

## Efectividad del ácido peracético (BioFruit HF15) frente a *Penicillium expansum* en condiciones *in vitro*

### INTRODUCCION

Luego de la cosecha la fruta de pepita es almacenada en cámaras frigoríficas durante un período de tiempo que puede prolongarse desde unos pocos días hasta un año. Durante el almacenamiento la fruta está expuesta a sufrir alteraciones que deterioran su calidad y disminuyen el beneficio económico (Sommer, 1985).

Las enfermedades causadas por hongos patógenos son la principal causa de pérdidas durante la poscosecha (Harvey, 1978; Kader, 1985; Kelman, 1989). Entre ellas, la podredumbre azul, producida por *Penicillium expansum* representa la enfermedad más importante en manzanas y peras en nuestro país y en todo el mundo (Eckert y Ogawa, 1988; Dobra y Rossini, 1993; Xu y Berrie, 2005). Las esporas de *P. expansum* están comúnmente presentes en las instalaciones del empaque, en el agua utilizada en el drench y en el hidromersor, en la línea de empaque, en el aire y sobre las paredes de las cámaras de almacenamiento, e infectan la fruta durante el manipuleo y el proceso de embalado (Rosenberger, 1990; Dobra y Rossini, 1993).

Para minimizar la ocurrencia de podredumbres se debe implementar un programa de manejo integrado durante las etapas de producción a campo, cosecha y poscosecha. Dentro del mismo, la realización de prácticas de higiene efectivas resulta fundamental para reducir la presencia de inóculo en el agua y sobre las superficies en contacto con el producto. Diferentes productos sanitizantes han demostrado una efectiva acción biocida sobre hongos patógenos de frutas (Vero et al., 2010). Entre ellos, el ácido peracético posee un amplio espectro de acción, es efectivo en presencia de materia orgánica y no afecta al ambiente, ya que se descompone en poco tiempo en agua, oxígeno y ácido acético (Kyanko et al., 2010). Sin embargo, si bien varios trabajos demostraron la eficacia sanitizante del mismo frente a bacterias patógenas, existen pocos estudios en relación a su acción antifúngica (Mari et al., 1999; Garmendia y Vero, 2006; Salomao et al., 2008).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción biocida del ácido peracético (BioFruit HF15) frente a conidios de *P. expansum* en condiciones *in vitro*, en función de la concentración y del tiempo de contacto, para determinar su efectividad para controlar esta enfermedad de poscosecha.

## MATERIALES Y METODOS

### **Sanitizante**

El sanitizante evaluado fue BioFruit HF15 (mezcla de ácido peroxiacético 15% y peróxido de hidrogeno 22%; Enviro Tech Chemical Service Inc). La muestra para realizar este estudio se tomó de un tambor de 200 L, identificado con el número de lote 33-103117-1.

A partir de la muestra se prepararon las diluciones en agua destilada estéril. El valor de pH de las soluciones fue de 2,8 a 3,0 y la temperatura de las mismas de aproximadamente 20 a 22°C. Para verificar la concentración de ácido peracético se utilizó el Peracetic Acid Test Kit elaborado por Masters Company Inc, USA, provisto por el fabricante del producto sanitizante a evaluar.

### **Ensayo de actividad sanitizante**

Se utilizaron tres cepas autóctonas de *P. expansum* pertenecientes al cepario de la EEA Alto Valle del INTA, con las cuales se preparó una suspensión de concentración  $10^6$  conidios/mL. Para ello, con un ansa se tomaron conidios desde tres placas Petri conteniendo cultivos monospóricos esporulados del hongo en agar papa glucosa (APG) de 15 a 20 días de incubación a 25 °C. Se colocaron dichos conidios en un tubo conteniendo agua destilada estéril con una gota de Tween 20. La suspensión se agitó en agitador Vortex y se midió la concentración al microscopio utilizando una cámara de Neubauer. Luego, se ajustó a la concentración deseada, la cual se verificó por recuento en placa.

