en una cámara de refrigeración hasta ser procesadas.

4.7.9.1. Primer ensayo.

Las muestras para determinación de fenoles fueron trasladadas por tejido en una hielera de esteoreofón al Centro de Investigaciones Agronómicas, donde se utilizó un liofilizador marca LABCONCO, modelo FreeZone 12 para el secado de las muestras utilizando una temperatura de -50°C y una presión de 0,15 mBar. Una vez procesadas las muestras se pesaron y se molieron en una cápsula con un mortero hasta lograr un polvo fino para cada tejido. De cada muestra se pesó un gramo, a excepción de la cáscara que se pesó 0,8 g y se procedió a aplicar a cada muestra el procedimiento detallado en la figura 7:

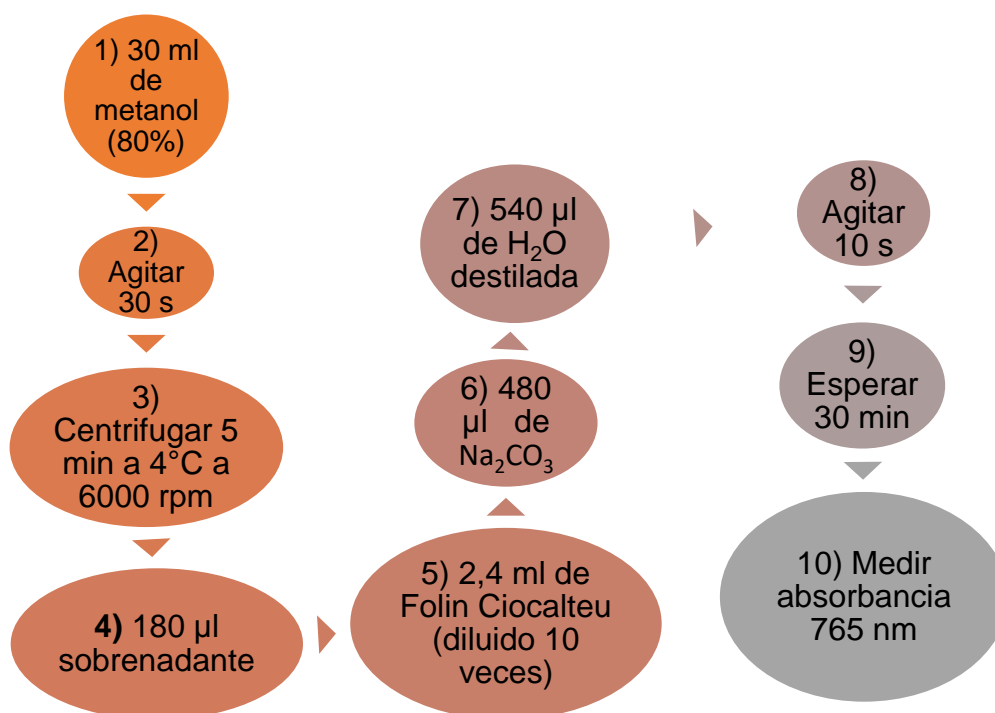


Figura 7. Procedimiento para la extracción y determinación de fenoles. A partir del paso 4) se utilizó el mismo procedimiento para la determinación del contenido de fenoles para las muestras de los ensayos 2 y 3.

4.7.9.2. Segundo y tercer ensayo.

La preparación de la muestra fue diferente para el segundo y tercer ensayo. Se pesaron 8 gramos de muestra fresca de cada tejido congelado en balanza analítica, cada muestra se colocó en un tubo de 50 ml y se le agregó 15 ml de metanol al 80%. Se molieron y homogenizaron las muestras con el Homogenizador manual PT 3000, Brinkmann, Kinematica AG evitando el salpique de las muestras. Luego se mantuvieron bajo luz roja para evitar la oxidación de los fenoles. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 4 °C, se extrajo el sobrenadante con pipeta y se depositó en tubos negros para centrifuga. Seguidamente a la misma muestra se le agregó 10 ml de metanol, se agitó, se centrifugó nuevamente y se extrajo el sobrenadante de cada tubo. Las muestras se aforaron en balones de 25 ml con metanol al 80% y se procedió a filtrarlas (filtro Whatman).

A partir de este paso el procedimiento para el tratamiento de muestras para la determinación de fenoles es el mismo que el aplicado en el primer ensayo (Figura 7, paso 4). En los tres ensayos antes de la medición de absorbancia se esperó 30 minutos, pasado este tiempo se leyó la absorbancia de la muestra utilizando un espectrómetro Thermo Scientific Genesys a una longitud de onda de 765 nm. El contenido fenólico se determinó de acuerdo con una curva patrón de ácido gálico y se expresó en miligramos de ácido por 100 gramos de peso fresco y seco de muestra. El procedimiento para la determinación del contenido de fenoles fue tomado de la literatura del artículo de Sari *et al.* 2016 con modificaciones; Calvo, 2020.

Para los tres ensayos se tomaron tres muestras compuestas por dos frutos para un total de 6 frutas y tres repeticiones por tratamiento. De cada fruta se tomaron tres submuestras por tejido de piña.

4.7.7. Deshidratación parcial de las aristas (DPA)

En cuanto al hundimiento en frutículos también denominado “pitting” o Deshidratación parcial de las aristas (DPA) (figura 8), se utilizó una cuadrícula de cartón de 10x10 (100 cm²) que se colocó sobre la cáscara para definir el área en donde se contaron diez frutículos totales, el número de frutículos con DPA, así como la severidad del DPA para lo que se utilizó como guía la escala que se detalla en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Escala para evaluar DPA en frutos de piña.

Grado	% afectación
0	Sin presencia de pitting
1	Oxidación
2	< 25% del área del frutículos afectada
3	> 25% del área del frutículos afectada



Figura 8. A. Cuadrícula de 10x10 cm utilizada para demarcar área para conteo de incidencia de DPA en diez frutículos en frutos de piña. B. Síntoma de DPA o “pitting” (flechas negras señalan síntoma de DPA).

4.7.8. Incidencia y severidad de moho en corona

Para evaluar la incidencia de moho se realizó un conteo de las frutas afectadas con síntoma de moho (Figura 9). Para establecer la severidad se contaron el total de las hojas de la corona que presentaban moho.



Figura 9. Síntomas de moho en corona de piña (flechas negras señalan síntoma de moho en la corona).

4.7.9. Incidencia y severidad de moho peduncular

La incidencia se registró como el número de frutos con presencia de moho del total de frutos evaluados y con esta información se calculó el número de frutos afectados. La severidad del moho en el pedúnculo se estimó de forma visual utilizando una escala como guía (Cuadro 6 y Figura 10), con esta se calculó el porcentaje de área cubierta por moho de cada una de las frutas que conformaron cada tratamiento, asignándose un grado de severidad de desarrollo de moho. Con la información de grado de severidad se calculó el índice de severidad de moho en el pedúnculo, mediante la siguiente fórmula:

Índice de severidad de moho: $(\sum na / (N-1) t) \times 100$, donde

n= número de piñas en cada grado de severidad

a= grado de severidad (0 a 6)

N= número de grados de la escala (6)

t= total de piñas evaluadas

Cuadro 6. Escala guía para estimar el porcentaje del área de afectación del moho peduncular en frutos de piña.

Grado	Porcentaje del área del pedúnculo afectada (%)
0	0
1	1-12
2	13-25
3	26-50
4	51-75
5	76-100

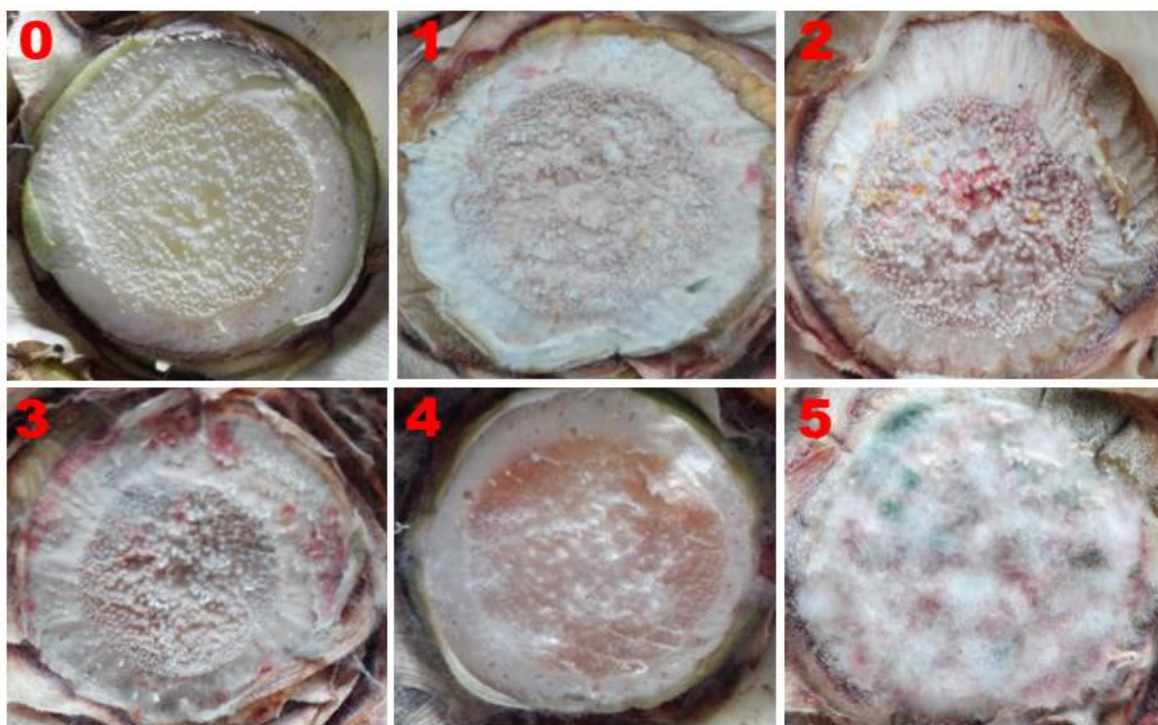


Figura 10. Escala gráfica del grado de desarrollo del moho en la zona del pedúnculo en los frutos de piña.

4.7.10. Incidencia y severidad de quema de corona

La evaluación de la incidencia de quema de corona se realizó de forma visual mediante un conteo de frutos para determinar síntomas de bronceamiento en las hojas (Figura 11), y con este se calculó la incidencia de frutos dañados. En cuanto a la severidad por quema en corona se utilizó una escala (Cuadro 7) con cuatro grados de severidad de acuerdo con el número de hojas afectadas y con este se determinó un índice de severidad.

Índice de severidad de quema de corona: $(\sum na/(N-1) t) \times 100$, donde

n= número de piñas en cada grado de severidad

a= grado de severidad (1 a 4)

N= número de grados de la escala (4)

t= total de piñas evaluadas



Figura 11. Síntoma de daño de quema en hojas de la corona en frutos de piña.

Cuadro 7. Escala para evaluar quema de corona en frutos de piña.

Grado	N° de hojas
1	Una hoja afectada
2	Dos hojas afectadas
3	Tres hojas afectadas
4	Cuatro hojas afectadas

4.8. Aislamiento de microorganismos a partir de diferentes tejidos de piña

El proceso de aislamiento de microorganismos *in vitro* se realizó a partir de dos tejidos de los frutos de piña: cáscara y pedúnculo. El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó únicamente para el ensayo dos correspondiente a dos diferentes dosis de *B. subtilis* y para el ensayo tres. Los aislamientos se montaron y se evaluaron en tres diferentes momentos para el ensayo dos: fruta sin ningún tratamiento (carga inicial), fruta con tratamiento aplicado después de 24 horas y fruta a salida de cámara fría luego de 21 días de almacenamiento a 7°C (cuadro 8). Para el ensayo tres se realizaron cuatro evaluaciones: carga inicial, 24 horas, 15 días de entrada de cámara fría de los frutos (15DEC) y otra a los 40 días de almacenamiento (40DSC).

Cuadro 8. Momentos de muestreos y conteos de microorganismos aislados a partir de cáscara y pedúnculo de frutos de piña para los ensayos dos y tres.

Momento de muestreo	Sigla	Días de evaluación
Carga inicial (sin tratamiento)	CI	
24 horas de aplicado el tratamiento	24 H	
Salida de cámara fría 7°C (21 días)	SC	3-5-8
** Quince días de entrada a cámara fría**	15 DEC	
Cuarenta días de almacenamiento en cámara fría	40DSC	

** Evaluaciones únicamente del Tercer ensayo.

Para hacer los aislamientos se seleccionaron al azar cinco piñas el primer día de fruta sin ningún tratamiento, tres por tratamiento a las 24 horas y a la salida de cámara. Se extrajeron discos con un sacabocados de aproximadamente 1 cm² de diámetro de la zona de corte del pedúnculo y cáscara de la zona ecuatorial de la fruta (Figura 12-13 A).

Cada uno de estos segmentos se cortaron con un bisturí en subunidades de tamaño similar (Figura 12-13 B y C), estas se colocaron en un beaker con 30 ml de agua destilada estéril con una gota de tenso activo Tween 80%, seguidamente se pusieron en un agitador magnético durante 5 minutos para separar las esporas de los tejidos. Para cada muestra de cáscara o pedúnculo, se utilizó el método de dilución seriada estándar con dos diluciones. Se tomaron 100 µl de la muestra con una pipeta y se depositaron 900 µl de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf (10⁻¹). A partir de esta dilución se tomó del tubo Eppendorf 100 µl y se completó con 900 µl de agua ultrapura 10⁻².

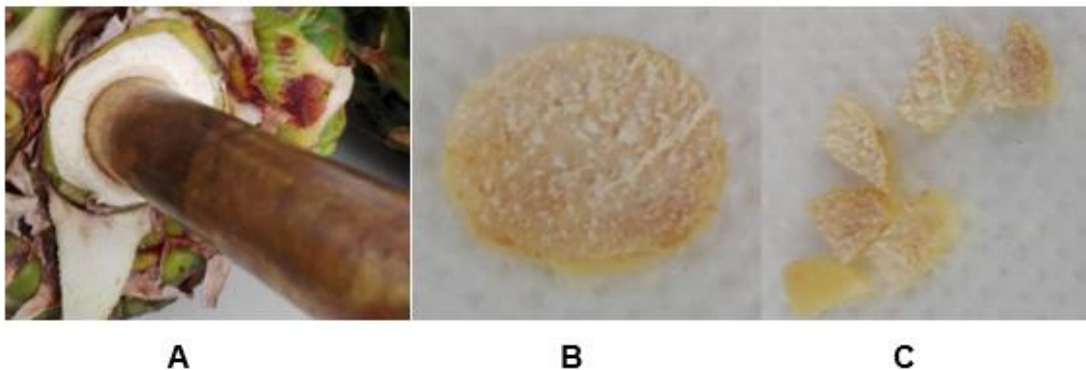


Figura 12. Discos de zona del pedúnculo extraídos con sacabocados (A y B) y cortados en segmentos para obtener aislamientos a partir de la técnica de dilución seriada (C).

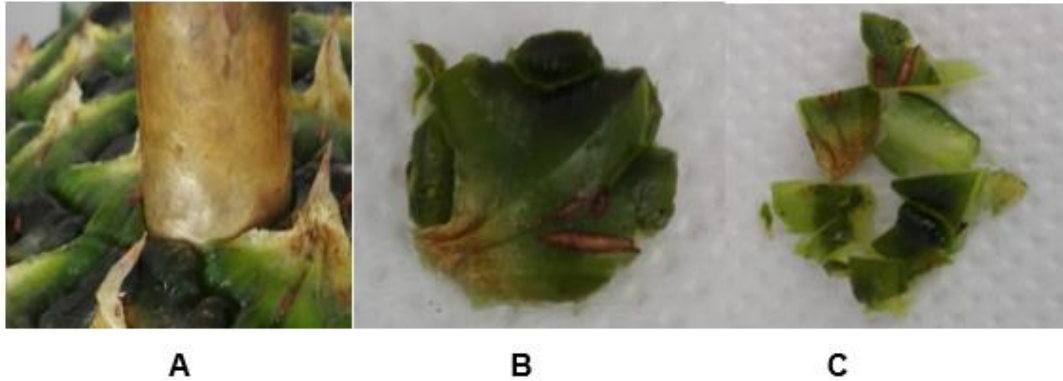


Figura 13. Disco de cáscara de piña tomados con sacabocados (A y B) y cortados en segmentos para obtener aislamientos a partir de la técnica de dilución seriada (C).

A continuación, se colocaron 100 μ l de cada dilución en una placa Petri con el medio de cultivo PDA + ácido láctico, se distribuyó sobre las mismas con un asa Digrafsky. Las placas se rotularon y se guardaron en una cámara de incubación a $22 \pm ^\circ\text{C}$. Se realizaron conteos de las unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras y bacterias a los tres, cinco y ocho días de incubación (Cuadro 8).

Para analizar los datos se tomaron como referencia los conteos de la dilución 10^{-1} los que se multiplicaron por un factor de 10 para determinar el número de UFC/ml de la muestra. Se decidió tomar solo en cuenta los días de evaluación tres y cinco haciendo una sumatoria de las UFC de estos días. Los datos se analizaron por separado entre unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras y bacterias, previo al análisis los datos fueron transformados a $\log_{10}(x+1)$.

4.9. Análisis estadístico de datos

El análisis de datos se realizó con el programa estadístico InfoStat (versión libre estudiantil 2018 y 2020) y la presentación de los datos con el programa Microsoft Excel 2016.

Las variables cuantitativas correspondientes a firmeza interna y externa, color CIELAB con colorímetro, sólidos solubles, contenido de fenoles se analizaron mediante un análisis de varianza y un análisis de separación de medias de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) con un intervalo de confianza del 95% ($p > 0,05$). Las variables no paramétricas correspondientes a la incidencia y severidad de moho peduncular, color visual (con escala), incidencia y severidad de quema y moho de corona, severidad de DPA o "pitting", conteo de unidades formadoras de colonias se les realizó un análisis no paramétrico mediante la prueba H de Kruskal Wallis con un nivel de significancia de p de 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Ensayo 1. Determinación de la mejor dosis de UVC sobre el control del desarrollo del moho en frutos de piña y variables de calidad

5.1.1. Variables de incidencia, severidad de moho en pedúnculo, corona y quema de corona en frutos de piña

La UV-C presentó un efecto de disminución sobre las variables de incidencia y severidad de moho a salida de cámara fría tanto en el tejido del corte en el pedúnculo como en la corona de los frutos de piña

En cuanto a la variable de incidencia de moho en el pedúnculo, en el momento de salida de cámara, el tratamiento con la mayor dosis (25 kJ/m²) presentó la menor incidencia (40%) y fue significativamente diferente al tratamiento 0 kJ/m². Cuando se evaluó esta variable al final de la vida en anaquel (figura 14 A), todos los tratamientos presentaron un 100% de incidencia.

En el caso de la severidad del moho en el pedúnculo (Figura 14 B), se observó en la evaluación a salida de cámara fría que todos los tratamientos expuestos a UVC resultaron ser significativamente diferentes con respecto al tratamiento testigo (0 kJ/m²), mientras que tres días después a salida de anaquel a una temperatura de 18°C ningún tratamiento presentó diferencias entre ellos, sin embargo, se encontró una tendencia que los porcentajes fueron más bajos con la menor dosis de UV-C que obtuvo una severidad de un 61,3% de desarrollo de moho, contra un 79% en el testigo.

