



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

Manual de procedimientos para el conteo de hongos en frutas por el Método Howard

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

ARMINDA RIVERA BARRA

ASESORES:

**DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ
DRA. AMPARO LONDOÑO OROZCO**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Manual de procedimientos para el conteo de hongos en frutas por el Método Howard

Que presenta la pasante: **Arminda Rivera Barra**

Con número de cuenta: **077443362** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Junio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	Dra. Alma Lucila Núñez del Arco	
1er. SUPLENTE	M.C. Alberto Natahliel Soto Guevara	
2do. SUPLENTE	M.C. Betsabé Rodríguez Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/lmcf*

ÍNDICE

ÍNDICE	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
1. RESUMEN	6
1.1. FRUTAS	7
1.2. MADURACIÓN DE LAS FRUTAS	8
CAMBIOS MÁS DESTACADOS DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DE LA FRUTA	8
1.3. DEFINICIONES	11
2. CARACTERÍSTICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS HONGOS	13
3. FUNDAMENTO	19
4. OBJETIVO DE LA TESIS	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1. CÁMARA HOWARD	21
5.2. PROCEDIMIENTOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	22
5.3. PROCEDIMIENTOS PARA LA LECTURA	25
5.4. PATRÓN DE CONTEO Y CÁLCULOS	26
5.5. TÉCNICAS GENERALES PARA LA DETERMINACIÓN DE % DE HONGOS HOWARD	27
5.5.1. <i>Jugos (Naranja)</i>	27
5.5.2. <i>Néctares (Guayaba, durazno, pera, mango, chabacano, papaya y manzana)</i>	28
5.5.3. CONCENTRADOS	29
5.6. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ESTABILIZANTE	30
5.7. ESPECIFICACIONES	31
5.8. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE HONGOS POR EL MÉTODO DE HOWARD	31
5.8.1.1 <i>Técnica Howard para conteo de hongos para productos de naranja</i>	32
5.8.1.2 <i>Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de naranja</i>	33
5.8.2.1 <i>Técnica Howard para conteo de hongos para productos de guayaba</i>	34
5.8.2.2 <i>Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de guayaba</i>	35
5.8.3.1 <i>Técnica Howard para conteo de hongos para productos de durazno</i>	36

5.8.3.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de durazno	37
5.8.4.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de pera	38
5.8.4.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de pera	39
5.8.5.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de mango	40
5.8.5.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de mango	41
5.8.6.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de chabacano	42
5.8.6.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de chabacano	43
5.8.7.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de papaya	44
5.8.7.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrado de papaya	45
5.8.8.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de manzana	46
5.8.8.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de manzana	47
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

Índice de tablas

Tabla 1. Pudrición de frutas.....	8
Tabla 2. Métodos de preservación.	11
Tabla 3. Rehidratación.	29
Tabla 4. Especificaciones.	31

Índice de figuras

Fig. 1. Fases de la vida de una fruta.....	8
Fig. 2. Actividad respiratoria de fruta recogida verde y almacenada a temperatura ordinaria.	10
Fig. 3. Estructura segmentada.....	13
Fig. 4. Estructura granulada.....	14
Fig. 5. Estructura ramificada.	14
Fig. 6. Extremos de filamentos.	14
Fig. 7. Alternaria.....	15
Fig. 8. Penicillium.....	15
Fig. 9. Oospora.	16
Fig. 10. Aspergillus.....	16
Fig. 11. Fusarium.	17
Fig. 12. Mucor.	17
Fig. 13. Rhizopus.	17
Fig. 14. Geotrichum.	18
Fig. 15. Cámara Howard.	21
Fig. 16. Rehidratar la pulpa concentrada.....	22
Fig. 17. Colocar una porción de la muestra rehidratada en un tubo de centrifuga.	22
Fig. 18. Centrifugar la muestra rehidratada.....	23
Fig. 19. Decantar la muestra y agregar estabilizante.	23
Fig. 20. Colocar la muestra en la cámara de Howard..	24
Fig. 21. Realizar la lectura en el microscopio.	24
Fig. 22. Cámara Howard. Vista superior.....	26

1. RESUMEN

Todos los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando severas pérdidas económicas al reducir el potencial de producción de los cultivos o productos que atacan, como son las frutas (United States Department of agriculture. Agricultural Marketing Service Fruit and Vegetable Division Processed Products Standardization and Inspection Branch, 1976).

Una vez que las frutas han alcanzado la madurez, se deterioran muy fácilmente debido al ablandamiento excesivo y a la senectud de los tejidos, pues ello ocasiona la pérdida del sistema defensivo natural (estructura tisular cerrada, sustancias antimicrobianas, etc.) que presentan los frutos contra los microorganismos presentes en la superficie. También lesiones de los tejidos naturales facilitan la penetración microbiana al interior de la fruta, lo favorece y acelera su alteración, dichas alteraciones pueden ser consecuencia de la acción de insectos, granizadas, heladas y golpes en general.

De las numerosas especies microbianas que existen en la superficie de las frutas, las levaduras y los mohos son los microorganismos que más contribuyen a su alteración; las bacterias intervienen menos activamente, ya que solamente las productoras de ácido láctico y acético podrían desarrollarse. Por ello la podredumbre es la alteración más frecuente y puede verse favorecida por prácticas inadecuadas antes o durante la recolección, transporte y almacenamiento.

La mayoría de los alimentos están constituidos por proteínas, carbohidratos, y grasas, así como varias vitaminas y minerales. Estos alimentos se ajustan a los requerimientos nutricionales de muchas bacterias y hongos. Sin embargo, las proporciones relativas de estos son importantes en la determinación del tipo de microorganismos que predominan. El grado de acidez o alcalinidad, el pH, es otro factor crítico. El grado de humedad y la concentración de las sales o de los azúcares,

están asociados con los fenómenos osmóticos y tienen una influencia decisiva. La disponibilidad o ausencia de oxígeno es una gente selectivo muy importante.