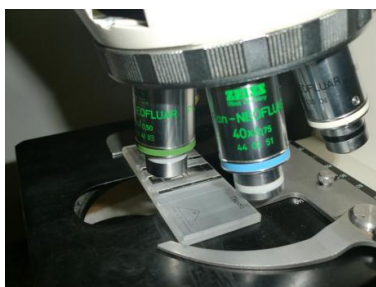
Para evaluar la actividad sanitizante del ácido peracético se colocaron 100 microlitros de la suspensión  $10^6$  conidios/mL a 10 mL de la muestra a evaluar. Los conidios se dejaron en contacto con la muestra durante un tiempo determinado, según cada caso. Pasado ese tiempo, se neutralizó la acción biocida utilizando metabisulfito de sodio (SMBS) a razón de 0,005 g de SMBS por cada 1 ppm de ácido peracético por litro de agua (EnviroTech, 2018). Finalmente, se determinó la concentración de conidios sobrevivientes en cada tratamiento por recuento en placa de APG. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado y el ensayo se repitió dos veces. Los resultados se expresan como el promedio del logaritmo base 10 del número de conidios sobrevivientes por mililitro de solución ( $\log n^\circ$  sobrevivientes/mL).

Se evaluaron los siguientes tratamientos:

- 1) Concentraciones: 50 ppm; 100 ppm; 200 ppm; 300 ppm y 400 ppm.
- 2) Tiempos de contacto: 60; 120 y 300 segundos.

### **Ensayo de validación del efecto neutralizante de la solución de SMBS**

Se evaluó la capacidad neutralizante del método utilizado, descrito anteriormente, determinando la concentración de conidios vivos remanentes luego de 2 minutos de contacto con una solución de ácido peracético neutralizada con la solución de SMBS. Para ello, 50 mL de solución sanitizante a una concentración de 200 ppm o 400 ppm se mezclaron con 1,052 mL o 2,104 mL de solución de SMBS a 50 g/l, respectivamente. Se agitó durante 10 segundos y luego se inoculó con 100 microlitros de una suspensión de conidios de *P. expansum* de concentración  $10^6$  conidios/mL. Después de 2 minutos se determinó el número de conidios sobrevivientes por recuento en placa y se comparó con el recuento obtenido en el control realizado utilizando 50 mL de agua.



**A.** Preparación de la suspensión de *P. expansum*



**B.** Medición de la concentración de ácido peracético



**C.** Preparación de las soluciones



**D.** Siembra en placas para recuento de conidios sobrevivientes



## RESULTADOS Y DISCUSION

### **Validación del efecto neutralizante de la solución de SMBS**

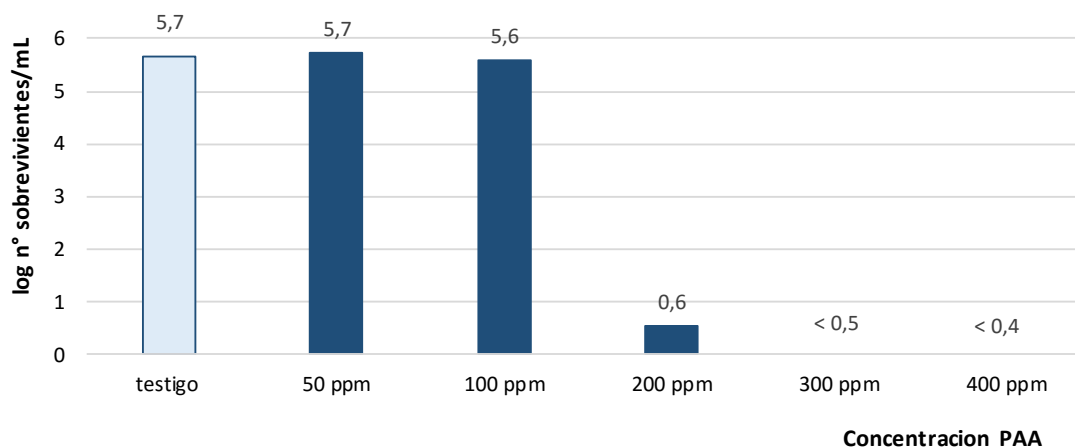
El método de neutralización fue validado. La concentración de conidios recuperada luego del tratamiento con las soluciones de ácido peracético a 200 ppm y 400 ppm neutralizadas con SMBS fue  $0,8 \times 10^6$  conidios/mL y  $1,2 \times 10^6$  conidios/mL respectivamente, mientras que el recuperado del tratamiento control con agua fue de  $1,1 \times 10^6$  conidios/mL. Esto demuestra que la adición de SMBS en las condiciones del ensayo resultó un método efectivo para neutralizar la actividad biocida del ácido peracético a las concentraciones mencionadas.

