

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

INGENIERÍA AGRÓNOMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

“IDENTIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES Y FISIOPATIAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*), EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI, EN EL PERIODO 2018-2019”

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR: CHANALUISA UNAUCHO LUIS ERNESTO

TUTORA: ING. MG. GIOVANA P. PARRA G


LATACUNGA- ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto declaro ser autor del presente proyecto de investigación: **“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI, EN EL PERIODO 2018-2019”** siendo el Ing. Mg. Giovana Parra, tutora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.


.....
Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto
C.I. 050334951-6

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte del Sr. **CHANALUISA UNAUCHO LUIS ERNESTO**, identificado con **C.C. N° 050334951-6**, estado civil soltero y con domicilio en el barrio Mollepamba, Cantón Saquisilí, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Ingeniería Agronómica, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI, EN EL PERIODO 2018-2019”** el cual se encuentra elaborado según los requerimientos académicos propios de la Facultad Académica según las características que a continuación se detallan:

Historial académico. Abril 2014 – Febrero 2019.

Aprobación HCA. - 22 de Febrero 2019

Tutora. - Ing.Mg Giovana Paulina Parra Gallardo

Tema: **“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI, EN EL PERIODO 2018-2019”**

CLÁUSULA SEGUNDA. - LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA/EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA/EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA/EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA/EL CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA/EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los.... días del mes de febrero del 2018.

Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto

EL CEDENTE

Ing. MBA. Cristian Tinajero Jiménez

EL CESIONARIO


AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el título:

“IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI, EN EL PERIODO 2018-2019”, de **Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto**, de la carrera de Ingeniería Agronómica, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científico-técnicos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Validación de Proyecto que el Consejo Directivo de la Facultad de de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Latacunga, Febrero 2019

Firma



Ing. Giovana P. Parra G. Mg.

CC: 180226703-7

Tutora


APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprueban el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, y por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el o los postulantes: **Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto**, con el título de Proyecto de Investigación **“IDENTIFICACIÓN ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI, EN EL PERÍODO 2018-2019”** han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de Sustentación de Proyecto.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, Febrero 2019

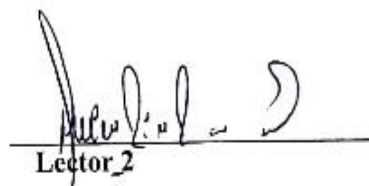
Para constancia firman:



Lector 1

Ing. Mg. Guadalupe López

CC: 180190290-7



Lector 2

Ing. Mg. Kléver Quimbiulco

CC: 170956110-2



Lector 3

Ing. Mg. José Zambrano Sarabia

CC: 050049411-7

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por todas las bendiciones brindadas.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi por haber hecho posible y darme la oportunidad de estudiar, para hoy convertirme en un gran profesional de excelencia académica.

A mi Tutora de tesis, Ing. Mg Giovana Parra y mis lectores de tesis, Ingeniera Guadalupe López, Ingeniero Kléver Quimbiulco, Ingeniero José Zambrano, por la ayuda brindada para la revisión de la tesis, pues gracias a sus conocimientos, experiencia, paciencia y su motivación han logrado encaminar de la mejor manera mis conocimientos y mi tesis con éxito.

A mi Madre Digna Unaicho quién me supo ayudar moral y económicamente para formarme como un buen profesional.

Luis Chanaluiza

DEDICATORIA

Este trabajo le dedico con mucho amor y cariño a mi Madre quien, con apoyo incondicional, me motivó a emprender nuevas metas en mi vida.

Luis Chanaluisa

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TITULO: “IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI EN EL PERIODO 2018-2019”

Autor: Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto

RESUMEN

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Poscosecha y Microbiología Vegetal, en el Campus Experimental Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi. El objetivo de la investigación fue la identificación de las enfermedades y fisiopatías del chocho verde en el proceso de poscosecha y la comprobación de las mismas mediante los postulados de Koch. La metodología que se utilizó fue la descriptiva debido a que se caracterizaron los agentes causales mediante claves taxonómicas y de identificación. Para la visualización de microorganismos viables se utilizó técnicas de aislamiento: cámaras húmedas y disoluciones decimales se preparó medios de cultivo específicos para cada tipo de microorganismo: bacterias *Escherichia coli* (MacConkey), coliformes totales (Tryptone Soy Agar), mohos y levaduras (Sabouraud Dextrose Agar). En cuanto a las fisiopatías se registró datos característicos organolépticos (textura, olor, color, consistencia al tacto).

En base a la pregunta científica sobre la presencia de enfermedades y fisiopatías en el chocho verde en el proceso de poscosecha, se identificó: bacterias Gram negativas (*Escherichia.Coli*), mohos (*Penicillium italicum*), y finalmente levaduras. Atribuyendo a la utilización de agua contaminada, referente a mohos su contagio se determinó por esporas de campo. En las fisiopatías se presenciaron: rugosidad en la cáscara del chocho, olor desagradable, viscosidad al tacto y cambio de coloración.