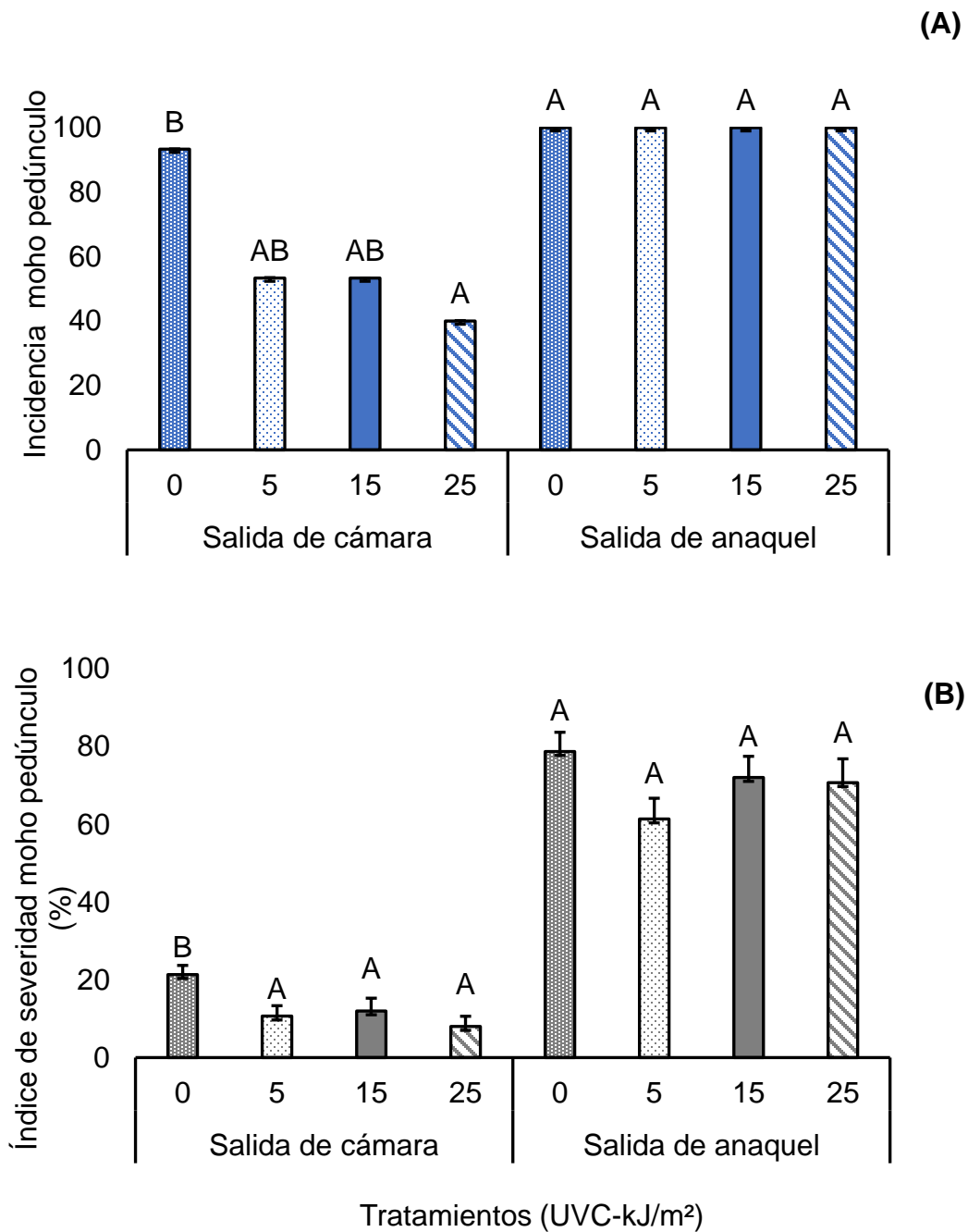


Figura 14. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de luz ultravioleta (UV-C) sobre la incidencia (A) e índice de severidad (B) de moho en el pedúnculo después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Barras con error estándar, medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

En cuanto a las variables de incidencia y severidad de moho en corona, no se presentaron diferencias significativas tanto a salida de frío como de anaquel (Anexo 1). En la última fase, todos los tratamientos alcanzaron un 100% de afectación. Por otro lado, para la severidad de moho en corona se encontró un comportamiento variado de los tratamientos, la dosis de 5 kJ/m² presentó el menor valor a salida de cámara con un 0,53 % de severidad, mientras que a salida de anaquel registró el mayor número de hojas afectadas con respecto a los demás tratamientos, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Anexo 1).

Para la variable de quema de corona (Cuadro 9), a salida de cámara fría, ningún tratamiento mostró diferencias estadísticas significativas tanto en incidencia como en severidad. A salida de anaquel las frutas con la dosis 15 kJ/m² mostraron un aumento en daño en quema de corona con 0,47 y un 21,7 % correspondiente a incidencia y severidad, siendo diferente con respecto a 0 kJ/m².

Cuadro 9. Incidencia y severidad de quema en corona en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.

Tratamientos Dosis UV-C (kJ/m ²)	Tiempo (min)	Quema de corona			
		Salida de frío (7° C)		Salida de anaquel (18° C)	
		% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad
0	0	0,00 (± 0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A
5	4	0,20 (±0,11) A	3,30 (±2,67) A	0,07 (±0,07) AB	5,00 (±3,33) AB
15	12	0,27 (±0,12) A	8,30 (±3,98) A	0,47 (±0,13) B	21,7 (±6,39) B
25	20	0,13 (±0,09) A	5,00 (±3,62) A	0,27 (±0,12) AB	15,0 (±6,81) AB
Valor de p		0,2124	0,2196	0,0064	0,0082

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes según Prueba Kruskal Wallis (p < 0,05). Error estándar entre paréntesis.

5.1.2. Variables de calidad de firmeza externa, interna, brix y acidez

De acuerdo con los resultados obtenidos la dosis de 5 kJ/m² mostró un comportamiento similar al testigo sobre la variable de firmeza externa con un valor de 58 newtons (N), promedio cercano a 0 kJ/m² con una resistencia de 60 N (Figura 15). En el caso de los tratamientos con las mayores dosis 15 y 25 kJ/m² fueron estadísticamente diferentes y con menor firmeza con respecto a 0 kJ/m².

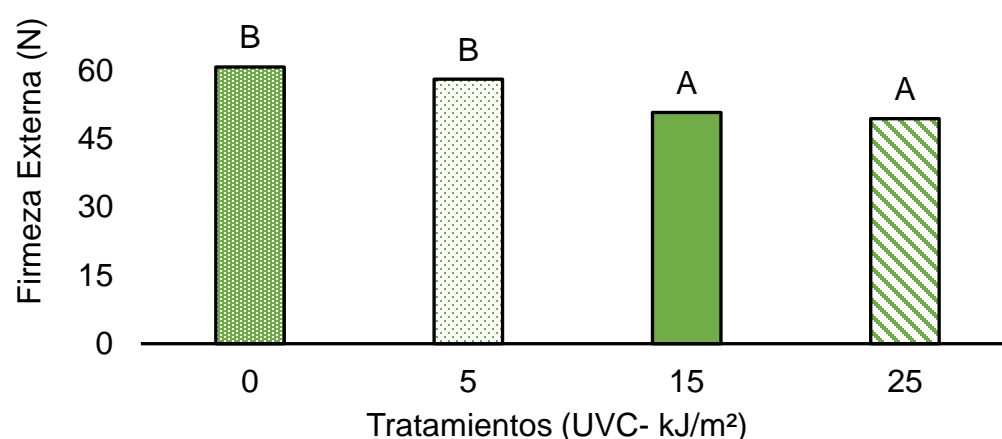


Figura 15. Efecto de la aplicación de luz ultravioleta (UV-C) en diferentes dosis sobre la firmeza externa evaluada a salida de anaquel en frutos de piña. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

A diferencia de la firmeza externa, la firmeza interna no presentó ninguna diferencia significativa en ninguno de los tratamientos (Anexos 2).

En cuanto a la acidez titulable, el testigo presentó el menor valor con un 0,75% de ácido cítrico comparado al tratamiento con la dosis de 25 kJ/m² el cual obtuvo la mayor acidez con un 0,90% (Anexos 2), sin embargo, no se evidenció ninguna diferencia significativa. Además, no se encontró diferencias estadísticamente significativas en la variable de brix en ninguno de los tratamientos (Anexos 2).

5.1.3. Variables de color CIELAB con colorímetro, color escala visual y DPA

Con relación a las variables medidas de color L^* , a^* , b^* y color evaluado con escala comercial (Anexo 3 y 4), no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Para la variable de DPA no se presentó ninguna diferencia entre los tratamientos en el porcentaje de incidencia en ninguna de las etapas de evaluación (Cuadro 10), mientras que, para la variable de severidad, se dio una diferencia estadística entre tratamientos, resultando el tratamiento con 5 kJ/m² con la mayor severidad de DPA, tanto a salida de cámara fría como a salida de anaquel.

Cuadro 10. Incidencia y severidad de DPA en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.

Tratamientos Dosis UV-C (kJ/m ²)	Tiempo (min)	DPA			
		Salida de frío 7° C)		Salida de anaquel 18°C	
		% incidencia	%severidad	% incidencia	%severidad
0	0	32,0 (± 0,56) A	27,78 (±3,06) A	70,07 (±0,59) A	54,45 (±3,08) A
5	4	52,0 (±0,58) A	50,22 (±3,92) C	74,7 (±0,58) A	64,84 (±3,35) C
15	12	44,7 (±0,57) A	39,11 (±3,70) B	70,0 (±0,38) A	55,11 (±3,15) AB
25	20	43,3 (±0,58) A	35,56 (±3,45) AB	76,0 (±0,60) A	62,22 (±3,10) BC
Valor de p		0,1132	0,0001	0,8309	0,006

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí según prueba Kruskal Wallis ($p < 0, 05$). Error estándar entre paréntesis.

En cuanto a los fenoles totales, el único tejido que mostró una respuesta a las dosis de ultravioleta fue el de corona, en donde la dosis de 5 kJ/m² presentó la concentración más elevada (Cuadro 11), sin embargo, este no fue diferente con 0 kJ/m², por lo que la aplicación de UV estimuló poco la acumulación de fenoles,

siendo la cáscara la que mostró una tendencia a ser mayor. Además, la dosis de 5 kJ/m² tendió a presentar una mayor cantidad de fenoles en cáscara, corona y pulpa.

Cuadro 11. Fenoles correspondientes a cuatro tejidos de frutos de piña con tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días).

Tratamientos (UVC)	Peso Seco mg equivalente ácido gálico/ 1 g			
	Cáscara	Corona	Pedúnculo	Pulpa
0	3,62 A	2,56 B	3,42 A	3,09 A
5	4,39 A	2,59 B	2,84 A	3,23 A
15	4,02 A	2,11 A	2,39 A	3,2 A
25	4,02 A	1,85 A	2,95 A	2,6 A
Valor de p	0,7834	0,0233	0,5433	0,6739

Medias con una letra distinta entre columnas son significativamente diferentes entre sí según prueba DGC ($p < 0,05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el primer ensayo de esta investigación el tratamiento con la dosis 5 kJ/m² de UV-C mostró mejores respuestas en los frutos de piña, como la tendencia a disminuir el índice de severidad de moho en el pedúnculo a salida de anaquel, un menor daño en la quema de la corona, firmeza externa similar a 0 kJ/m² y mayor que las de los tratamientos 15 y 25 kJ/m², sin embargo, si presentó la mayor severidad en DPA. Por las anteriores razones, al conseguir un número importante de respuestas positivas en variables importantes y en el mantenimiento de la calidad, se eligió esta dosis para aplicarla en el segundo ensayo.

5.2. Ensayo 2: Efecto de la aplicación de la mejor dosis de luz ultravioleta (UV-C) en combinación con *Bacillus subtilis* y cera sobre el control de moho y variables de calidad en frutos de piña

5.2.1. Variables de incidencia, severidad de moho en pedúnculo, corona y quema de corona en frutos de piña.

La combinación de los tratamientos UV-C, *Bacillus subtilis* y cera aplicados a los frutos de piña permitió una disminución del desarrollo del moho en el pedúnculo. En cuanto a la incidencia de moho en el pedúnculo en el momento de salida de cámara el tratamiento Ce presentó un 95% de incidencia, mientras que el tratamiento combinado UV-C + *B.s m* + Ce presentó un 55% de desarrollo de moho, mostrando un mayor control con respecto a los demás tratamientos (Figura 16 A). A salida de anaquel ante el cambio de temperatura todos los tratamientos aumentaron hasta un 100% de incidencia.

Para la variable de severidad de moho en pedúnculo se encontró un efecto de disminución en el tratamiento con dosis medias del controlador. Como se observa en la Figura 16 B, a la salida de cámara fría los tratamientos en que se combinó UV-C con el controlador biológico fueron significativamente diferentes con respecto al tratamiento con solo UV-C + Ce. En los dos momentos de evaluación (salida de cámara y salida de anaquel) el tratamiento UV-C + *B.s m* + Ce presentó los porcentajes más bajos de desarrollo de moho con un 12 y un 48,2 % respectivamente, mostrando diferencias significativas con el tratamiento al que solo se le aplicó UVC + Ce con un 24 y 76,5% de moho respectivamente, sin ser diferente a los otros tratamientos con *Bacillus*.

Por otro lado, el tratamiento UV.C + *B.s* a presentó un 67,1% y no se diferenció estadísticamente con UV-C+ Ce. Los tratamientos UVC- *B.s m*, UV-C + *B.s m* + Ce y UV-C + *B.s a* + Ce no se diferenciaron estadísticamente entre sí. Ante estos resultados se observa posiblemente un efecto aditivo del microorganismo biológico para el control del complejo de moho en el pedúnculo y un mayor control con la dosis media.

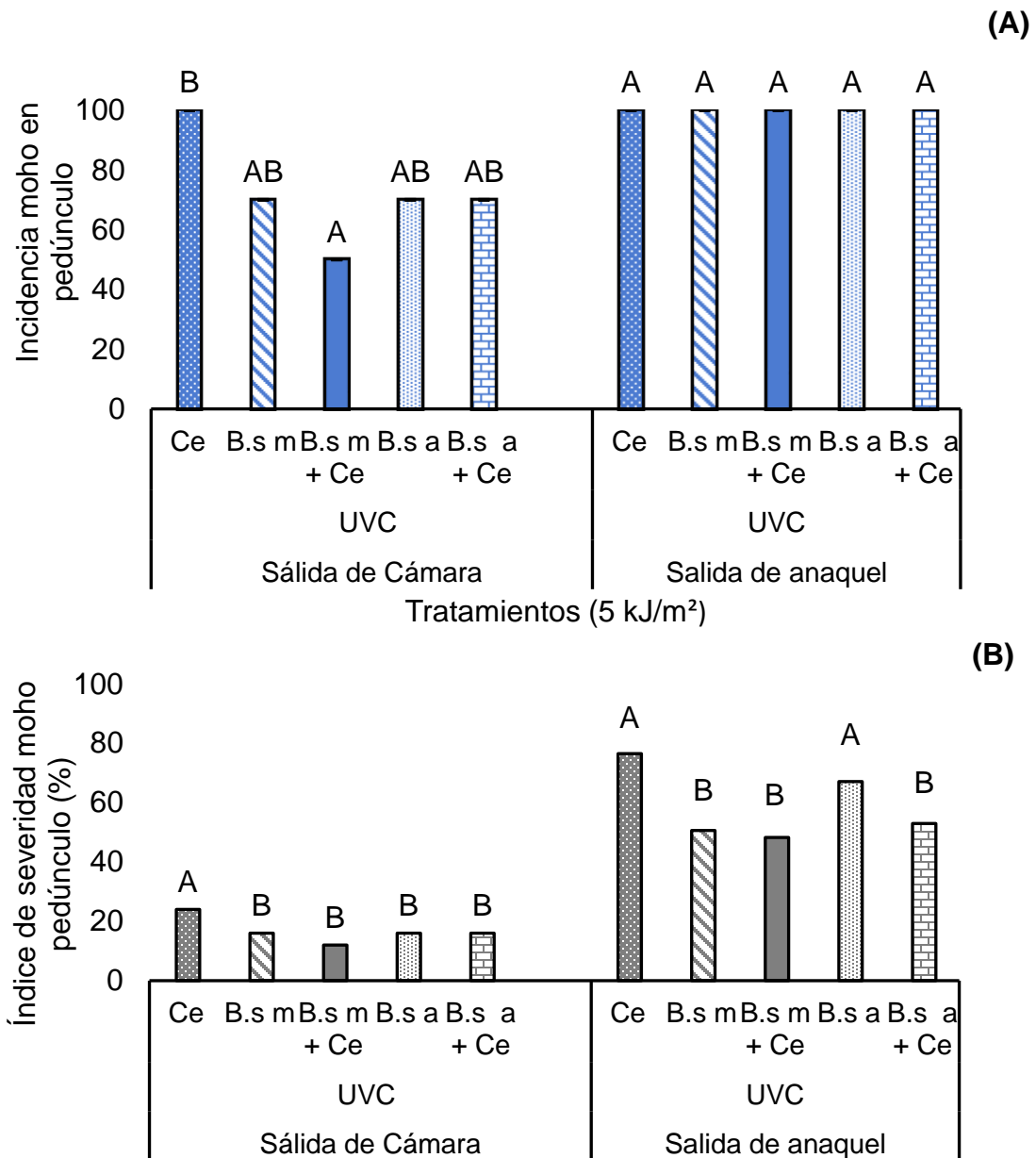


Figura 16. Porcentaje de incidencia (A) e índice de severidad (B) de moho en pedúnculo con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *B. subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con una letra distinta en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

En cuanto al porcentaje de moho en corona a salida de cámara fría (Cuadro 12) el tratamiento UV-C + *B.s m* +Ce presentó la menor incidencia y con diferencias significativas con respecto al tratamiento UV-C + Ce, pero no fue diferente con los otros tratamientos. En cuanto a la salida de anaquel (Cuadro 12) la incidencia aumentó en todos los tratamientos hasta alcanzar el 100%.

Cuadro 12. Incidencia de moho en la corona con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *B. subtilis* (*B.s*) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos		Moho en corona	
Dosis UV-C	Combinación	Salida de frío (7° C)	Salida de anaquel (18°C)
		% incidencia	
5 kJ/m ²	Ce	95,00 (±0,05) B	100,00 (±0,00)
	<i>B.s m</i>	80,00 (±0,09) AB	100,00 (±0,00)
	<i>B.s m</i> + Ce	55,00 (±0,11) A	100,00 (±0,00)
	<i>B.s al</i>	85,00 (±0,08) AB	100,00 (±0,00)
	<i>B.s a</i> +Ce	90,00 (±0,07) AB	100,00 (±0,00)
	Valor de p		0,0141

Medias con una letra distinta en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis para incidencia y DGC para severidad ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

En el caso del número de hojas afectadas por moho en corona a salida de cámara fría (Figura 17), se encontró que el tratamiento UV-C + *B.s m* + Ce presentó el menor promedio de afectación con 1,3% y fue estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Para vida en anaquel no se observaron diferencias entre los tratamientos.

En cuanto a la variable de quema de hojas de la corona (Anexo 5) tanto a salida de frío como a salida de anaquel ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas. Cabe mencionar que tanto en incidencia como en severidad las coronas de los frutos que recibieron el tratamiento UV-C + Ce presentaron una tendencia a menor daño en las hojas.

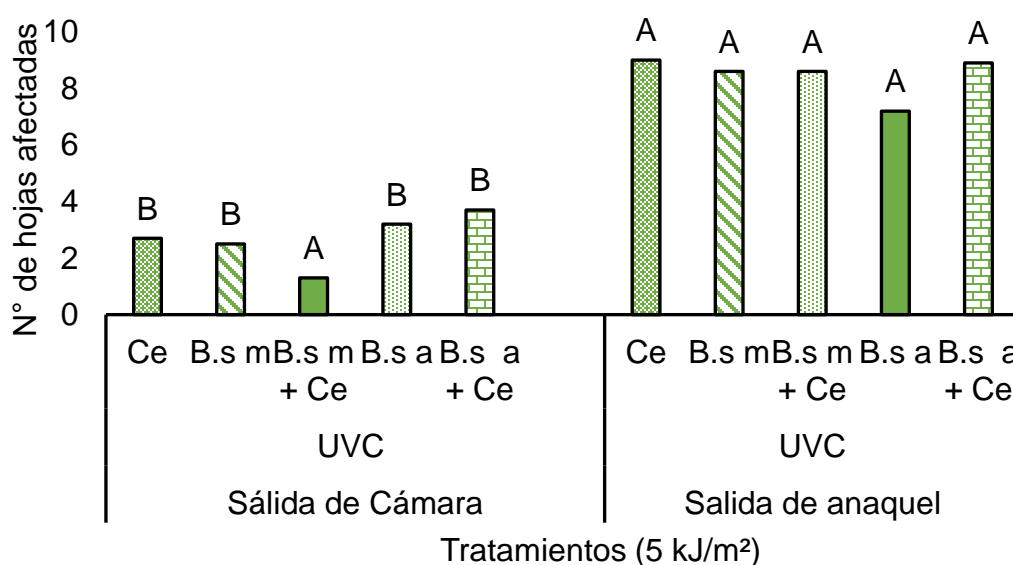


Figura 17. Número de hojas de la corona afectadas por moho con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C y más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con una letra distinta entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba DGC ($p < 0,05$).

5.2.2. Variables de calidad: firmeza interna, externa y brix

En la variable de resistencia a la penetración externa de la cáscara (Figura 18) se observa un valor mayor de la firmeza en los tratamientos UV-C + Ce, UV.C + *B.s* m con y sin cera y un promedio menor en los tratamientos con la dosis alta (50 ml/l) del controlador biológico con diferencias significativas entre los tratamientos. La combinación UV-C + Ce presentó el mayor promedio con 46,35 newtons (N), mientras que el tratamiento combinado UV-C + *B.s* m + Ce obtuvo un 38,1 N de firmeza externa. Las dosis medias de *Bacillus* y UV-C + Ce fueron diferentes significativamente con respecto a los tratamientos con la dosis alta.