### **Ensayos de actividad sanitizante**

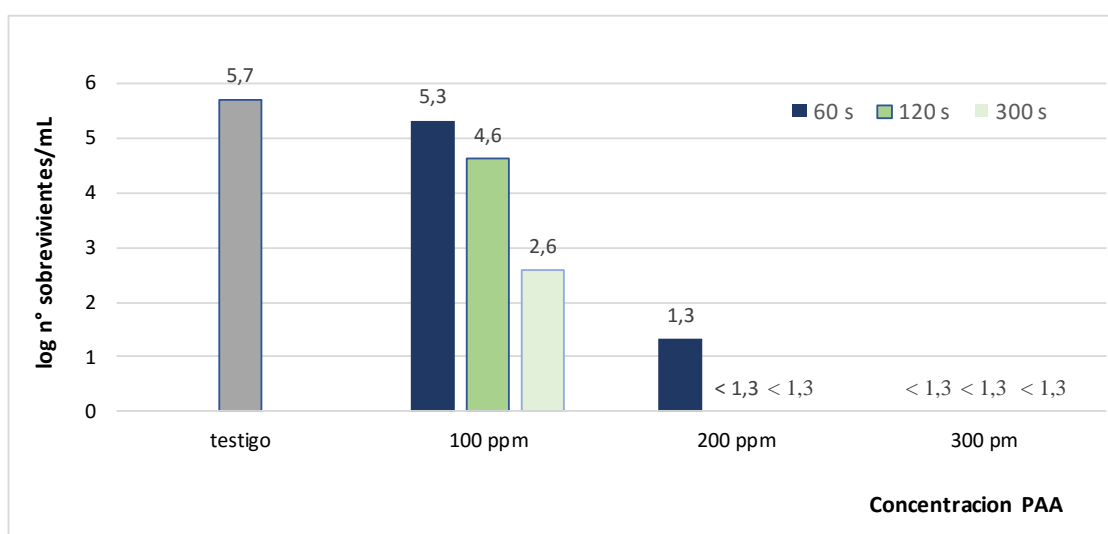
Luego de 120 s de contacto, el ácido peracético a 200 ppm logró disminuir más de 5 órdenes la concentración de conidios sobrevivientes de *P. expansum* (Figura 1). La Food and Drug Administration (FDA, 2014) define como sanitizante efectivo aquel que logra reducir 5 órdenes (99,999 %) la carga inicial de los microorganismos que se pretende controlar en 30 s de contacto. Según estos parámetros, las menores concentraciones evaluadas en este estudio de 50 ppm y 100 ppm, con un tiempo de contacto de 120 s, no resultaron efectivas para controlar al patógeno. Similares resultados fueron obtenidos por Garmendia y Vero (2006), quienes obtuvieron una reducción de 1,5 órdenes en el logaritmo de la concentración de esporas sobrevivientes de *P. expansum* luego de 30 s de contacto con una solución de 80 ppm de ácido peracético. Mientras que Kyanko et al. (2010), en trabajos similares, no observaron diferencias significativas entre el tratamiento control con agua y una solución de ácido peracético a 500 ppm, luego de 30 minutos de contacto.