Palabras clave: Poscosecha, enfermedades, fisiopatías, bacteria, mohos, levadura.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

TITLE: "IDENTIFICATION OF DISEASES AND PHYIOPATHIES OF THE CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) IN GREEN GRAIN, IN THE POSTHARVEST PROCESS, IN THE CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI IN THE PERIOD 2018-2019"

Author: Chanaluisa Unaicho Luis Ernesto

SUMMARY

The present investigation was carried out in the laboratories of Poscosecha and Vegetal Microbiology, in the Experimental Salache Campus of the Technical University of Cotopaxi. The objective of the investigation was the identification of the diseases and physiopathies of the green pussy in the postharvest process and the verification of them by the postulates of Koch. The methodology that is used as the descriptive one is characterized by the taxonomic and identification characteristic. For the visualization of viable microorganisms are used isolation techniques: humid chambers and diseases are prepared culture media for each type of microorganism: bacteria *Escherichia coli* (Mac Conkey), total coliforms (Tryptone Soy Agar), molds and yeasts (Sabouraud) Agar Destroxe). Regarding physiopathies, characteristic organoleptic data are found (texture, smell, color, and consistency of touch).

In the scientific question about the presence of diseases and physiopathies in the post-harvest process, we identified: Gram-negative bacteria (*Escherichia.Coli*), molds (*Penicillium italicum*), and finally yeasts. Attributed to the use of contaminated water, it refers to the links and was determined by field spores. In the physiopathies we observed: roughness in the skin of the cunt, unpleasant odor, viscosity to the touch and change of coloration

Key words: post-harvest, diseases, physiopathies, bacteria, molds, yeast.



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

CENTRO DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que: la traducción del resumen del proyecto de investigación al Idioma Inglés presentado por el Sr. Egresado de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, **CHANALUISA UNAUCHO LUIS ERNESTO** cuyo título versa, “**IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y FISIOPATÍAS DEL CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) EN GRANO VERDE, EN EL PROCESO DE POSCOSECHA, EN EL PERIODO 2018 - 2019**”. Lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimare conveniente.

Latacunga, Febrero 2019

Atentamente,

Lic. MS. c. Amparo de Jesús Romero-Palacios

C.C. 0501369185

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS

XI



Contenido

DECLARACIÓN DE AUTORÍA _____ ¡Error! Marcador no definido.

AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN ____ ¡Error! Marcador no definido.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN _____ V

1. INFORMACIÓN GENERAL _____	1
Título del Proyecto: _____	1
Fecha de inicio: _____	1
Fecha de finalización: _____	1
Lugar de ejecución: _____	1
Unidad Académica que auspicia _____	1
Carrera que auspicia: _____	1
Proyecto de investigación vinculado: _____	1
Equipo de Trabajo: _____	1
Área de Conocimiento: _____	2
Sub líneas de investigación de la Carrera: _____	2
2. RESUMEN DEL PROYECTO _____	4
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO _____	5
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO. _____	6
5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN: _____	7
6. OBJETIVOS: _____	8
6.1 General _____	8
6.2 Específicos _____	8
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS. _____	9
8 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA _____	11
8.1 Enfermedad _____	11
8.2 Hongos _____	13

8.2.1 Mohos	14
8.2.1.1 Claves taxonómicas para identificación de mohos	14
8.2.2 Hongos Levaduriformes	15
8.2.2.1 Aspectos Morfológicos.	16
8.3 Bacterias	16
8. 4 Principales enfermedades y daños en poscosecha	19
8.4.1 <i>Penicillium sp.</i>	19
8.4.1.1 <i>Penicillium digitatum</i>	20
8.4.1.2 <i>Penicillium Italicum</i>	20
8.4.2 <i>Alternaría</i>	21
8.4.3 <i>Botrytis cinerea</i>	21
8.4.4 <i>Phytophthora</i>	22
8.4.5 <i>Rhizopus</i>	22
8.5 Medios de Cultivo	23
8.5.1 Tipos de medios de cultivo	23
8.5.2 Agua peptona	24
8.5.3 Agar papa dextrosa	25
8.5.4 Agar MacConkey	26
8.5.5 Triptone soy agar	27
8.5.6 .Sabouraud Destroxe Agar	28
8.6 Postulados de Koch	29
8.7 Fisiopatías	30
8.7.1 Daños por frío	30
8.7.2 Daño por altas temperaturas	31
8.7.3 Daños por bajos niveles de oxígeno	31
8.7.4 Daños por altos niveles de CO ₂	31
8.7.5 Daños físicos	31
9.- PREGUNTA CIENTÍFICA	31
9.1 Operacionalización de variables	32
9.2 Variables a evaluar	32