Todos los factores anteriormente citados están relacionados con los mismos componentes de los alimentos a pesar de que el hombre puede y los altera deliberadamente de diversas maneras. Los factores extrínsecos, que no están relacionados con la composición química de los alimentos, se encuentran representados por las fuentes (sueño, océano, etc.) la limpieza del medio ambiente durante el manejo y los parámetros físicos, tales como la temperatura, humedad y ambiente gaseoso son importantes durante el almacenamiento o el embarque.

1.1. Frutas

Las frutas contienen la proporción más elevada de carbohidratos en relación con la mayoría de las verduras y otros alimentos. Cuando la fruta madura, alguna porción de los almidones se convierte en carbohidratos del tipo hexosa. El jugo dulce que mana de los higos maduros, la solución azucarada que se deposita en un resquicio de la epidermis del durazno, la epidermis entera de las uvas maduras y otros ambientes igualmente azucarados, son colonizados por una variedad de levaduras “silvestres”. Igual que en el caso de los néctares de las flores, las levaduras probablemente son traídas por medio de insectos voladores. La mayoría de las frutas tienen un pH ácido, a menudo en el rango de 2 a 5 unidades, lo cual está cercano o por abajo del pH mínimo o de la mayoría de las bacterias. De tal manera, que las cuentas bacterianas son relativamente bajas. Sin embargo, muchos hongos están adaptados tanto al bajo pH como a las altas concentraciones de azúcar y causan una gran variedad de pudriciones en los frutos.

1.2. Maduración de las frutas

La mayoría de las frutas pueden madurar sobre la planta, sin embargo, por motivos tecnológicos o económicos, algunas frutas se recogen antes de su completa maduración, entonces, la maduración se produce durante el transporte o almacenamiento.

Las frutas, una vez alcanzada la madurez, están muy expuestas al deterioro, debido a enfermedades fisiológicas, tales como el pardeamiento superficial, o bien ataque por microorganismos, por ejemplo, la alteración por mohos (Tabla 1). Al estado de madurez óptimo (desde el punto de vista organoléptico) sigue inmediatamente la desorganización y senectud de los tejidos, ablandamiento excesivo, pardeamiento enzimático, etc. Esquemáticamente se puede considerar la vida de una fruta como formada en cuatro fases (ICMSF, 1999). Fig. 1.

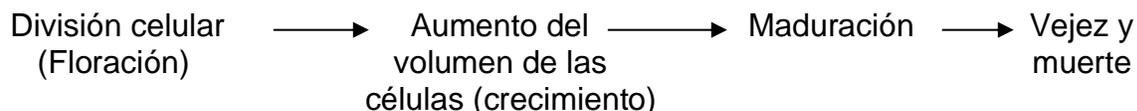


Fig. 1. Fases de la vida de una fruta.

Cambios más destacados durante el proceso de maduración de la fruta

Madurez fisiológica: una fruta se encuentra fisiológicamente madura cuando ha logrado un estado de desarrollo y puede ser separada de la planta para continuar madurando para su consumo.

PUDRICIÓN CAUSADA POR HONGOS

<i>Penicillium</i>	Raíz azul de los granos
<i>Botrytis</i>	Pudrición gris
<i>Aspergillus</i>	Podredumbre negra
<i>Cladosporium</i>	Pudrición verde
<i>Trichoderma</i>	

Tabla 1. Pudrición de frutas.

Hay frutas:

- ✓ Climatéricas: Son aquellas frutas que siguen madurando después de su corte, ejemplo: plátano, mango.
- ✓ No climatéricas: Son aquellas frutas que se cortan y no siguen madurando, ejemplo: es el caso de los cítricos.
- ✓ Cambios composicionales: durante su desarrollo y composición, las frutas desarrollan una serie de cambios internos y externos más evidentes.
 - a) Desarrollo de color: Por la maduración por lo general disminuye el color verde de la fruta debido a una disminución de la clorofila y a un incremento de la síntesis del color amarillo, naranja y rojo.
 - b) Desarrollo de sabor: el sabor cambia debido a la hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares, su sabor pasa de ser ácido a ser más dulce, debido a que el pH se eleva cuando se madura, ejemplo la naranja pasa de un pH de 2.5 a 5.2.
 - c) Desarrollo de aroma: se desarrolla por una serie de compuestos volátiles que le imparten un olor característico de cada fruta.
 - d) Cambios de firmeza: por lo general la textura de la fruta cambia debido a la hidrólisis de los almidones y de las pectinas, por la reducción de su contenido de fibra y por el proceso degradativo de las paredes celulares de las frutas, se vuelven más blandas y más susceptibles de ser dañadas durante el manejo postcosecha.

En algunas frutas, por ejemplo, las manzanas, esas fases son bastante lentas, debido sin duda, a su baja actividad respiratoria, por eso tienen diferente tipo de almacenamiento y preservación.

La respiración de los tejidos de las frutas consiste en la oxidación de los hidratos de carbono, por tanto, origina una pérdida de materia seca y también frecuentemente una disminución del sabor azucarado. Consume oxígeno y por eso, en este aspecto, es importante que las frutas tengan oxígeno a su disposición.

La respiración desprende anhídrido carbónico, produce agua y mantiene la transpiración de los tejidos, pero es preciso evitar que esta agua se acumule en la superficie de las frutas, porque un exceso de humedad favorece el desarrollo de microorganismos. La respiración también desprende calor, que conviene eliminar, pues un aumento de temperatura aceleraría estos diversos fenómenos y por lo tanto el deterioro (Fig. 2).