La actividad biocida del sanitizante se incrementó con el tiempo de contacto (Figura 2). El tratamiento con ácido peracético a 100 ppm redujo la concentración de conidios sobrevivientes en 0,4; 1,1 y 3,1 órdenes, a medida que el tiempo de contacto aumentó desde 60, 120 hasta 300 s, respectivamente. En tanto que, el tratamiento con ácido peracético a 200 ppm redujo la concentración de conidios 4,4 órdenes luego de 60 s de contacto y con 120 s logró una reducción mayor a 5 órdenes. Con una concentración del sanitizante de 300 ppm, se obtuvo una reducción mayor a 5 órdenes en 60 s.

Diferentes trabajos demuestran la efectividad del ácido peracético a una concentración de 40-80 ppm para controlar bacterias patógenas humanas como *Escherichia coli* O157 y *Listeria monocytogenes* (Park y Beuchat, 1999; FDA, 2001; Garmendia y Vero, 2006). Sin embargo, la actividad biocida de un sanitizante es dependiente del tipo de microorganismo que se pretende controlar. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la concentración para controlar conidios de *P. expansum* en los establecimientos de empaque debería ser  $\geq 100$  ppm, en función fundamentalmente del tiempo de contacto disponible, según las condiciones de uso en cada caso.

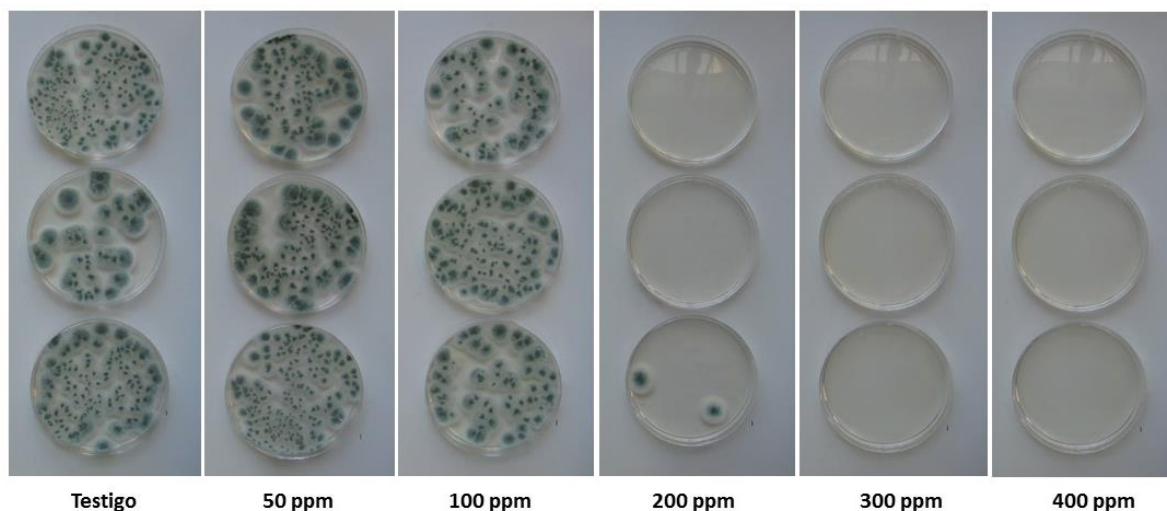


**Figura 1:** Logaritmo de la concentración de conidios sobrevivientes de *P. expansum* luego de 120 s de contacto con diferentes concentraciones de ácido peracético (PAA) a pH=3 y 20 °C.



**Figura 2:** Logaritmo de la concentración de conidios sobrevivientes de *P. expansum* luego de diferentes tiempos de contacto con diferentes concentraciones de ácido peracético (PAA) a pH=3 y 20 °C.

Las barras en la Figura 1 y Figura 2, muestran el valor promedio de tres repeticiones del logaritmo de la concentración de conidios sobrevivientes para cada tratamiento. El valor <n significa que el número de colonias obtenidas en la placa de recuento en las condiciones del ensayo fue 0. Pero, según el método utilizado, se puede asegurar que el logaritmo de la concentración de conidios sobrevivientes por mililitro es <n.