10.- METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	32
10.1. Materiales	32
10.2 Ubicación del Área de estudio	34
10.3 Diseño metodológico	34
10.3.1 Metodología	35
10.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	36
10.5 Manejo específico del experimento	36
10.5.1 Fase de campo	36
10.5.2 Cosecha	36
10.5.3.1 Fases de desamargo del chocho verde	37
10.5.4 Laboratorio	37
10.6 Manejo Específico del Experimento Fase de Laboratorio	39
10.6.1 Técnicas para propagación de microorganismos viables.	39
10.6.2 Protocolos para identificación de microorganismos	39
10.6.3 Protocolo para obtención del inóculo (Anexo10)	39
11.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
11.1 Signos de las enfermedades del chocho verde, en poscosecha.	40
11.2 Caracterización de los agentes patógenos.	40
11.2.1 Caracterización macro y microscópicas del moho.	40
11.2.2 Caracterización macro y microscópicas de las levaduras.	43
11.2.3 Caracterización macro y microscópicas de las bacterias.	45
11.3 Comprobación mediante los postulados de Koch, de las enfermedades causadas por patógenos en chocho verde.	47
11.3.1. Resultado de inocular <i>Penicillium italicum</i> .	47
11.3.2 Resultado de inocular Levaduras	48
11.3.3 Resultado de inocular Bacterias	48
11.4. Fisiopatías del chocho verde, en poscosecha.	49
12. CONCLUSIONES	51
13. RECOMENDACIONES	51
14. BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos _____	9
Cuadro 2: Fórmula de Agua Peptona _____	24
Cuadro 3: Fórmula de Agar Papa Dextrosa _____	25
Cuadro 4: Fórmula de Agar Mac Conkey _____	26
Cuadro 5: Fórmula de Triptone soy agar _____	27
Cuadro 6: Fórmula de Sabouraud Destroxe Agar _____	28
Cuadro 7: Operacionalización de variables _____	32

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1 : Moho verde _____	20
Imagen 2 : Vista microscópica del moho verde _____	20
Imagen 3 : Moho azul _____	20
Imagen 4: vista microscópica del moho azul _____	20
Imagen 5: <i>Alternaria</i> _____	21
Imagen 6: vista microscópica _____	21
Imagen 7 : <i>Botrytis cinérea</i> _____	21
Imagen 8: vista microscópica _____	21
Imagen 9 : <i>Phytophthora</i> _____	22
Imagen 10: vista microscópica _____	22
Imagen 11: <i>Rhizopu</i> _____	22
Imagen 12: vista microscópica _____	22
Imagen 13: Moho Azulado 2 días de incubación _____	41
Imagen 14 : Moho Azulado a los 5 días de incubación. _____	41
Imagen 15: <i>Penicillium Italicum</i> vista 100 X _____	42
Imagen 16 : Levadura en placa _____	43
Imagen 17 : Levaduras 100 X _____	44
Imagen 18 : Levaduras 100 X _____	44
Imagen 19: Bacteria <i>Escherichia Coli</i> en placa _____	45
Imagen 20: Bacterias 100 X _____	46
Imagen 21: Tinción para observación de flagelos _____	46
Imagen 22: Inoculacion de <i>Penicillium italicum</i> _____	47
Imagen 23: Inoculación de levaduras _____	48
Imagen 24: Inoculación de la bacteria <i>Escherichia coli</i> _____	48
Imagen 25 : chocho verde desamargado a los 3 días de almacenamiento _____	49
Imagen 26: chocho verde desamargado a los 5 días de almacenamiento _____	50
Imagen 27: chocho verde desamargado a los 7 días de almacenamiento _____	50

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Curriculum Vitae del tutor _____	56
Anexo 2: Curriculum Vitae del primer lector _____	56
Anexo 3: Curriculum vitae del segundo lector _____	57
Anexo 4: Curriculum vitae del tercer lector _____	60
Anexo 5: Curriculum vitae del autor _____	61
Anexo 6: Fase des amargo del chocho verde _____	57
Anexo 7: Cámaras húmedas _____	60
Anexo 7: Protocolo de Cámaras húmedas _____	67
Anexo 8: Disoluciones Decimales _____	61
Anexo 8: Protocolo de Disoluciones Decimales _____	68
Anexo 9: Identificación de hongos _____	62
Anexo 9: Protocolo para identificacion de hongos _____	69
Anexo 10: Identificación de levaduras. _____	62
Anexo 10: Protocolo para identificación de levaduras _____	70
Anexo 11: Método de Tinción Gram en bacterias. _____	63
Anexo 11: Protocolo para Tinción de Gram _____	60
Anexo 12: Método de Tinción para observación de Flagelos en bacterias _____	63
Anexo 12: Protocolo de metodo de tincion para observacion de flagelos _____	72
Anexo 13: Obtención y aplicación del inóculo _____	64
Anexo 13: Protocolo para elaboración del inóculo _____	73
Anexo 7: Cámaras húmedas _____	60
Anexo 14: Presupuesto _____	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Recuento de placas _____	65
Tabla 2: Recuento de placas _____	65

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Identificación de enfermedades y fisiopatías del chocho verde en poscosecha en el Campus Salache, Latacunga Cotopaxi, en el periodo 2018-2019.

Fecha de inicio:

03 Abril del 2018

Fecha de finalización:

Febrero 2019

Lugar de ejecución:

CEASA –Cantón Latacunga – Provincia de Cotopaxi

Unidad Académica que auspicia

Unidad Académica De Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Ingeniería Agronómica.

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto de investigación formativa Manejo de Cosecha y Poscosecha de cultivos.

Proyecto: Fortalecimiento de los sistemas productivos en las comunidades de la provincia de Cotopaxi a través de la generación y procesamiento de granos andinos (chocho, quinua y amaranto).

Equipo de Trabajo:

Responsable del Proyecto: Ing. Mg. Sc. Giovana P. Parra G

Director: Ing. Mg. Giovana P. Parra G

Lector 1: Ing. Mg. Guadalupe López

Lector 2: Ing. Mg. Klever Quimbiulco

Lector 3: Ing. Mg. José Zambrano

Asesor: Ing. Mg. Orlando Rojas.