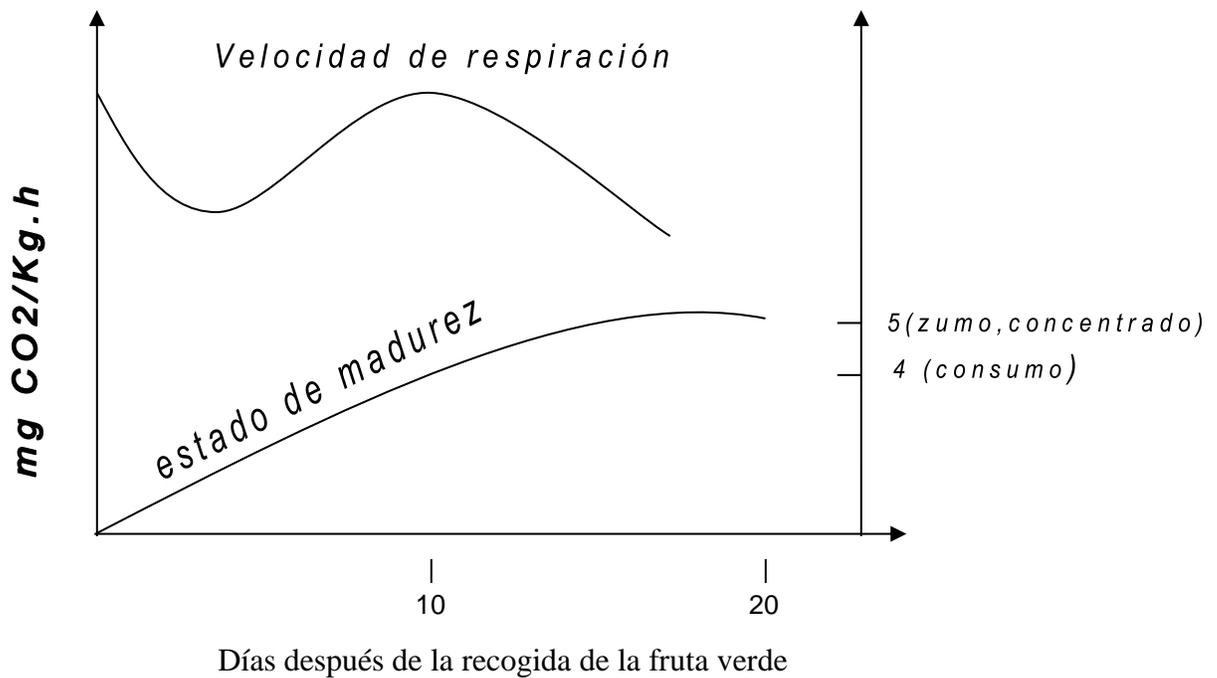


Fig. 2. Actividad respiratoria de fruta recogida verde y almacenada a temperatura ordinaria.

MÉTODOS DE PRESERVACIÓN

Preservación por calor	Pasteurización
Preservación por el frío	Almacenamiento en frío (refrigeración y congelación)
Preservación por secado	Secado
Preservación por medio de agentes químicos	Sal Azúcar Ácidos Benzoatos Sorbatos Óxido de etileno
Preservación por radiación	Rayos X Rayos gama Electrones acelerados

Tabla 2. Métodos de preservación.

La radiación es un método físico de conservación que consiste en exponer a el producto a las radiaciones ionizantes (rayos X, gama y electrones acelerados) durante un cierto tiempo y así proveer su ionización, su nivel de tratamiento se mide en grays (Gy), y se define como la energía media comunicada por la radiación ionizante a la materia por unidad de masa. Un Gy equivale a un julio por kilogramo. la Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que en dosis de hasta 10 kGy (10,000 grays) no hay ningún riesgo toxicológico, nutricional y microbiológico (OMS-FAO, 1989).

1.3. Definiciones

HONGOS: Son organismos a los que se les ha reconocido como un grupo independiente del Reino Vegetal, para lo cual se ha constituido el Reino Fungi. Están caracterizados por crecer en masas irregulares sin diferenciación de raíces, tronco y hojas como las plantas superiores. Debido a la ausencia de clorofila no pueden fabricar sus propios alimentos y deben obtenerlos de fuentes externas a ellos, consecuentemente crecen de plantas o animales vivos (parásitos) o muertos (saprofitos). Estos organismos son eucariotas, lo que significa que tienen núcleos bien definidos por membranas y que contienen un determinado número de

cromosomas, lo que los diferencia de las bacterias. Los hongos son heterótrofos, por lo tanto, dependen de la obtención de compuestos orgánicos a través de sus actividades saprofiticas o parasíticas. La mayoría de los hongos están constituidos por estructuras tubulares llamadas hifas, las cuales en algunas especies se mantienen simples, formando lo que se reconoce como micelio y en otras se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad, como son las llamadas setas u hongos superiores. La reproducción de los hongos se lleva a cabo mediante los propágulos de origen asexual y sexual, a los cuales, en términos generales se les conoce con el nombre de ESPORAS. Sin embargo, hay algunos hongos que no producen esporas, por lo que su reproducción se realiza a través de estructuras vegetativas, como lo son el propio micelio o estructuras derivadas del micelio.

HIFA: Filamento tubular largo que crece por germinación de una espora o por multiplicación vegetativa que son los dos mecanismos de reproducción de los hongos. Pueden o no ramificarse.

MICELIO: Así se denomina al cuerpo de hifas formado por el conjunto de hifas individuales ramificadas y re-ramificadas inter-enroscadas.

ANILLOS DE NEWTON: Efecto de arcoíris causado por la interferencia entre rayos de luz reflejados en la unión de dos superficies de vidrio limpias.

BRIX: Es la cantidad de sólidos disueltos. 1° Brix equivale a un gramo de sacarosa en 100 ml de agua.

2. Características para el diagnóstico de los hongos

Los hongos pueden reproducirse por esporas que germinan por multiplicación vegetativa, en la que un fragmento de este puede crecer y formar una hifa, conforme la hifa continúa creciendo empieza a ramificarse y re-ramificarse hasta formar un sistema o cuerpo entrelazado llamado micelio. Del micelio salen a la superficie numerosas ramas que toman los nutrimentos de la masa o material del cual se alimentan rompiendo las paredes celulares (University of Adelaide, 2005).

Es necesario, por lo tanto, que el analista sea capaz de distinguir las hifas de otras estructuras parecidas, aunque muchos filamentos pueden ser identificados como hongos fácil y acertadamente, otros requieren de una apreciación más cuidadosa antes de ser reportados como hongos. Solo en contadas ocasiones se encuentran al mismo tiempo todas las características de las hifas descritas a continuación. Usualmente 2 o 3 están ausentes (Moreno Martínez, 1988).

