

## Actividad esporicida de la solución electrolizada con pH neutro en hongos de importancia poscosecha\*

### Sporicidal activity of the electrolyzed solution with neutral pH in fungi of postharvest importance

Rafael Gómez Jaimes<sup>1§</sup>, Tania Villarreal Barajas<sup>2</sup>, Alfonso Vázquez López<sup>3</sup>, Ramón Ignacio Arteaga Garibay<sup>4</sup> y Jorge Alberto Osuna García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Internacional México-Nogales km 6, Entrada a Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. (gomez.rafael@inifap.gob.mx; osuna.jorgealberto@inifap.gob.mx). <sup>2</sup>Esteripharma México, SA de CV. Patricio Sanz 1582, Col. del Valle, Ciudad de México, México. CP. 03100. (tvillarreal@esteripharma.com.mx). <sup>3</sup>Hornos núm. 1003, Col. Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. CP. 71230. (avasquez@jpn.mx). <sup>4</sup>Boulevard de la Biodiversidad núm. 2498, Col. Centro, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. CP. 47600. (arteaga.ramon@inifap.gob.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: gomez.rafael@inifap.gob.mx.

#### Resumen

El agua electrolizada con pH neutro (7) es un novedoso agente antimicrobiano, que tiene efecto en una gran variedad de microorganismos, seguro para los seres humanos y el medio ambiente. Se determinó la eficacia del agua electrolizada de súper oxidación con pH neutro (SES) en la reducción de la germinación de esporas y desarrollo del tubo germinativo en hongos de importancia poscosecha. Una suspensión de  $8 \times 10^7$  esporas mL<sup>-1</sup> de los hongos *Botrytis cinerea* aislado de zarzamora, *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de mango, guayaba y lichi, *Fusarium solani* aislado de chile y estevia, *Monilinia fructicola* aislado de durazno, *Penicillium digitatum* aislado de limón mexicano y limón persa, *Penicillium* sp., aislado de papaya y *Rhizopus stolonifer* aislado de yaca y guanábana, estuvieron en contacto con la SES por 5 min a concentraciones de 3, 5, 6, 8, 18, 24, 27, 29, 36 y 43 ppm de cloro libre, y agua destilada estéril (testigo). Las esporas se sembraron en medio de cultivo papa dextrosa agar (Bioxon<sup>®</sup>); las evaluaciones se realizaron a las 24 y 48 horas posteriores a la siembra. La inhibición de 100% en la

#### Abstract

The electroless water with neutral pH (7) is a novel antimicrobial agent, which has an effect on a large variety of microorganisms, safe for humans and the environment. The efficiency of electrolyzed super oxidation water with neutral pH (SES) in the reduction of spore germination and development of the germinative tube in fungi of postharvest importance was determined. A suspension of  $8 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> spores of the fungi *Botrytis cinerea* isolated from blackberry, *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango, guava and lychee, *Fusarium solani* isolated from chili and stevia, *Monilinia fructicola* isolated from peach, *Penicillium digitatum* isolated from Mexican lemon and Persian lemon, *Penicillium* sp., papaya isolate and *Rhizopus stolonifer* isolated from yaca and soursop, were in contact with the SES for 5 min at concentrations of 3, 5, 6, 8, 18, 24, 27, 29, 36 and 43 ppm free chlorine, and sterile distilled water (control). Spores were seeded in culture medium potato dextrose agar (Bioxon<sup>®</sup>); the evaluations were carried out at 24 and 48 hours after sowing. The 100% inhibition of spore

germinación de esporas y longitud del tubo germinativo de *Botrytis* se observó en el rango de concentración de 18-43 ppm, *Colletotrichum* (6-43 ppm), *Fusarium* (6-43 ppm), *Monilinia* (8 y 24-43 ppm), *Penicillium* (18-43 ppm), *Rhizopus* aislado de guanábana (5-24 y 29-43 ppm) y *Rhizopus* de yaca (18-43 ppm). Los resultados sugieren que la SES podría ser utilizada como alternativa de control de hongos poscosecha.

**Palabras clave:** enfermedad, esporas, fruto, pudrición, patógeno.

## Introducción

Los patógenos poscosecha de origen fungoso son considerados la causa de pérdidas poscosecha en frutos y vegetales frescos (Nunes, 2012; Spadaro y Droby, 2016). FAO (2011) mencionó que el porcentaje de pérdidas de frutos y vegetales durante el manejo poscosecha, almacenamiento y empaque 34% en el Sur y Suroeste de Asia, 30% en América Latina, Asia Central y Norte de África, 10% en países industrializados de Asia, 7% en Europa y 6% en Norteamérica y Oceanía. Especies de hongos dentro de los géneros *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Gloeosporium* y *Colletotrichum*, representan los patógenos responsables de las enfermedades poscosecha más importantes (Dean *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Aunque el uso de fungicidas químicos para el manejo de enfermedades poscosecha de frutos y vegetales sigue siendo el método de control más utilizado, los efectos en la salud por los residuos de fungicidas y el medio ambiente, así como el desarrollo de biotipos resistentes de patógenos asociados a su uso continuo, han generado el establecimiento de estrictas normas regulatorias y fuertes demandas de los consumidores para reducir al máximo el uso de químicos en sus suministros de alimentos (Droby *et al.*, 2009; Abano y Sam-Amoah, 2012; Spadaro y Droby, 2016).

Debido a lo anterior, en los últimos años se han explorado métodos alternativos para el manejo de enfermedades poscosecha de bajo impacto ambiental y en la salud humana (Sharma *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Rahul *et al.*, 2015). La industria de los alimentos ha empleado numerosas técnicas para la eliminación de patógenos en cada una de las cadenas de la producción de alimentos. Sin embargo, algunas de estas técnicas poseen desventajas por su alto costo, permanencia de residuos químicos, baja eficacia o efectos adversos en

germinación and *Botrytis* germ length was observed in the concentration range of 18-43 ppm, *Colletotrichum* (6-43 ppm), *Fusarium* (6-43 ppm), *Monilinia* (8 and 24-43 ppm), *Penicillium* (18-43 ppm), *Rhizopus* isolated from soursop (5-24 and 29-43 ppm) and *Rhizopus* of yaca (18-43 ppm). The results suggest that SES could be used as an alternative control of post-harvest fungi.

**Keywords:** disease, fruit, pathogen, rot, spores,

## Introduction

Post-harvest pathogens of fungal origin are considered the main cause of post-harvest losses in fresh fruits and vegetables (Nunes, 2012; Spadaro and Droby, 2016). FAO (2011) mentioned that the percentage of losses of fruits and vegetables during post-harvest handling, storage and packaging 34% in South and Southwest Asia, 30% in Latin America, Central Asia and North Africa, 10% in industrialized countries of Asia, 7% in Europe and 6% in North America and Oceania. In the present study, the most important species of fungi were found in the genus *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Gloeosporium* and *Colletotrichum* represent the pathogens responsible for the most important postharvest disease (Dean *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Although the use of chemical fungicides for the management of post-harvest diseases of fruits and vegetables remains the most commonly used control method, the health effects of fungicide residues and the environment, as well as the development of resistant biotypes of associated pathogens to their continued use, have led to the establishment of strict regulatory standards and strong consumer demands to minimize the use of chemicals in their food supplies (Droby *et al.*, 2009; Abano and Sam-Amoah, 2012; Spadaro and Droby, 2016).

Due to the above, in the last years alternative methods have been explored for the management of postharvest diseases of low environmental impact and in human health (Sharma *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Rahul *et al.*, 2015). The food industry has employed numerous techniques for the elimination of pathogens in each of the food production chains. However, some of these techniques have disadvantages due to their high cost, permanence of chemical residues, low efficacy

la calidad de los productos alimenticios (Abadias *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2016). Actualmente se han generado otras alternativas de control de patógenos, tal es caso del agua electrolizada, la cual es producida con agua normal, sin la adición de ningún químico, excepto cloruro de sodio (Rahman *et al.*, 2016).

