

Aislamiento y caracterización de hongos en mango fresco y procesado

Ramírez Hernández, M.I.^a, Mares-Mares, E.^{ac}, Díaz Cervantes, E.^b, Martínez Jaime, O.A.^d,
Abraham Juárez, M.R.^{a*}

^a Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Carretera Irapuato-Silao km 9, C.P. 36500, Irapuato, Gto., México.

^b Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, CINUG. Km. 28 de la Carretera San José Iturbide- Tierra Blanca.

^c Instituto Tecnológico Superior de Guanajuato, Coord. De Ingeniería en Industrias Alimentarias, Carr. Guanajuato-Puentecillas km 10.5. Puentecillas.

^d Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Agronomía, Carretera Irapuato-Silao km 9, C.P. 36500, Irapuato, Gto., México.

*mabraham@ugto.mx

RESUMEN: El mango es la fruta con la mayor producción del país, es rico en vitamina A y C, minerales y antioxidantes; los hongos pueden producir micotoxinas que pueden formar parte de productos derivados del mango, como pulpas que se han sometido a cierto tratamiento térmico. Por lo cual, en este trabajo se llevó a cabo un análisis microbiológico en el mango fresco y procesado (pasteurizado), creando un cepario de los hongos encontrados en las pulpas analizadas y así, hacer su caracterización. Para realizar el análisis microbiológico, se pasó un asa estéril por la parte dañada de la cáscara del mango y se sembró en PDA, incubando a 25°C por 48 horas, esto fue hecho por triplicado. Posteriormente se sembró en placas de PDA con antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias que impidieran ver la morfología de los hongos. Se hizo un micro cultivo de los hongos obtenidos y se observaron al microscopio. Los resultados que se obtuvieron al ser observados al microscopio indican la presencia de dos tipos de hongos los cuales son: *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

Palabras clave: Mango, hongo, *Aspergillus*, *Penicillium*.

ABSTRACT: Mango is the fruit with the highest production in the country, it is rich in vitamin A and C, minerals and antioxidants; Fungi can produce mycotoxins that can be part of mango-derived products, such as pulps that have undergone some heat treatment. Therefore, in this work was carried out a microbiological analysis in the Mango fresh and processed (pasteurized), creating a strain of fungi found in the pulps analyzed and thus, make its characterization. To perform the microbiological analysis, a sterile loop was passed through the damaged part of the mango shell and sowed in PDA, incubating at 25 °c for 48 hours, this was done in triplicate. Later it was sown in PDA plates with antibiotic to avoid the growth of bacteria that prevented to see the morphology of the fungi. A micro-culture of the fungi obtained was made and the microscope was observed. The results obtained when observed in the microscope indicate the presence of two types of fungi which are: *Aspergillus sp. and Penicillium sp.*

Keywords: Mango, fungus, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Área: Frutas y hortalizas

INTRODUCCIÓN

El mango es una fruta tropical altamente consumida en el mundo, presenta un alto contenido de vitaminas, minerales, un agradable sabor y aroma, con lo cual se convierte en una de las frutas más apetecibles y demandadas por los consumidores (Sumaya *et al.*, 2012). El mango no está exento de ser atacado por algunas enfermedades antes y durante la post cosecha del mismo, se han desarrollado algunos tratamientos para prevenir estas enfermedades (SAGARPA, 2011). Otro problema que enfrenta el mango fresco es su perecibilidad, ya que su tiempo de vida en almacenamiento es máximo de 5 a 7 días, para esto la ciencia y tecnología de alimentos ha volcado sus esfuerzos desde hace décadas en darle valor agregado a esta materia prima, transformándola en productos procesados con un tiempo de vida mucho más amplio, uno de estos productos son las

pulpas, aunque durante el procesamiento también puede sufrir contaminación el producto por microorganismos, ya que el mango en fresco presenta el ataque de ciertos hongos generadores de Micotoxinas; sustancias producidas principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Méndez *et al.*, 2009).