Autor del Proyecto

Nombre: Luis Ernesto Chanaluisa Unaicho

Teléfonos: 0998720257

Correo electrónico: luis.chanaluis6@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura

Línea de investigación:

Desarrollo y seguridad alimentaria

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Producción Agrícola sostenible

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El proyecto de investigación tuvo como objetivo identificar las enfermedades y fisiopatías del chocho (*Lupinus mutabilis*) en estado verde, en proceso de poscosecha. Se describió los signos de la enfermedad y se identificó su agente causal. Por otra parte, se determinó las fisiopatías más importantes del chocho verde, durante el almacenamiento en poscosecha.

Se identificó y analizó el patógeno, mediante postulados de Koch el cual consistió en aislar el patógeno, reproducirlo, inocularlo y comprobarlo. Todo este procedimiento se lo realizó en laboratorio. Por otro lado, se obtuvo información de las fisiopatías mediante descripciones organolépticas (textura, consistencia al tacto, olor, color).

Hasta la actualidad no se han descrito la existencia de enfermedades y fisiopatías en el proceso de poscosecha del chocho verde desamargado, motivo por el cual se realizó la investigación.

2. RESUMEN DEL PROYECTO

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Poscosecha y Microbiología Vegetal, en el Campus Experimental Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi. El objetivo de la investigación fue la identificación de las enfermedades y fisiopatías del chocho verde en el proceso de poscosecha y la comprobación de las mismas mediante los postulados de Koch. La metodología que se utilizó fue la descriptiva debido a que se caracterizaron los agentes causales mediante claves taxonómicas y de identificación. Para la visualización de microorganismos viables se utilizaron técnicas de aislamiento: cámaras húmedas y diluciones decimales se preparó medios de cultivo específicos para cada tipo de microorganismo: bacterias *Escherichia coli* (MacConkey), coliformes totales (Tryptone Soy Agar), mohos y levaduras (Sabouraud Dextrose Agar). En cuanto a las fisiopatías se registró datos característicos organolépticos (textura, olor, color, consistencia al tacto).

En base a la pregunta científica sobre la presencia de enfermedades y fisiopatías en el chocho verde en el proceso de poscosecha, se identificó: bacterias Gram negativas (*Escherichia.Coli*), mohos (*Penicillium italicum*), y finalmente levaduras.

En las fisiopatías se presenció: rugosidad en la cáscara del chocho, olor desagradable, viscosidad al tacto y cambio de coloración

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En el presente proyecto de investigación será de mucha importancia debido a que se identificarán, las enfermedades y fisiopatías del chocho verde en el almacenamiento de poscosecha. Para que posteriormente se realicen estudios de métodos, estrategias y buen almacenamiento en poscosecha.

Este trabajo facilitará tanto agricultores como estudiantes a conocer los signos de la enfermedad y cambios durante el almacenamiento en poscosecha, para posteriormente diseñen métodos y estrategias de control.

El chocho es importante por su alto contenido de sustancias minerales que se asemejan al de otras leguminosas que representan en total una valiosa fuente de calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, proteína, aceite y nutrientes que le colocan en un plano comparable a la soya. El grano es amargo debido a la presencia de alcaloides, pues contiene en promedio el 42% de proteína en base seca; sin embargo el proceso de des amargo (la eliminación de alcaloides), permite concentrar aún más el contenido de este nutriente, registrando valores de hasta 51 % en base seca. (Loja & Orellana, 2011)

Este producto también es rico en ácido linoleico, un ácido graso esencial que más allá de constituir un aporte energético, posee propiedades que lo hacen único e irremplazable en las etapas más críticas del desarrollo humano esto es, durante la gestación en los primeros meses de vida. (Loja & Orellana, 2011)

El uso inadecuado de las técnicas poscosecha puede propiciar algunos daños como son las fisiopatías y daños físicos, por ejemplo, se tienen evidencias de desórdenes relacionados a atmósferas controladas durante un almacenamiento prolongado ocasionando pérdida del sabor característico. También se debe hacer un control adecuado de las condiciones de temperatura y humedad durante la poscosecha de lo contrario se favorecen las condiciones para la presencia de enfermedades. (Trejo, 2014)

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.

Beneficiarios directos: Los beneficiarios del proyecto serán los agricultores de la comunidad Salache, estudiantes y el Proyecto de Granos Andinos de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Beneficiarios indirectos: Productores y consumidores de chocho a nivel nacional.

5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

No se ha descrito la existencia de enfermedades y fisiopatías en poscosecha del chocho verde desamargado, el cual vendría a ser un problema para el pequeño productor que comercializa este tipo de producto, puesto que se podrían presentar signos de algún hongo u otro microorganismo el cual afectaría la calidad del mismo.

Sería dificultoso para el agricultor identificar los signos del patógeno que afecta al producto puesto que para ello se necesita medios de cultivo puros, para aislar los microorganismos y poderlos identificar mediante claves taxonómicas y la ayuda de un especialista en laboratorio.

De igual manera para poder conocer las fisiopatías se debe investigar bibliográficamente las características adecuadas de procesamiento para que el producto no sufra daños.