El agua electrolizada es generada por la electrolisis de una solución diluida de NaCl que pasa a través de un ánodo en una membrana de electrolisis (Kim *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008). El agua electrolizada presenta un elevado potencial óxido reducción y presencia de ácido hipocloroso, estas propiedades hacen que exhiba actividad antimicrobiana contra diferentes tipos de virus, bacterias y hongos (Buck *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). En el caso de hongos, el agua electrolizada ha mostrado efectividad sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasticus*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Helminthosporium* sp., y *Phytophthora parasitica* (Buck *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2003; Whangchai *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

En años recientes, el agua electrolizada acida (pH 2-4) y el agua electrolizada neutra (pH 6-8) han sido estudiadas por su alta efectividad contra patógenos que afectan frutas y vegetales. El agua electrolizada acida tiene un fuerte efecto antimicrobiano debido a su bajo pH (2-4), alto potencial oxidación reducción y a sus activos oxidantes como el ácido hipocloroso. No obstante, presenta algunas desventajas, es potencialmente corrosiva para los equipos utilizados en los procesos e irritante para las manos, y presenta una vida corta de almacén debido a la pérdida de cloro, ya que a este pH bajo, el Cl<sub>2</sub> disuelto en gas puede rápidamente perderse por efecto de la volatilización, pudiendo afectar de manera adversa la salud humana y medioambiente (Abadias *et al.*, 2008; Guentzel *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

Por otra parte, el agua electrolizada neutra, conocida también como agua electrolizada ligeramente acida, es una solución con pH entre 6-8, en la cual los principales agentes biocidas son el HOCl, ClO<sup>-</sup>, HO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Debido a su pH neutro es más estable, ya que la pérdida de cloro se reduce significativamente; además, contribuye a la no corrosión de superficies metálicas y minimiza los daños potenciales a la salud humana y el medio ambiente (Landa-Solis *et al.*, 2005; Deza *et al.*, 2005; Luo y Oh, 2015; Wang *et al.*, 2016). Con base a lo anterior, el agua electrolizada es una alternativa potencial para el control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola, sin que se

or adverse effects on the quality of food products (Abadias *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2016). Other pathogen control alternatives have now been generated, such as electrolyzed water, which is produced with normal water, without the addition of any chemicals except sodium chloride (Rahman *et al.*, 2016).

Electrolyzed water is generated by the electrolysis of a dilute NaCl solution that passes through an anode in an electrolysis membrane (Kim *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008). The electrolyzed water has a high oxidation potential and the presence of hypochlorous acid, these properties cause it to exhibit antimicrobial activity against different types of viruses, bacteria and fungi (Buck *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). In the case of fungi, electrolyzed water has shown effectiveness on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasticus*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Helminthosporium* sp., and *Phytophthora parasitica* (Buck *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2003; Whangchai *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

In recent years acid electrolyzed water (pH 2-4) and neutral electrolyzed water (pH 6-8) have been studied for their high effectiveness against pathogens affecting fruits and vegetables. Acid electrolyzed water has a strong antimicrobial effect due to its low pH (2-4), high potential oxidation reduction and its oxidizing actives such as hypochlorous acid. However, it has some disadvantages, is potentially corrosive to the equipment used in the processes and irritant to the hands, and presents a short shelf life due to the loss of chlorine, since at this low pH, the Cl<sub>2</sub> dissolved in gas can rapidly be lost as a result of volatilization, and may adversely affect human health and the environment (Abadias *et al.*, 2008; Guentzel *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016).

On the other hand, neutral electrolyzed water, also known as slightly acidic electrolyzed water, is a solution with pH between 6-8, in which the main biocidal agents are HOCl, ClO<sup>-</sup>, HO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. Due to its neutral pH it is more stable, since the loss of chlorine is significantly reduced; in addition, it contributes to the non-corrosion of metallic surfaces and minimizes potential damages to human health and the environment (Landa-Solis *et al.*, 2005; Deza *et al.*, 2005; Luo and Oh, 2015; Wang *et al.*, 2016). Based on the above, electrolyzed water is a potential alternative for the control of phytopathogenic fungi of agricultural importance,

generen organismos resistentes, daños al ambiente y a la salud humana. El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad biológica de la solución electrolizada de súper oxidación con pH neutro (SES) a diferentes concentraciones en diferentes géneros de hongos poscosecha de importancia económica que afectan frutos y hortalizas.

## Materiales y métodos

### Hongos experimentales

En el presente estudio se evaluaron siete hongos de importancia en postcosecha: *Botrytis cinerea*, *Monilia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* y *Rhizopus stolonifer*. En el Cuadro 1 se detalla la información de cada aislado.

**Cuadro 1. Procedencia y cultivo de los aislados de hongos.**  
**Table 1. Origin and culture of fungal isolates**

| Hongo                                 | Cultivo                                       | Órgano afectado | Síntoma     | Estado            |
|---------------------------------------|---|-----------------|-------------|-------------------|
| <i>Botrytis cinerea</i>               | Zarzamora ( <i>Rubus ulmifolius</i> )         | Fruto           | Pudrición   | Colima y Jalisco  |
| <i>Monilia fructicola</i>             | Durazno ( <i>Prunus persica</i> )             | Fruto           | Pudrición   | México            |
| <i>Penicillium digitatum</i>          | Limón mexicano ( <i>Citrus aurantifolia</i> ) | Fruto           | Pudrición   | Colima            |
| <i>Penicillium digitatum</i>          | Limón persa ( <i>Citrus latifolia</i> )       | Fruto           | Pudrición   | Nayarit           |
| <i>Penicillium</i> sp.                | Papaya ( <i>Carica papaya</i> )               | Fruto           | Pudrición   | Colima            |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Mango ( <i>Mangifera indica</i> )             | Fruto           | Antracnosis | Nayarit y Sinaloa |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> )            | Fruto           | Antracnosis | Aguascalientes    |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Lichi ( <i>Litchi chinensis</i> )             | Fruto           | Antracnosis | Nayarit           |
| <i>Fusarium solani</i>                | Estevia ( <i>Stevia rebaudiana</i> )          | Raíz y tallo    | Pudrición   | Nayarit           |
| <i>Fusarium solani</i>                | Chile ( <i>Capsicum annuum</i> )              | Raíz y tallo    | Pudrición   | Aguascalientes    |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>            | Guanábana ( <i>Annona muricata</i> )          | Fruto           | Pudrición   | Nayarit           |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>            | Yaca ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> )      | Fruto           | Pudrición   | Nayarit           |

### Pruebas de efectividad biológica de la SES sobre la germinación de esporas y desarrollo del tubo germinativo

Se hizo un incremento de inóculo de las cepas seleccionadas en medio de cultivo PDA. Los hongos se incubaron a 27 °C durante 7-10 días en una incubadora BINDER-BD®. De cada uno de los géneros se preparó una solución conidial de  $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup> en agua destilada estéril. Se utilizó una solución electrolizada de súper oxidación con pH neutro (SES), la cual fue proporcionada por la empresa Esteripharma, SA. de CV.

without generating resistant organisms, damage to the environment and human health. The objective of this study was to determine the biological effectiveness of electrolyzed solution of super oxidation with neutral pH (SES) at different concentrations in different sorts of post-harvest fungi of economic importance affecting fruits and vegetables.

## Materials and methods

### Experimental fungi

In the present study seven fungi of importance in postharvest were evaluated: *Botrytis cinerea*, *Monilia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* and *Rhizopus stolonifer*. In the Table 1 details the information for each isolate.

### Testing biological effectiveness of the SES on spore germination and germ tube development

An inoculation increment was made for the selected strains in PDA culture medium. The fungi were incubated at 27 °C for 7-10 days in a BINDER-BD® incubator. From each of the genera, a conidial solution of  $1 \times 10^5$  spores mL<sup>-1</sup> in sterile distilled water was prepared. An electrolyzed super oxidation solution with neutral pH (SES) was used, which was provided by Esteripharma, SA. of CV. The value of pH

Respecto a las principales propiedades químicas de la SES, después de la electrólisis y hasta el final del experimento, el valor del pH ( $\text{pH } 7.03 \pm 0.02$ ), concentración de cloro activo ( $54 \pm 1 \text{ mg}^{-1} \text{ L}$ ) y potencial oxido-reducción ( $862 \pm 3.9 \text{ mV}$ ) fueron completamente estables.