Son numerosos los factores que pueden influir para la contaminación, entre estos están la resistencia genética del cultivo, las condiciones climatológicas caracterizadas por temperaturas y humedades relativamente altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y un secado deficiente. Por lo que la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación, este último punto es muy importante ya que, si los procesos de conservación como la pasteurización no han sido eficientes, podría haber presencia de micotoxinas y por ende producir una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) (Slaughter *et al.*, 2009). Existen métodos para el análisis de las micotoxinas en pulpas de fruta y han ido evolucionando en busca de una mayor precisión en la identificación de estas sustancias. La Cromatografía en Capa Fina (TLC) es una de las técnicas utilizada para la identificación de la presencia de micotoxinas (Oriols. 2011). Por lo que en este trabajo se realizó la caracterización de hongos en mango fresco y procesado para su posterior evaluación de la posible presencia de micotoxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron mangos (*Mangifera indica* L) frescos de la variedad manila, los cuales fueron obtenidos en el mercado “Barahona” ubicado en Rosario Castellanos s/n de Municipio de Salamanca, Gto., y muestras de Pulpa de mango procesada proveniente de la Empresa Frozen Pulps de México S.A de C.V ubicada en la Localidad de Aldama Municipio de Irapuato, Gto. Se trabajaron con 6 mangos, los cuales se dejaron a la sombra a temperatura ambiente hasta que presentaron manchas oscuras, para llevar a cabo el aislamiento de los hongos (se etiquetaron como pruebas 1-6).

Proceso de descomposición del mango. Las muestras de mango (pruebas) estuvieron bajo observación hasta los primeros signos de descomposición, presentando manchas negras. Se tomaron muestras de la piel para ser sembradas en placas de PDA bajo las siguientes condiciones: 25° C por un lapso de 24 horas, para el inicio del crecimiento de los hongos, el cual se sigue desarrollando hasta que alcanzó su punto máximo en los siguientes días.

Obtención de muestras. Las muestras de mango (pruebas) estuvieron bajo observación hasta los primeros signos de descomposición, presentando manchas oscuras al quinto día de su observación, estas manchas negras son producto del ataque de microorganismos que han debilitado la pared celular. Las muestras de pulpa de mango fueron aportadas por parte de una Empresa productoras de pulpa de mango, las cuales tenían las siguientes características; pulpa obtenida a partir de mango manila, conservada por pasteurización y congelada a - 20 °C en presentación de 20 L. Una vez que se tomaron las muestras de hongos de la cascara del mango, esta se retiró por completo y se extrajo la pulpa, colocándola por separado en bolsas plásticas previamente rotuladas para cada prueba, la pulpa obtenida fue conservada en congelación hasta su análisis.

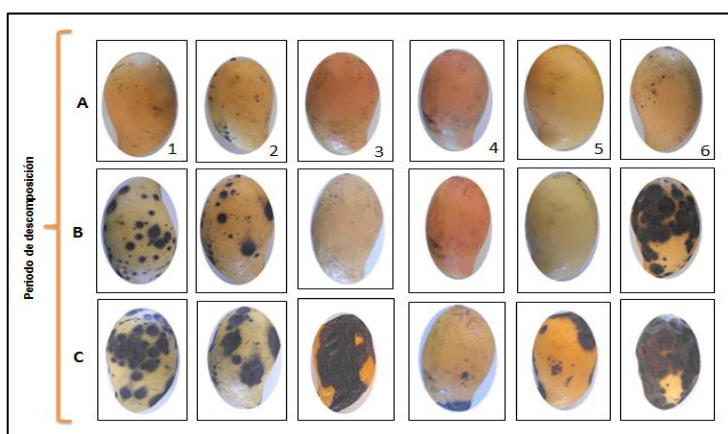


Figura 1. Descomposición de mango manila para la caracterización microbiológica a partir de la piel. La numeración indica el número de prueba. **A:** Día 1, **B:** Día 6 y **C:** Día.