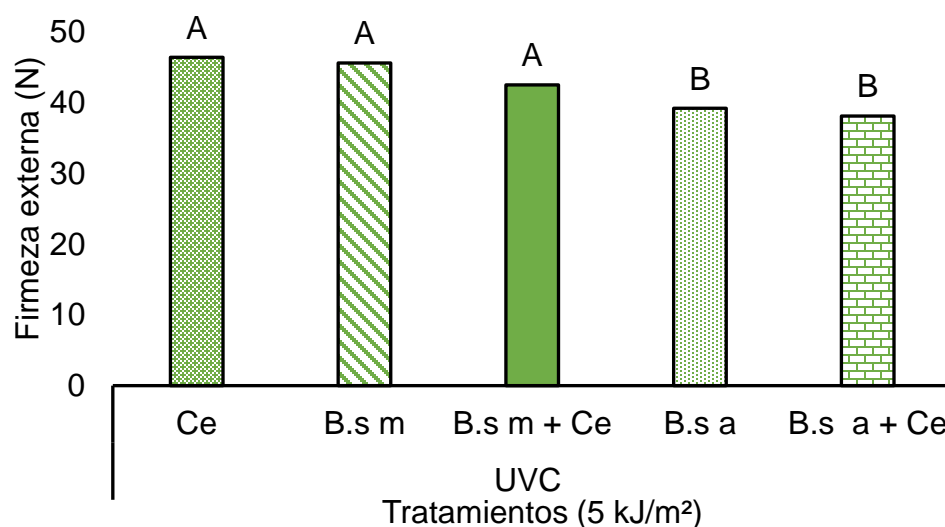


Figura 18. Firmeza externa con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s* m = *B. subtilis* media, *B.s* a = *B. subtilis* alta. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias ($p < 0,05$).

Para la variable de firmeza interna se observó un comportamiento inverso a la firmeza externa (Figura 19), dado que los tratamientos (UV-C + Ce y UV-C + *B.s* m)

presentaron promedios menores ambos con 6,2 N, mientras que el tratamiento combinado UV-C + *B.s m* + Ce y los dos tratamientos con el controlador a dosis alta presentaron promedios más altos 6,7- 7,1 y 7,3 N respectivamente. Cabe señalar que el tratamiento UV-C + *B.s m* + Ce presentó un comportamiento consistente ya que tanto en la firmeza externa como en la interna mostró una menor pérdida de resistencia a la penetración, a diferencia de los demás tratamientos. Además, se observó que a mayor dosis de *Bacillus*, mayor promedio en firmeza interna pero menor firmeza externa. Por otro lado, el tratamiento UV-C + *B.s m*, si mostró una menor firmeza interna, en comparación cuando se usó la misma dosis, pero complementado con la cera en los frutos de piña.

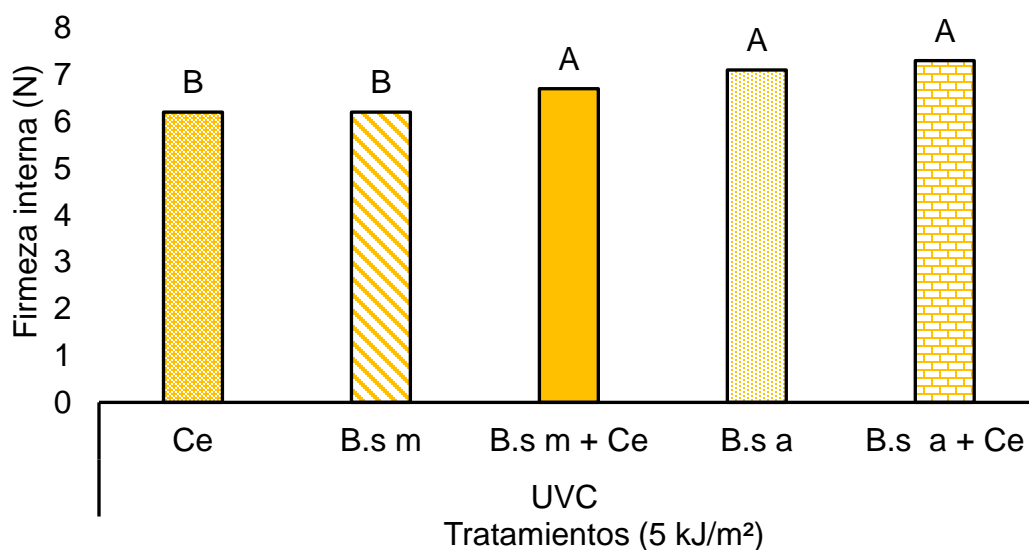


Figura 19. Firmeza interna con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C) más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

En cuanto al porcentaje de sólidos solubles o brix se logró identificar que el tratamiento UV-C + Ce presentó un mayor promedio de azúcares en los frutos de

piña (Figura 20) con un 14,4%, siendo significativamente diferente con respecto a los demás tratamientos en que fueron aplicados el controlador *B. subtilis*. El tratamiento en que se combinó UV-C + *B.s m* + Ce presentó el menor promedio 12,6%, sin embargo, este no fue significativamente diferente con los otros tratamientos.

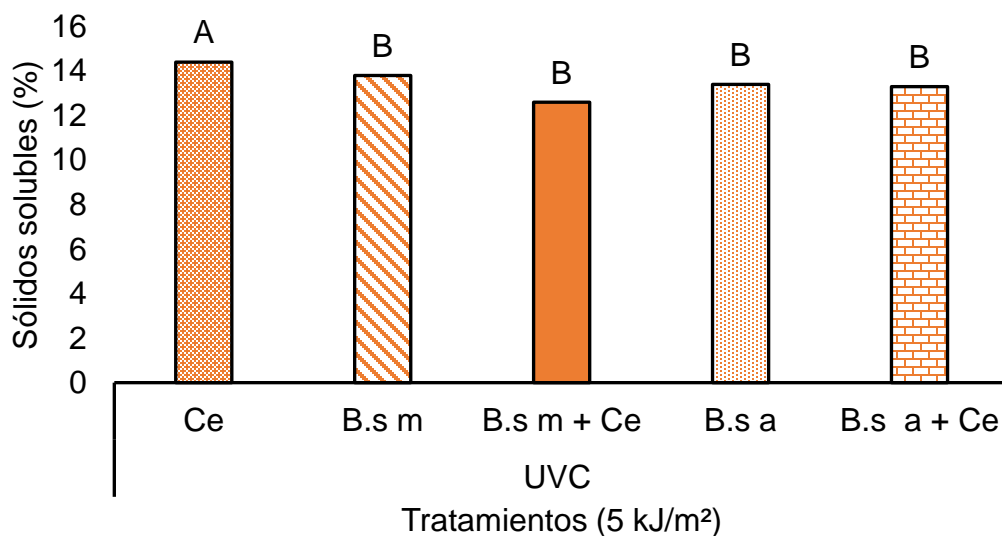


Figura 20. Porcentaje de sólidos solubles con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² UV-C más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis media*, *B.s a* = *B. subtilis alta*. Medias con una letra distintas son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

5.2.3. Variables de color CIELAB con colorímetro, color visual con escala, acidez y DPA.

En cuanto a las evaluaciones de color en los frutos de piña, el color CIELAB medido con colorímetro que incluye los componentes L*, a* y b* no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Los promedios para L* y b* fueron muy similares entre los tratamientos (Anexo 7).

La variable de color visual medida utilizando la escala comercial mostró que los tratamientos UV-C + Ce y UV-C + *B.s m* presentaron los menores índices de color 5,8 y 6,25% respectivamente a salida de cámara y 7,35- 8,58% a salida de anaquel (Figura 21), mientras que los tratamientos con la mayor dosis de *Bacillus* muestran un mayor índice de color tanto a salida de cámara fría como de anaquel. Hubo un mayor avance de color externo en los tratamientos en que se aplicó la dosis alta de *B. subtilis*.

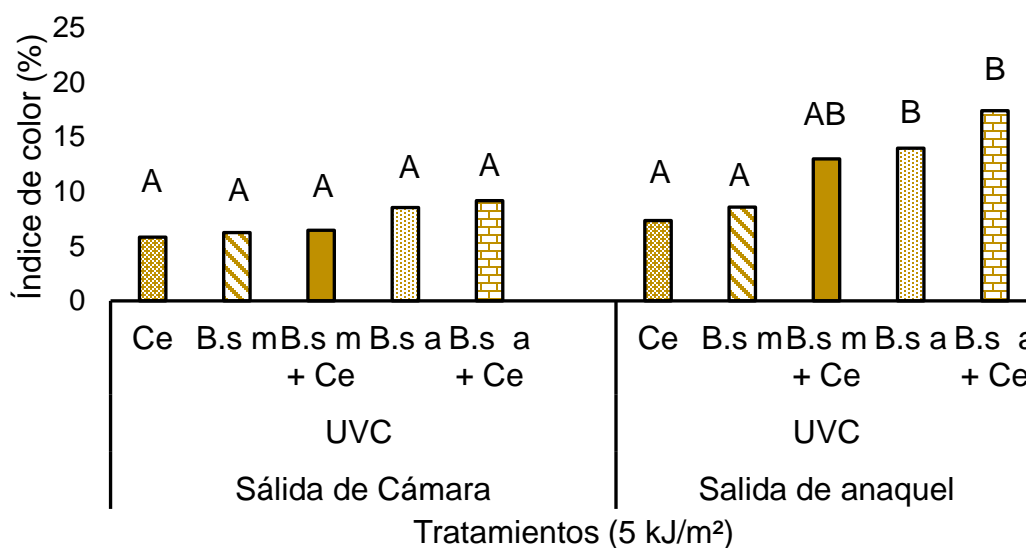


Figura 21. Efecto de la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis media y alta sobre el índice de color escala después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis media*, *B.s a* = *B. subtilis* alta. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

La acidez de la fruta de piña a salida de anaquel no presentó diferencias significativas para ninguno de los tratamientos (Anexo 6). En cuanto a la variable de deshidratación parcial de las aristas (DPA, Cuadro 13) a salida de cámara fría los tratamientos no presentaron ninguna diferencia significativa entre ellos, tanto para la incidencia como para la severidad de DPA, sin embargo, a la salida de anaquel el tratamiento en el que se aplicó la dosis alta de *Bacillus* sin cera presentó

un aumento de deshidratación presentando estadísticamente diferencias con respecto a los otros tratamientos.

Cuadro 13. Incidencia y severidad del DPA de tratamientos con 5 kJ/m² de UV-C y el controlador biológico *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos		DPA			
Dosis UVC	Combinación	Salida de cámara (7°C)		Salida de anaquel (18°C)	
		% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad
5 kJ/m ²	Ce	25,79 (±3,92) A	9,99 (±1,32) A	54,12 A (±3,44)	32,75 (±2,70) A
	<i>B.s m</i>	27,50 (±3,76) A	13,33 (±1,65) A	61,18 A (±6,58)	39,41 (±2,79) A
	<i>B.s m</i> + Ce	24,21 (±4,35) A	10,17 (±1,43) A	59,41 A (±6,15)	39,02 (±2,89) A
	<i>B.s a</i>	32,5 (±4,58) A	16,25 (±1,75) A	75,88 B (±4,29)	56,67 (±3,03) B
	<i>B.s a</i> + Ce	27,5 (±4,58) A	11,39 (±1,47) A	56,47 A (±3,53)	39,22 (±2,99) A
	Valor de p	0,7030	0,0616	0,0110	0,0001

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativas entre si según prueba Kruskal Wallis (p< 0,05). Error estándar entre paréntesis.

La cantidad de fenoles totales analizada fue estadísticamente significativa en los tejidos de cáscara y corona. En cuanto a la cáscara los tratamientos UV-C + *B.s a*, UV-C + *B. s a* + Ce y UV-C + *B.s m* presentaron mayores concentraciones de fenoles totales con 9,39 - 8,34 y 7,89 mg/g respectivamente, siendo diferentes con respecto al tratamiento con UV-C + *B.s m* + Ce el cual presentó el menor contenido de fenoles correspondiente a un 5,39 mg/g. Además, el contenido de fenoles totales del tratamiento UV-C + Ce no fue diferente al de UV-C + *B.s* sin cera y UV-C + *B.s a* + Ce (Cuadro 14).

En la corona el tratamiento UV-C + Ce presentó el mayor promedio de fenoles 2,12 mg/g, siendo diferente estadísticamente solo con respecto al tratamiento UV-C +

B.s a sin cera el cual presentó 1,34 mg/g de fenoles totales. Los contenidos de fenoles en los tejidos de pedúnculo y pulpa no presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 14. Contenido de fenoles correspondientes a cuatro tejidos de frutos de piña en combinación con 5 kJ/m² de UV-C y el controlador biológico *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos Combinados (UVC)	Peso Seco mg/g			
	Cáscara	Corona	Pedúnculo	Pulpa
Ce	7,14 AB	2,12 B	0,76 A	2,30 A
B.s m	7,89 BC	1,52 AB	1,08 A	2,05 A
B.s m + Ce	5,39 A	2,01 B	1,00 A	2,40 A
B.s a	9,39 C	1,34 A	0,76 A	2,66 A
B.s a + Ce	8,54 BC	1,9 B	0,85 A	2,30 A
Valor de p	0,0163	0,0500	0,8048	0,2818

Medias con una letra distinta entre columnas son significativamente diferentes entre sí según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

El tratamiento en que se combinó UV-C con la dosis de 5 kJ/m² más la dosis media de *Bacillus* más cera (*B.s m + Ce*), presentó una serie de respuestas positivas en variables asociadas con enfermedades y con la calidad de la piña. Este tratamiento mostró la menor incidencia y severidad de moho en pedúnculo y en lo referente a moho en corona durante el almacenamiento en frío. Además, mostró valores de firmeza externa e interna altos, sin embargo, presentó un menor valor en sólidos solubles, pero sin diferencias significativas en relación con el comportamiento de los tratamientos que también recibieron aplicaciones de UV-C + *B. subtilis*. Debido a que se lograron varias respuestas de interés en los relativo al combate de enfermedades y mantenimiento de calidad de la piña se definió como el mejor tratamiento para el tercer ensayo y ser comparado con el tratamiento comercial.

5.3. Aislamientos de poblaciones de hongos, levaduras y bacterias.

5.3.1. Segundo ensayo

Al evaluar la cantidad de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras y bacterias, sin ningún tratamiento se encontraron los siguientes datos: 0,00; 3,082; 0,2611 UFC respectivamente. En los aislamientos de tejidos del pedúnculo en el medio de cultivo, se encontró que los tratamientos combinados UV-C + *B.s* con la dosis media y alta más cera del controlador presentaron una menor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) para los hongos y bacterias tanto a las 24 horas como a salida de cámara, siendo significativo en la última evaluación (Cuadro 15). A salida de frío el tratamiento UV-C + *B.s* m + Ce presentó 0,56 UFC.m⁻¹ y el tratamiento UV-C + Ce un 2,05 UFC.m⁻¹. Estos resultados de recuperación de UFC concuerdan con lo encontrado para el índice de severidad de moho en el pedúnculo, estos mismos tratamientos fueron los de menor severidad de la enfermedad a la salida de cámara (Figura 15).

Las levaduras presentaron diferencias significativas tanto a las 24 horas como en el momento de salida de cámara fría, el tratamiento UV-C + Ce presentó en ambas evaluaciones la mayor cantidad de colonias con 3,64 y 3,39 UFC respectivamente, mientras que el tratamiento *B.s* a + Ce mostró la menor cantidad de colonias de levaduras con un 2,47 UFC.m⁻¹ (Cuadro 15).

Las bacterias alcanzaron mayor presencia de colonias en el tratamiento UV-C + Ce con 2,20 UFC.m⁻¹, sin embargo, las poblaciones se redujeron a la salida de cámara fría. Por otro lado, el *Bacillus* mostró mayor cantidad de colonias a las 24 horas tanto en cáscara como en pedúnculo, siendo efectivamente mayor en los tratamientos a los cuales se les aplicó en conjunto con cera. A salida de cámara fría no se encontraron diferencias, pero se evidenció la presencia del controlador en los tratamientos en que este fue aplicado, esto se comprobó en los conteos de las UFC realizados en los aislamientos a partir del pedúnculo de la piña. Los tratamientos UVC + *B.s* m y UV-C + *B.s* a ambos sin cera presentaron un mayor número de UFC.

En el anexo 9 se puede observar la presencia del controlador a salida cámara fría después de 21 días de almacenamiento de frutos de piña, lo que señala que este microorganismo puede sobrevivir a bajas temperaturas.

Cuadro 15. Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en el pedúnculo de frutos de piña en diferentes momentos de evaluación. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos	Hongos (Log ₁₀ x+1)		Levaduras (Log ₁₀ x+1)		Bacterias (Log ₁₀ x+1)		<i>Bacillus</i> (Log ₁₀ x+1)	
	24 H	SC	24 H	SC	24H	SC	24H	SC
Ce	1,01 (±0,32) A	2,05 (±0,12) C	3,64 (±0,07) C	3,39 (±0,13) C	2,20 (±0,45) B	0,49 (±0,33) A	0,41 (±0,41) A	0,00 (±0,00) A
<i>B.s me</i>	1,06 (±0,55) A	1,30 (±0,26) AB	3,43 (±0,27) BC	2,96 (±0,28) ABC	0,45 (±0,45) A	0,00 (±0,00) A	2,24 (±0,16) AB	2,05 (±0,41) A
<i>B.s me</i> + Ce	0,17 (±0,17) A	0,56 (±0,25) A	3,14 (±0,07) AB	3,39 (±0,07) BC	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	3,69 (±0,09) C	1,39 (±0,56) A
<i>B.s a</i>	1,03 (±0,39) A	1,94 (±0,16) BC	3,05 (±0,08) A	2,95 (±0,17) AB	1,17 (±0,17) A	0,00 (±0,00) A	2,89 (±0,59) BC	1,88 (±0,49) A
<i>B.s a</i> + Ce	0,17 (±0,17) A	0,85 (±0,31) A	2,86 (±0,21) A	2,47 (±0,32) A	0,35 (±0,22) AB	0,00 (±0,00) A	3,42 (±0,31) C	1,45 (±0,58) A
p valor <0,05	0,1608	0,0001	0,0051	0,0149	0,0095	0,0851	0,0010	0,0571

24H: Evaluación realizada 24 horas después de aplicados los tratamientos.

SC: Evaluación realizada al finalizar el periodo de almacenamiento a 7°C.

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis (p < 0,05). Error estándar entre paréntesis.

Al evaluar la cantidad de UFC a nivel de cáscara la carga inicial de hongos, levaduras y bacterias fue de 0,434; 0,454; 2,96 UFC. Se recuperaron menores cantidades de hongos a las 24 horas después de aplicados los tratamientos en las piñas con UV-C + *Bs a* y UV-C + *B.s a* + Ce con la dosis alta del controlador con 1,80 y 1,33 UFC.m⁻¹ respectivamente, mientras que a la salida de cámara fría fue con la combinación en que se usó la dosis media de *Bacillus* más cera (Cuadro 16).

En cuanto a las levaduras a las 24 hrs el tratamiento con UV-C + *B.s a* + Ce presentó el mayor promedio con 3,24 UFC y fue diferente al resto de tratamientos;

entre el resto los resultados obtenidos fueron muy similares. En el momento de salida de la cámara, si bien no se encontraron diferencias significativas, la menor cantidad se observó en el tratamiento donde se combinó UV-C + *B.s a* + Ce.

Al finalizar las poblaciones de bacterias la cantidad de colonias fue estable para ambas evaluaciones y sin diferencias significativas entre los tratamientos. La presencia de *Bacillus* fue significativa a las 24 horas, con mayor presencia en los tratamientos en que se aplicó dosis media y alta. A salida de cámara fría la mayor cantidad de UFC de *Bacillus* correspondió a los tratamientos en que se aplicó la dosis alta, en donde la dosis alta con cera fue estadísticamente diferente con respecto a los demás tratamientos, pero no diferente con la dosis alta sin cera.

Cuadro 16. Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en la cáscara de frutas de piña en diferentes momentos de evaluación. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos	Hongos (Log ₁₀ x+1)		Levaduras (Log ₁₀ x+1)		Bacterias (Log ₁₀ x+1)		<i>Bacillus</i> (Log ₁₀ x+1)	
	24 H	SC	24H	SC	24H	SC	24H	SC
Ce	2,55 (±0,04) B	1,73 (±0,27) AB	2,55 (±0,19) A	2,00 (±0,23) A	0,89 (±0,40) A	0,44 (±0,23) A	1,96 (±0,65) A	0,68 (±0,45) A
<i>B.s me</i>	2,25 (±0,25) AB	0,72 (±0,26) AB	2,35 (±0,15) A	1,49 (±0,28) A	0,64 (±0,29) A	0,00 (±0,00) A	3,67 (±0,11) B	1,71 (±0,46) A
<i>B.s me</i> + Ce	2,48 (±0,11) B	0,95 (±0,26) A	2,75 (±0,21) A	1,63 (±0,27) A	0,99 (±0,33) A	0,00 (±0,00) A	2,58 (±0,82) B	2,16 (±0,44) AB
<i>B.s a</i>	1,80 (±0,13) A	1,88 (±0,32) BC	2,89 (±0,06) A	1,38 (±0,31) A	0,88 (±0,29) A	0,12 (±0,12) A	3,82 (±0,07) B	2,90 (±0,38) BC
<i>B.s a</i> + Ce	1,33 (±0,45) A	0,94 (±0,30) ABC	3,24 (±0,11) B	0,92 (±0,21) A	0,46 (±0,46) A	0,00 (±0,00) A	3,51 (±0,39) AB	3,38 (±0,22) C
p valor <0,05	0,0059	0,0345	0,0043	0,0692	0,6371	0,0531	0,0219	0,0008

24H: Evaluación realizada 24 horas después de aplicados los tratamientos.

SC: Evaluación realizada al finalizar el periodo de almacenamiento a 7°C.

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis (p< 0,05). Error estándar entre paréntesis.