Se hicieron diluciones con la SES y la solución conidial en agua destilada estéril a concentraciones de 3, 5, 6, 8, 18, 24, 27, 29, 36 y  $43 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro activo. Las esporas permanecieron 5 min en cada concentración. De cada dilución (tratamiento) se tomaron ocho muestras (repeticiones) de  $100 \mu\text{L}$  y se colocaron en cuatro puntos equidistantes sobre una caja de Petri con medio de cultivo PDA; las gotas fueron cubiertas con un cubreobjetos, después las cajas se taparon e incubaron a  $27^\circ\text{C}$ . Para cada tratamiento se incluyó un testigo absoluto. En el testigo absoluto, las esporas se sumergieron en agua destilada estéril en sustitución de la SES.

Se determinó el porcentaje de inhibición de germinación de esporas. La estimación se realizó mediante el conteo de 100 esporas en ocho puntos escogidos de manera aleatoria, un punto por cubreobjetos, en el campo claro a 10x de un microscopio óptico marca Leica® modelo DM1000. Se registró el número de esporas germinadas sobre el medio de cultivo PDA a las 24 y 48 h después de la siembra.

Asimismo, se tomaron fotografías de las esporas, y con el software Leica LAS® se midió la longitud del tubo germinativo ( $\mu\text{m}$ ) de las esporas a 24 y 48 h. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar con ocho repeticiones por tratamiento, en donde la unidad experimental fue la concentración de esporas cubierta con el cubreobjetos. Se realizó un análisis de varianza (Anova) y comparación de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ) usando SAS (SAS Institute, Inc., 2010).

## Resultados y discusión

### Efectividad de la SES sobre *Botrytis cinerea*

En *Botrytis* aislada de zarzamora en el estado de Colima, la SES tuvo efecto en la reducción de la germinación de esporas en todas las concentraciones a las 24 h, a intervalos de concentración de 2-43 ppm de cloro activo la germinación se redujo 100%. A las 48 h 100% de reducción se observó a 4 y 18-43 ppm (Cuadro 2). El desarrollo del tubo germinativo se inhibió las 24 h a concentraciones de 2 a 43 ppm, mientras que

( $\text{pH } 7.03 \pm 0.02$ ), concentration of active chlorine ( $54 \pm 1 \text{ mg}^{-1} \text{ L}$ ) and potential oxidation-reduction was observed after the electrolysis and until the end of the experiment. ( $862 \pm 3.9 \text{ mV}$ ) were completely stable.

Dilutions were made with the SES and the conidial solution in sterile distilled water at concentrations of 3, 5, 6, 8, 18, 24, 27, 29, 36 and  $43 \text{ mg L}^{-1}$  of active chlorine. The spores remained 5 min at each concentration. From each dilution (treatment) eight samples (replicates) of  $100 \mu\text{L}$  were taken and placed at four equidistant points on a Petri dish with PDA culture medium; the beads were covered with a coverslip, then the boxes were capped and incubated at  $27^\circ\text{C}$ . For each treatment, an absolute control was included. In the absolute control, the spores were immersed in sterile distilled water replacing the SES.

Percent inhibition of spore germination was determined. The estimation was performed by counting 100 spores at eight randomly selected points, one spot per coverslip, in the clear field at 10x of a Leica® model DM1000 optical microscope. The number of spores germinated on the PDA culture medium was recorded at 24 and 48 h after sowing.

Also, photographs were taken of the spores, and the software Leica LAS® length germ tube ( $\mu\text{m}$ ) spores 24 and 48 h was measured. A completely randomized design with eight replicates per treatment was used for the statistical analysis, where the experimental unit was the spore concentration covered with the coverslip. An analysis of variance (Anova) was performed and comparison of means (Tukey  $p \leq 0.05$ ) using SAS (SAS Institute, Inc., 2010).

## Results and discussion

### Effectiveness of SES on *Botrytis cinerea*

In *Botrytis* isolated blackberry in the state of Colima, SES had effect in reducing spore germination at all concentrations at 24 h at concentration intervals of 2-43 ppm active chlorine germination was reduced by 100%. At 48 h 100% reduction was observed at 4 and 18-43 ppm (Table 2). The development of the germ tube was inhibited at 24 h at concentrations of 2 to 43 ppm, while at 48 h the total inhibition was reached from 4 to 43 ppm (Table 3). For the case of *Botrytis* isolated from blackberry in Jalisco, similar results were observed, where concentrations of 2 to 43 ppm



a las 48 h la inhibición total se alcanzó de 4 a 43 ppm (Cuadro 3). Para el caso de *Botrytis* aislado de zarzamora en Jalisco, se observaron resultados similares, donde concentraciones de 2 a 43 ppm no fueron estadísticamente diferentes a las 24 h y 100% de reducción en la germinación se presentó a concentraciones de 3, 4 y 18-43 ppm a 48 h, 100% de reducción se observó a 1, 3, 4, y 18-43 ppm (Cuadro 2).

### Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *B. cinerea* en frutos de zarzamora.

Table 2. Percent inhibition of *B. cinerea* spores germination in blackberry fruits.

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Zarzamora |           |          |          |
|------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
|                              | Colima    |           | Jalisco  |          |
|                              | 24 h      | 48 h      | 24 h     | 48 h     |
| Testigo                      | 0 b       | 0 d       | 0 c      | 0 c      |
| 3                            | 100 a     | 81.18 ab  | 100 a    | 100 a    |
| 5                            | 100 a     | 85.21 ab  | 95.32 ab | 96.42 ab |
| 6                            | 100 a     | 33.85 cd  | 87.04 ab | 81.02 ab |
| 8                            | 100 a     | 65.73 abc | 94.33 ab | 79.54 ab |
| 18                           | 100 a     | 100 a     | 100 a    | 100 a    |
| 24                           | 100 a     | 100 a     | 100 a    | 100 a    |
| 27                           | 100 a     | 100 a     | 100 a    | 100 a    |
| 29                           | 100 a     | 100 a     | 100 a    | 100 a    |
| 36                           | 100 a     | 100 a     | 100 a    | 100 a    |
| 43                           | 100 a     | 100 a     | 100 a    | 100 a    |

Letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En la longitud del tubo germinativo, a 24 h la inhibición se alcanzó a 3, 4 y 18-43 ppm, mientras que para 48 h se presentó a concentraciones de 1, 3, 4 y 18-43 ppm (Cuadro 3). Diversos estudios han reportado que el agua electrolizada tiene efecto esporicida sobre *Botrytis* (Huang *et al.*, 2008; Cravero *et al.*, 2016 y Feliziani *et al.*, 2016). Guentzel *et al.* (2010 y 2011) mencionaron que el agua electrolizada cercana a la neutralidad (pH= 6.3-6.5) inhibió *B. cinerea* aislada de uva y fresa a concentraciones de 25 a 100 ppm de cloro activo.

### Efectividad de la SES sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

En *Colletotrichum* aislado de mango en Nayarit, la SES inhibió 100% la germinación de las esporas a 24 h en concentraciones de 3, 6-24 y 29-43 ppm, mientras que en 48 h todas las concentraciones mostraron la inhibición total

were not statistically different at 24 h and 100% reduction in germination was presented at concentrations of 3, 4 and 18-43 ppm at 48 h, 100% reduction was observed at 1, 3, 4, and 18-43 ppm (Table 2).

### Cuadro 3. Longitud del tubo germinativo ( $\mu\text{m}$ ) de *B. cinerea* en frutos de zarzamora.

Table 3. Length of the germinative tube ( $\mu\text{m}$ ) of *B. cinerea* in blackberry fruits.