6. OBJETIVOS:

6.1 General

Identificar las enfermedades y fisiopatías del chocho verde en el proceso de poscosecha, en el Campus Salache, Latacunga, Cotopaxi, en el periodo 2018-2019.

6.2 Específicos

- Describir los signos de las enfermedades del chocho verde, en poscosecha.
- Caracterizar los agentes patógenos.
- Comprobar mediante los postulados de Koch las enfermedades causadas por patógenos en chocho verde.
- Describir las fisiopatías del chocho verde, en poscosecha.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.

Cuadro 1. Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos

Objetivo 1	Actividad(tareas)	Resultado de la actividad	Medios de Verificación
Describir los signos de las enfermedades del chocho tierno en poscosecha.	<ul style="list-style-type: none"> • Descripción de los signos encontrados en el chocho verde. • Descripción macroscópica (en función de los medios del cultivo) de los microorganismos. • Descripción de microscópica de microorganismos. 	Lista de microorganismo encontrados	Fotografías

Objetivo 2	Actividad(tareas)	Resultado de la actividad	Medios de Verificación
Caracterizar los agentes patógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Utilización de claves y técnicas de identificación. • Caracterización de agente patógeno. 	Conocimiento de la estructura de los agentes patógenos.	Observación

Objetivo 3	Actividad(tareas)	Resultado de la actividad	Medios de Verificación
Comprobar mediante los postulados de Koch.	<ul style="list-style-type: none"> • Aislamiento de los microorganismos en medios de cultivo puro. • Reproducción de los patógenos. • Purificación • Obtención del inóculo. • Inoculación de los patógenos. • Comparación de los agentes patógenos. 	<p>Evaluar el comportamiento de los agentes patógenos mediante los postulados de Koch.</p>	Observación y comparación

Objetivo 4	Actividad(tareas)	Resultado de la actividad	Medios de Verificación
Describir las fisiopatías en chocho verde, en poscosecha.	<ul style="list-style-type: none"> • Descripción organoléptica de cambios morfológicos. 	Listado de las fisiopatías del chocho verde.	Observación

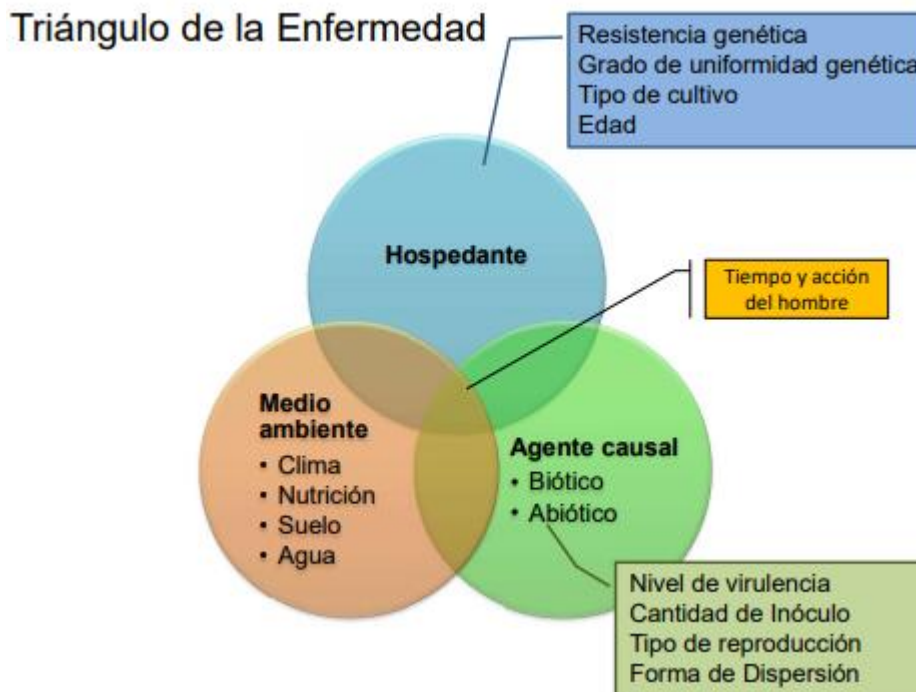
8 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

8.1 Enfermedad

Respuestas visibles o invisibles de una planta/tejidos ante la acción de un organismo patógeno o factor ambiental que genera cambios en su forma, funcionamiento o integridad, originando un deterioro parcial hasta la muerte. (Cárdenas, 2015)

Herramientas básicas para identificar la enfermedad

- **Síntoma:** Expresión de la enfermedad. (Cárdenas, 2015)
- **Signo:** Estructuras del patógeno o sus productos dentro o sobre el individuo enfermo. (Cárdenas, 2015)



Elaborado por (Cárdenas, 2015)

Clasificación de las enfermedades

Impacto

- Aniquiladora: Destrucción total.