Estas estructuras pueden observarse a 10X-40X.

a) Paredes Paralelas: Las hifas son tubulares y su diámetro es uniforme por lo que se ven como líneas paralelas bajo el microscopio, sin embargo, puede haber excepciones, en algunos hongos mayores, las paredes pueden estar colapsadas, enroscadas o tener hinchazones a los lados.

b) Segmentación: Muchos filamentos de hongos están divididos por paredes cruzadas en secciones, pero no hay que confundirlas con vellosidades de las plantas que pueden verse segmentadas, pero se diferencian en que generalmente las paredes están convergentes formando un ápice filoso. Fig. 3.

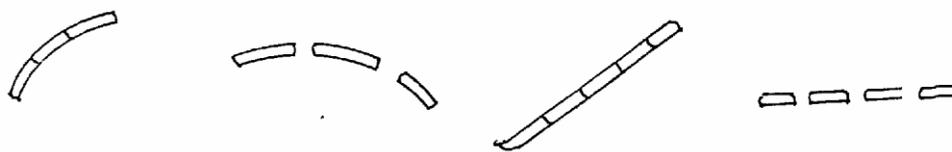


Fig. 3. Estructura segmentada.

c) Granulación: Algunas hifas tienen paredes delgadas y contienen un protoplasma que parece granuloso a través del microscopio usando un gran aumento, por ejemplo, en MUCOR. En algunos hongos finos la granulación del protoplasma no es evidente dejando paredes claras, casi tubos invisibles, extremadamente difíciles de contar.

Fig. 4



Fig. 4. Estructura granulada.

d) Ramificación: Algunos hongos muestran ramificación abundante generalmente del mismo diámetro del tronco principal.

Fig. 5



Fig. 5. Estructura ramificada.

e) Extremos de los Filamentos: El extremo final generalmente está redondeado y raramente está afilado, excepto las hifas en estado reproductivo. Ocasionalmente el extremo está expandido en una bola o cabeza cuando el hongo está formando un cuerpo fructificante. Un extremo roto de un filamento generalmente es cuadrado y la porción adyacente puede estar colapsada y no contener protoplasma.

Fig. 6



Fig. 6. Extremos de filamentos.

f) Apariencia no retráctil: Las hifas generalmente no refractan la luz. Otras estructuras pueden parecer hifas, tales como vasos de plantas, que generalmente tienen una apariencia altamente retráctil como sería una carilla de vidrio sólido o plástico.

Algunos géneros de hongos encontrados en el producto y en los concentrados de fruta:

Alternaria: Es un hongo ascomiceto esto es, de filo de las Ascomycota, las diferentes especies de este género son uno de los mayores patógenos de las plantas. Fig. 7.



Fig. 7. *Alternaria*.

Penicillium: Es un género del reino Fungí, incluyendo más de 300 especies, la más conocida es *Penicillium chrysogenum*, productora de penicilina, es del filo de Ascomycota. Fig. 8.



Fig. 8. *Penicillium*.

Oospra: Es el resultado sexual de la unión del Anteridio y oogonio, es de pared celular gruesa y es característico de los oomicetos. Fig. 9.



Fig. 9. Oospora.

Aspergillus: Es un género de alrededor de 600 hongos y es ubicuo. Los hongos se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: levaduras y las hifas. Aspergillus es un hongo filamentoso. El habitat natural de las especies de Aspergillus es el heno y el compostaje. Es del filo Ascomycota. Fig. 10.

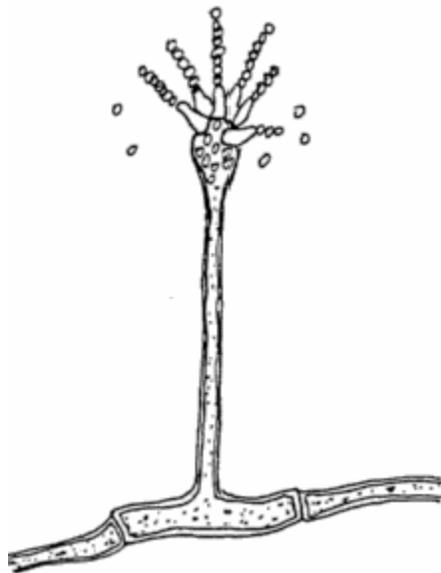


Fig. 10. Aspergillus.

Fusarium: Es un extenso genero de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y en asociación con plantas. Fig. 11.



Fig. 11. *Fusarium*.

Mucor: Es un género de hongos de la familia *Mucuraceae*, orden *Mucorates* que forman delicados filamentos y esporangios negros esféricos. Fig. 12.

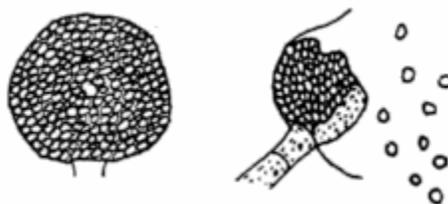


Fig. 12. *Mucor*.

Rhizopus: Es un género de mohos que incluyen especies cosmopolitas de hongos filamentosos hallados en el suelo, degradando frutos y vegetales, las especies de *Rhizopus* producen esporas sexuales y asexuales. Fig. 13.



Fig. 13. *Rhizopus*.

Geotrichum: Es un hongo hallado cosmopolitamente en el suelo, agua, aire, detritos, plantas, cereales, productos lácteos, común en la flora normal humana y se aísla de esputo y heces. Es del filo Ascomycota. Fig. 14.

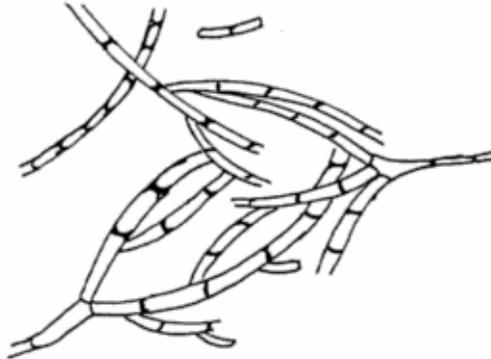


Fig. 14. Geotrichum.