5.4. Ensayo 3. Efecto de UV-C sola y en combinación con controlador biológico *Bacillus subtilis* en el combate del moho en el pedúnculo en comparación con el tratamiento comercial en poscosecha de frutos de piña. Tratamiento seleccionado en el segundo ensayo.

5.4.1. Variables de incidencia, severidad de moho en pedúnculo, corona y quema en la corona en frutos de piña

El desarrollo del moho en el pedúnculo del fruto de piña resultó bajo durante los primeros 15 días de almacenamiento a 7°C de entrada a cámara (DEC), sin embargo, continuó aumentando aun cuando la piña se mantuvo en frío, lo que se evidenció en los resultados de la evaluación a salida de cámara que correspondió a 40 días de almacenamiento en frío a 7°C (Figura 22 A).

La variable de incidencia de moho en pedúnculo tuvo un comportamiento similar a lo largo de los tres ensayos, aumentando casi al 100% a salida de anaquel. En la Figura 22 A, en la evaluación del día 15 de almacenamiento en cámara fría, el tratamiento químico comercial presentó un 4% de presencia de moho, mostrando diferencias significativas con respecto al testigo en el que se registró un 31% de frutos afectados. En el caso del tratamiento en que se combinó UV-C + *B.s m* + *Ce*, la incidencia fue de 14%, sin embargo, no se diferenció estadísticamente del testigo. A salida de cámara fría el tratamiento químico presentó la menor incidencia de moho siendo diferente estadísticamente con los otros tratamientos, mientras que a salida de anaquel ningún tratamiento fue diferente.

En cuanto al índice de severidad de moho en el pedúnculo el tratamiento químico presentó el menor porcentaje de moho en el pedúnculo a lo largo de las dos últimas evaluaciones, siendo estadísticamente diferente con respecto al testigo y al tratamiento combinado (Figura 22 B). En la evaluación del día 15 el tratamiento químico comercial no fue diferente con respecto al testigo y con el tratamiento UV-C + *B.s m* + *Ce*. A salida de cámara fría y de anaquel el testigo y el tratamiento combinado presentaron un aumento de presencia de moho con porcentajes cercanos al 100%, mientras el tratamiento químico fue diferente a los otros tratamientos con un 29,5% de severidad en los frutos de piña a anaquel.

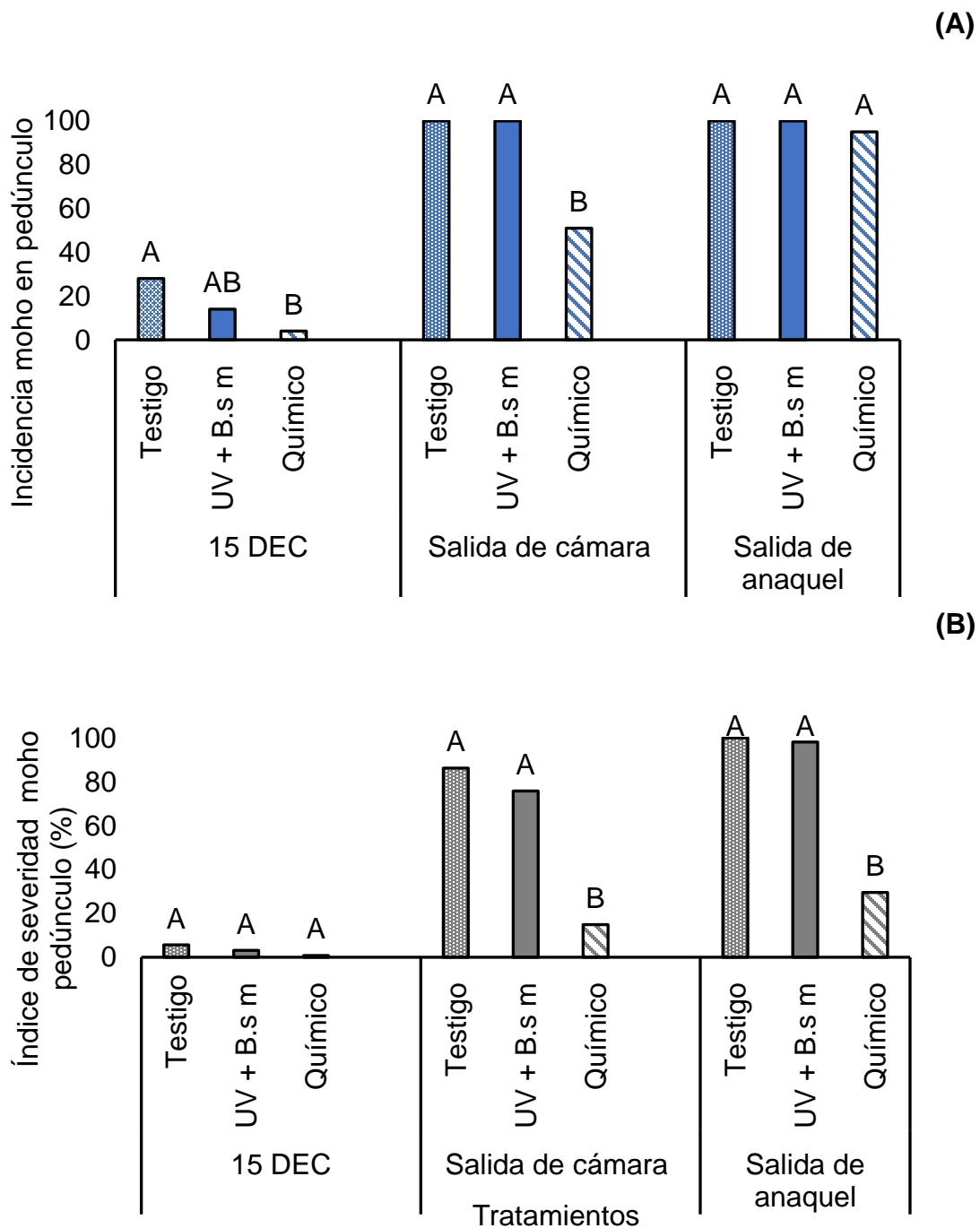


Figura 22. Incidencia (A) e índice de severidad (B) de moho en pedúnculo a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (3 días a 18°C) de frutos de piña. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente entre si según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

La variable de porcentaje de incidencia de moho en corona (Figura 23 A) no mostró diferencias entre tratamientos durante la evaluación del día 15 de entrada a cámara fría, ni en la evaluación de salida de anaquel del día 43 de almacenamiento, en donde casi un 100% de los frutos presentaron desarrollo de moho en la corona. A salida de cámara fría el tratamiento químico presentó una menor presencia de moho en la corona siendo diferente con respecto al testigo y al tratamiento combinado.

Para la variable de número de hojas afectadas por moho en la corona en la primera etapa de evaluación, no se presentaron diferencias entre los tratamientos. Durante la segunda evaluación a salida de cámara fría el testigo y UV-C + *B.s* presentaron 3 y 4 de hojas con moho en las hojas sin diferencias entre ellos (Figura 23 B), pero si con el químico comercial. A salida de anaquel, el tratamiento UV-C + *B.s* mostró un aumento de moho con 23 de hojas afectadas. Además, el tratamiento químico comercial presentó la menor cantidad de afectación de moho con cuatro hojas en promedio, siendo distinto a los otros tratamientos.

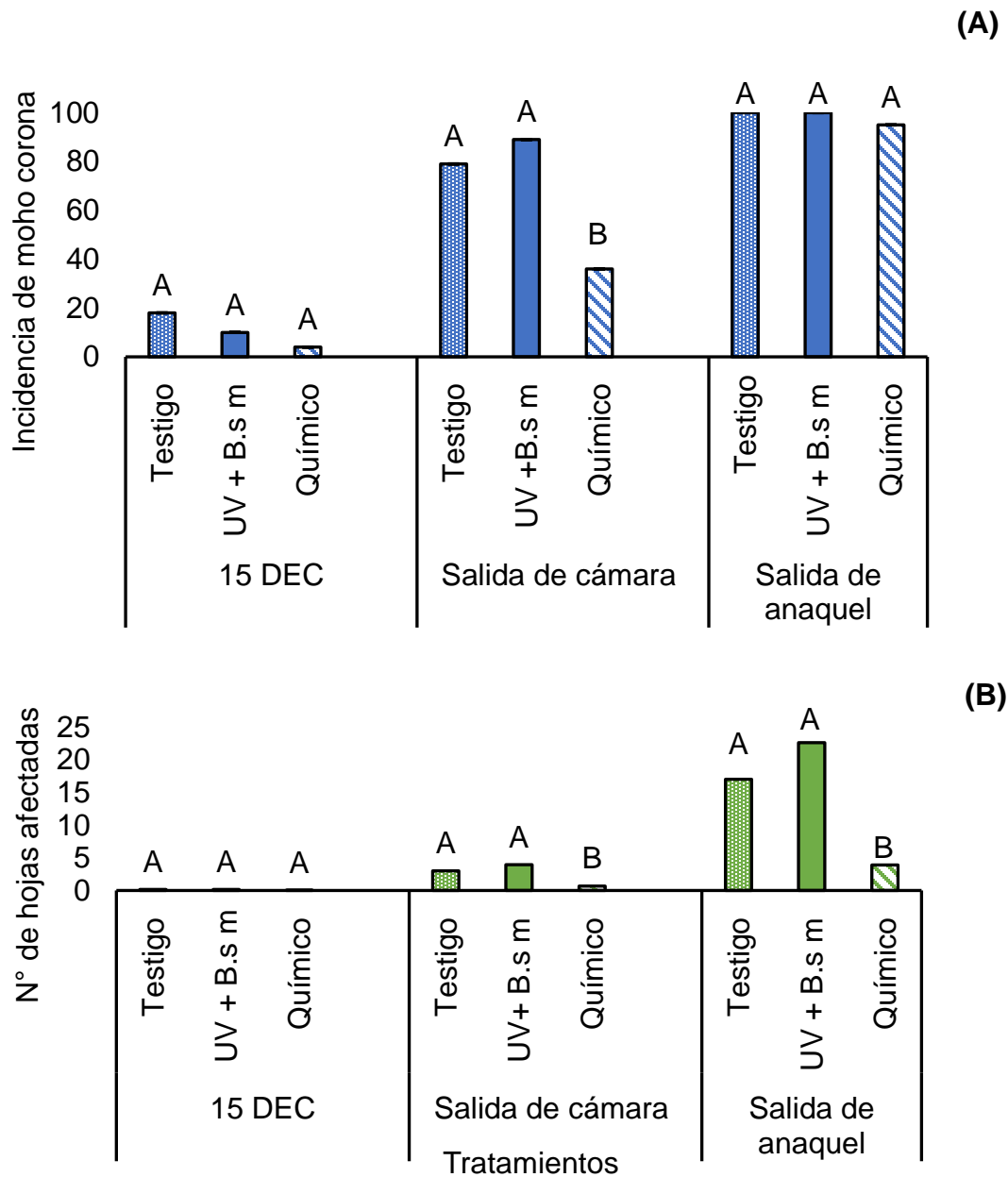


Figura 23. Incidencia (A) y número de hojas afectadas (B) por moho en corona a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C) de frutos de piña. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente entre si según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

La variable quema de corona (Anexo 11) no presentó diferencias significativas a lo largo de las tres evaluaciones en los frutos de piña, el tratamiento aplicado con UVC presentó un pequeño aumento de daño por quema posiblemente por ser el tratamiento expuesto a la radiación ultravioleta, con 3,38% de severidad a la salida de cámara fría.

5.4.2. Variables de calidad: firmeza externa, interna, brix y acidez de frutos de piña.

Para la variable de firmeza externa se observó un comportamiento estable en las frutas durante los primeros 15 días de almacenamiento en frío a 7°C (Figura 24). A la salida de anaquel con el cambio de temperatura que se hizo a la salida de almacenamiento en frío pasando la fruta de 7°C a 18°C el tratamiento químico comercial obtuvo la mayor firmeza con 50 N, mientras que tanto el testigo y el tratamiento combinado obtuvieron 44 N de firmeza, en consecuencia, el tratamiento químico presentó diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos (Figura 24).

En cuanto a la firmeza interna, la piña con UVC + B.s presentó los mayores valores en la primera evaluación con 10 N siendo significativamente diferente a los demás tratamientos (Figura 25), no obstante, en las otras dos evaluaciones la firmeza fue disminuyendo. A la salida de cámara fría no se presentaron diferencias entre los tres tratamientos, mientras que a salida de anaquel la fruta con el tratamiento combinado obtuvo la menor firmeza con 5,1 N siendo diferente al testigo (6,4 N) y al químico comercial (7,2 N).

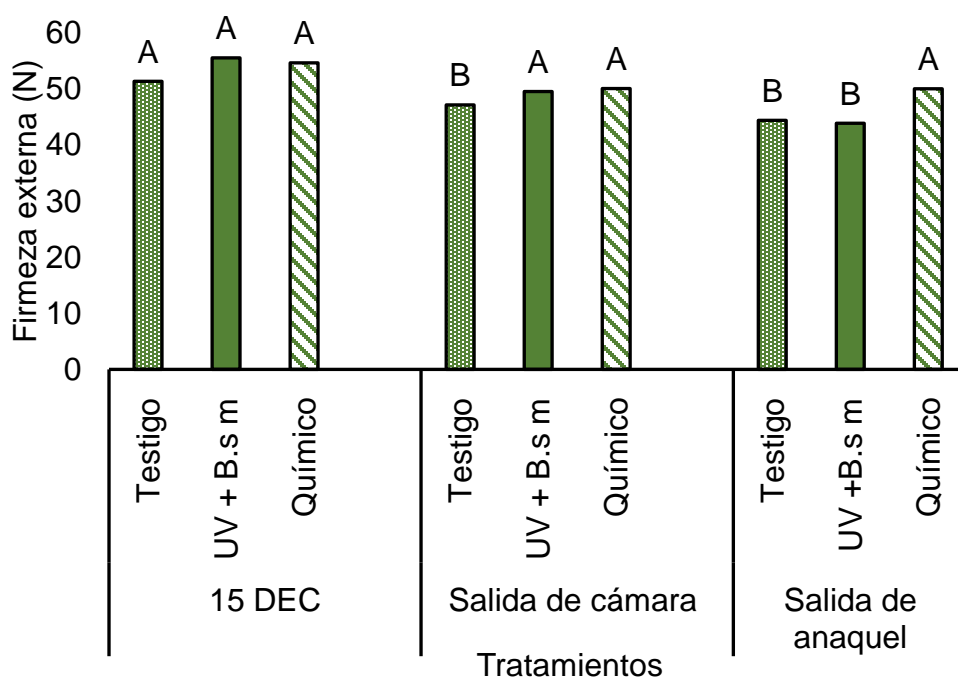


Figura 24. Firmeza externa de frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + B.s m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

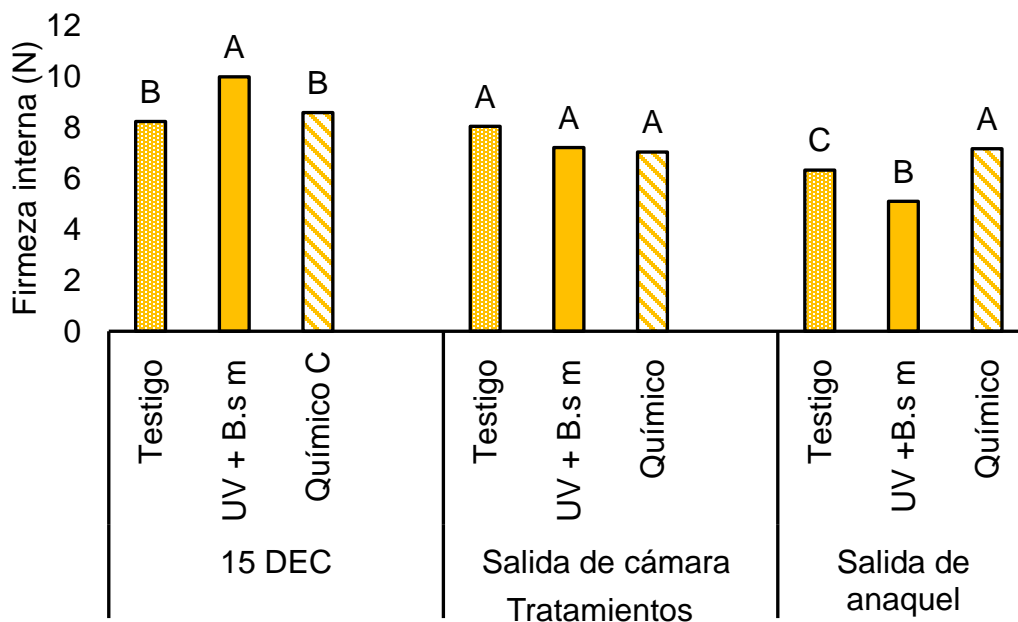


Figura 25. Firmeza interna en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + B.s m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con una letra distinta en cada etapa son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

Para las variables de brix y acidez titulable (Anexo 12) no se presentaron diferencias entre los tratamientos.

5.4.3. Variables de calidad de color CIELAB, color visual evaluado con escala y DPA.

La variable de color relativa a la componente b^* no mostró diferencias entre los tratamientos (Anexo 13). En cuanto a los valores de a^* (Figura 26) correspondiente al viraje de color de verde a rojo, a salida de cámara fría no se presentaron diferencias entre los tratamientos, al finalizar el periodo de anaquel el tratamiento químico obtuvo el menor avance de color hacia rojo con un 1,33 mientras que tanto el testigo como el tratamiento combinado presentaron un 3%, siendo el tratamiento químico diferente con respecto a los otros tratamientos. También la variable L^* a

diferencia de lo encontrado en los primeros dos ensayos, presentó diferencias a salida de cámara fría, en donde el tratamiento químico presentó un 23,79 de luminosidad siendo significativamente diferente al testigo y al tratamiento combinado. A salida de anaquel no se presentaron diferencias entre los tratamientos (Figura 27).

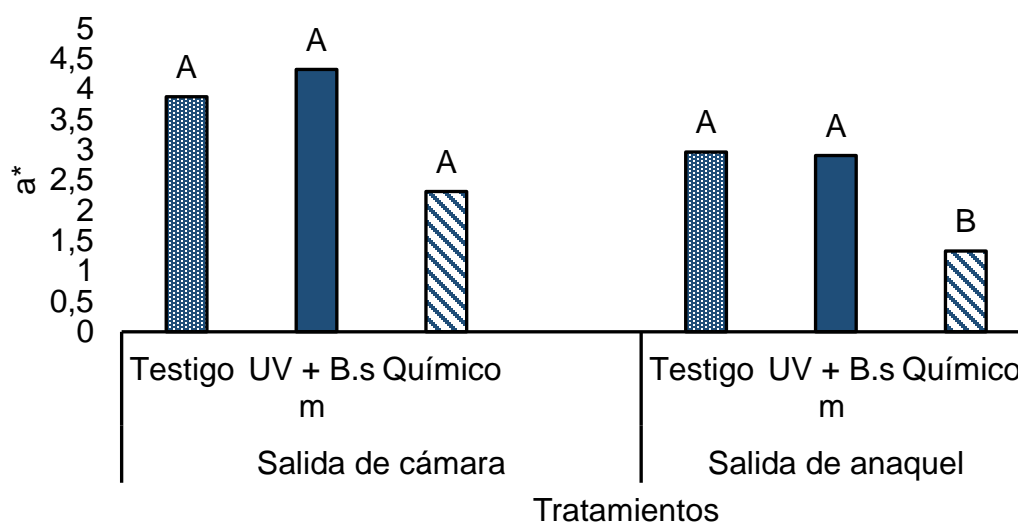


Figura 26. Variable a^* en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

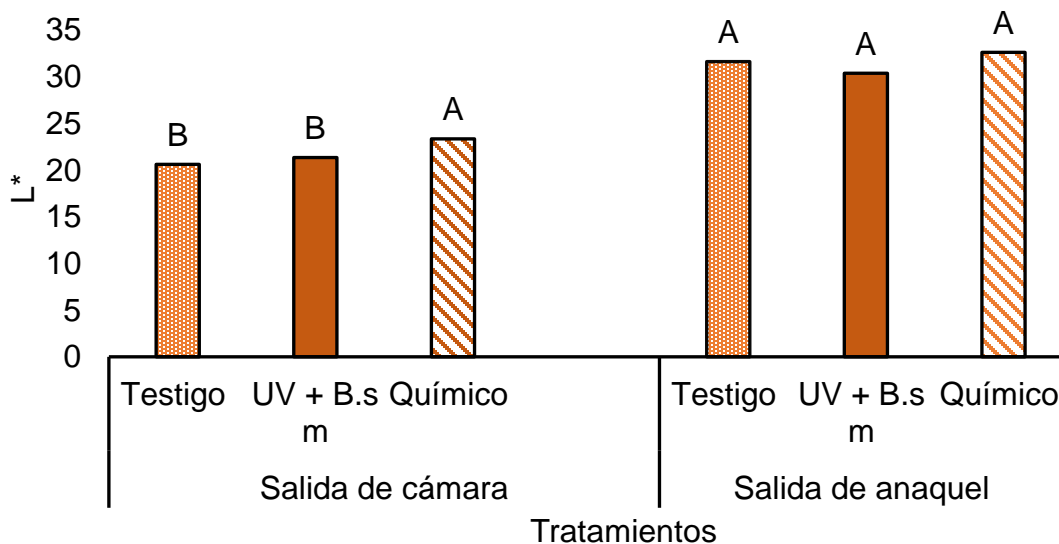


Figura 27. Variable L* de frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

De acuerdo con lo que se observa en la Figura 28 el porcentaje de índice de color evaluado visualmente con escala al día 15 de almacenamiento muestra que las frutas estaban con un mismo color en esa etapa del ensayo. A salida de cámara fría el tratamiento con la aplicación de UV-C + *B.s* presentó un aumento en el avance de color de la fruta con un 30%, siendo significativamente diferente con respecto al tratamiento testigo y el químico, ambos con un 25%. En la última evaluación a salida de anaquel, el testigo y el tratamiento combinado no fueron diferentes entre sí, con un aumento en el avance de color hacia amarillo, el primero con un 35% y el segundo 38%. El tratamiento químico comercial presentó un 30% de índice de color, siendo diferente al tratamiento con UV-C + *B.s*.