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Zarzamora             |          |          |          |
|------------------------------|-----------------------|----------|----------|----------|
|                              | Colima                |          | Jalisco  |          |
|                              | 24 h                  | 48 h     | 24 h     | 48 h     |
| Testigo                      | 274.78 <sup>x</sup> a | 584.65 a | 343.62 a | 264.02 b |
| 3                            | 0 c                   | 65.85 b  | 0 c      | 0 d      |
| 5                            | 0 c                   | 0 b      | 264.27 b | 72.72 cd |
| 6                            | 0 c                   | 0 b      | 41.46 c  | 375.02 a |
| 8                            | 0 c                   | 0 b      | 6.85 c   | 262.52 b |
| 18                           | 0 c                   | 0 b      | 0 c      | 0 d      |
| 24                           | 0 c                   | 0 b      | 0 c      | 0 d      |
| 27                           | 0 c                   | 0 b      | 0 c      | 0 d      |
| 29                           | 0 c                   | 0 b      | 0 c      | 0 d      |
| 36                           | 0 c                   | 0 b      | 0 c      | 0 d      |
| 43                           | 0 c                   | 0 b      | 0 c      | 0 d      |

<sup>x</sup> $\mu\text{m}$ = micras; letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

In the length of the germ tube, at 24 h the inhibition was reached at 3, 4 and 18-43 ppm, while at 48 h it was present at concentrations of 1, 3, 4 and 18-43 ppm (Table 3). Several studies have reported that electrolyzed water has a sporicidal effect on *Botrytis* (Huang *et al.*, 2008; Cravero *et al.*, 2016 and Feliziani *et al.*, 2016). Guentzel *et al.* (2010 and 2011) reported that electrolyzed water close to neutrality (pH= 6.3-6.5) inhibited *B. cinerea* isolated from grape and strawberry at concentrations of 25 to 100 ppm of active chlorine.

### Effectiveness of SES on *Colletotrichum gloeosporioides*

In *Colletotrichum* mango isolated in Nayarit, SES inhibited 100% germination of spores at 24 h in concentrations of 3, 6-24 and 29-43 ppm, whereas in 48 h, all concentrations showed total inhibition of spores (Table 4). The SES inhibited germ tube development at all concentrations at 24 h. At 48 h, concentrations of 2-43 ppm inhibited 100% growth, except at 27 ppm, where the length was 6  $\mu\text{m}$  (Table 5).

de las esporas (Cuadro 4). La SES inhibió el desarrollo del tubo germinativo en todas las concentraciones a las 24 h. A las 48 h, las concentraciones de 2-43 ppm inhibieron 100% el crecimiento, excepto a 27 ppm, donde la longitud fue de 6  $\mu$  (Cuadro 5).

Para *Colletotrichum* en frutos de mango de Sinaloa, la inhibición en la germinación fue de 100% a intervalos de concentración de 6-43 ppm a 24 h, y de 5-43 ppm a 48 h (Cuadro 4). Efectos similares se observaron en la longitud del tubo germinativo (Cuadro 5). En *Colletotrichum* de frutos de guayaba, la SES inhibió 100% la germinación de esporas y desarrollo del tubo germinativo en todas las concentraciones a las 24 y 48 h (Cuadro 4 y 5). Para el caso de *Colletotrichum* en frutos de lichi, a las 24 h concentraciones de 3 a 18 ppm y de 27 a 43 ppm inhibieron 100% la germinación, en tanto que a las 48 h, todas las concentraciones con la SES inhibieron 100% la germinación de las esporas (Cuadro 4). En la longitud del tubo germinativo, a las 24 h se inhibió su desarrollo a intervalos de concentración de 3-18 ppm y de 27-43 ppm. Para las 48 h, todas las concentraciones con la SES inhibieron el desarrollo del tubo germinativo (Cuadro 5).

Con base a los resultados obtenidos, se puede determinar que la SES tiene efecto de control sobre esporas de *Colletotrichum*, causante de la antracnosis en mango, lichi y guayaba, a concentraciones iguales o superiores a 6 ppm. Huang *et al.* (2008) y Hati *et al.* (2012) mencionaron que el agua electrolizada ha mostrado efecto esporicida sobre *Colletotrichum*. En un estudio en fresa (*Fragaria*  $\times$  *ananassa*), Hirayama *et al.* (2016), reportaron que el agua electrolizada neutra (pH= 6.5-7.5) eliminó por completo los conidios de *C. fruticola* a 10 ppm. De acuerdo con Buck *et al.* (2002), *Colletotrichum* es un hongo que posee una pared delgada, lo que lo hace susceptible al daño con agua electrolizada. Esto se debe a que induce ruptura de la célula, lo cual provoca alteraciones en los procesos celulares y por consiguiente muerte celular (Hati *et al.*, 2012).

### Efectividad de la SES sobre *Fusarium solani*

Los resultados en *Fusarium* aislado de Chile mostraron que la SES a concentraciones de 3 a 43 ppm redujo 100% la germinación de esporas a las 24 h; a las 48 h sólo la concentración a 5 ppm redujo la germinación 81.45%, el resto de las concentraciones la redujeron 100% (Cuadro 6). En la longitud del tubo germinativo las concentraciones de 3 a 43 ppm inhibieron totalmente el desarrollo del tubo a 24 h, y a las 48 h a

For *Colletotrichum* in mango fruits from Sinaloa, inhibition in germination was 100% at concentration intervals of 6-43 ppm at 24 h, and from 5-43 ppm at 48 h (Table 4). Similar effects were observed in the length of the germ tube (Table 5). In *Colletotrichum* guava fruits, SES inhibited 100% spore germination and germination development at all concentrations at 24 and 48 h (Table 4 and 5). For the case of *Colletotrichum* in lychee fruits, at 24 h concentrations of 3 to 18 ppm and 27 to 43 ppm inhibited 100% germination, while at 48 h, all concentrations with SES inhibited 100% germination of spores (Table 4). In the length of the germ tube, at 24 h their development was inhibited at concentration intervals of 3-18 ppm and 27-43 ppm. At 48 h, all concentrations with SES inhibited the development of the germ tube (Table 5).

Based on the results obtained, it can be determined that SES has a control effect on *Colletotrichum* spores, which causes anthracnose in mango, lychee and guava, at concentrations equal to or greater than 6 ppm. Huang *et al.* (2008) and Hati *et al.* (2012) mentioned that electrolyzed water has shown sporocidal effect on *Colletotrichum*. In a strawberry study (*Fragaria*  $\times$  *ananassa*), Hirayama *et al.* (2016), reported that neutral electrolyzed water (pH= 6.5-7.5) completely eliminated the conidia of *C. fruticola* at 10 ppm. According to Buck *et al.* (2002), *Colletotrichum* is a fungus that has a thin wall, which makes it susceptible to damage with electrolyzed water. This is because it induces cell disruption, which causes alterations in cellular processes and consequently cell death (Hati *et al.*, 2012).

### Effectiveness of SES on *Fusarium solani*

The results on *Fusarium* isolated from Chile showed that SES at concentrations of 3 to 43 ppm reduced spore germination by 100% at 24 h; at 48 h only the concentration at 5 ppm reduced germination 81.45%, the rest of the concentrations reduced it by 100% (Table 6). In the germ tube length concentrations of 3 to 43 ppm completely inhibited the development of the tube at 24 h, and at 48 h at concentrations of 3 to 4 and from 6 to 43 ppm there was no tube growth (Table 7). On the other hand, *Fusarium* isolated from stevia presented results similar to *Fusarium* isolated from Chile, both in the percentage of inhibition of spore germination and in the length of the germinative tube (Table 6 and 7). Buck *et al.* (2002) reported that electrolyzed water reduces spore germination in *Fusarium*.

concentraciones de 3 a 4 y de 6 a 43 ppm no hubo crecimiento del tubo (Cuadro 7). Por otra parte, *Fusarium* aislado de estevia presentó resultados similares a *Fusarium* aislado de chile, tanto en el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas como en la longitud del tubo germinativo (Cuadro 6 y 7). Buck *et al.* (2002) mencionaron que el agua electrolizada reduce la germinación de esporas en *Fusarium*.