3. Fundamento

Una vez que las frutas han alcanzado la madurez, se deterioran muy fácilmente debido al ablandamiento excesivo y la senectud de los tejidos, pues ello ocasiona la pérdida del sistema defensivo natural (estructura tisular cerrada, sustancias antimicrobianas, etc.), que presentan los frutos contra los microorganismos presentes en la superficie.

También las lesiones de los tejidos naturales facilitan la penetración microbiana al interior de la fruta, lo que favorece y acelera su alteración. Dichas alteraciones pueden ser consecuencia de la acción de insectos, granizadas heladas y golpes en general.

De las numerosas especies microbianas que existen en la superficie de las frutas, la levadura y los mohos son microorganismos que más contribuyen a su alteración; las bacterias intervienen menos activamente, ya que solamente las productoras de ácido láctico y acético podrían desarrollarse. Por ello la podredumbre es la alteración más frecuente y puede verse favorecida por prácticas inadecuadas antes o durante la recolección, el transporte y almacenamiento.

Por todo lo anterior, para evaluar la calidad de la materia prima utilizada en concentrados, néctares y jugos, se realiza una determinación del porcentaje de hongos mediante el método de Howard.

Considerando que la FDA y el AOAC₁ establecen especificaciones y procedimientos solamente para las siguientes frutas: chabacano, durazno, guayaba, mango, papaya, naranja y pera. Para ello tomamos en cuenta características comunes con las frutas especificadas, dándoles el mismo manejo en cuanto a procedimiento y especificación (Association of Official Analytical Chemists, 1984) (Department on Healt and Human services Public Healt Service. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1989).

4. Objetivo de la Tesis

Objetivo General: Desarrollar un manual de procedimientos para el conteo de hongos en frutas utilizadas en la industria alimenticia.

Objetivos Particulares:

- a). - Búsqueda de bibliografía de las técnicas de detección de hongos.
- b). - Montaje de la técnica de Howard.
- c). - Montaje de la técnica de Howard aplicada a: jugos y néctares
 - Naranja
 - Guayaba.
 - Durazno.
 - Pera.
 - Mango.
 - Chabacano.
 - Papaya.
 - Manzana.
- d). - Montaje de la técnica de Howard aplicada concentrados de fruta:
 - Naranja
 - Guayaba.
 - Durazno.
 - Pera.
 - Mango.
 - Chabacano.
 - Papaya.
 - Manzana.

5. Material y métodos

5.1. Cámara Howard

Es un portaobjetos de vidrio (construcción de una pieza) con un círculo plano de aproximadamente 19 mm de diámetro o bien con un rectángulo de 20 mm x 15 mm rodeado por un foso y flanqueado por cada lado por bordes de 0.1 mm más altos que la superficie plana.

El cubreobjetos es soportado sobre los bordes y deja un espesor de 0.1 mm entre el lado del cubreobjetos que está en contacto con la muestra y la superficie plana. Las superficies del plano central de los bordes y del cubreobjetos son superficies trabajadas ópticamente.

Para facilitar la calibración del microscopio, las cámaras actualmente están graduadas con un círculo de 1.382 mm de diámetro o con dos líneas finas paralelas con una separación de 1.382 mm.

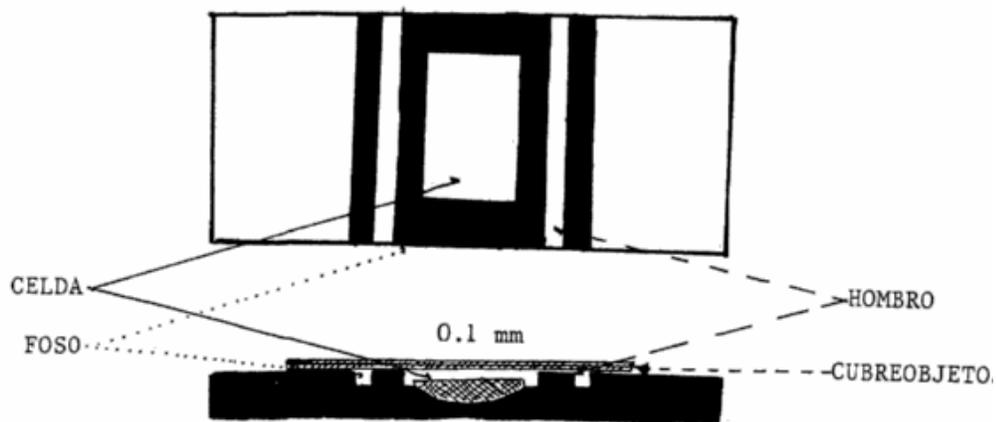


Fig. 15. Cámara Howard.

Área del campo microscópico:

$$\begin{aligned} A_c &= r^2 = 1/4 d^2 = 0.7854 d^2 \\ &= (0.7854)(1.382 \text{ mm}^2) = 1.5 \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

Volumen del material en el campo microscópico:

$$V = \text{área} \times \text{altura} = (1.5 \text{ mm}^2)(0.1 \text{ mm}) = 0.15 \text{ mm}^3$$

5.2. Procedimientos para la preparación de la muestra

5.2.1. Se coloca una pequeña porción de pulpa concentrada en un vaso perfectamente limpio y se adiciona agua para rehidratar a los grados brix necesarios dependiendo de que fruta se trate (Fig. 16).



Fig. 16. Rehidratar la pulpa concentrada.

5.2.2. Se realiza la lectura de los grados brix en un refractómetro de mano.

5.2.3. Una vez ajustada la muestra, se coloca en un tubo de centrifuga con la cantidad de 40 ml o 50 ml según sea necesario (Fig. 17).



Fig. 17. Colocar una porción de la muestra rehidratada en un tubo de centrifuga.