Siembra de hongos. Se obtuvieron diferentes hongos en medio PDA y se aislaron individualmente para su identificación. Se cortaron cuadros de PDA sin antibiótico de una caja Petri de 1 cm de lado y 3 mm de espesor con un bisturí estéril, se inoculó por picadura en cada uno de los lados del cuadro del agar, se colocó sobre el agar un cubre-objeto, el cual se presionó ligeramente para que se adhiriera al medio, se adicionaron 5 mL de glicerol al 10% en la caja Petri y finalmente se incubó la caja a 28 °C durante 48 h. El hongo se colocó en un cubreobjetos sobre el colorante y se observó al microscopio a 40 X, se tomaron fotos a las estructuras observadas.

Cepario. La Identificación se realizó por placa extendida, para ello se pasó un asa estéril por cada uno de los hongos obtenidos, y éstos se introdujeron en un tubo de ensayo, el cual contenía 1 mL de agua destilada, posteriormente se agitó. Se tomaron 0.1 µL de la solución y se colocaron en una placa de PDA con antibiótico, con la ayuda de un asa de vidrio se expandió por toda la placa y se incubó a 25°C hasta que hubo crecimiento completamente del hongo.

Obtención de hongos puros y caracterización . Con un asa se tomó una muestra de los hongos obtenidos anteriormente y se introdujo en un tubo de vidrio que contenía 2 mL de agua estéril y se agitó, seguido de esto con una pipeta estéril se tomó 1 mL de la disolución y se pasó a otro tubo que tenía 1 mL de agua estéril, se agitó. Cuando hubo aparición de las primeras esporas del hongo se identificó una que no estuviera combinada con alguna otra (aislada), se cortó y se pasó a una placa nueva de PDA y se incubó a 25°C durante 48 hrs. Cuando hubo crecimiento total del hongo se caracterizó por medio de micro cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de hongos y creación de cepario en mango fresco

Como se puede observar en la Figura 1 se muestran las placas de los hongos que se sembraron individualmente en PDA para la colección de hongos, y en PDA con antibiótico para la creación del cepario, los cuales fueron aislados en micro cultivo para poder ser observados en microscopio, esto se efectuó para poder identificar que hongos son de interés para la producción de micotoxinas.

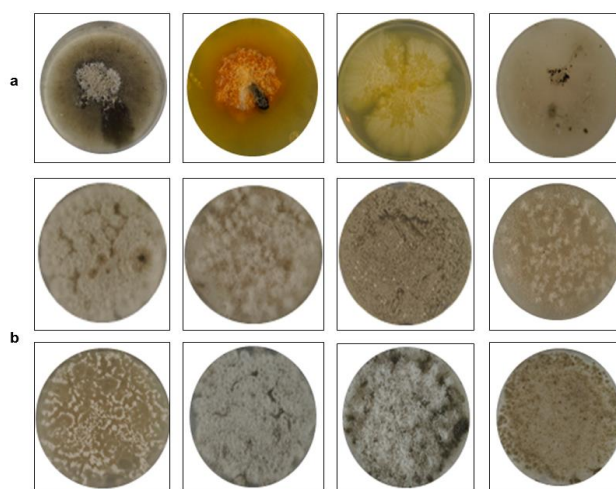


Figura 2. Placas de los hongos de la colección (a) y el cepario (b).

Aislamiento, identificación y caracterización de hongos para cepario. Después del crecimiento de hongos de un total de 18 placas de PDA se diferenciaron de acuerdo a su color y tamaño, pero existieron hongos que no fueron identificados, por lo que fue necesario resembrar nuevamente un mismo hongo de acuerdo con las características que presentaba. Posteriormente se sembró en placas de PDA por el método de placa extendida. Sin embargo, hubo contaminación de bacterias al segundo día, por lo cual fue necesario repetir la operación sembrando en placas de PDA con el antibiótico “Bencilpenicilina”. Una vez efectuado lo anterior, al quinto día el crecimiento del hongo se encontraba extendido a lo largo de la placa, con lo cual fue posible hacer el micro cultivo para ser observados en el microscopio y poder obtener la estructura del mismo.