Similar results were reported in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with acid electrolyzed water (Abbasi and Lazarovits, 2006). For its part Audenaert *et al.* (2012) determined that the electrolyzed neutral water had a sporicidal effect on *F. graminearum*. The data obtained in this research suggest that the SES has sporicidal effect and in the development of the *Fusarium* germinative tube at concentrations up to 3 ppm.

**Cuadro 4. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *C. gloeosporioides* en frutos de mango, guayaba y lichi.**  
**Table 4. Percentage inhibition of *C. gloeosporioides* spores germination in mango, guava and lychee fruits.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Mango   |         | Guayaba        |       | Lichi   |        | Mango   |         |
|------------------------------|---------|---------|----------------|-------|---------|--------|---------|---------|
|                              | Nayarit |         | Aguascalientes |       | Nayarit |        | Sinaloa |         |
|                              | 24 h    | 48 h    | 24 h           | 48 h  | 24 h    | 48 h   | 24 h    | 48 h    |
| Testigo                      | 0 b     | 21.86 b | 0 b            | 0 b   | 9.88 c  | 5.41 b | 5.65 b  | 8.51 b  |
| 3                            | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 96.67 a | 98.33 a |
| 5                            | 72.22 a | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 90.85 a | 100 a   |
| 6                            | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 100 a   | 100 a   |
| 8                            | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 100 a   | 100 a   |
| 18                           | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 100 a   | 100 a   |
| 24                           | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 85.75 b | 100 a  | 100 a   | 100 a   |
| 27                           | 99.35 a | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 100 a   | 100 a   |
| 29                           | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 100 a   | 100 a   |
| 43                           | 100 a   | 100 a   | 100 a          | 100 a | 100 a   | 100 a  | 100 a   | 100 a   |

Letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 5. Longitud del tubo germinativo ( $\mu\text{m}$ ) de *C. gloeosporioides* en frutos de mango, guayaba y lichi.**  
**Table 5. Length of the germ tube ( $\mu\text{m}$ ) of *C. gloeosporioides* in mango, guava and lychee fruits.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Mango                 |          | Guayaba        |          | Lichi    |          | Mango    |         |
|------------------------------|-----------------------|----------|----------------|----------|----------|----------|----------|---------|
|                              | Nayarit               |          | Aguascalientes |          | Nayarit  |          | Sinaloa  |         |
|                              | 24 h                  | 48 h     | 24 h           | 48 h     | 24 h     | 48 h     | 24 h     | 48 h    |
| Testigo                      | 190.86 <sup>x</sup> a | 443.69 a | 229.34 b       | 394.85 a | 638.87 a | 724.12 a | 122.09 a | 174.2 a |
| 3                            | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 5.13 c   | 10.6 b  |
| 5                            | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 71.56 b  | 0 b     |
| 6                            | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 8                            | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 18                           | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 24                           | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 80.59 b  | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 27                           | 0 b                   | 6.38 c   | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 29                           | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 36                           | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |
| 43                           | 0 b                   | 0 c      | 0 b            | 0 b      | 0 c      | 0 b      | 0 c      | 0 b     |

<sup>x</sup> $\mu\text{m}$ = micras; letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *F. solani* en Chile y estevia.****Table 6. Percentage inhibition of spore germination of *F. solani* in Chile and stevia.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Chile          |         | Estevia |        |
|------------------------------|----------------|---------|---------|--------|
|                              | Aguascalientes |         | Nayarit |        |
|                              | 24 h           | 48 h    | 24 h    | 48 h   |
| Testigo                      | 0 b            | 0 c     | 0 c     | 0 b    |
| 3                            | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 5                            | 100 a          | 81.45 b | 11.57 b | 3.12 b |
| 6                            | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 8                            | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 18                           | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 24                           | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 27                           | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 29                           | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 36                           | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |
| 43                           | 100 a          | 100 a   | 100 a   | 100 a  |

Letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Resultados similares fueron reportados en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con agua electrolizada acida (Abbasi y Lazarovits, 2006). Por su parte Audenaert *et al.* (2012) determinaron que el agua electrolizada neutra tuvo efecto esporicida sobre *F. graminearum*. Los datos obtenidos en esta investigación sugieren que la SES tiene efecto esporicida y en el desarrollo del tubo germinativo de *Fusarium* a concentraciones de hasta 3 ppm.

**Efectividad de la SES sobre *Monilinia fructicola***

En el porcentaje de reducción en la germinación de esporas todas las concentraciones de la SES no fueron estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) en las dos evaluaciones (24 y 48 h); en la primera evaluación el porcentaje de reducción fue de 77 a 100%, donde las concentraciones de 6 a 43 ppm inhibieron la germinación 100%, para la última evaluación el porcentaje de reducción estuvo entre 66 y 100%, y las concentraciones que inhibieron totalmente la germinación fueron 3, 8, y de 24 a 43 ppm (Cuadro 8). Para el caso de la longitud del tubo germinativo, las concentraciones de 6 a 43 ppm inhibieron el desarrollo del tubo a las 24 h, mientras que a las 48 h la inhibición se presentó en 3, 8 y de 24 a 43 ppm (Cuadro 9).

**Cuadro 7. Longitud del tubo germinativo ( $\mu\text{m}$ ) de *F. solani* en Chile y estevia.****Table 7. Length of the germinative tube ( $\mu\text{m}$ ) of *F. solani* in Chile and stevia.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Chile                 |          | Estevia  |          |
|------------------------------|-----------------------|----------|----------|----------|
|                              | Aguascalientes        |          | Nayarit  |          |
|                              | 24 h                  | 48 h     | 24 h     | 48 h     |
| Testigo                      | 173.73 <sup>x</sup> a | 565.28 a | 389.19 b | 577.98 b |
| 3                            | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 5                            | 0 b                   | 58.2 b   | 465.27 a | 661.80 a |
| 6                            | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 8                            | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 18                           | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 24                           | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 27                           | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 29                           | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 36                           | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |
| 43                           | 0 b                   | 0 b      | 0 c      | 0 c      |

<sup>x</sup> $\mu\text{m}$ =micras; letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Effectiveness of SES on *Monilinia fructicola***

In the percentage reduction in spore germination all SES concentrations were not statistically different ( $p \leq 0.05$ ) in the two evaluations (24 and 48 h); in the first evaluation the percentage of reduction was 77 to 100%, where the concentrations of 6 to 43 ppm inhibited the germination 100%, for the last evaluation the reduction percentage was between 66 and 100%, and the concentrations that totally inhibited germination were 3, 8, and 24 to 43 ppm (Table 8). For the germ tube length, concentrations of 6 to 43 ppm inhibited the development of the tube at 24 h, whereas at 48 h the inhibition was present at 3, 8 and from 24 to 43 ppm (Table 9).

In general, it can be inferred that concentrations of SES equal to or greater than 24 ppm significantly affect the germination and development of the *Monilinia* germ tube. Similar results were reported by Al-Haq *et al.* (2001); Huang *et al.* (2008); Hati *et al.* (2012); Rahman *et al.* (2016); Feliziani *et al.* (2016), who mentioned that electrolyzed water has control effects on *Monilinia*. For its part Guentzel *et al.* (2010) reported that electrolyzed water near neutrality (pH= 6.3-6.5) inhibited *M. fructicola* at concentrations of 25 to 100 ppm of active chlorine.

**Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *M. fructicola* en frutos de durazno.****Table 8. Percentage inhibition of *M. fructicola* spores germination in peach fruits.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Durazno          |         |
|------------------------------|------------------|---------|
|                              | Estado de México |         |
|                              | 24 h             | 48 h    |
| Testigo                      | 0 b <sup>x</sup> | 6.4 b   |
| 3                            | 78.33 a          | 100 a   |
| 5                            | 77.78 a          | 94.82 a |
| 6                            | 100 a            | 95.97 a |
| 8                            | 100 a            | 100 a   |
| 18                           | 100 a            | 93.33 a |
| 24                           | 100 a            | 100 a   |
| 27                           | 100 a            | 100 a   |
| 29                           | 100 a            | 100 a   |
| 36                           | 100 a            | 100 a   |
| 43                           | 100 a            | 100 a   |

Letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

De manera general se puede inferir que concentraciones de la SES iguales o mayores de 24 ppm afectan significativamente la germinación y desarrollo del tubo germinativo de *Monilinia*. Resultados similares fueron reportados por Al-Haq *et al.* (2001), Huang *et al.* (2008), Hati *et al.*, (2012), Rahman *et al.* (2016) y Feliziani *et al.* (2016), quienes mencionaron que el agua electrolizada tiene efectos de control sobre *Monilinia*. Por su parte Guentzel *et al.* (2010) mencionaron que el agua electrolizada cercana a la neutralidad (pH= 6.3-6.5) inhibió *M. fructicola* a concentraciones de 25 a 100 ppm de cloro activo.

**Efectividad de la SES sobre *Penicillium digitatum* y *Penicillium sp.***

Para el caso de *Penicillium* aislado de limón persa de Nayarit, las concentraciones de la SES de 18 a 43 ppm redujeron la germinación de esporas 100% a las 24 y 48 h (Cuadro 10). Por otra parte, la inhibición total del tubo germinativo a 24 y 48 h se observó en el intervalo de concentración de 18 a 43 ppm (Cuadro 11). Para el caso de *Penicillium* aislado de limón mexicano de Colima, la reducción 100% a las 24 h se obtuvo a concentraciones de 4 a 43 ppm, mientras que a las 48 h fue de 8 a 43 ppm (Cuadro 10).

**Cuadro 9. Longitud del tubo germinativo ( $\mu\text{m}$ ) de *M. fructicola* en frutos de durazno.****Table 9. Length of the germinative tube ( $\mu\text{m}$ ) of *M. fructicola* in peach fruits.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Durazno               |          |
|------------------------------|-----------------------|----------|
|                              | Estado de México      |          |
|                              | 24 h                  | 48 h     |
| Testigo                      | 255.99 <sup>x</sup> a | 372.69 a |
| 3                            | 33.61 b               | 0 d      |
| 5                            | 29.66 b               | 34.59 cd |
| 6                            | 0 b                   | 50.11 cd |
| 8                            | 0 b                   | 0 d      |
| 18                           | 0 b                   | 35.18 cd |
| 24                           | 0 b                   | 0 d      |
| 27                           | 0 b                   | 0 d      |
| 29                           | 0 b                   | 0 d      |
| 36                           | 0 b                   | 0 d      |
| 43                           | 0 b                   | 0 d      |

<sup>x</sup> $\mu\text{m}$ = micras; letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Effectiveness of SES on *Penicillium digitatum* and *Penicillium sp.***

For *Penicillium* case isolated from Persian lemon from Nayarit, SES concentrations of 18 to 43 ppm reduced germination of 100% spores at 24 and 48 h (Table 10). On the other hand, total inhibition of the germ tube at 24 and 48 h was observed in the concentration range of 18 to 43 ppm (Table 11). For the case of *Penicillium* isolated from Mexican lemon from Colima, the 100% reduction at 24 h was obtained at concentrations of 4 to 43 ppm, while at 48 h it was from 8 to 43 ppm (Table 10).

On the other hand, in the germ tube length, total inhibition at 24 h was presented in the concentration range of 4 to 43 ppm, whereas at 48 h it was in the range of 8 to 43 ppm (Table 11). In *Penicillium* isolated from papaya, similar effects were also observed; in the reduction of spore germination, at 24 h the concentration range of 3 to 43 ppm reduced germination by 100% and at 48 h at concentrations of 5 and 8-43 ppm (Table 10). The length of the germ tube was inhibited at the same concentrations as in spore germination (Table 11). Whangchai *et al.* (2009) reported that acid electrolyzed water (pH=

Por otra parte, en la longitud del tubo germinativo, la inhibición total a las 24 h se presentó en el intervalo de concentración de 4 a 43 ppm, mientras que a 48 h fue en el intervalo de 8 a 43 ppm (Cuadro 11). En *Penicillium* aislado de papaya, también se observaron efectos similares; en la reducción de la germinación de esporas, a las 24 h se observó que el intervalo de concentración de 3 a 43 ppm redujo 100% la germinación, y a las 48 h a concentraciones de 5 y 8-43 ppm (Cuadro 10). La longitud del tubo germinativo fue inhibida a las mismas concentraciones que en la germinación de esporas (Cuadro 11). Whangchai *et al.* (2009) reportaron que el agua electrolizada ácida (pH=4.84) a una concentración de 215 ppm de cloro activo inhibió completamente el desarrollo de esporas de *P. digitatum* en mandarina (*Citrus x tangerina*) a partir de dos minutos de inmersión.

Un año después Whangchai *et al.* (2010) mencionaron que el agua electrolizada ácida (pH= 3.9) a 102 ppm de cloro activo tuvo el mismo efecto sobre el mismo hongo desde un minuto de inmersión. A diferencia de lo anterior, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que concentraciones con la SES superiores a 8 ppm tienen efectos esporicidas sobre *Penicillium*.

4.84) at a concentration of 215 ppm of active chlorine completely inhibited the development of *P. digitatum* spores in mandarin (*Citrus x tangerina*) after two minutes of immersion.

One year later Whangchai *et al.* (2010) reported that acid electrolyzed water (pH = 3.9) at 102 ppm of active chlorine had the same effect on the same fungus from one minute of immersion. In contrast to the above, the results obtained in this research suggest that concentrations with SES higher than 8 ppm have sporicidal effects on *Penicillium*.

#### Effectiveness of SES on *Rhizopus stolonifer*

The total reduction of *Rhizopus* spore germination in soursop was presented at concentration intervals of 5-24 and 29-43 ppm at 24 h, while at 48 h concentrations of 5, 6, 18, 24, 29 and 43 ppm also inhibited 100% (Table 12). On the other hand, in the length of the germinative tube the concentration intervals 5-24 and 29-43 ppm totally inhibited their development in 24 and 48 h, the rest of the concentrations had similar or greater growth to the control (Table 13).

**Cuadro 10. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *P. digitatum* en frutos de limón persa y limón mexicano, y *Penicillium* sp., en frutos de papaya.**

**Table 10. Percentage inhibition of spore germination of *P. digitatum* in fruits of Persian lemon and Mexican lemon, and *Penicillium* sp., in papaya fruits.**

| Concentraciones SES (ppm) | Limón persa |         | Limón mexicano |         | Papaya |         |
|---------------------------|-------------|---------|----------------|---------|--------|---------|
|                           | Nayarit     |         | Colima         |         | Colima |         |
|                           | 24 h        | 48 h    | 24 h           | 48 h    | 24 h   | 48 h    |
| Testigo                   | 5.61 c      | 0 c     | 0 b            | 0 d     | 0 b    | 0 b     |
| 3                         | 32.14 b     | 8.55 c  | 96.02 a        | 57.44 c | 100 a  | 69.29 a |
| 5                         | 50.24 b     | 39.1 b  | 100 a          | 89.05 a | 100 a  | 100 a   |
| 6                         | 99.47 a     | 36.12 b | 100 a          | 97.03 a | 100 a  | 93.75 a |
| 8                         | 93.84 a     | 84.96 a | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| 18                        | 100 a       | 100 a   | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| 24                        | 100 a       | 100 a   | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| 27                        | 100 a       | 100 a   | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| 29                        | 100 a       | 100 a   | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| 36                        | 100 a       | 100 a   | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |
| 43                        | 100 a       | 100 a   | 100 a          | 100 a   | 100 a  | 100 a   |

Letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 11. Longitud del tubo germinativo ( $\mu\text{m}$ ) de *P. digitatum* en frutos de limón persa y limón mexicano, y *Penicillium* sp., en frutos de papaya.****Table 11. Length of the germinative tube ( $\mu\text{m}$ ) of *P. digitatum* in fruits of Persian lemon and Mexican lemon, and *Penicillium* sp., in papaya fruits.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Limón                 |         | Limón   |          | Papaya   |           |
|------------------------------|-----------------------|---------|---------|----------|----------|-----------|
|                              | Nayarit               |         | Colima  |          | Colima   |           |
|                              | 24 h                  | 48 h    | 24 h    | 48 h     | 24 h     | 48 h      |
| Testigo                      | 449.71 <sup>x</sup> a | 602.2 a | 255.3 a | 620.71 a | 216.84 a | 121.707 a |
| 3                            | 372.94 b              | 603 a   | 17.73 b | 203.39 c | 0 b      | 62.44 b   |
| 5                            | 204.37 c              | 522.9 a | 0 b     | 328.68 b | 0 b      | 0 c       |
| 6                            | 0.32 d                | 538.4 a | 0 b     | 16.91 d  | 0 b      | 11.46 c   |
| 8                            | 35.42 d               | 242 a   | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |
| 18                           | 0 d                   | 0 a     | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |
| 24                           | 0 d                   | 0 a     | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |
| 27                           | 0 d                   | 0 a     | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |
| 29                           | 0 d                   | 0 a     | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |
| 36                           | 0 d                   | 0 a     | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |
| 43                           | 0 d                   | 0 a     | 0 b     | 0 d      | 0 b      | 0 c       |

<sup>x</sup> $\mu\text{m}$ = micras; letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Efectividad de la SES sobre *Rhizopus stolonifer***

La reducción total de la germinación de esporas de *Rhizopus* en guanábana se presentó a intervalos de concentración de 5-24 y 29-43 ppm a 24 h, en tanto que a 48 h concentraciones de 5, 6, 18, 24, 29 y 43 ppm también inhibieron al 100% (Cuadro 12). Por otra parte, en la longitud del tubo germinativo los intervalos de concentración 5-24 y 29-43 ppm inhibieron totalmente su desarrollo en 24 y 48 h, el resto de las concentraciones tuvieron crecimientos similares o mayores al testigo (Cuadro 13).

Para el caso de *Rhizopus* aislado de yaca, se observó que concentraciones con la SES de 18 a 43 ppm redujeron 100% la germinación de espóra en 24 y 48 h; por otra parte, es importante destacar que la concentración de 8 ppm no fue estadísticamente diferente a las concentraciones anteriormente citadas, y que la reducción en la germinación de esporas fue ligeramente menor en 24 y 48 h (Cuadro 12). En la longitud del tubo germinativo las concentraciones de 18 a 43 ppm inhibieron por completo el desarrollo del tubo en ambas evaluaciones, 24 y 48 h. Sin embargo, cabe resaltar que la concentración de 8 ppm no fue estadísticamente diferente en el intervalo de concentración de 18 a 43 ppm a 48 h (Cuadro 13).

**Cuadro 12. Porcentaje de inhibición en germinación de esporas de *R. stolonifer* en frutos de guanábana y yaca.****Table 12. Percentage of inhibition in germination of *R. stolonifer* spores in soursop and yaca fruits.**

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Nayarit   |          |          |         |
|------------------------------|-----------|----------|----------|---------|
|                              | Guanábana |          | Yaca     |         |
|                              | 24 h      | 48 h     | 24 h     | 48 h    |
| Testigo                      | 5.19 c    | 13.5 d   | 2.01 d   | 3.07 c  |
| 3                            | 7.81 c    | 3.21 d   | 69.63 bc | 72.65 b |
| 5                            | 100 a     | 100 a    | 0 d      | 0.00 c  |
| 6                            | 100 a     | 100 a    | 69.63 bc | 73.14 b |
| 8                            | 100 a     | 77.77 b  | 87.23 ab | 98.66 a |
| 18                           | 100 a     | 100 a    | 100 a    | 100 a   |
| 24                           | 100 a     | 100 a    | 100 a    | 100 a   |
| 27                           | 43.92 b   | 48.82 c  | 100 a    | 100 a   |
| 29                           | 100 a     | 100 a    | 100 a    | 100 a   |
| 36                           | 100 a     | 96.63 ab | 100 a    | 100 a   |
| 43                           | 100 a     | 100 a    | 100 a    | 100 a   |

Letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

A pesar de que el género *Rhizopus* y específicamente *R. stolonifer* es una de los hongos de mayor importancia en postcosecha (Spadaro y Droby, 2006), existe poca información de los efectos del agua electrolizada sobre esporas de *Rhizopus*; no obstante, los resultados obtenidos indican que concentraciones iguales o mayores a 18 ppm de la SES tienen efectos significativos en la germinación y desarrollo de las esporas de *Rhizopus*.

## Conclusiones

La solución electrolizada de súper oxidación con pH neutro mostró efectividad esporicida e inhibió el tubo germinativo en diferentes géneros de hongos de importancia económica (*Colletotrichum*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus*), en la mayoría de las concentraciones evaluadas. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la solución electrolizada de súper oxidación con pH neutro podría ser utilizada como alternativa de control a las medidas convencionales para controlar hongos poscosecha. Sin embargo, para validar el uso de la SES para el control de hongos poscosecha, será necesario realizar estudios de efectividad biológica sobre frutos infectados e inoculados con los géneros de hongos antes mencionados.

## Literatura citada

- Abadias, M.; Usall, J.; Oliveira, M.; Alegre, I. and Viñas, I. 2008. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally processed vegetables. *Inter. J. Food Microbiol.* 123(1-2):151-158.
- Abano, E. E. and Sam-Amoah, L. K. 2012. Application of antagonistic microorganisms for the control of postharvest decays in fruits and vegetables. *Inter. J. Adv. Biol. Res.* 2(1):1-8.
- Abbasi, P. A. and Lazarovits, G. 2006. Effect of acidic electrolyzed water on the viability of bacterial and fungal plant pathogens and on bacterial spot disease of tomato. *Can. J. Microbiol.* 52(10):915-923.
- Al-Haq, M. I.; Seo, Y.; Oshita, S. and Kawagoe, Y. 2001. Fungicidal effectiveness of electrolyzed oxidizing water on post harvest brown rot of peach. *Hortic. Sci.* 36(7):1310-1314.
- Audenaert K.; Monbaliu, S.; Deschuyffeleer, N.; Maene, P.; Vekeman, F.; Haesaert, G.; Saeger, S. D. and Eeckhout, M. 2012. Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium* spp. In vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis. *Food Control.* 23(2):515-521.

For the case of *Rhizopus* isolated from yaca, concentrations with SES of 18 to 43 ppm were observed to reduce spore germination by 100% in 24 and 48 h; On the other hand, it is important to note that the concentration of 8 ppm was not statistically different from the above concentrations, and that the reduction in spore germination was slightly lower in 24 and 48 h (Table 12). In the length of the germ tube the concentrations of 18 to 43 ppm completely inhibited the development of the tube in both evaluations, 24 and 48 h. However, it should be noted that the concentration of 8 ppm was not statistically different in the concentration range of 18 to 43 ppm at 48 h (Table 13).