- Devastadora: Controlable (pero peligro latente)
- Limitante: Aumento gradual. Zonas restringidas
- Debilitante: Afecta follaje o raíces debilitando la planta
- Desfigurante: Calidad inferior del producto. (Trejo, 2014)

Agente

Enfermedad Infecciosa

(Agente biótico)

- Micosis
- Virosis
- Bacteriosis

Enfermedad No Infecciosa

(Agente abiótico)

- Mecánicas
- Físicos
- Nutricionales
- Químicos

Interacción hospedante – patógeno

Desintegración de tejidos: Pared + Laminilla media protoplasto

Podredumbre Húmeda: Parenquima

Podredumbre seca: Parenquima

Necrosis: Cancrosis, Damping off, Vuelco del pietín, antracnosis. (Cárdenas, 2015)

8.2 Hongos

Los hongos constituyen uno de los grupos de organismos más vitales para el medio ambiente, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica, liberando en la tierra muchos nutrientes inorgánicos, tales como el carbono (C) y el nitrógeno (N), beneficiando de esta manera a las plantas y a los animales que dependen de estos elementos para vivir. En menor escala, existen algunas especies de hongos perjudiciales que causan daño tanto al hombre, como a los animales y plantas. (Rocabado, 2011)

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos (miceliales o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. (García Bona, 2013)

Fisiológicamente los hongos se adaptan a condiciones más severas que las bacterias. Por ejemplo, los mohos se desarrollan en sustratos con concentraciones de azúcar que las bacterias no pueden tolerar ya que los hongos no son tan sensibles a la presión osmótica elevada. Los hongos toleran y se desarrollan en concentraciones de acidez elevadas, soportan escalas de pH entre 2 a 9 pero el pH óptimo es 5.6. Aunque necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio, los hongos pueden vivir en ambientes deshidratados que serán inhibitorios para la mayor parte de las bacterias. (Barria Olivo, 2013)

- **Identificación de hongos**

El proceso de identificación de un hongo multicelular comienza desde que se toma la muestra de la parte deteriorada del alimento sujeto a análisis hasta la obtención del nombre del hongo. Dicha identificación se realiza a través del uso de claves dicotómicas, las cuales son diseñadas por expertos en micología, las mismas tienen en cuenta los caracteres macro y micro morfológicos de un hongo cultivado bajo un conjunto estándar de condiciones. El estudio de las características encontradas permitirá diferenciar e identificar el género y la especie del hongo analizado. El mejor método para el estudio microscópico es el micro cultivo que permite observar cuidadosamente y a intervalos las estructuras microscópicas

intactas, mientras que en la técnica de desprender una porción del cultivo se altera muy seriamente la arquitectura microscópica tanto que a veces es imposible reconocer el hongo. (García Bona , 2013)

8.2.1 Mohos

8.2.1.1 Claves taxonómicas para identificación de mohos

Observación macroscópica

- Determinar tamaño de la colonia, diámetro
- Textura, lanosa, flocosa, granulosa, etc
- Color, escala de colores
- Presencia de surcos
- Exudado
- Producción de pigmento, etc...

Observación microscópica

Algunos caracteres microscópicos del micelio fúngico: Micelio tabicado, hifas septadas, ramificadas, formando una maraña. Observamos la periferia de la misma para encontrar conidios (macro y microconidias) o bien algunas estructuras morfológicamente interesantes para el diagnóstico micológico. Conidias: Microconidias, son unicelulares, pequeñas, redondas, ovales o piriformes. Presentan dos tipos de disposición: a lo largo de la hifa (tipoaccladium) en forma de racimos. Unas veces son sésiles, otras nacen sobre cortos esterigmas. Las macroconidias, son multicelulares, grandes, con tabiques transversales. Existen diversos tipos: fusiformes, en raquetas y en lápiz o maza. A su vez pueden tener las paredes gruesas o finas, ser lisas o rugosas, aisladas o en racimos. (Barria Olivo, 2013)

- Estructuras morfológicas especiales: Casi todas variantes de tamaño y forma de las hifas septadas:
- Espirales: hifa fina enrollada en espiral.

- Hifa en raqueta: ensanchamiento oval de una porción media o terminal de una hifa.
- Cuerpos nodulares: filamentos engrosados formando nudos sobre sí mismo.
- Hifa peptinada: pequeñas prolongaciones en un solo lado de la hifa, que adopta así forma de peine.
- Hifa retrógrada: hifa que nace en sentido contrario, en ángulo agudo, al resto de las ramificaciones. (Barria Olivo, 2013)

8.2.2 Hongos Levaduriformes

Las levaduras son un grupo diverso de hongos; sus formas teleomorfas (sexuales) se distribuyen en dos clases principales; Ascomycotina y Basidiomycotina, su denominación “levadura” describe el predominio unicelular de estos organismos que en su división celular vegetativa se realiza por gemación o por fisión. Las levaduras poseen numerosas aplicaciones en la biotecnología tradicional y moderna, ya que participan en procesos de producción de alimentos, proteínas de organismos unicelulares, productos con valor añadido y en las últimas décadas se han incorporado a la industria biotecnológica como hospederos para la producción de proteínas de eucariontes. (Barria Olivo, 2013)

- **Identificación taxonómica de las levaduras**

Puede ser realizada tomando en cuenta diferentes criterios que complementan su diagnóstico específico: (García Bona , 2013)

- morfológico
- bioquímico
- fisiológico
- inmunológico

El interés general de su clasificación e identificación se relaciona con una necesidad de enfrentar un tratamiento adecuado en las infecciones de aquellas formas patógenas o comprender la interacción de las especies en la naturaleza, o la selección conveniente en la producción de alimentos y en las fermentaciones industriales por sus diversas capacidades metabólicas. (García Bona , 2013)