**Figura 3:** Actividad sanitizante de diferentes concentraciones de ácido peracético frente a conidios de *P. expansum* luego de 120 s de contacto a pH=3 y 20 °C.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, en las condiciones en que se realizaron las evaluaciones, el ácido peracético BioFruit HF15 demostró una efectiva acción fungicida frente a conidios de *P. expansum* en condiciones in vitro, cuando se utilizó a una concentración de 200 ppm con un tiempo de contacto de 120 s, logrando una disminución mayor a 5 órdenes en la concentración inicial de conidios vivos.

El ácido peracético resulta una alternativa muy interesante para reducir el inoculo dentro de un programa de manejo integrado para el control de *P. expansum* y otras enfermedades de poscosecha. En futuros estudios se sugiere evaluar el efecto del sanitizante sobre otros hongos patógenos, así como realizar pruebas en condiciones de uso real en los establecimientos de empaque, para validar los resultados obtenidos en este trabajo.

15/11/2018

Ing. Agr. Adrián Colodner

INTA EEA Alto Valle

## BIBLIOGRAFIA

Dobra, A.; Rossini, M. 1993. Patógenos de postcosecha: Aspectos epidemiológicos, resistencia a fungicidas y su control. Curso internacional de sanidad en frutales de pepita / INTA EEA Alto Valle. Cap. 11, p. 22.

Eckert, J.W. and Ogawa, J.M. 1988. The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. Annual Review of Phytopathology 26: 433-469.

EnviroTech. 2018. Neutralization of Perasan® A and BioSide® HS 15% using sodium metabisulfite and sodium bisulfite. Disponible en: <https://envirotech.com/?s=metabisulfite+neutralization>. Acceso: 4 de junio de 2018.

FDA 2001. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Produce and Fresh-Cut Produce. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ucm091363.htm>. Acceso: noviembre 2018.

FDA 2014. Science and our food supply. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/ToolsMaterials/UCM430363.pdf> Acceso: noviembre de 2018

Garmendia, G. and Vero, S. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Horticultura: Revista de frutas, hortalizas, flores, plantas ornamentales y de viveros. ISSN 1132-2950 N°197, 18-27. Disponible en: [http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh197/18\\_27.pdf](http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh197/18_27.pdf). Acceso: junio de 2018.

Harvey, J.M. 1978. Reduction of Losses in Fresh Market Fruits and Vegetables. Annual Review of Phytopathology. 16: 321-341.

Kader, A. 1985. Postharvest biology and technology: An overview. Postharvest technology of horticultural crops. Published by University of California, p.3-7.

Kelman, A. 1989. Introduction: The Importance of Research on the Control of Postharvest Diseases of Perishable Food Crops. Phytopathology 79: 1374.

Kyanko, M.; Russo, M.; Fernandez, M y Pose G. 2010. Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de la pudrición de poscosecha de frutas y hortalizas. Información Tecnológica Vol. 21(4) 125-130.

Mari, M.; Cembali, T.; Baraldi, E. y Casalini, L. 1999. Peracetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits. Plant disease 83, 773-776.

Park CM, Beuchat LR. 1999. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. Dairy Food Environ Sanit 19:842-7

Rosenberger, D.A. 1990. Blue mold. In: Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. (Eds.), Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press, St. Paul, MN, pp. 54-55.

Salamao, B.; Aragao, G.; Churey, J. y Worobo, R. 2008. Efficacy of sanitizing treatments against *Penicillium expansum* inoculated on six varieties of apples. *Journal of food protection*, Vol 71. No 3, 643-647.

Sommer, N.F. 1985. Strategies for control of postharvest diseases of selected commodities. In: *Postharvest technology of horticultural crops*. Published by University of California, p. 83-99.

Vero, S.; Colodner, A.; Di Masi, S.; Garmendia, G.; Falconí, C.; Mondino, P.; Montealegre, J.; Nunes, C.; Salazar, M.; Stadnik, M.; Usall, J. 2010. Guía de higiene para establecimientos manipuladores de frutas frescas, 32p. Proyecto CYTED 106AC0302 "Desarrollo de tecnologías para manejo integrado (MI) de enfermedades del manzano".

Xu, X.M. and Berrie, A.M. 2005. Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: a review. *Food Add. Contam* 22: 290-301.