Como se puede observar en las Figuras 3,4 a partir de las pruebas del mango en descomposición se logró el aislamiento de dos microorganismos de importancia biológica y generadores de Micotoxinas en 4 pruebas realizadas, es importante destacar que en las dos pruebas restantes no hubo un crecimiento de microorganismos a diferencia del resto, esto debido a que el tiempo en que el mango se descomponía vario entre uno y otro, este hecho fue atribuido al grado de maduración del fruto, ya que no eran del todo iguales en grado de maduración, no se presentó una descomposición elevada en dos pruebas durante los 13 días, y los microorganismos tuvieron un comportamiento complejo debido a que su desarrollo ya estaba acelerado y la cantidad de células viables colocadas en el plaqueo estaban en un estado de latencia a diferencia de los otros hongos presentes en las otras pruebas. Al obtenerse en 2 periodos de tiempo el desarrollo de los hongos a los 8 y 13 días se observa un mayor crecimiento entre una placa y otra. De los hongos aislados que conforman el cepario (Figura 1) se pudieron identificar a *Penicillium sp.*, el cual se obtuvo por siembra directa para ambos casos (Figura 2) y *Aspergillus sp.* que se obtuvo por placa extendida y doble dilución (Figura 3) para lograr identificar las estructuras presentes, ya que había

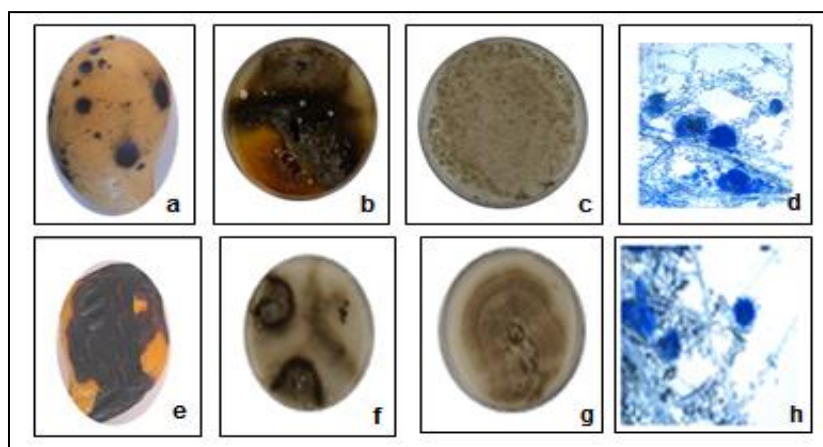


Figura 3. Identificación de hongos presentes en la superficie del mango variedad Manila. **a y e:** frutos en descomposición de 8 y 13 días respectivamente, **b y f:** hongos aislados de la cascara de los mangos, **c y g:** *Aspergillus sp.*, **d y h:** Identificación microscópica de *Aspergillus sp.*

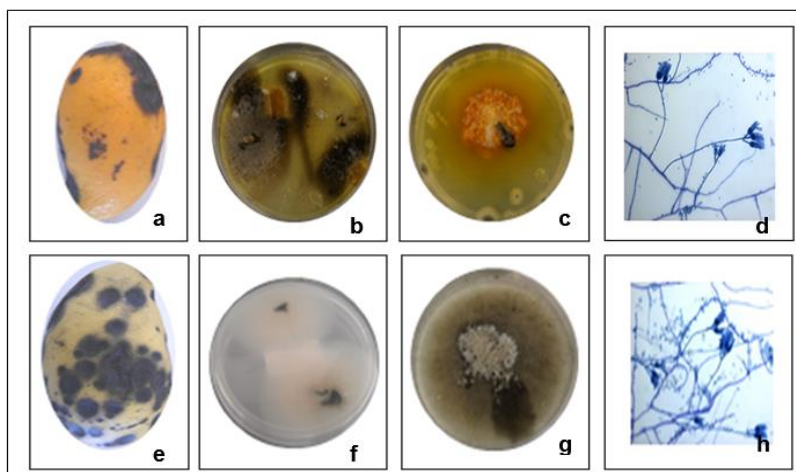


Figura 4. Identificación de hongos presentes en la superficie del mango variedad Manila. **a y e:** frutos en descomposición de 8 y 13 días respectivamente, **b y f:** hongos aislados de la cascara de los mangos, **c y g:** *Penicillium* sp., **d y h:** Identificación microscópica de *Penicillium* sp.