8.2.2.1 Aspectos Morfológicos.

- **Observación Macroscópica**

Toma en cuenta las características que desarrollan las colonias de levadura que crecen en diferentes medios, siendo su mejor medio de cultivo y aislamiento el Agar Sabaouraud. Y/ó harina de Maíz. (García Bona , 2013)

- **Aspectos Microscópicos**

La separación de las levaduras en género y ocasionalmente en especie, se realiza corrientemente a través de la apariencia microscópica por el reconocimiento de los estado vegetativos y sexuales. Definiendo en estos sentidos; forma celular, gemación, hifas, blastoconidias, clamidosporas, artrosporas y ascosporas. La observación se efectúa alrededor de 400 – 500X en microscopía de luz y en inmersión cuando es necesario distinguir ornamentación de ascosporas. (García Bona , 2013)

8.3 Bacterias

- **Identificación**

En este apartado se revisan las técnicas de identificación fenotípica de las principales bacterias que pueden encontrarse en muestras clínicas y pretende ser una guía detallada del proceso de identificación. En ningún caso, los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta. Únicamente indicaron cual es el género y/o la especie a la que la bacteria identificada tiene mayor probabilidad de pertenecer. (Olmos Fernández, 2010)

- **Características macroscópicas**

Morfología

Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando

crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus 5 características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color. (Olmos Fernández, 2010)

Tamaño: Las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. Por ejemplo, las colonias de estreptococos tienen un tamaño más pequeño que las de los estafilococos y las enterobacterias. (Olmos Fernández, 2010)

Forma: Está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. (Olmos Fernández, 2010)

Textura: Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. (Olmos Fernández, 2010)

Color: Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación (ejemplo: Pseudónimas a eruginosa (pigmento verde), Serratia marcescens (pigmento rojo) aunque en una misma especie puede haber cepas no pigmentadas. (Olmos Fernández, 2010)

Medios de cultivo: En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas. En términos generales todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. Necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos, pero en muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales. (Olmos Fernández, 2010)

Características microscópicas

El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso, y ocasionalmente el único, para la identificación bacteriana. Las tinciones más utilizadas e imprescindibles son la del azul de metileno y la de Gram. La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso. (Olmos Fernández, 2010)

Estos son algunos de los términos utilizados para preparaciones teñidas:

- tinción: uniforme, irregular, unipolar, bipolar, etc.
- forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.
- cápsula: presente o ausente
- endosporas: ovales, esféricas, terminales, subterminales
- tamaño: cortos, largos, etc.
- bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares
- extremos: redondeados, puntiagudos
- disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.
- formas irregulares: variación en forma y tamaño, ramificados, fusiformes, etc.

(Olmos Fernández, 2010)

Requisitos de crecimiento.

Atmósfera. Las bacterias se clasifican en función de sus requerimientos atmosféricos:

- Aerobias estrictas, que crecen solo en presencia de oxígeno.
- Anaerobias estrictas, que solo crecen en ausencia de oxígeno.
- Facultativas, que crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.
- Micro aerofílicas, que crecen mejor en una atmósfera con reducida concentración de oxígeno.
- Capnofílicas, que requieren CO₂ adicional para crecer. (Olmos Fernández, 2010)

Temperatura. Se clasifican además en función de la temperatura necesaria para su crecimiento:

- Psicofílicas, pueden crecer a bajas temperaturas entre 2-5°C (Óptimo 10-30°C).
- Mesofílicas, crecen a temperaturas entre 10- 45°C (Óptimo 30-40°C).

- Termofílicas, crecen muy poco a 37°C (Óptimo 50-60°C). La mayoría de las bacterias encontradas en muestras clínicas son mesofílicas. (Olmos Fernández, 2010)

8. 4 Principales enfermedades y daños en poscosecha

Durante la poscosecha, verduras son susceptibles de verse afectadas por distintos microorganismos como hongos y bacterias que empeoran su rendimiento y calidad. Cada uno de estos organismos patógenos tiene un efecto distinto en los frutos, pero las consecuencias más habituales derivadas de estas enfermedades en poscosecha son la podredumbre, la degradación, la pérdida de sabor y los malos olores. (Ibérica, 2015)

Cuanto mayor tiempo estén los frutos almacenados, mayor será la posibilidad de que contraigan alguna de estas enfermedades, ya que la capacidad de síntesis de las sustancias naturales que los protegen frente a estas enfermedades disminuye. Algunas de las enfermedades en poscosecha más comunes son las siguientes: *Penicillium Digitatum* (moho verde) y *Penicillium Italicum* (moho azul), *Alternaria*, *Botrytis Cinerea*, *Phytophthora*, *Rhizopus*. (Ibérica, 2015)

8.4.1 *Penicillium* sp.