5.2.4. Se centrifuga a 2200 rpm durante 10 minutos (Fig. 18).



Fig. 18. Centrifugar la muestra rehidratada.

5.2.5. Se decanta la muestra, se le agrega el estabilizante según sea la fruta (Fig. 19).



Fig. 19. Decantar la muestra y agregar estabilizante.

5.2.6. Se coloca la muestra en la cámara de Howard (Fig. 20).



Fig. 20. Colocar la muestra en la cámara de Howard.

5.2.7. Se realiza la lectura en el microscopio con el objetivo de 10X y si hay alguna duda se revisará en 40X (Fig. 21).



Fig. 21. Realizar la lectura en el microscopio.

5.3. Procedimientos para la lectura

5.3.1. Limpiar la cámara Howard de tal forma que aparezcan los anillos Newton entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

5.3.2. Quitar el cubreobjetos y con una espátula poner una porción de la muestra bien mezclada sobre la parte central de la celda y extenderla de manera que se obtenga una distribución uniforme.

5.3.3. Usar solo la cantidad de muestra suficiente para llegar a la orilla del disco (es muy importante que la porción sea tomada de la muestra perfectamente mezclada y que sea extendida sobre el portaobjetos, de lo contrario cuando se coloque el cubreobjetos en su lugar el material insoluble y consecuentemente los hongos podrán ser más abundantes en el centro).

5.3.4. Descartar cualquier muestra que tenga una distribución desigual o que no presente los anillos de Newton o líquido que se ha derramado al foso contiguo de la parte central de la cámara.

5.3.5. Colocar la cámara bajo el microscopio y examinar ajustando de tal forma que cada campo observado cubra 1.5 mm. (Esta área que es esencial frecuentemente puede ser obtenida ajustando el Draw-tube, este diámetro de campo es de 1.382 mm. Cuando tal ajuste no es posible, hacer un accesorio improvisado, un ocular diafragma con apertura exactamente cortada al tamaño necesario. El diámetro del área del campo puede determinarse usando un micrómetro. Cuando el instrumento es débilmente ajustado, el volumen del líquido analizado por campo es de 0.15 mm³). Emplear 90X-125X. En aquellos casos donde no sean claramente discernibles las características para la identificación de los filamentos de hongos en el campo estándar use aproximadamente 200X (objetivo de 8mm), para confirmar la identidad de los filamentos de hongo previamente observados en el campo estándar.

5.3.6. Descartar lecturas que presenten una diferencia de más de 3 campos positivos.

5.4. Patrón de conteo y cálculos

Por cada celda se deben examinar 25 o más campos tomados de tal manera que sean representativos de todas las secciones de la cámara (Fig. 22). Una forma de obtener una buena representación es tomar una columna sí, otra no, desplazando a la celda en dirección horizontal y tomando una hilera sí y otra no, desplazando la celda en dirección vertical, de esta forma la celda se cubrirá completamente en cada revisión.

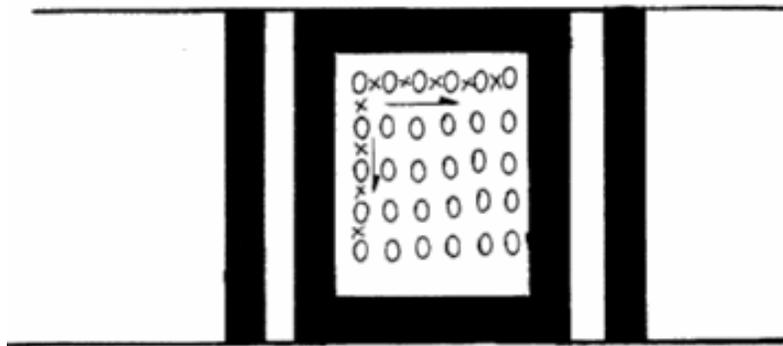


Fig. 22. Cámara Howard. Vista superior.

Es importante que mientras se cuenta una cámara no se pierda la secuencia, que ocasionaría el recuento de un campo, etc. Una buena manera de prevenir esto es siempre contar de izquierda a derecha, de la misma manera que se lee un libro. Esto permite que el trabajo sea automático y hace cualquier interrupción menos confusa.

Es esencial que los campos sean seleccionados sistemáticamente y que la cámara nunca sea movida para incluirlo o excluir filamentos de mohos.

Un campo es contado positivo o negativo. Ningún campo puede ser contado positivo más de una vez. El método requiere que el campo sea contado como positivo cuando la longitud agregada de no más de 3 filamentos de hongos presentes excedan un sexto del diámetro del campo. Un sexto del diámetro no es suficiente para ser contado como positivo; la longitud agregada debe exceder de una sexta parte el campo.

El analista debe decidir si el campo es positivo. La mayoría de los campos positivos calificados como tales sobre bases de filamentos de hongos simples, incluyendo longitud de ramificaciones exceda una sexta parte del diámetro del campo.

Los campos pueden ser calificados positivos si cualquiera de las siguientes longitudes excede una sexta parte del diámetro el campo.

- Longitud del filamento simple no ramificado.
- Longitud del filamento simple + longitud de las ramificaciones (longitud agregada).
- Longitud agregada de dos filamentos de hongos.
- Longitud agregada de tres filamentos de hongos (no pueden ser contados más de tres filamentos).
- Longitud agregada de todos los filamentos aglomerados (un aglomerado es considerado como una pieza simple y se cuenta las longitudes agregadas de todos los filamentos).

Para calcular la proporción de campos positivos a partir de los resultados de la examinaron de todos los campos observados y reportar como % de campos positivos.

$$\% \text{ CAMPOS POSITIVOS} = \frac{\text{NUM. CAMPOS POSITIVOS}}{\text{NUM. CAMPOS TOT. OBSERVADOS}} \times 100$$

5.5. Técnicas generales para la determinación de % de Hongos Howard

5.5.1. Jugos (Naranja)

1. Homogeneizar el contenido de la lata vaciándola a un vaso de precipitado y de este nuevamente a la lata, 12 veces.

2. Colocar 50 ml de jugo en un tubo para centrifuga.
3. Centrifugar a 2200 rpm (revoluciones por minuto) por 10 minutos.
4. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
5. Añadir 0.5 ml de ácido clorhídrico diluido para disolver los cristales de oxalato.
6. Añadir agua al tubo hasta llegar al nivel graduado a 10 ml.
7. Añadir 5 ml de solución estabilizante.
8. Mezclar hasta obtener una solución perfectamente homogénea.
9. Se deben registrar por separado aquellos campos positivos a *Geotrichum candidum*.