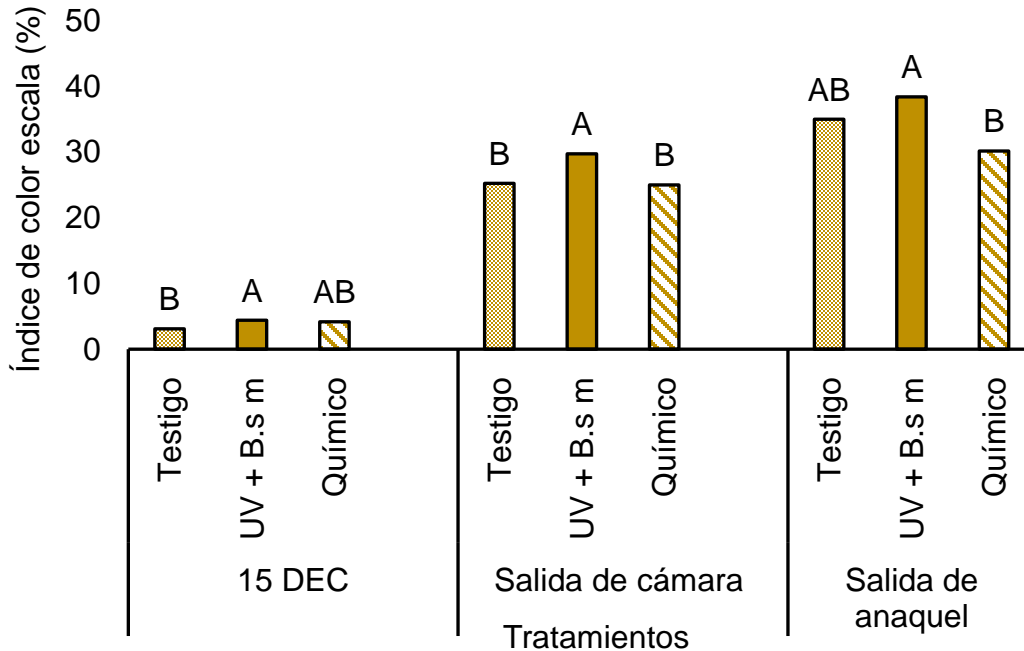


Figura 28. Porcentaje de índice de color evaluado con escala de frutos de piña los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + B.s m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a. Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

En lo correspondiente a la variable DPA en los frutos de piña (Cuadro 17) se evidenció en la evaluación del día 15 de entrada a almacenamiento frío (DEC) que el tratamiento combinado presentó un 6% de incidencia siendo diferente con respecto al testigo y al tratamiento químico comercial, en donde ambos obtuvieron un 5% de DPA. Para las dos siguientes evaluaciones, las piñas con los tratamientos combinado y testigo registraron la mayor incidencia tanto para la salida de cámara fría como para anaquel, los tratamientos no presentaron diferencias entre ellos, pero cabe resaltar que se ve un aumento de incidencia con la acumulación de días en almacenamiento de las frutas, ya que a salida de anaquel las frutas tenían 43 días de almacenamiento.

En el caso de la severidad de DPA a los 15 días de almacenamiento el tratamiento combinado presentó el mayor porcentaje de deshidratación siendo diferente con los demás tratamientos. A lo largo de las dos últimas evaluaciones el tratamiento combinado mantuvo una mayor severidad no siendo diferente al testigo a salida de cámara fría, pero si con respecto al químico comercial. En el momento de salida de anaquel el tratamiento UV + *B.s* m + Ce presentó la mayor severidad y fue diferente estadísticamente con los otros tratamientos.

Cuadro 17. Incidencia de DPA en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s* m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamiento	DPA					
	15 DEC (7° C)		Salida de frío (7° C)		Salida de anaquel 18°C	
	% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad
Testigo	50,24 (±3,42) B	28,99 (±1,33) B	83,71 (±2,75) A	45,83 (±1,40) A	100,0 (±0,00) A	58,90 (±1,71) B
UVC + <i>B.s</i> m	60,59 (±2,72) A	34,85 (±1,34) A	85,95 (±2,83) A	48,22 (±1,42) A	100,0 (±0,00) A	64,46 (±1,49) A
Químico Comercial	49,61 (±2,88) B	26,93 (±1,31) B	81,79 (±2,52) A	40,17 (±1,25) B	98,6 (±0,78) A	55,40 (±1,34) B
Valor de p	0,0152	0,0065	0,3160	0,0001	0,0695	0,0002

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

En cuanto a los fenoles totales en peso seco (Cuadro 18, en fresco Anexo 14) a diferencia de los ensayos uno y dos en donde los tejidos de corona y cáscara fueron estadísticamente diferentes, en este ensayo el pedúnculo presentó el mayor contenido de fenoles totales 3,06 mg/g para el tratamiento con la aplicación de UV-C + *B.s*, siendo significativamente diferente a los demás tratamientos. Este tratamiento obtuvo mayores valores de fenoles en corona y pulpa, pero no fue estadísticamente diferente con los otros tratamientos.

Cuadro 18. Fenoles totales correspondientes a cuatro diferentes tejidos de frutos de piña expuestos a tres tratamientos. Testigo: solo cera, UV + B.s m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamientos (UVC)	Peso Seco mg/g			
	Cáscara	Corona	Pedúnculo	Pulpa
Testigo	9,93 A	1,54 A	1,01 A	5,68 A
UV-C + B.s m + Ce	9,47 A	1,81 A	3,06 B	6,56 A
Químico	8,33 A	1,50 A	0,65 A	6,38 A
Valor de p	0,7943	0,4636	0,0001	0,2811

Medias con letras diferentes entre columnas son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

5.5. Aislamientos de hongos, levaduras y bacterias

5.5.1. Tercer ensayo

La carga inicial de UFC en pedúnculo de los frutos de piña correspondió a 0,47 de hongos, 1,4023 de levaduras, 0,0694 bacterias y 0,2893 de *Bacillus*. En cuanto a las UFC de hongos para el tejido de pedúnculo (Cuadro 19), se presentaron diferencias entre los tratamientos en la evaluación a los 40 días de salida a cámara (40DSC), en donde el tratamiento químico comercial presentó la menor cantidad 1,16 UFC.m⁻¹ con respecto a un 2,19 y 3 de UFC.m⁻¹ del testigo y del tratamiento combinado.

Las UFC de levaduras a las 24 horas fueron mayores en el tratamiento químico, el que resultó estadísticamente diferente al tratamiento combinado y al testigo, además, a los 40 días los frutos correspondientes al tratamiento testigo presentaron el mayor número de levaduras con un promedio de 3,9 UFC estadísticamente diferente a los resultados obtenidos con los otros dos tratamientos.

Cuadro 19. Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en el pedúnculo de frutos de piña en diferentes momentos de evaluación. Testigo: solo cera, UV + B.s m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamiento	Hongos (Log ₁₀ x+1)			Levaduras (Log ₁₀ x+1)			Bacterias (Log ₁₀ x+1)			<i>Bacillus</i> (Log ₁₀ x+1)		
	24 H	15 DEC	40 DSC	24 H	15 DEC	40 DSC	24 H	15 DEC	40 DSC	24 H	15 DEC	40 DSC
Testigo	0,79 (±0,42) A	0,00 (±0,00) A	2,19 (±0,16) A	2,14 (±0,11) B	2,94 (±0,35) A	3,94 (±0,03) B	0,18 (±0,18) A	0,00 (±0,10) A	0,00 (±0,10) A	0,00 (±0,00) A	0,34 (±0,34) AB	0,00 (±0,10) A
UV + B.s m + Ce	0,00 (±0,00) A	0,26 (±0,18) A	3,00 (±0,08) A	2,37 (±0,38) B	2,43 (±0,28) A	0,38 (±0,27) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	1,20 (±0,40) B	1,32 (±0,39) B	0,81 (±0,32) B
Químico comercial	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	1,16 (±0,37) B	2,93 (±0,11) A	2,93 (±0,11) A	1,09 (±0,52) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,18 (±0,18) A	0,00 (±0,00) A
p valor <0,05	0,0393	0,1253	0,0003	0,0019	0,4848	0,0002	0,3679	sd	sd	0,0029	0,0231	0,0029

24H: Evaluación realizada 24 horas después de aplicados los tratamientos.

15DEC: Evaluación realizada a los 15 días de entrada a cámara fría.

40DSC: Evaluación realizada a los 40 días de estar la fruta almacenada.

Medias con letras distintas entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

En el caso de las bacterias no se presentó crecimiento bacteriano en los periodos de evaluación, a excepción del tratamiento testigo a las 24 horas. En cuanto al *Bacillus*, el tratamiento combinado presentó el mayor promedio de UFC tanto en pedúnculo como en cáscara en las evaluaciones a las 24 H y el día quince de entrada a cámara fría. A los 40 días solo el tratamiento combinado presentó *Bacillus* (Cuadro 19).

En la cáscara la carga inicial de microorganismos de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* recuperados fue de 2,73; 2,89; 0 y 1,41 UFC respectivamente. En el caso de los hongos (Cuadro 20) las UFC fueron estadísticamente menores en el tratamiento químico tanto a las 24 horas como en la evaluación a los 40 días de salida a cámara.

Al evaluar la cantidad de UFC de levaduras a las 24 horas el tratamiento químico presentó una menor recuperación de levaduras con respecto al tratamiento combinado y al testigo, siendo estadísticamente diferente con estos. A los 15 días de entrada a cámara fría no se observan diferencias entre los tratamientos. Por otro lado, a los 40 días se recuperaron levaduras en menor cantidad en el tratamiento combinado y el químico 0,30 y 0,70 UFC.m⁻¹ respectivamente, mientras que la presencia de levaduras en el testigo fue de 4,21 UFC, donde el tratamiento combinado y el químico resultaron diferentes con el testigo.

En cuanto a las bacterias no se presentó crecimiento bacteriano a lo largo de las evaluaciones en ninguno de los tratamientos, a excepción de la evaluación a las 24 horas en el tratamiento testigo. Por otro lado, el *Bacillus* fue recuperado a las 24 horas en el tratamiento combinado siendo diferente con los demás tratamientos. En la evaluación a los 15 días de entrada a cámara fría el tratamiento con el controlador fue estadísticamente diferente respecto al tratamiento químico, pero no así con el testigo, mientras que a los 40 días ningún tratamiento presentó *Bacillus*.

Cuadro 20. Promedio del número de unidades formadoras de colonias de hongos, levaduras, bacterias y *Bacillus* presentes en la cáscara de frutos de piña en diferentes momentos de evaluación. Testigo: solo cera, UV + B.s m = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamiento	Hongos (Log ₁₀ x+1)			Levaduras (Log ₁₀ x+1)			Bacterias (Log ₁₀ x+1)			<i>Bacillus</i> (Log ₁₀ x+1)		
	24 H	15 DEC	40 DSC	24 H	15 DEC	40 DSC	24 H	15 DEC	40 DSC	24 H	15 DEC	40 DSC
Testigo	2,21 (±0,13) B	2,17 (±0,33) A	1,54 (±0,24) B	2,84 (±0,08) B	2,13 (±0,30) A	4,21 (±0,11) B	0,12 (±0,12) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,10) A	0,12 (±0,12) A	0,34 (±0,34) AB	0,00 (±0,00) A
UV + B.s m + Ce	1,62 (±0,29) B	1,15 (±0,31) A	2,20 (±0,04) B	2,96 (±0,22) B	1,81 (±0,27) A	0,30 (±0,30) A	0,00 ±0,00 B	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	1,20 (±0,26) B	1,32 (±0,39) B	0,00 (±0,00) A
Químico comercial	0,49 (±0,20) A	1,94 (±0,40) A	0,28 (±0,19) A	2,69 (±0,09) A	2,32 (±0,32) A	0,70 (±0,47) A	0,00 (±0,00) B	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,18 (±0,18) A	0,00 (±0,00) A
p valor <0,05	0,0006	0,0760	0,0002	0,1361	0,0566	0,0001	0,0001	sd	sd	0,0004	0,0330	sd

24H: Evaluación realizada 24 horas después de aplicados los tratamientos.

15DEC: Evaluación realizada a los 15 días de entrada a cámara fría.

40DSC: Evaluación realizada a los 40 días de estar la fruta almacenada Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis (p< 0,05). Error estándar entre paréntesis.

6. DISCUSIÓN

6.1. Ensayo 1. Determinación de la mejor dosis de UVC sobre el control del desarrollo del moho en frutos de piña y variables de calidad.

6.1.1. Efecto de diferentes dosis de radiación UVC sobre el desarrollo de moho en corona y pedúnculo en frutos de piña.

Con respecto a la aplicación de diferentes dosis de UVC sobre frutos de piña el tratamiento con mayor control en incidencia de moho en la zona del pedúnculo fue la dosis de 25 kJ/m² a salida de cámara fría.

Resultados similares registró Velásquez (2018) en frutos de piña, donde la eficacia de la luz UV-C permitió una reducción de la incidencia de moho durante el periodo de almacenamiento en frío, sin embargo, al igual que en esta investigación durante la vida en anaquel se perdió el efecto y la incidencia aumentó hasta el 100% en todos los tratamientos en el momento en que se incrementó la temperatura de 7°C a 18°C. Ante estos resultados se podría decir que la que juega un papel de impacto ante el desarrollo de moho en el pedúnculo es el cambio de la temperatura para la etapa de anaquel, en donde la irradiación de UVC no parece tener mayor control ante el aumento de temperatura. Un comportamiento similar reportó Ulloa (2017) donde con el cambio de temperaturas en frutos de piña utilizando un rango de 12°C a 15°C observó un crecimiento de moho del 24 al 100%, en frutos tratados con procesos comerciales de lavado, con más tratamiento químico. Además, este aumento de moho podría estar asociado con las especies que han sido caracterizadas dentro del complejo de hongos que afectan al pedúnculo (Castro, 2015), una de estas es *Penicillium* sp. la cual presenta un amplio rango de temperaturas para su crecimiento, siendo las cercanas de 20° a 24°C las óptimas (Yadav *et al.* 2018).

En cuanto a la variable de índice de severidad de moho en el pedúnculo se evidenció un efecto en las tres dosis de 5, 15 y 25 kJ/m² (Figura.12). Al igual que la

variable de incidencia a salida de anaquel con el aumento de temperatura la severidad se incrementa. Las dosis de 5 y 25 kJ/m² fueron las que mostraron un mejor control en comparación con el testigo. De acuerdo con investigaciones realizadas por Cote *et al.* (2013) en fresas y tomates con UVC a una dosis de 4 kJ/m², Lingfei y Yanmin Du (2012) en frutos de pera con tres diferentes dosis de UVC con tres diferentes tiempos 10 min (3,33 kJ m⁻²), 15 min (5 kJ m⁻²) y 20 min (6,67 kJ m⁻²), obtuvieron resultados positivos para el control de *Botrytis.cinerea* y *Penicillium expansum* con dosis bajas entre 4 y 5 kJ/m².

En esta investigación la dosis de 5 kJ/m² mostró tener efecto a salida de cámara con un menor porcentaje de afectación de moho en el pedúnculo de piña, pero no significativa con respecto a las otras dosis de UVC, mostrando que reduce el moho, pero no siendo tan contundente el efecto como en las investigaciones mencionadas. Cabe destacar que en las investigaciones antes descritas se mantuvieron las condiciones de temperatura durante el almacenamiento constantes, no se hace el cambio de temperatura para vida en anaquel como la presente investigación, lo cual podría explicar el menor desarrollo de moho en los frutos tratados en otras investigaciones.

Otro factor que podría estar asociado es el tiempo de exposición, ya que los frutos de piña fueron expuestos durante 4 minutos, mientras que Lingfei y Yanmin Du (2012) irradiaron frutos de pera durante 15 minutos, por lo que el tiempo de aplicación pudo haber limitado y disminuido la efectividad de los tratamientos en el control del moho en el pedúnculo en los frutos de piña, por lo que investigar tiempos más altos puede ser una opción para aumentar la eficacia del tratamiento UV-C. Otra de las opciones para mejorar el tiempo de aplicación podría ser tomar más en cuenta la intensidad de la radiación de la luz ultravioleta de las lámparas de los equipos y con esto mejorar las condiciones de aplicación, ya que la mayoría de los estudios se centran en las dosis, sin embargo, Cote *et al.* (2013) encontró que en tomates los efectos de aumentar las intensidades de los rayos UV-C es más efectivo y en fresas observó que aumentar la intensidad de la radiación puede reducir la

descomposición y presencia de mohos, mejorando el mantenimiento de la calidad de los frutos y reduciendo los tiempos de aplicación.

La aplicación de la dosis de 5 y 25 kJ/m² posiblemente pudo haber provocado la inhibición de la actividad de los patógenos, ayudando a inducir mecanismos de resistencia del huésped, además de la oxidación fotoquímica del ADN induciendo daño celular al patógeno (Romanazzi *et al.* 2016). Estos efectos son posibles al aplicar dosis que puedan generar el fenómeno de hormesis en frutos dando paso a una estimulación de respuestas beneficiosas para bajos niveles de estrés, induciendo posiblemente una acumulación de fitoalexinas y activando genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (Barka *et al.* 2000).

6.1.2. Primer Ensayo – Calidad

La calidad fisicoquímica no mostró efectos negativos, específicamente en lo relativo a la dosis baja utilizada de 5 kJ/m², lo que coincide con resultados obtenidos en otras investigaciones, en las que se encontró que las dosis altas pueden generar efectos negativos sobre la calidad de los frutos aplicados con UV-C.

En el presente estudio la dosis de 5 kJ/m² no fue diferente al testigo en firmeza externa. Estos resultados coinciden con los encontrados por Velásquez (2018) en frutos de piña con cera en donde a salida de anaquel dosis similares como la de 4 kJ/m² tampoco fue diferente al testigo. Además, cabe señalar que frutos sin cera y a dosis de 17 y 23 kJ/m² presentaron una menor firmeza con respecto al testigo y a la menor dosis, coincidiendo con la presente investigación.

Las dosis más bajas como la de 5 kJ/m² pueden mantener la firmeza debido a que puede generar un efecto de hormesis al desencadenar estrés en los frutos que pueden llevar a cambios sobre la firmeza y retrasar la degradación de la pared celular (Perkins-Veazie *et al.* 2008, Barka *et al.*, 2000) En frutos de tomate se encontró que la actividad de la enzima degradadora de la pared celular es

significativamente mayor en los tratamientos sin aplicaciones de UVC y menor en las frutas sometidas a dosis de ultravioleta. Esta menor actividad podría provocar un retraso en el proceso de maduración, un mantenimiento de la dureza, menor degradación de la pared celular y una mínima pérdida de agua durante la maduración, efectos mencionados por Syamaladevi *et al.* (2014) en frutos de pera.

Por otro lado, dosis más altas como la de 15 y 25 kJ/m² presentaron una menor firmeza externa, este ablandamiento podría estar relacionado con la producción de radicales libres como resultado de la senescencia y su efecto en la pared celular. Yong-Gui y He (2012) explican que la aplicación de dosis altas de ultravioleta puede generar ablandamiento de la pared en cáscara, por lo que este efecto pudo haber generado la disminución de firmeza en los frutos de piña.

En cuanto a firmeza interna, grados brix, porcentaje de acidez, color evaluado con escala y color CIELAB las diferentes dosis del primer ensayo no alteraron la calidad visual y sensorial, lo cual podría indicar que los frutos de piña pueden presentar una amplia respuesta ante la aplicación de dosis de UVC, siendo la piña menos sensible con respecto a otros frutos. Por ejemplo, en frutos de pera se observó que dosis menores a 3,1 kJ/m² son las más recomendables, ya que estas no afectan los sólidos solubles y la textura de la fruta (Syamaladevi *et al.* 2014). También Sari *et al.* (2016) con dosis entre 13 y 39,6 kJ/m² y con diferentes tiempos de aplicación en piña variedad "Phulae" no registraron diferencias en las variables de color, sólidos solubles y acidez, lo que respalda los resultados obtenidos en esta investigación para piña MD-2, sin embargo, al analizar que estos autores aplicaron dosis mayores y por más tiempo, que en la presente investigación esto podría indicar que la variedad de piña podría tener cierta influencia en la respuesta al ultravioleta. MD2 ha sido sometida a mayores dosis presentando comportamiento variable principalmente en la variable de firmeza y disminución de sólidos solubles en dosis de 30 y 80 kJ/m².