### Cuadro 13. Longitud del tubo germinativo (µm) de *R. stolonifer* en frutos de guanábana y yaca.

Table 13. Length of germinating tube (µm) of *R. stolonifer* in soursop and yaca fruits.

| Concentraciones<br>SES (ppm) | Nayarit               |          |           |          |
|------------------------------|-----------------------|----------|-----------|----------|
|                              | Guanábana             |          | Yaca      |          |
|                              | 24 h                  | 48 h     | 24 h      | 48 h     |
| Testigo                      | 380.26 <sup>x</sup> b | 299.58 c | 421.06 a  | 502.86 a |
| 3                            | 969.9 a               | 820.75 a | 226.58 cd | 292.85 b |
| 5                            | 0 c                   | 0 d      | 334.45 ab | 465.5 a  |
| 6                            | 0 c                   | 0 d      | 288.47 bc | 460.99 a |
| 8                            | 0 c                   | 6.81 d   | 176.9 d   | 26.43 c  |
| 18                           | 0 c                   | 0 d      | 0 e       | 0 c      |
| 24                           | 0 c                   | 0 d      | 0 e       | 0 c      |
| 27                           | 146.84 b              | 491.58 b | 0 e       | 0 c      |
| 29                           | 0 c                   | 0.0 d    | 0 e       | 0 c      |
| 36                           | 0 c                   | 4.66 d   | 0 e       | 0 c      |
| 43                           | 0 c                   | 0 d      | 0 e       | 0 c      |

<sup>x</sup>µm=micras; letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Although the genus *Rhizopus* and specifically *R. stolonifer* is one of the most important post-harvest fungi (Spadaro and Droby, 2006), there is little information on the effects of electrolyzed water on *Rhizopus* spores; however, the results indicate that concentrations equal to or greater than 18 ppm of SES have significant effects on the germination and development of *Rhizopus* spores.



- Buck, J. W.; van Iersel, M. W.; Oetting, R. D. and Hung, Y. C. 2002. *In vitro* fungicidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water. *Plant Dis.* 86(3):278-281.
- Cravero, F.; Englezos, V.; Torchio, F.; Giacosa, S.; Segade, S. R.; Rantsiou, V. G. K.; Rolle, L. and Cocolin, L. 2016. Post-harvest control of wine-grape mycobiota using electrolyzed water. *Inn. Food Sci. Emer. Technol.* 35: 21-28.
- Dean, R.; Van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E. and Di Pietro, A. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13(4): 414-430.
- Deza, M. A.; Araujo, M. and Garrido, M. J. 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces by neutral electrolysed water. *Letters App. Microbiol.* 40(5):341-346.
- Ding, T.; Ge, Z.; Shi, J.; Xu, Y-T.; Jones, C. L. and Liu, D-H. 2015. Impact of slightly acidic electrolyzed water (SAEW) and ultrasound on microbial loads and quality of fresh fruits. *LWT-Food Sci. Technol.* 60(2):1195-1199.
- Droby, S.; Wisniewski, M.; Macarisin, D. and Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52(2):137-145.
- FAO. 2011. Global food losses and food waste: extent, causes and prevention. FAO, Rome. <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>.
- Feliziani, E.; Lichterb, A.; Smilanick, J. L. and Ippolito, A. 2016. Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biol. Technol.* 122: 53-69.
- Guentzel, J. L.; Lam, K. L.; Callan, M. A.; Emmons, S. A. and Dunham, V. L. 2008. Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiol.* 25(1):36-41.
- Guentzel, J. L.; Lam, K. L.; Callan, M. A.; Emmons, S. A. and Dunham, V. L. 2010. Postharvest management of gray mold and brown rot on surfaces of peaches and grapes using electrolyzed oxidizing water. *Inter. J. Food Microbiol.* 143(1-2):54-60.
- Guentzel, J. L.; Callan, M. A.; Lam, K. L.; Emmons, S. A. and Dunham, V. L. 2011. Evaluation of electrolyzed oxidizing water for phytotoxic effects and pre-harvest management of gray mold disease on strawberry plants. *Crop Protection.* 30(10):1274-1279.
- Hati, S.; Mandal, S.; Minz, P. S.; Vij, S.; Khetra, Y.; Singh, B. P. and Yadav, D. 2012. Electrolyzed Oxidized Water (EOW): non-thermal approach for decontamination of food borne microorganisms in food industry. *Food Nutr. Sci.* 3(6):760-768.
- Hirayama, Y.; Asano, S.; Watanabe, K.; Sakamoto, Y.; Ozaki, M.; Okayama, K.; Ohki, S. and Tojo, M. 2016. Control of *Colletotrichum fructicola* on strawberry with a foliar spray of neutral electrolyzed water through an overhead irrigation system. *J. General Plant Pathol.* 82(4):186-189.
- Hou, Y. T.; Ren, J.; Liu, H. J. and Li, F. D. 2012. Efficiency of electrolyzed water (EW) on inhibition of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* growth in vitro. *Crop Protection.* 42: 128-133.
- Huang, Y. R.; Hung, Y. C.; Hsu, S. Y.; Huang, Y. W. and Hwang, D. F. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control.* 19(4):329-345.

## Conclusions

The electrolyte solution of super oxidation with neutral pH showed sporicidal effectiveness and inhibited the germinative tube in different genera of economically important fungi (*Colletotrichum*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Rhizopus*), in the majority of the evaluated concentrations. The results obtained in this study suggest that the electrolyzed solution of super oxidation with neutral pH could be used as an alternative control to the conventional measures to control post-harvest fungi. However, to validate the use of the SES for the control of post-harvest fungi, it will be necessary to carry out biological effectiveness studies on infected fruits and inoculated with the fungi genera mentioned above.

*End of the English version*



- Kim, C.; Hung, Y. C. and Brackett, R. E. 2000. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 61(2-3):199-207.
- Landa-Solis, C.; González-Espinosa, D.; Guzmán-Soriano, B.; Snyder, M.; Reyes-Terán, G.; Torres, K. and Gutierrez, A. A. 2015. Microcyn: a novel super-oxidized water with neutral pH and disinfectant activity. *J. Hospital Infect.* 61(4):291-299.
- Liu, J.; Sui, Y.; Wisniewski, M.; Droby, S. and Liu, Y. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Inter. J. Food Microbiol.* 167(2):153-160.
- Luo, K. and Oh, D. H. 2015. Synergistic effect of slightly acidic electrolyzed water and ultrasound at mild heat temperature in microbial reduction and shelf-life extension of fresh-cut bell pepper. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(9):1502-1509.
- Mueller, D. S.; Hung, Y.-C.; Oetting, R. D.; van Iersel, M. W. and Buck, J. W. 2003. Evaluation of electrolyzed oxidizing water for management of powdery mildew on gerbera daisy. *Plant Dis.* 87(8):965-969.
- Nunes, C. A. 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 133(1):181-196.
- Rahul, S. N.; Khilari, K.; Sagar, S.; Chaudhary, S.; Kumar, S.; Vihan, N. and Tomar, A. 2015. Challenges in postharvest management of fungal diseases in fruits and vegetables - a review. *South Asian J. Food Technol. Environ.* 1(2):126-130.
- Rahman, S. M. E.; Ding, T. and Oh, D. H. 2010. Effectiveness of low concentration electrolyzed water to inactivate foodborne pathogens under different environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 139(3):147-153.

- Rahman, S. M. E.; Khan, I. and Oh, D. H. 2016. Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: current trends and future perspectives. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*. 15(3):471-490. SAS. 2010. Institute Inc SAS/STAT 9.22 User's Guide. Cary, NC, USA.
- Sharma, R. R.; Singh, D. and Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol. Control*. 50(3):205-221.
- Spadaro, D. and Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast. Antagonists. *Trends in Food Sci. Technol.* 47:39-49.
- Whangchai, K.; Saengnil, K.; Singkamane, C. and Uthaibutra, J. 2010. Effect of electrolyzed oxidizing water and continuous ozone exposure on the control of *Penicillium digitatum* on tangerine cv. 'Sai Nam Pung' during storage. *Crop Protection*. 29(4):386-389.
- Wang, L.; Xia, Q.; Huang, P. and Li, T. 2016. The application of slightly acidic electrolyzed water as a potential washing agent on shelf-life and quality of fresh cut vegetables (lettuce and carrot). *Inter. Proc. Chem. Biol. Environ. Eng.* 95: 57-61.
- Zhang, Q.; Xiong, K.; Tatsumi, E.; Li, L. T. and Liu, H. J. 2012. Elimination of aflatoxin B1 in peanuts by acidic electrolyzed oxidizing water. *Food Control*. 27(1):16-20.