*Para el jugo de tomate se toma directamente de la lata previamente homogeneizada.

Para el jugo de manzana y bebidas de ponche de frutas y uva, no se cuenta con técnicas específicas y por tener un bajo porcentaje de sólidos insolubles, se realiza la determinación, tomando la muestra directamente de la lata (sin preparación alguna), colocándola en la celda de la cámara de Howard para realizar el conteo, previa homogeneización.

Para el jugo de vegetales se tomó la técnica del jugo de tomate por ser este el ingrediente mayoritario (Association of Official Analytical Chemists, 1984).

5.5.2. Néctares (Guayaba, durazno, pera, mango, chabacano, papaya y manzana)

- 5.5.2.1 Agitar invirtiendo el producto 12 veces con el fin de obtener una mezcla completamente homogénea, vaciar el contenido en un recipiente.
- 5.5.2.2 Transferir 40 ml del néctar a un tubo para centrifuga.
- 5.5.2.3 Centrifugar durante 10 minutos a 2200 rpm (revoluciones por minuto).

5.5.2.4 Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.

5.5.2.5 Golpear suavemente las paredes del tubo para nivelar el volumen del sedimento y medirlo.

5.5.2.6 Adicionar solución de estabilizante en las siguientes proporciones:

Chabacano, durazno, mango, papaya y manzana	1:1
Guayaba y pera	1:3

5.5.2.7 Mezclar hasta obtener una solución perfectamente homogénea.

5.5.3. CONCENTRADOS

Debido a que no se cuenta con todas las especificaciones de % de hongos Howard y métodos particulares para los concentrados de frutas, estos se ajustan a las condiciones de producto terminado que se elabora en planta, para poder evaluarlo de acuerdo a las especificaciones particulares.

Para preparar las pulpas:

5.5.3.1.- Dispensar 1 parte de pasta en tres partes de agua. Si es necesario ligeramente caliente para romper el gel. Ajustar los brix según la Tabla 3.

FRUTA	BRIX
Naranja	12.0
Guayaba	2.2
Durazno	2.4
Pera	4.6
Mango	3.2
Chabacano	3.2
Papaya	4.0
Manzana	5.6

Tabla 3. Rehidratación.

5.5.3.2. Seguir el procedimiento de néctar a partir del número 5.5.2.2

5.6. Preparación de solución estabilizante

Carboximetilcelulosa de sodio al 0.5% (CMC).

Goma celulosa CMC-7H3SF, Hercules Inc.

5.6.1. Colocar 500 ml de agua caliente en un agitador de alta velocidad.

5.6.2. Agregar lentamente 2.5 g de CMC con el agitador trabajando.

5.6.3. Agitar hasta completa disolución.

5.6.4. Agregar 10 ml de solución de formaldehído al 37% w/w como conservador.

5.6.5. Agitar durante un minuto

= Alternativas de sustitución =

Solución de Pectina 3-5% o Alginato al 1%.

1. Añadir las cantidades requeridas de estabilizante directamente al agua manteniendo agitación a alta velocidad.
2. Tratar la solución con calor o vacío para remover las burbujas de aire.
3. Añadir 2 ml de solución de formaldehído por cada 100 ml de solución como conservador. (Si no se dispone de agitador, mezclar el estabilizante seco con alcohol para facilitar la incorporación de agua.
4. Ajustar el pH de 7.0-7.5.
5. Filtrar la solución a través de una membrana filtro millipore Num. XX15-047-00 o equivalente.

5.7. Especificaciones

El porcentaje de especificación máximo por fruta se muestra en la Tabla 4.

FRUTA	ESPECIFICACIÓN % MÁXIMO
Naranja	12
Guayaba	18
Durazno	10
Pera	10
Mango	10
Chabacano	10
Papaya	12
Manzana	10

Tabla 4. Especificaciones.

5.8. Técnicas para la determinación de porcentaje de hongos por el Método de Howard

Naranja
 Guayaba
 Durazno
 Pera
 Mango
 Chabacano
 Papaya
 Manzana

5.8.1.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de naranja

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Ácido Clorhídrico diluido.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 50 ml del producto perfectamente homogeneizado
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar agua destilada hasta completar 10 ml, 5 ml de estabilizante y 0.5 ml de Ácido Clorhídrico diluido.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 12% MÁXIMO

5.8.1.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de naranja

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Ácido Clorhídrico diluido.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 12.0 Brix.
2. Centrifugar 50 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar agua destilada hasta completar 10 ml, 5 ml de estabilizante y 0.5 ml de Ácido Clorhídrico diluido.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 12% MÁXIMO

5.8.2.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de guayaba

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 40 ml del producto perfectamente homogeneizado.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 3 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 18% MÁXIMO

5.8.2.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de guayaba

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 2.2 Brix.
2. Centrifugar 40 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 3 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 18% MÁXIMO

5.8.3.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de durazno

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 40 ml del producto perfectamente homogeneizado.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.3.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de durazno

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 2.5 Brix.
2. Centrifugar 40 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 12% MÁXIMO

5.8.4.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de pera

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 40 ml del producto perfectamente homogeneizado.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 3 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.4.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de pera

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 4.6 Brix.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 3 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.5.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de mango

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 40 ml del producto perfectamente homogeneizado.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.5.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de mango

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 3.2 Brix.
2. Centrifugar 40 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.6.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de chabacano

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 40 ml del producto perfectamente homogeneizado.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.6.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de chabacano

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 2.4 Brix.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.7.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de papaya

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
estabilizante
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Homogeneizar perfectamente el producto.
2. Centrifugar 40 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto).
Durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 12% MÁXIMO

5.8.7.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrado de papaya

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 4.0 Brix.
2. Centrifugar 40 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 1 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 2.$$

ESPECIFICACIÓN: 12% MÁXIMO

5.8.8.1 Técnica Howard para conteo de hongos para productos de manzana

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS.