Con relación a la calidad, la deshidratación es una variable que afecta la apariencia de la fruta y de importancia al momento de llegada a los mercados. De acuerdo con

los resultados, el tratamiento que presentó el mayor promedio de DPA fue el de 5 kJ/m² sin resultar ser diferente estadísticamente con la mayor dosis, pero sí con respecto al testigo. Por otro lado, la dosis de 15 kJ/m² obtuvo junto con el testigo el menor impacto en DPA, sin embargo, fue el que presentó mayor promedio de quema en corona siendo diferente con el testigo, pero no con los demás tratamientos. Ante esta respuesta se podría haber esperado que la dosis de 15 kJ/m² se viera más afectada por la deshidratación al haber sido más afectada por la quema en corona, sin embargo, la cáscara y la corona son tejidos diferentes con diferente sensibilidad, lo que también podría generar diferentes tolerancias a la aplicación de UV-C y a la deshidratación. En este ensayo se estimó indirectamente la deshidratación de la cáscara al considerar el DPA, en la corona se evaluó la quema, por lo que sería importante para próximas investigaciones con UV-C cuantificar la pérdida de agua de ambos tejidos.

En cuanto al análisis de fenoles totales, solo los contenidos a nivel de la corona presentaron diferencias. El tratamiento con dosis más baja de UV-C (5 kJ/m²) y el testigo, también presentaron la mayor cantidad de fenoles totales sin ser significativa para pulpa y cáscara. Este tratamiento pudo estimular la producción de fenoles que redujo el desarrollo de moho, aunque por otro lado quizás este mismo estímulo favoreció el DPA por afectar la integridad de las membranas celulares. En cuanto al tratamiento testigo podría ser que el mayor desarrollo de moho en el pedúnculo promovió la síntesis de compuestos fenólicos. Las dosis de 15 y 25 kJ/m² aun cuando redujeron el moho presentaron una tendencia de daño en la corona, lo que podría afectar la síntesis de fenoles por daños en el tejido.

Sari *et al.* (2016) señalan que la dosis de 39,6 kJ/m² de UV-C en piña estimuló una mayor cantidad de fenoles totales en cáscara, pero no en pulpa, lo que se relaciona con la poca penetración de la luz ultravioleta en la cáscara gruesa de la fruta por lo que no se induce la producción de fenoles en pulpa, pero si en tejido más expuesto, como lo es el de la corona, tal como en el caso de la corona analizada en esta tesis. Otro de los factores que pudo influir en la respuesta a la acumulación de fenoles

puede ser el tiempo de aplicación ya que, en la presente prueba la dosis de 15 y 25 kJ/m² se aplicaron por 12 y 20 minutos respectivamente, mientras que Sari *et al.* (2016) señalan que la dosis con mayores contenidos de fenoles fue irradiada durante 30 minutos.

6.2. Ensayo 2 y 3

6.2.1 Efecto de una dosis de radiación UVC y dos dosis de *Bacillus subtilis* sobre el desarrollo de moho en corona y pedúnculo en frutos de piña

La combinación de los tratamientos UV-C con el controlador *Bacillus* mostraron un efecto de disminución sobre la presencia de moho en el pedúnculo, la dosis media del controlador evidenció un mejor efecto tanto con cera como sin cera (Figura 16). De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación la aplicación de solo UV-C si bien disminuye el moho, no es suficiente para el combate que se requiere a nivel comercial.

Velásquez (2018) concluyó que con un rango de dosis desde 0,5 hasta 5 kJ/m² se pueden obtener resultados positivos, estas dosis mostraron los menores porcentajes de severidad de moho en corte y mayores porcentajes de eficacia de control comparados con el testigo al igual que lo observado en la presente tesis, sin embargo, no se logró la eliminación completa del moho en el pedúnculo en los frutos de piña, posiblemente la menor efectividad está asociada a que el moho provocado en el pedúnculo está compuesto por un complejo de hongos, lo cual podría dificultar el combate del moho en las piñas.

Por otro lado los tratamientos combinados con UVC y *Bacillus* principalmente la dosis media de *B.subtilis* mostraron una mayor efectividad en el combate de moho (Figura 16), lo que sugiere que la aplicación de UVC seguida de la aplicación del controlador puede crear un efecto aditivo o sinérgico, siendo más efectivo que el tratamiento ultravioleta. De acuerdo con Xu y Du (2011) tratamientos

independientes pueden presentar limitaciones que podrían afectar su aplicabilidad comercial, en este caso puede que el pedúnculo al ser un tejido fibroso no permita que la luz penetre efectivamente hacia el interior limitando su efecto, por lo que la integración del controlador biológico permite tener un efecto agregado o de sinergia provocando una disminución del moho y un aumento de la eficacia. Guo *et al.* (2014) con la combinación de UVC a una dosis de 5 kJ/m² + la levadura *Metschnikowia pulcherrimas* obtuvieron en fruta de azufaifa (*Zizyphus jujuba* Mill.) mejores resultados en la reducción de incidencia y severidad de *Alternaria*. También Lingfei y Yanmin Du, (2012), señalan que, en frutos de pera sin inocular, la combinación de UVC (5 kJ m²) más la levadura *C. guilliermondii* aumentó la eficacia del antagonista o del UVC para el control de *Penicillium expansum* comparados con los tratamientos solos.

Además, la aplicación de tratamientos en frutos de naranja para el combate del moho verde, combinando cepillado corto con agua caliente a 55 ° C durante 30 s en conjunto con la dosis de 1,5 kJm⁻² de irradiación UVC y la aplicación del antagonista la levadura *Candida membranifaciens* CMAA-1112 presentó muy baja severidad en la pudrición de los frutos durante el almacenamiento refrigerado. Las naranjas en su mayoría no presentaron síntomas durante 15 días de evaluación y con esto aumentó el periodo de almacenamiento de los frutos (Terao *et al.* 2017). Estas investigaciones muestran que tratamientos físicos como UVC en combinación con un antagonista pueden incrementar mecanismos de acción y así aumentar la eficacia del control de mohos. Además, se sabe que el tratamiento UV-C no proporciona persistencia para la protección de la fruta contra la reinfección después del tratamiento, mientras que los microorganismos del control biológico persisten durante largos períodos después del tratamiento y protegen la fruta de la reinfección (Guo *et al.* 2014).

La dosis alta del controlador con cera tuvo mayor eficacia en el combate de moho en el pedúnculo, mientras que en el caso de la dosis media se obtuvo un combate tanto cuando se combinó con y sin cera. La cera aplicada en estos tratamientos

pudo haber contribuido a la disminución de la enfermedad, ya que de acuerdo con Anchatuña y Villagómez (2011) la cera Frutiver permite una acción fungistática sobre el crecimiento y elongación en hongos y bacterias, además las ceras pueden funcionar como barreras protectoras contra el deterioro de los frutos, retardando los procesos naturales de maduración, previenen la pérdida de humedad y restringe el crecimiento de microorganismos (Jiménez *et al.* 2010). También Soto (2018) observó una interacción significativa entre la cera y el uso de controladores como los son *Bacillus* y levaduras, lo que coincide con los resultados encontrados en esta tesis ante la acción de la cera en los tratamientos que fueron aplicados con esta.

Además, en relación con las dosis del controlador *Bacillus* en aplicaciones de antagonistas como *Bacillus amyloliquefaciens* en uvas para el control de *Botrytis cinerea*, se evidenció que al emplear las dosis 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 de UFC/ml, la dosis baja tuvo una incidencia similar al control, la dosis mayor presentó la mayor incidencia, mientras que la dosis media 1×10^7 se consideró como el mejor tratamiento para el combate de *Botrytis* y asegurar un mejor almacenamiento de las uvas (Zhou *et al.* 2020), lo que evidencia que no necesariamente una dosis alta de un antagonista va a ser la más efectiva para el combate de las enfermedades, tal como resultó mejor para este estudio con piña, donde la dosis media fue más eficaz en la reducción del moho en el pedúnculo de la piña con *Bacillus*. De acuerdo con los autores una de las razones por las cuales las concentraciones más altas de *B. amyloliquefaciens* pueden no resultar tan efectivas es que estas concentraciones posiblemente requieren más nutrientes de la fruta, lo cual puede provocar mayor daño en la fruta y mayor producción de moho (Zhou *et al.* 2020).

En corona de banano Lassois *et al.* (2008) para el control de la pudrición utilizaron dos controladores *Pichia anomala* y *Candida oleophila*. Se encontró que entre tres dosis de *P. anómala* 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/ml, tanto la concentración 10^7 , 10^8 registraron una reducción significativa para *F. moniliforme* presentando un 47,0% y 51,3% de protección. Asimismo, se conoce que la corona de banano es afectada por un complejo de hongos al igual que el pedúnculo de la piña, al inocular la corona con

Colletotrichum musae, *Fusarium moniliforme* *Cephalosporium* sp. la dosis media de P. anomalo presentó un mejor porcentaje de protección 26,9% comparado a las otras dosis del mismo controlador, sin embargo el antagonista *Candida oleophila* con la dosis alta 10^8 UFC/ ml ofreció un porcentaje de protección significativamente mayor 54,4% que las demás dosis de los tratamientos biológicos (Lassois *et al.* 2008). Cabe señalar que ante un complejo de hongos la enfermedad puede ser más severa en los frutos, en comparación cuando solo se presenta uno solo patógeno, por lo que la gravedad de la enfermedad depende de su compleja composición y de las interacciones existentes entre patógenos y huésped, por lo que las dosis pueden variar en su efecto.

De acuerdo con In *et al.* (2020) *Bacillus subtilis* presenta producción de compuestos antifúngicos fuertes como la subtilina, antibióticos de la familia de las iturinas, compuestos volátiles y enzimas que pueden degradar los polímeros estructurales fúngicos, y tienen la capacidad de sobrevivir y colonizar el tejido herido de las frutas (Fernández, 2001). Múltiples efectos de los tratamientos UV-C + *B.s* m aplicados en este estudio de piña pudieron sumarse y reducir el desarrollo de moho, lo que compensó las limitaciones del uso individual de los tratamientos (Wisniewski *et al.* 2016).

Además, el efecto de los tratamientos con *Bacillus* mostró que el microorganismo mostró tener un resultado en los frutos de piña por más de 23 días de almacenamiento, tal como lo manifestaron las evaluaciones a salida de anaquel en el ensayo dos para la dosis media del controlador y la alta con cera, evidenciando que el microorganismo puede sobrevivir y ejercer su efecto sobre el moho en el pedúnculo, sin embargo, este efecto no se prolongó durante el almacenamiento de 40 días esto según las evaluaciones del tercer ensayo. El tratamiento químico fludioxonil en el tercer ensayo a pesar del largo almacenamiento de la fruta presentó un buen combate del moho en el corte del pedúnculo a diferencia del tratamiento con UV-C + *B. subtilis*. Resultados similares se presentaron con el fungicida thiabendazol (500 mg/l) en corona de banano en donde el fungicida controló a

Colletotrichum musae, *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium* sp. inoculados solos o combinados con altos porcentajes de protección entre 96,9% y 99,5%, a diferencia de los controladores *Pichia anomala* y *Candida oleophila*, los cuales presentaron baja efectividad de protección ante el moho en corona en comparación con el fungicida (Lassois *et al.* 2008).

Los resultados anteriores sugieren que el controlador biológico aplicado en poscosecha mantiene poblaciones de *Bacillus* alrededor de tres semanas, además en el ensayo tres en la evaluación a los 15 días el controlador es similar con el efecto del tratamiento químico, por lo que a mayor tiempo de almacenamiento se da una menor efectividad del controlador.

6.2.2 Segundo Ensayo- Calidad

Con relación a la calidad de la piña, los tratamientos combinados UV-C con dosis media de *Bacillus* y cera mostraron la mayor retención de firmeza externa (Figura 18), caso contrario los tratamientos con la dosis alta. Los presentes resultados con la combinación de tratamientos en piña coinciden con los de Guo y colaboradores (2014) quienes determinaron que las aplicaciones en azufaifa con UVC a 5 kJ/m² en combinación con la levadura *M. pulcherrima* pero con una sola dosis del controlador fue mayor en el tratamiento combinado y en el de UVC solo. Además, se obtuvo un efecto contrario en la firmeza interna en donde los tratamientos combinados con dosis alta y el de dosis media + cera mostraron mayor retención de firmeza interna (Figura 19). Cabe destacar que con la aplicación de solo UV-C en el primer ensayo a los frutos de piña no se presentó ningún efecto sobre la firmeza interna.

El color CIELAB evaluado con colorímetro no presentó diferencias entre los tratamientos, sin embargo, el color evaluado con escala comercial mostró mayor avance de color amarillo en los tratamientos combinados con la dosis alta de *Bacillus*, además del tratamiento con dosis media más cera. Este aumento de color podría estar relacionado con procesos externos como lo es el ablandamiento del

tejido de la cáscara por la acción de la degradación de pectinas y hemicelulosas de la pared celular por acción de diferentes enzimas hidrolíticas (Karakurt, 2007), lo cual podría estar directamente relacionado con la senescencia de la fruta y el avance de color. Además, los antibióticos que produce *Bacillus* podría tener un efecto ante la degradación de la clorofila en la cáscara de los frutos, principalmente en la dosis alta que presentó un mayor avance de color amarillo.

El proceso de hidrolisis en la pared celular daría paso a una disminución en la firmeza tanto externa como interna de los frutos, sin embargo, en esta investigación se obtuvo menor retención de firmeza solamente en la firmeza externa, mientras que a nivel interno la retención fue mayor en las dosis altas del controlador. Cabe señalar que el promedio de firmeza interna inicial de la fruta del ensayo dos fue de 8,24 Newtons y a la salida de anaquel la dosis alta con el controlador retuvo la firmeza con 7,3 mientras que el tratamiento con solo UVC presentó un 6,2 Newtons.

Por otro lado, el almacenamiento a 7°C y posterior cambio de temperatura a 18°C favorece el DPA principalmente a salida de anaquel en el tratamiento con dosis alta sin cera (Cuadro 13). Esta deshidratación podría estar relacionada con la pérdida de turgencia en los frutos, lo cual puede causar la reducción gradual de los valores de firmeza externa, esto coincide con la aplicación como recubrimiento de *Bacillus subtilis* en arándanos en los cuales se detectó una progresiva pérdida de agua y con esto reducción en la firmeza (Martínez *et al.* 2019). Además, esta pérdida de agua podría estar relacionada con que la firmeza interna se haya mantenido con mayor dureza a nivel interno de la pulpa, ya que la pérdida de agua puede generar que se ponga más dura.

El primer ensayo demuestra que la aplicación de UVC con la dosis de 5 kJ/m² no afecta la firmeza externa ni interna en la piña, sin embargo, ante la combinación con el controlador los tratamientos generaron una respuesta diferente. Según estudios de Pombo (2019) la aplicación de UVC a bajas dosis desde 0,2 hasta 20 kJ/m² retrasan la pérdida de firmeza en tomate, chile y fresa. Otros factores para tomar en

cuenta en el comportamiento de la firmeza en los tres ensayos y que están muy relacionados con cambios en la etapa poscosecha sería la fertilización que se aplicó en campo, ya que esta variable puede incidir directamente con la firmeza de los frutos de piña. A este respecto, se debe tener en cuenta que, si bien los frutos de esta investigación prevenían de la misma finca, estos se cosecharon en diferentes épocas y esto incide en las características en la calidad de la fruta (Anexo 15).

En esta investigación los cambios en firmeza de la piña también podrían estar relacionados con las dosis del controlador *B. subtilis*. El *Bacillus* puede secretar enzimas hidrolíticas las cuales suelen utilizar la quitina o la pared celular del patógeno como fuente de carbono y así hidrolizar el micelio del patógeno y fortalecer los efectos antagónicos (Guo *et al.* (2014), lo que podría afectar los tejidos externos de la piña. Ante lo anterior se podría sugerir que algunos efectos que produce el antagonista ante los patógenos podrían generar cierto efecto en las cáscaras de los frutos al producir lipopéptidos, generando cambios en la pared celular o en pulpa incidiendo sobre firmeza y avance de la senescencia en los frutos de piña. Sin embargo, en investigaciones donde se mide el impacto de *Bacillus* sobre la calidad de la fruta ya sea por sí solo o en combinación no se reporta efectos por causa de las sustancias que produce (Martínez *et al.* 2019). Esto probablemente se debe a que las dosis utilizadas son las apropiadas, tal como resultó en este ensayo con la dosis media.

En cuanto a otras variables de calidad, como los sólidos solubles solo en el segundo ensayo se presentaron diferencias entre tratamientos. Todos los tratamientos combinados presentaron una menor cantidad de azúcares con respecto al tratamiento con solo UVC. El tratamiento con dosis media de *Bacillus* + cera fue el más efectivo para el combate de moho en el pedúnculo y en corona, pero el de menor contenido de azúcares. Una posible razón ante este comportamiento en la reducción de sólidos solubles podría ser que el controlador biológico generara cambios en los carbohidratos del fruto, utilizándolos como fuente de sustrato, dado

que la competencia por espacio y recursos es uno de los mecanismos de acción de *Bacillus* (Merillón y Gopal, 2020).

En cuanto al contenido de fenoles totales en el primer ensayo la dosis de 5 kJ/m² presentó un efecto sobre la producción de estos en la corona, además de mantener mayores valores en cáscara y pulpa, por lo que los tratamientos con UVC por sí solos si tuvieron un efecto ante una mayor acumulación de fenoles en la corona de la piña. En el segundo ensayo se presentaron diferencias significativas donde tanto cáscara como corona presentaron contenidos de fenoles más altos. Esto confirma lo que se encontró en el primer ensayo, donde al parecer la aplicación de ultravioleta solo causa estrés en los tejidos más externos de la piña ya que no se observó aumentos en los contenidos de fenoles en la pulpa.

También *Bacillus* es conocido por poder inducir acumulación de fenoles al ser aplicado en poscosecha para control de enfermedades, Wang y colaboradores (2013), al aplicar en frutos de melocotón con la cepa de *Bacillus* SM21 para el control de *Rhizopus* encontraron que los contenidos de fenoles totales aumentaron. Esto parece indicar que el mecanismo de acción de *B. subtilis* induciendo resistencia para suprimir la pudrición de *Rhizopus*. también puede estimular la acumulación de fenoles en frutos de melocotón. Además, de acuerdo con Merillón y Gopal (2020) tanto la luz ultravioleta como *Bacillus* sp. son elicitores los cuales inducen una secuencia de reacciones en la célula viva, particularmente relacionadas con la biosíntesis de metabolitos como las fitoalexinas por lo que podría haber un efecto sinérgico entre ambos tratamientos y con esto retención o síntesis de fenoles.

6.3. Tercer Ensayo- Calidad.

Con relación a la firmeza externa el tratamiento combinado presentó mayor retención de firmeza junto con el tratamiento químico, mostrando un comportamiento similar al del segundo ensayo durante el almacenamiento en frío, sin embargo, en vida en anaquel con el paso de los 43 días en almacenamiento la

firmeza externa del tratamiento combinado fue similar a la del testigo, mientras que el tratamiento químico presentó la mayor retención de firmeza externa, lo que podría indicar que el tratamiento combinado podría mantener la firmeza por periodos más cortos de almacenamiento.

Otra de las variables que puede estar estrechamente relacionada con la firmeza en los frutos de piña es la de DPA, el tratamiento combinado presentó el mayor porcentaje de afectación en el tercer ensayo. Cabe destacar que el tratamiento de UV-C + *B.s m* + Ce en el segundo ensayo no presentó diferencias con los otros tratamientos a salida de cámara ni a salida de anaquel, sino que los tratamientos sin cera fueron los más afectados, sin embargo, el almacenamiento más prolongado en el tercer ensayo mostró que tanto el testigo como el tratamiento combinado fueron más afectados por la pérdida de agua en los frutos en comparación con el tratamiento químico. Esto posiblemente podría estar relacionado con la aplicación de UV-C y *B. subtilis* ya que estos tratamientos pudieron ejercer un estrés sobre los frutos ya sea aumentando la tasa respiratoria en los frutos o causando un efecto de ósmosis, lo cual podría explicar la deshidratación en los frutos.

Las variables de color con colorímetro L^* , a^* y b^* no mostraron diferencias significativas en los primeros dos ensayos en los tratamientos ya sea solo con la aplicación de ultravioleta o junto con el controlador biológico. En el tercer ensayo las variables L^* y a^* si presentaron diferencias. La variable a^* fue mayor en el testigo y en el tratamiento combinado, lo cual señala que estos tratamientos mostraron una mayor oxidación que el tratamiento químico. La investigación de Sari *et al.* (2016) en frutos de piña aplicados con ultravioleta y el testigo sin aplicación mostró diferencias en la variable de L^* en donde observaron una disminución a lo largo de 28 días de almacenamiento, sin embargo, en la presente investigación los valores de L^* incrementaron durante el almacenamiento en frío al cambio de vida en anaquel. Posiblemente el efecto no mostrado en las variables de color con colorímetro en los tres ensayos esté relacionado con el tiempo de almacenamiento ya que los primeros dos corresponden a 23 días de almacenamiento mientras que

el tercero estuvo almacenado 43 días y los frutos presentaron un mayor avance en senescencia, mayor avance de color hacia amarillo.