Las manchas negras que se encuentran en el mango la mayoría de las veces se les atribuye a las enfermedades de poscosecha como es: la pudrición. Al realizar los análisis microbiológicos, e identificar los hongos presentes en los frutos de mango de la variedad Manila, se puede observar que estos no son pertenecientes a los síntomas de la pudrición. Esto debido a que los hongos productores de la enfermedad son: *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*, lo cual fue reportado por Sandoval *et al.* (2012).

CONCLUSIÓN

Se pudo identificar mediante micro cultivo y observar al microscopio a dos hongos generadores de Micotoxinas *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp de acuerdo con su morfología y Los resultados encontrados permiten formular la hipótesis de que en un gran porcentaje de las muestras de pulpa tanto frescas como procesadas se pueda encontrar la presencia de la micotoxina.

BIBLIOGRAFÍA

- AGROMUEL. Pulpa de mango. Fecha de consulta 6 de Mayo del 2014. Disponible en línea en: <http://agrolmue.cl/pulpa-de-mango/>
- Alvarado Cepeda Yessica Abigail., 2013. Maduración y Frigoconservación de frutos de mango “Tommy Atkins” con diferentes dosis de maduración. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Edo. De México. Tesis de Maestría. 11p
- Arenas Guzmán Roberto. 2008. Micología Médica Ilustrada. México. 3era ed. Mcgrawn-Hill. 423p.
- Codex Alimentarius. Comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Fecha de consulta 3 de Julio del 2014. Disponible en línea en: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFAC/CCFAC31/fa99_16s.pdf
- Méndez Albores Abraham y Moreno Martínez Ernesto. 2009. Las Micotoxinas: Contaminantes Naturales de los alimentos. Revista Ciencia. 1 p
- Oriols Pladevall Núria. 2011. Cromatografía en Capa Fina (TLC). Una herramienta útil para el Conservador-Restaurador. Fecha de consulta 5 de Julio. Disponible en línea en: http://unicum.cat/es/2011/06/cromatografia-en-capa-prima-tlc-una-eina-util-per-al-conservador-restaurador/?tmp_lang=es
- SAGARPA. 2011. IV Jornada de transferencia de tecnología en el cultivo de mango. Fecha de consulta 21 de Mayo del 2014. Disponible en línea en: http://www.fps.org.mx/divulgacion/index.php?option=com_content&view=article&id=818:iv-jornada-de-transferencia-de-tecnologia-en-el-cultivo-de-mango&catid=131:frutales&Itemid=408

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

- Sandoval Sánchez Maricarmen, Nieto Ángel Daniel, Sandoval-Islas J. Sergio, Téliz Ortiz Daniel, Orozco Santos Mario Y Silva Rojas H. Victoria. 2012. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera Indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73 2013. Volumen 47. No. 1. 60-70p.
- Slaughter. 2009. Métodos para el manejo de la maduración en mango. Universidad de California. Pág. 1-3
- Sumaya y col. 2012. Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*. Volumen 30. 827p
- Trombete Felipe M., Saldanha Tatiana, Direito Glória M. y Fraga Marcelo E. 2013. Aflatoxinas y tricotecenos en trigo y derivados: incidencia de la contaminación y métodos de determinación. *Rev. Chil Nutr* Vol. 40. 181-185 p
- Villacís Reyes Cristina Soraya. 2011. Determinación del contenido de patulina en manzanas, jugos y néctares de manzana, por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito. 14-20p