1. Tomar 40 ml del producto perfectamente homogeneizado.
2. Centrifugar esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 3 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

5.8.8.2 Técnica Howard para conteo de hongos para concentrados de manzana

MATERIAL Y EQUIPO

Cámara Howard (limpia y seca).
Cubre Objetos. (24 x 50 mm).
Tubo Cónico para centrifuga de 50 ml.
Espátula.
Agitador.
Centrifuga.
Microscopio.
Refractómetro.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución estabilizante

PROCEDIMIENTO PARA CONCENTRADOS.

1. Ajustar el concentrado a 5.6 Brix.
2. Centrifugar 40 ml de esta solución a 2200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.
3. Decantar el sobrenadante sin alterar el sedimento.
4. Adicionar el estabilizante en proporción 1 + 3 con el sedimento.
5. Agitar hasta completa disolución de los sólidos.
6. Colocar una gota de la muestra en el relieve de la cámara Howard cubriendo exactamente la superficie de una manera homogénea.
7. Leer 25 campos a 10X.

FÓRMULA

$$\% \text{ DE HONGOS} = \text{TOTAL DE CAMPOS POSITIVOS} \times 4.$$

ESPECIFICACIÓN: 10% MÁXIMO

CONCLUSIONES

- 1.- Se logra desarrollar este manual para la determinación del porcentaje de hongos Howard para verificar la calidad de las pulpas de fruta con los cuales se van a elaborar los productos (Jugos, bebidas y néctares).

- 2.- Estas técnicas nos sirven también para recolección, selección de la fruta para antes de entrar a las moliendas tomando en cuenta también sus características microbiológicas y fisicoquímicas.

- 3.- De acuerdo a estas características microbiológicas, fisicoquímicas y porcentaje de hongos se pueden seleccionar las pulpas para exportación.

- 4.- Con esta técnica de Hongos Howard también se pueden determinar las concentraciones de desinfectantes y germicidas de los recambios de agua de lavado de la fruta, así como las horas de producción de las pulpas para obtener una excelente calidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, R. (1993). *Micología Médica Ilustrada*. México: Mc Graw Hill.
- Association of Official Analytical Chemists. (1984). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (40 ed.). (S. Williams, Ed.) USA.
- Carter, G. (1969). *Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinarias*. (J. Vilas Tarazona, Trad.) Acribia.
- Carter, G., & Chengappa, M. (1993). *Microbial Diseases*. Ame, Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Department on Health and Human services Public Health Service. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. (1989). *The food defect action levels. Current levels for natural or Unavoidable Defects for Human Use that present no health hazard*. Washington, D.C.
- Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. (2000). *CURSO DE BIOLOGIA VEGETAL*. (M. Piaggio, Editor) Recuperado el 2005, de ATLAS DE IMÁGENES: <http://micol.fcien.edu.uy/atlas/Zygomycetes.html>
- Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. (1989). *The Food Defect Action Levels. Current Levels for Natural or Unavoidable Defects for Human Use that Present no Health Hazard*. Washington D.C.
- Gobierno de México. (2005). *Secretaría de Salubridad y Asistencia*. Recuperado el 2005, de <http://www.ssa.gob.mx>
- Harper International. (1980). *Morphology of Plants and Fungi* (4 ed.). (C. J. Harold C. Bold, Ed.) USA.
- ICMSF. (1999). *Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas*. Zaragoza, España: Acribia.
- Koneman, E. W., & Roberts, G. D. (1987). *Micología : práctica de laboratorio* (3 ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- KONEMAN, E., & ALLEN S.D. DOWELL, B. &. (1991). *Diagnostico microbiológico*. México, D.F.: Médica Panamericana.

Moreno Martínez, E. (1988). *Manual para identificación de hongos en granos y sus derivados*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

OMS-FAO. (1989). *La Irradiación De Los Alimentos*. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/36940/9243542400_spa.pdf;jsessionid=A055F8C78AD6E1665F5F8A70E1925348?sequence=1

Rippon, J. W. (1990). *Tratado de micología médica* (3 ed.). Mc Graw Hill.

Salek, A., & Arnold, W. (1995). Trehalose-stabilisation of osmophilicity and viability of baker's and distiller's yeast: Application to storage and drying. *Food Chemistry, Microbiology, Technology*, 17, 14-21.

SMITH, G. (1963). *Introducción a la micología industrial*. (A. Rodríguez de Castro, Trad.) Zaragoza, España: Acribia.

United States Department of agriculture. Agricultural Marketing Service Fruit and Vegetable Division Processed Products Standardization and Inspection Branch. (1976). *Foreign Material Technical Inspection Procedures*. USA.

University of Adelaide. (2005). *Mycology Online*. Recuperado el 2005, de <https://mycology.adelaide.edu.au/>

Weidenboerner, M., & Kunz, B. (1996). Controlling of the food-relevant fungi *Cladosporium herbarum*, *Eurotium repens*, *Penicillium expansum* und *Rhizopus stolonifer* by use of spices in wheat bread. *AGRIS*, 17(1-2), 1-5.

Lugar de Realización:

Laboratorio L504. Sección de Ciencias de la Salud Humana. Campo 1.
FES-Cuautitlán.

Tiempo de Realización:

8 meses.

Materias relacionadas:

Microbiología General 1 (QFB).
Micología Médica (QFB).

Asesores:

Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez.
Profesor de Carrera Titular "C" de tiempo completo.

Materias que imparte.
Inmunología Veterinaria.
Micología Médica (QFB).
Microbiología Veterinaria.

Dra. Amparo Londoño Orozco.
Profesor de Asignatura "A".

Materias que imparte.
Micología Médica.
Microbiología General 1.
Microbiología General 2.