En cuanto a la medición de acidez titulable, al igual que en los dos primeros ensayos no se observaron diferencias entre tratamientos (Cuadro 28), señalando que los tratamientos con diferentes dosis de luz ultravioleta, la aplicación de la bacteria antagonista y la de fludioxonil no presentan un impacto sobre esta variable en los frutos de piña. Resultados similares obtuvo Sari y colaboradores (2016) en frutos de piña variedad "Phulae" con aplicaciones de ultravioleta con dosis desde 13,2 a 39,6 kJ/m², asimismo Terao *et al.* (2017) en naranjas con tratamientos combinados de UVC más *Candida membranifaciens* en donde después del almacenamiento ni la irradiación sola ni en combinación con un antagonista presentó ningún efecto significativo sobre la acidez.

En cuanto a los fenoles el único tejido que presentó diferencias significativas fue el pedúnculo, en donde el tratamiento combinado presentó el mayor contenido de fenoles totales, en comparación con el testigo y tratamiento químico. En corona y pulpa el tratamiento con UVC presentó mayor cantidad de fenoles, pero no fue significativo. Una de las posibles razones de que la cáscara o corona no mostraron efecto del tratamiento aplicado con ultravioleta podría ser la cantidad de días de almacenamiento y el avance de senescencia de los frutos en este ensayo.

6.4. Aislamientos

6.4.1 Aislamientos de cáscara y pedúnculo del segundo ensayo.

La recuperación de organismos para los ensayos dos y tres representan poblaciones que sobrevivieron al efecto de los tratamientos y al almacenamiento, ya que los frutos de piña no fueron inoculados posiblemente estos fueron microorganismos que se mantuvieron en la fruta debido a que los tratamientos no pudieron penetrar o colonizar esos espacios. La piña al ser un fruto múltiple formada por un racimo de frutículos individuales (Rodríguez, 2013) tiene muchos espacios

donde los microorganismos podrían sobrevivir, además la aplicación de ultravioleta se ve limitada por la rugosidad e irregularidades de la superficie donde se aplica, limitando su efecto.

Tanto en la evaluación a las 24 horas como a salida de cámara las principales poblaciones de microorganismos recuperados fueron las levaduras, hongos y en menor cantidad bacterias, esto se observó tanto en los tratamientos combinados del segundo ensayo como en los tratamientos del tercer ensayo. A pesar de que en la evaluación inicial la cantidad de hongos fue muy baja, se logró recuperar en las frutas tratadas a las 24 horas en todos los tratamientos y se observó un leve aumento a la salida de cámara en el pedúnculo, en donde se lograron identificar *Penicillium* sp y *Fusarium* sp.

La combinación UV-C ambas dosis de *Bacillus* + Ce presentaron menos UFC en las poblaciones de hongos, levaduras y bacterias tanto para pedúnculo como cáscara en comparación con los tratamientos con solo UV-C y sin cera. Este mismo efecto fue observado por Soto (2017), quien sugiere que la aplicación de la cera cumple su función de proteger a la fruta además del efecto fungistático, evitando que las poblaciones de microorganismos proliferen en el pedúnculo y en la cáscara.

Las levaduras fueron las primeras en aparecer en el medio de cultivo principalmente una levadura blanca cremosa, con una constante frecuencia de aparición en las evaluaciones independientemente del tratamiento, observándose una gran cantidad de UFC, además, la cantidad inicial de levaduras en pedúnculo fue alta. Las levaduras presentan una alta tasa de crecimiento, se reproducen asexualmente por gemación o fisión, esto resulta en un crecimiento que se compone principalmente de células individuales (Kurtzman *et al.* 2011). Además, presentan una alta tolerancia a las condiciones ambientales adaptándose de manera única al microambiente en los tejidos de las frutas, lo que podría implicar que a pesar de la aplicación de luz ultravioleta o del controlador biológico estos microorganismos pueden sobrevivir al estrés generado por estos tratamientos en las frutas.

En cuanto a las bacterias se observó que estuvieron presentes principalmente en el pedúnculo a las 24 horas de aplicados los tratamientos, y que no aumentaron a salida del cámara. Entre las bacterias encontradas tanto en cáscara como en pedúnculo luego del almacenamiento en frío de los frutos sobresale *Bacillus subtilis*, esta se recolectó tanto a las 24 horas de aplicados los tratamientos como a salida de cámara. Este controlador también se encontró en el tratamiento al que no se le aplicó *Bacillus* en menores cantidades con respecto a los otros tratamientos, lo cual podría provenir del campo.

Este controlador presentó mayores poblaciones en el pedúnculo a las 24 horas tanto en los tratamientos de dosis media como alta, ambas con cera, mientras que en cáscara fue significativamente más alto en la dosis alta del controlador. Por otro lado, las cantidades de UFC de las otras bacterias no fueron significativas. *Bacillus subtilis* es un microorganismo que puede sobrevivir a condiciones de bajas o altas temperaturas, desecación (Kovacs, 2019) o en el caso de este estudio, a pesar del cambio de temperatura de almacenamiento de los frutos de 7 a 18 °C *Bacillus* fue capaz de permanecer en los tejidos de cáscara y pedúnculo posiblemente ejerciendo antagonismo y evitando el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, teniendo un mayor efecto sobre hongos y bacterias que sobre levaduras.

6.4.2 Aislamientos en pedúnculo y cáscara del tercer ensayo.

Los microorganismos más frecuentes presentes en este ensayo fueron los hongos y las levaduras, lo cual coincide con el ensayo dos, las bacterias no fueron tan abundantes ni en el pedúnculo ni en la cáscara.

Las poblaciones de hongos fueron estables a las 24 horas y a salida de cámara en el pedúnculo, mientras que en cáscara las poblaciones fueron mayores en la evaluación inicial. Con el cambio de temperatura a 18°C las poblaciones aumentaron para todos los tratamientos. Se observaron más hongos con

diferentes tonalidades de verde posiblemente del género *Penicillium* sp. en el medio de cultivo, sin embargo, también se recuperaron hongos de color rosado, los cuales podrían ser *Fusarium ananatum*, según análisis realizado al microscopio. De acuerdo con Umaña y Castro (2015), las principales especies que se desarrollan en pedúnculo y también en cáscara corresponden a *Penicillium* sp, *Fusarium* sp. entre otros, donde el primero presenta una tasa mayor de crecimiento que el segundo. El género *Penicillium* puede crecer bajo un amplio rango de temperaturas desde 4° hasta 37° siendo 24°C su óptima (Yadav *et al.* 2018), lo que en el caso de este ensayo explicaría por qué a pesar de que la fruta estuvo almacenada por 40 días a 7°C las temperaturas pudieron retrasar el crecimiento de hongos, pero no evitar su desarrollo especialmente en un periodo de almacenamiento extenso.

El tratamiento químico presentó menores poblaciones de hongos a la salida de cámara tanto en pedúnculo como en cáscara, por lo que fludioxonil resultó ser efectivo tanto en el combate del moho en el pedúnculo de la fruta como en la disminución de las UFC recuperados a partir de los tejidos de piña. El fludioxonil ha mostrado ser eficaz para el combate de cepas de *P. digitatum* resistentes a thiabendazol en naranja, además de presentar una supresión activa de la esporulación de este hongo (Zhang, 2007).

A partir de las frutas con el tratamiento combinado se recuperó *Bacillus* en pedúnculo, incluso en el muestreo que se hizo a los 40 días luego del almacenamiento, en cáscara en la evaluación a salida de cámara. De acuerdo con los resultados del tercer ensayo el controlador se logró recuperar en los aislamientos, lo que indica que este puede sobrevivir a prolongados almacenamientos. A diferencia del segundo ensayo donde el controlador registró un mejor control en las poblaciones de hongos que de levaduras, en el tercero presentó menores poblaciones de levaduras. Algunas investigaciones relacionan la alta o baja presencia de algunos microorganismos con la época de siembra y cosecha, esto podría explicar la variación en las poblaciones de los microorganismos y sin dejar de lado el efecto del largo almacenamiento (Umaña y Castro (2015).

La presencia de *Bacillus subtilis* en el pedúnculo después del almacenamiento y no en cáscara podría sugerir que este requiere de un tejido más rico en nutrientes como lo es el corte de piña ya que la cáscara se vio expuesta a una mayor deshidratación lo cual pudo limitar su permanencia y acción antagónica. Según algunos estudios *Bacillus subtilis* puede formar endosporas al verse expuesta a un agotamiento del entorno, que puede estar relacionado con diversos factores físicos, que incluyen (pero no se limitan al calor húmedo y seco, radiación UV y gamma, desecación extrema (incluido el vacío) y agentes oxidantes. Por tanto, la formación de endosporas representa una estrategia mediante la cual la célula bacteriana escapa temporalmente de las condiciones locales nutricionalmente desfavorables a través de la latencia (Nicholson *et al.* 2000). En esta investigación no se puede asegurar este comportamiento de supervivencia, ya que se recuperaron poblaciones de *Bacillus* solamente en el pedúnculo de la fruta, a diferencia del segundo ensayo en donde ambos tejidos evidenciaron al controlador, por lo que es posible que el largo periodo de almacenamiento haya influido en la acción del controlador.

Esta investigación mostró resultados en la determinación de la eficacia de la aplicación de UV-C y la combinación con el controlador biológico *Bacillus subtilis* como tratamiento para el combate de moho en frutos de piña, esta señala el potencial de la combinación de tratamientos físicos y biológicos. Los resultados obtenidos son opciones de combate que las piñeras pueden considerar para disminuir la carga química en poscosecha y obtener frutos con menos residuos, además, de ser una opción para destinos de exportación cercanos como estados Unidos o Europa.

7. CONCLUSIONES

1. Bajo las condiciones de este estudio las dosis de 5 y 25 kJ/m² fueron más eficaces en la reducción de moho en la corona y en el pedúnculo. Adjunto a lo anterior la dosis de 5 kJ/m² no afectó negativamente las variables de calidad

de firmeza externa, interna, brix, color y acidez. Además, se presentó un mayor contenido de fenoles totales en tejidos externos de la piña.

2. La combinación de UV-C (5 kJ/m^2) con la dosis media del controlador biológico *B. subtilis* con y sin cera fueron eficaces en el combate de moho, con un posible efecto aditivo entre tratamientos, por lo que podría ser una alternativa para el combate de estos en poscosecha. En cuanto a calidad las respuestas fueron variables en firmeza, los tratamientos con *Bacillus* presentaron mayor avance de color y menor cantidad de sólidos solubles.
3. La combinación de tratamientos UV-C y *Bacillus* fue más eficaz para el combate de moho durante almacenamientos por periodos cortos, lo cual lo hace una opción para exportaciones a destinos como Estados Unidos o Europa.
4. Conforme a los resultados obtenidos el controlador biológico *B. subtilis* parece ser capaz de tolerar las temperaturas bajas de almacenamiento que se utilizaron en piña.
5. Las levaduras fueron los microorganismos con mayores UFC presentes en los aislamientos tanto de cáscara como de pedúnculo.

8. RECOMENDACIONES

1. Validar mediante ensayos la efectividad del control de moho de la dosis de 25 kJ/m^2 y el efecto de esta sobre la calidad de la piña principalmente en la variable de firmeza.
2. Validar el control de la dosis media de *Bacillus* frente al tratamiento químico comercial con una simulación de transporte más corta.
3. Ante la comprobación de que la combinación de tratamientos puede disminuir el desarrollo de hongos en el pedúnculo de la piña se recomienda probar con otros controladores biológicos o mezclas de estos. Una opción sería *Pichia caribbica* el cual es un microorganismo habitante de la cáscara de piña. También se podría estudiar la combinación de la aplicación de UV-C con fungicidas naturales como el caso del tomillo, dado que en experimentos cuyos

datos no han sido publicados tiene un efecto en la disminución del moho en piña.

4. Colocar un tratamiento con solo *Bacillus subtilis* para determinar su potencial individual como antagonista del moho en frutos de piña.
5. Determinar los fenoles por medio de una misma metodología para estandarizar sus contenidos.

9. LITERATURA CITADA

Alvarado, E; Demerutis, C; González, M. 2006. Evaluación de fungicidas biológicos para el control postcosecha de la pudrición de corona y pedúnculo. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, en piña (*Ananas comosus* (L) Merr) 8(1):17-18.

Anchatuña, A; Villagómez M. 2011. Determinación de parámetros fisicoquímicos en poscosecha en fruto de manzano cosechados en tres estados de madurez en tres variedades (*Golden Deliceous, royal gala, emilia*) con la aplicación de ceras en el cantón Cevallos". Tesis licenciatura en Agronomía. Cotopaxi, Ecuador. Universidad Técnica de Copataxi. 132 p.

Arias. J. P. 2019. Procomer: Piña desbancó al banano como principal producto de exportación agrícola. Cr hoy; 22 enero. Consultado 23 de ene. 2019. Disponible en <https://www.crhoy.com/economia/pina-desbanco-al-banano-como-principal-producto-de-exportacion-agricola/>

Banacol. Sin fecha. Escala de maduración utilizada en empacadoras de piña.

Baños, B. S. 2006. El control biológico en el control de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha 8(1):1-6.

- Barka, E; Kalantari, S; Makhlof, J; Arul, J. Impact of UV-C irradiation on the cell wall-degrading enzymes during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 667-671.
- Bu, J; Yu, Y; Aisikaer, G; Ying, T. 2013. Irradiación UV-C poscosecha en la inhibición de la producción de etileno y la actividad de las enzimas que degradan la pared celular durante el ablandamiento de la fruta de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) Poscosecha biología y tecnología. 86:377–345.
- CANAPEP. 2021. Consultado el 29 de junio del 2021. <https://canapep.com/estadisticas/>
<https://canapep.com/historia-de-la-pina-en-costa-rica/>
- Castro C. J. 2015. Hongos causantes de mohos en frutos de piña poscosecha, su incidencia y relación con las condiciones climáticas en dos zonas de Costa Rica. Tesis de Maestría en Agronomía. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 21-29 -80 p.
- Castro Chinchilla, J; Umaña Rojas, G. 2015. Poblaciones e Identificación De Los Hongos Causantes De Mohos Poscosecha en el pedúnculo de la Piña, en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39(3):61–77.
- Conway, WS; Leverentz, B; Janisiewicz, WJ; Blodgett, AB; Saftner, RA; Camp, MJ. 2004. Integrating heat treatment, biocontrol, and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology* 34(1):11–20.
- Cote, S; Rodoni, L; Miceli, E; Concellón, A; Civello, PM; Vicente, AR. 2013. Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments. *Postharvest Biology and Technology* 83:83–89.

- Demerutis Peña, C. 2010. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. (en línea). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 11(1). Disponible en <http://www.redalyc.org/html/813/81315093002/>.
- Di Francesco, A; Martini, C; Mari, M. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? European Journal of Plant Pathology 145(4):711–717.
- Dimkic, I; Živkovi, S; Beri, T; Ivanovi, Z; Gavrilovi, V; Stankovi, S; Fira, D. 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus strains*, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. Biological Control 65, 312–321.
- Droby, S; Chalutz, E; Wilson, CL; Wisniewski, ME. 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. Phytoparasitica 20(1):149–153.
- Fan, X; Huang, R; Chen, H. 2017. Application of ultraviolet C technology for surface decontamination of fresh produce. Trends in Food Science and Technology 70:9–19.
- Fernández Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario (en línea). Manejo Integrado de Plagas 62(62):96–100.
- George, DS; Razali, Z; Santhirasegaram, V; Somasundram, C. 2015. Effects of Ultraviolet Light (UV-C) and Heat Treatment on the Quality of Fresh-Cut Chokanan Mango and Josephine Pineapple. Journal of Food Science 80(2): 13-15.
- Guo, D; Zhu, Lixia; Hou, Xujie. 2014. Combination of UV-C Treatment and *Metschnikowia pulcherrimas* for Controlling Alternaria Rot in Postharvest Winter Jujube Fruit. Journal of Food Science. 00(0): 1-5.

- Haro, M. J; Guerrero, B. A. 2013. Efecto de la radiación UV-C en frutas y verduras. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 7(1): 68-77.
- Hong, P; Hao, W; Luo, J; Chen, S; Hu, M; Zhong, G. 2014. Postharvest Biology and Technology Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit (en línea). Postharvest Biology and Technology 88:96-102.
- In H. B; Ye E. K; Seung Y. L; Sea C. M. 2020. Microbial decontamination of black peppercorns by simultaneous treatment with cold plasma and ultraviolet C. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 63: 1-6.
- Jiménez, P; Terán, Y; Rojas, B; Salinas, R; García, J; Báez R. 2010. Efecto de las ceras comestibles sobre la calidad de papaya. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha Vol 11(1): 37-42.
- Jordán M y Casaretto J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Fisiología vegetal. 15:1-23.
- Karakurt, Y. (2007). Fruit cell wall polysacharides and their modification during ripening. Journal of the Faculty Agriculture HR., 11 (1-2), 13-19.
- Kinsella, K; Shulthess, C; Morris, T; Stuart, J. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 41: 374-379.
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. Trends in microbiology. Vol. 27 (8):724 - 725.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization, and maintenance of yeasts. The Yeasts Vol. 1. Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>

Lahlali, R; Penga, G; McGregora, L; Gossena, B.D; Hwangb, S.F; McDonaldc, M. 2011. Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. Biocontrol Science and Technology.Vol. 21 (11): 1351-1362.

Lara, R. 2015. Efecto de diferentes tiempos de exposición a radiaciones ultravioleta sobre las características sensoriales y la reducción de bacterias patógenas y deterioro en melón (*Cucumis melo*), piña (*Ananas comusus*), y banano (*Musa Cavendish*). Tesis licenciatura en Agronomía. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 22-23 p.

Lata, B; Trampcztnska, A; Paczesna, J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. Scientia Horticulture 121:176-181

Leelasuphakul, W; Hemmanee, P; Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 48(1):113–121.

Lingfei Xu y Yanmin Du. 2012. Effects of yeast antagonist in combination with UV-C treatment on postharvest diseases of pear fruit. Biocontrol. 57:451–461.

Liu, Y; Chen, Z; Liu, Y; Wang, X; Luo, C; Nie, Y; Wang, K. 2011. Enhancing bioefficacy of *Bacillus subtilis* with sodium bicarbonate for the control of ring rot in pear during storage. Biological Control 57(2):110–117.

- López C. 2012. Frecuencia de los principales organismos asociados con el moho en el corte de piña (*Ananas comosus*) Var. Dorada Extradulce, patogenicidad y sensibilidad al fungicida triadimefon. Tesis licenciatura en Agronomía. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 71 p.
- Maglianesi, S. M. 2013. Desarrollo de las piñeras en Costa Rica y sus impactos sobre ecosistemas naturales y agro urbanos. Universidad Estatal a Distancia. Biocenosis. 27(1-2) 64-65.
- Manzocco, L; Plazzotta, S; Maifreni, M; Calligaris, S; Anese, M; Nicoli, MC. 2016. Impact of UV-C light on storage quality of fresh-cut pineapple in two different packages. Food Science and Technology 65:1138–1143.
- Martínez J. O. Juárez A. M; Robles S. A., Cervantes D. E; Ozuna L. C., Pérez B. L. (2019). Efecto de la Aplicación de *Bacillus subtilis* Sobre Propiedades Fisicoquímicas de Frutos de Arándano (*Vaccinium corymbosum*) Almacenados en Refrigeración. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos 4: 399-403.
- Matamoros, R. G. 2017. Aplicación de luz ultravioleta de onda corta (UV-C) como tratamiento poscosecha y su efecto sobre características fisicoquímicas y calidad fitosanitaria en el fruto de papaya (*Carica papaya* L.) híbrido “Pococi”. Tesis de licenciatura en Agronomía. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2-3 p.
- Mérillon, Jean-Michael; Gopel, K. 2020. Plant Defence: Biological Control. Progress in Biological Control. Vol. 22.1-473. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-51034-3>.
- Nicholson, W; Mukanata, N; Hornek, G; Melosh, H; Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. Microbiology and molecular biology reviews. 64(3):548–572.

- Nigro, F; Ippolito, A; Lattanzio, V; Venere, D Di; Salerno, M. 2000. Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *Journal of Plant Pathology* 82 (1): 29-37
- Nunes, CA. 2012. Control biológico de enfermedades poscosecha de frutas. *Revista Europea de Patología Vegetal* 133(1):181–196.
- Obagwu, J; Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water 28:187–194.
- Patel, H; Tscheka, C; Edwards k; Karlsson, G; Heerklotz, H. 2011. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. Vol 1808 (8): 2000-2008.
- Perkins, VP; Collins, JK; Howard, L. 2008. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology* 47(3):280–285.
- Pombo. A.M. (2009). Irradiación de frutillas con UV-C: efecto sobre la síntesis de proteínas, degradación de la pared celular y mecanismos de defensa. Tesis de Doctorado en Biología molecular y Biotecnología. Buenos Aire, Argentina. Universidad de San Martin. 1-153 p.
- Punja Z; Rodríguez G; Tirajoh A. (2016). Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Crop protection*. 84:98-104.
- Rodríguez Valverde, G. E. (2013). Efecto de la altura de cama de siembra sobre el crecimiento del cultivo de la piña híbrido md-2 (*Ananas Comosus* var. *comosus*), en Pindeco Pacifico, Buenos aires, Puntarenas. Tesis de licenciatura en Agronomía San Carlos, Costa Rica. 1-97 p.

- Ragazzo-Sánchez, JA; Robles-Cabrera, A; Lomelí-González, L; Luna-Solano, G; Calderón-Santoyo, M. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1):5–11.
- Rahman M. 2016. *Bacillus* spp.: A promising biocontrol agent of root, foliar, and postharvest diseases of plants. *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer 113-141
- Rivera, P. DM; Béjar, AG; Martínez-Téllez, MA; González, A M. 2007. Efectos bioquímicos poscosecha de la irradiación UV-C en frutas y hortalizas. *Revista de fitotecnia México* 30(4):361-372.
- Romanazzi, G; Smilanick, J. L; Feliziani, E; & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69-76.
- Sari, K; Setha, S; Naradisorn, M. 2016. Effect of UV-C irradiation on postharvest quality of 'Phulae' pineapple (en línea). *Scientia Horticulturae* 213:314–320.
- Severo, J; de Oliveira, IR; Tiecher, A; Chaves, FC; Rombaldi, CV. 2015. Postharvest UV-C treatment increases bioactive, ester volatile compounds and a putative allergenic protein in strawberry. *Food Science and Technology* 64(2):685–692.
- Sharma, RR; Singh, D; Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: *Biological Control* 50(3):205–221.
- Soto, M. L. 2017. Evaluación y selección de microorganismos para el control de moho en el pedúnculo de la piña (*Ananas comosus* L.) en poscosecha. Tesis licenciatura en Agronomía. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2-113 p.

- Spadaro, D; Gullino, M. L. (2004). State of the art and prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 185–194.
- Sripong, K; Jitareerat, P; Tsuyumu, S. 2015. Combined treatment with hot water and UV-C elicits disease resistance against anthracnose and improves the quality of harvested mangoes. *Crop Protection* 77:1-8.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses, and specific functions. *Molecular Microbiology* 56(4):845–857.
- Syamaladevi, R, M; Lupien, S; Bhunia, K; Sablani, S; Dugan, F; Rasco, B; Killinger, K; Dhingra, A; Ross, C. 2014. UV-C light inactivation kinetics of *Penicillium expansum* on pear surfaces: Influence on physicochemical and sensory quality during storage. *Postharvest Biology and Technology* 87: 27–32.
- Terao, D; Nechet, K; Silava, M; Nunes, A; Delgado, V; Almedida, B. 2017. Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold. *Scientia Horticulturae* 224: 317–323.
- Ulloa Gómez, L. A. (2017). Efecto de la variación en las temperaturas de acondicionamiento en la etapa poscosecha, sobre el desarrollo de color amarillo de piña (*Ananas comosus*) cv Dorado extradulce. Tesis de licenciatura en Agronomía. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 1-75 p.
- Uribe Gutiérrez, L. A. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Tesis de licenciatura en Microbiología. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 1-154 p.

- Usall, J; Ippolito, A; Sisquella, M; Neri, F. 2016. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 122:30–40.
- Velásquez, D, 2018. Efecto de la irradiación de Luz Ultravioleta UV-C sobre el desarrollo de moho y otras variables de calidad poscosecha en piña (*Ananas comusus* L. Merr.) Híbrido MD-2. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 30-35 p.
- Villarroel, D; Romero, L; Brito, M; Yndira, A. 2014. Luz Ultravioleta: Inactivación Microbiana En Frutas (en línea). *Universidad de Oriente, Venezuela* 27(3):454–469.
- Waewthongrak, W; Pisuchpen, S; Leelasuphakul, W. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 99:44–49.
- Wisniewski, M; Droby, S; Norelli, J; Liu, J; Schena, L. 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity (en línea). *Postharvest Biology and Technology* 122:3–10.
- Xu LF; Du YM. 2011. Effects of yeast antagonist in combination with UV-C treatment on postharvest diseases of pear fruit. *BioControl* 57(3):C451–61.
- Yáñez- Mendizábal, V; Viñas, I; Usall J; Torres, R; Solsona, C; Teixidó, N. 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low-cost commercial products and by-products. *Biological Control* 60: 280–289.
- Yadav, AN; Verma, P; Kumar, V; Sangwan, P; Mishra, S; Panjiar, N; Gupta, VK; Saxena, AK. 2018. Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habits., Elsevier B.V. 1-18 p.

- Yong-Gui, P; He, Z. 2012. Effect of UV-C Radiation on the Quality of Fresh-cut Pineapples. *Procedia Engineering* 37:113 – 119.
- Zhang, J. (2007). The potential of a new fungicide fludioxonil for stem-end rot and green mold control on Florida citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 46: 262–270.
- Zhang, D; López, R JG; Spadaro, D; Garibaldi, A; Gullino, ML. 2010. Efficacy of yeast antagonists used individually or in combination with hot water dipping for control of postharvest brown rot of peaches. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117(5):226–232.
- Zheng, M; Shi, J; Shi, Juan, Wang, Q; Li, Y. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control* (65):200–206.
- Zhou, Q; Fu M., Chen X; Qiu J., Wang F; Yan R., Zhao S; Xin X. (2020). Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes. *Food science and nutrition* 8:1499–1508.

10. ANEXOS

10.1. Primer ensayo- resultados.

Anexo 1. Incidencia y número de hojas afectadas por moho en la corona en frutos de piña de tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.

Tratamientos Dosis UVC (kJ/m ²)	Tiempo (min)	Moho en corona			
		Salida de frío 7° C)		Salida de anaquel 18°C	
		% incidencia	N° de hojas afectadas	% incidencia	N° de hojas afectadas
0	0	0,67 (± 0,13)	1,73 (±0,45)	100,00 (±0,00)	7,73 (±0,45)
5	4	0,27 (± 0,12)	0,53 (±0,29)	100,00 (±0,00)	10,53 (±0,86)
15	12	0,33 (± 0,13)	0,73 (±0,36)	100,00 (±0,00)	8,93 (±1,06)
25	20	0,47 (± 0,13)	0,87 (±0,27)	100,00 (±0,00)	8,33 (±0,96)
Valor de p		0,1324	0,0835	sp	0,1107

Medias con letras iguales entre cada etapa evaluación no son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Anexo 2. Firmeza interna, acidez titulable y brix en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.

Tratamientos Dosis UVC (kJ/m ²)	Tiempo (min)	Firmeza interna	Acidez (%)	Brix (%)
		Salida de anaquel (18° C)		
0	0	8,24 A (±0,47)	0,75 A (±0,04)	15,17 A (±0,34)
5	4	9,53 A (±0,51)	0,77 A (±0,05)	15,11 A (±0,27)
15	12	9,49 A (±0,76)	0,79 A (±0,05)	15,46 A (±0,30)
25	20	8,36 A (±0,44)	0,90 A (±0,06)	14,95 A (±0,33)
Valor de p		0,1880	0,4830	0,7003

Medias con letra distinta son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

Anexo 3. Color con colorímetro en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.

Tratamientos Dosis UVC (kJ/m ²)	Tiempo (min)	Dosis UV- C (kJ/m ²)	Color con colorímetro		
			Salida de anaquel (18° C)		
			L*	a*	b*
0	0	0	27,63 A (±0,65)	1,69 A (±0,23)	22,31 A (±0,66)
5	4	5	26,03 A (±0,35)	1,57 A (±0,21)	23,05 A (±0,48)
15	12	15	26,09 A (±0,49)	1,63 A (±0,26)	24,11 A (±0,66)
25	20	25	26,67 A (±0,49)	2,01 A (±0,16)	24,36 A (±0,80)
Valor de p			0,1070	0,4830	0,1133

Medias con letras distinta son significativamente diferentes entre sí, según prueba DGC para color con colorímetro y Kruskal Wallis para color con escala ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

Anexo 4. Índice de color escala en frutos de piña según tratamientos con diferentes dosis de UV-C después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel.

Dosis UV- C (kJ/m ²) Tratamientos	Tiempo (min)	Índice Color escala (%)	
		Salida de cámara (7° C)	Salida de anaquel (18°)
Testigo	0	4,17 A (±0,70)	8,33 A (±1,22)
5	4	4,45 A (±0,76)	8,89 A (±1,14)
15	12	4,72, A (±0,69)	8,89 A (±0,90)
25	20	6,39 A (±1,07)	11,39 A (±1,37)
Valor de p		0,2278	0,3338

Medias con letra distinta entre periodos son significativamente diferentes entre sí, según prueba DGC para color con colorímetro y Kruskal Wallis para color con escala ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

10.2. Segundo ensayo- resultados

Anexo 5. Quema de corona con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *B. subtilis* (*B.s*) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos Combinados (UVC) kJ/m ²	Quema de corona		Quema de corona	
	Salida de frío (7° C)		Salida de anaquel 18°C	
	% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad
Ce	10,00 (±0,07)	2,50 A (±1,72)	18,00 (±0,10)	7,35 A (±4,17)
<i>B.s m</i>	20,00 (±0,09)	5,00 A (±2,29)	41,00 (±0,12)	13,24 A (±4,35)
<i>B.s m</i> + Ce	10,00 (±0,07)	3,75 A (±2,74)	24,00 (±0,11)	10,29 A (±4,82)
<i>B.s al</i>	20,00 (±0,09)	6,25 A (±3,08)	29,00 (±0,11)	13,24 A (±4,35)
<i>B.s a</i> +Ce	20,00 (±0,09)	6,25 A (±3,08)	47,00 (±0,12)	13,24 A (±4,35)
Valor de p	0,7784	0,8199	0,3294	0,8605

Medias con una letra distinta entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis para incidencia y DGC para severidad ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

Anexo 6. Porcentaje de acidez titulable con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *B. subtilis* (B.s) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, B.s m = *B. subtilis* media, B.s a = *B. subtilis* alta.

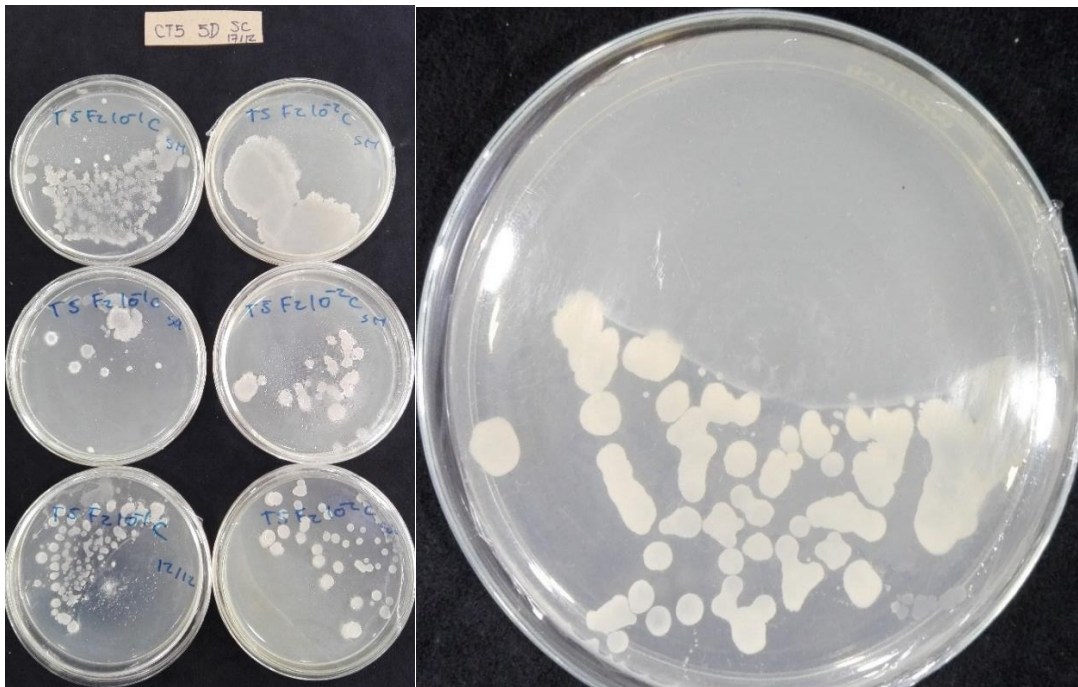
Tratamientos Combinados (UVC) kJ/ m ²	Acidez (%)
	Salida de anaquel 18°C
Ce	0,72 A (±0,02)
B.s m	0,70 A (±0,09)
B.s m + Ce	0,76 A (±0,09)
B.s al	0,71 A (±0,04)
B.s a +Ce	0,74 A (±0,02)
Valor de p	0,6262

Medias con una letra distinta entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba DGC (p< 0,05).

Anexo 7. Variables de color *L, *a y *b con la aplicación combinada de la dosis 5 kJ/m² de UV-C más *B. subtilis* (B.s) después del almacenamiento en frío (21 días) y 3 días de vida en anaquel de frutos de piña. Ce = cera, B.s m = *B. subtilis* media, B.s a = *B. subtilis* alta después del almacenamiento en frío de frutos de piña con cuatro tratamientos combinados UV-C, B.s y cera.

Tratamientos Combinados (UVC) kJ/m ²	Color con colorímetro		
	Salida de anaquel (18° C)		
	L*	a*	b*
Ce	47,08 A (±1,17)	1,11 A (±0,65)	27,82 A (±0,75)
B.s m	46,91 A (±0,88)	1,96 A (±0,64)	26,21 A (±0,56)
B.s m + Ce	47,54 A (±0,49)	2,79 A (±0,60)	26,24 A (±0,80)
B.s al	46,12 A (±0,76)	3,35 A (±0,60)	26,34 A (±0,66)
B.s a +Ce	47,54 A (±0,99)	2,79 A (±0,60)	26,24 A (±0,80)
Valor de p	0,8324	0,0883	0,4393

Medias con letras distintas entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC (p< 0,05). Error estándar entre paréntesis.

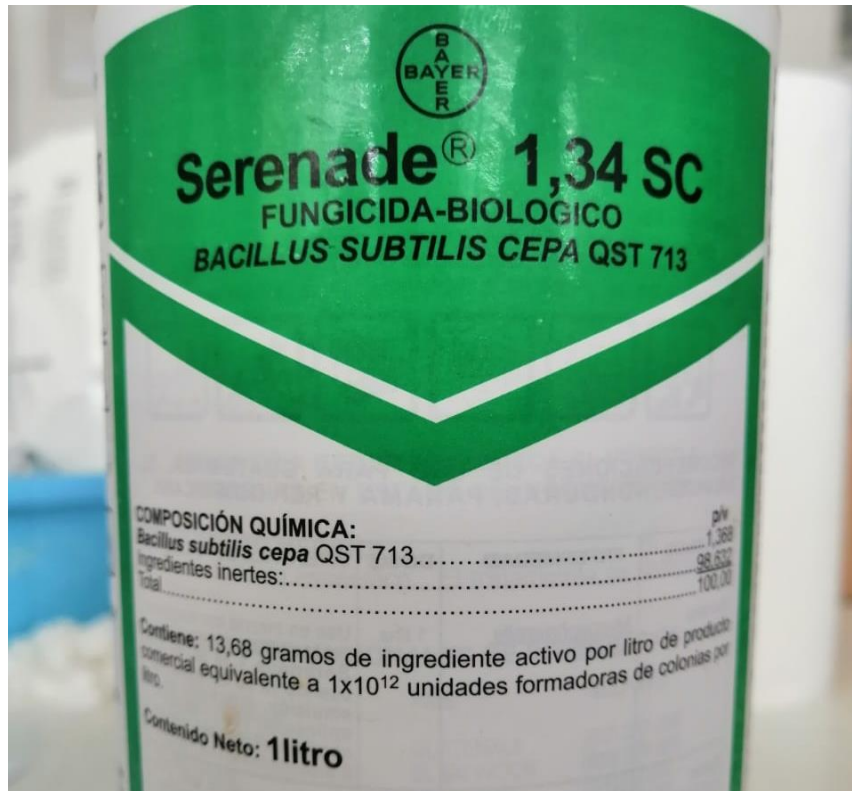


Anexo 8. *Bacillus* recuperado en el ensayo dos del tratamiento UVC+ *B.s a* + Ce a salida de cámara fría (SC).

Anexo 9. Contenido de fenoles correspondientes a cuatro tejidos de frutos de piña en combinación con 5 kJ/m² de UV-C y el controlador biológico *Bacillus subtilis* (*B.s*) en dos diferentes dosis. Ce = cera, *B.s m* = *B. subtilis* media, *B.s a* = *B. subtilis* alta.

Tratamientos Combinados (UVC)	Fresco mg eq/aci gal/1 g			
	Cáscara	Corona	Pedúnculo	Pulpa
Ce	1,56 A	0,24 A	0,1 A	0,42 A
<i>B.s m</i>	1,8 A	0,19 A	0,19 A	0,33 A
<i>B.s m</i> + Ce	1,58 A	0,23 A	0,15 A	0,41 A
<i>B.s a</i>	2,36 B	0,16 A	0,16 A	0,37 A
<i>B.s a</i> + Ce	2,04 B	0,24 A	0,09 A	0,37 A
Valor de p	0,0007	0,1584	0,0594	0,4177

Medias con letras entre columnas son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).



Anexo 10. Presentación comercial de Serenade 1,34 SC fungicida biológico, *Bacillus subtilis* cepa QST 713 usada para los ensayos dos y tres.

10.3. Tercer ensayo- resultados

Anexo 11. Quema de corona en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a

Tratamientos	Quema de corona					
	15 DEC (7° C)		Salida de frío (7° C)		Salida de anaquel 18°C	
	% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad	% incidencia	% severidad
Testigo	0,02 (±0,02) A	0,52 (±0,52) A	0,03 (±0,00) A	0,71 (±0,71) A	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)
UV-C + <i>B.s m</i>	0,00 (±0,00) A	0,49 (±0,49) A	0,14 (±0,06) A	3,38 (±1,42) A	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)
Químico	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00) A	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)
Valor de p	0,3456	0,5945	0,0252	0,0342	sd	sd

Medias con letras distintas entre cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

Anexo 12. Sólidos solubles y acidez titulable en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamientos	Sólidos solubles (%)			Acidez (%)
	15 DEC (7° C)	Salida de frío (7° C)	Salida de anaquel 18°C	Salida de anaquel 18°C
Testigo	14,81 A (±0,57)	12,89 A (±0,28)	13,28 A (±0,25)	0,60 A (±0,02)
UV-C + <i>B.s m</i>	13,97, A (±0,24)	13,18 A (±0,29)	12,99 A (±0,18)	0,55 A (±0,03)
Químico	13,57 A (±0,24)	12,98 A (±0,23)	13,17 A (±0,13)	0,59 A (±0,02)
Valor de p	0,0869	0,7443	0,5315	0,3320

Medias con letras distintas entre cada etapa de evaluación son distintas son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

Anexo 13. Variable de color *b en frutos de piña a los 15 (15DEC) y 41 días a salida de cámara de fría a 7°C y posteriormente vida en anaquel (43 días a 18°C). Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamientos	Color colorímetro b*	
	Salida de frío (7° C)	Salida de anaquel 18°C
Testigo	48,84 A (±3,56)	21,71, B (±0,83)
UV-C + <i>B.s m</i>	50,98, A (±2,66)	21,54, B (±0,63)
Químico	51,59, A (±3,62)	22,49, B (±0,64)
Valor de p	0,8272	0,5741

Medias con letras distintas en cada etapa de evaluación son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$). Error estándar entre paréntesis.

Anexo 14. Fenoles totales correspondientes a cuatro diferentes tejidos de frutos de piña expuestos a tres tratamientos. Testigo: solo cera, UV + *B.s m* = UV + *B. subtilis* dosis media= 37,5 ml + Cera y Químico comercial = fludioxonil + Ce, 600 mg/ i.a.

Tratamientos (UVC)	fresco mg eq/aci gal/1 g			
	Cáscara	Corona	Pedúnculo	Pulpa
Testigo	2,73 B	0,20 A	0,14 B	0,85 A
UV-C + <i>B.s m</i>	1,96 A	0,23 A	0,2 C	0,93 A
Químico	2,36 B	0,20 A	0,09 A	0,89 A
Valor de p	0,0280	0,7585	0,0006	0,5097

Medias con letras en las columnas son significativamente diferentes entre sí, según prueba de separación de medias DGC ($p < 0,05$).

Anexo 15. Variables de Calidad inicial de diferentes frutos de piña evaluadas el día cero de llegada al laboratorio de poscosecha correspondiente a los tres ensayos.

Meses del año	Setiembre y octubre 2019	Noviembre y diciembre 2019	Marzo y abril 2020
Calidad inicial	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Firmeza externa (N)	52,47	61,48	53,90
Firmeza interna (N)	10,13	8,24	9,48
Brix (%)	15,42	13,83	13,2
acidez	0,62	0,68	0,48
L*	37,89	26,54	26,25
a*	-0,86	-0,09	0,29
b*	21,18	18,14	20,39
color escala (%)	0,83	0,97	1,19