Los penicilios son mohos comunes que desarrollan sobre los más diversos sustratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. (Carrillo, 2011)

El género *Penicillium* posee ramificaciones llamados verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado, si tienen métula, fiálides y conidias se llaman biverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. (Carrillo, 2011)

8.4.1.1 *Penicillium digitatum*

El área esporulada es de color verde oliva y se presenta rodeada por una amplia zona (1-2 cm) de micelio blanco y de una estrecha banda de cáscara blanda de aspecto acuoso. (Delgado Arce & Pérez Iarza, 2014)

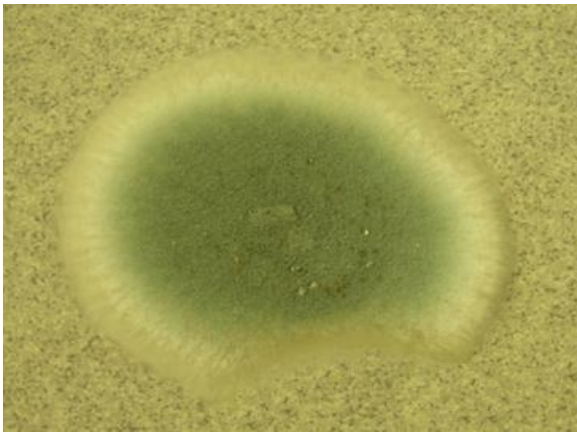


Imagen 1 : Moho verde
Fuente: Fernando Huerta 2014

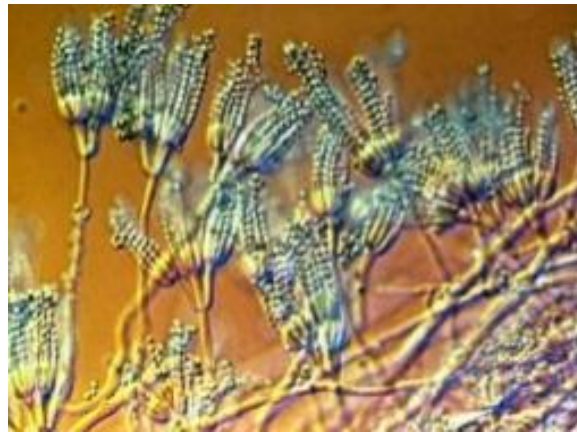


Imagen 2 : vista microscópica
Fuente: Fernando Huerta 2014

8.4.1.2 *Penicillium italicum*

El área esporulada denota una coloración azulada y se distingue por estar rodeada por una pequeña banda de micelio blanco, seguida por una amplia zona de cáscara blanda de aspecto acuoso. (Delgado Arce & Pérez Iarza, 2014)



Imagen 3: Moho azul
Fuente: Alexander Dávila 2009



Imagen 4: vista microscópica
Fuente: Fernando Huerta 2014

8.4.2 *Alternaria*

Es un género fúngico muy común, donde se incluyen numerosas especies saprofitas, endofíticas y patógenas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición. (Pavón Moreno & González Alonso, 2012)



Imagen 5: Moho alternaria
Fuente: Jorge Centeno 2003

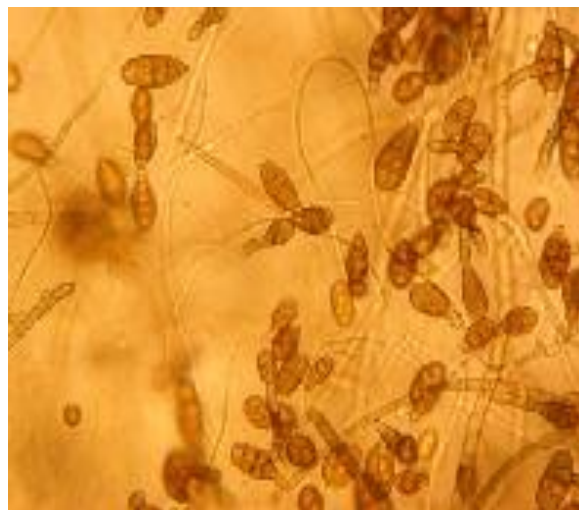


Imagen 6: vista microscópica
Fuente: Logiieco 2003

8.4.3 *Botrytis cinerea*

Se caracteriza por los abundantes conidios (esporas asexuales) de forma oval en el extremo de conidióforos grises ramificados. El hongo además produce esclerocios altamente resistentes como formas de resistencia en cultivos viejos. (Chamorro , 2015)



Imagen 7 : Botrytis cinérea
Fuente: María López

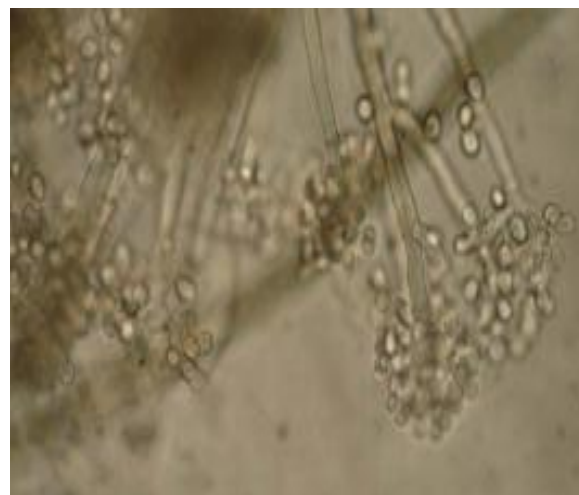


Imagen 8: vista microscópica
Fuente: María López

8.4.4 Phytophthora

Todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo, de paredes paralelas o irregularmente calibrado, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. El micelio es cenocítico. (Medina, 2007)

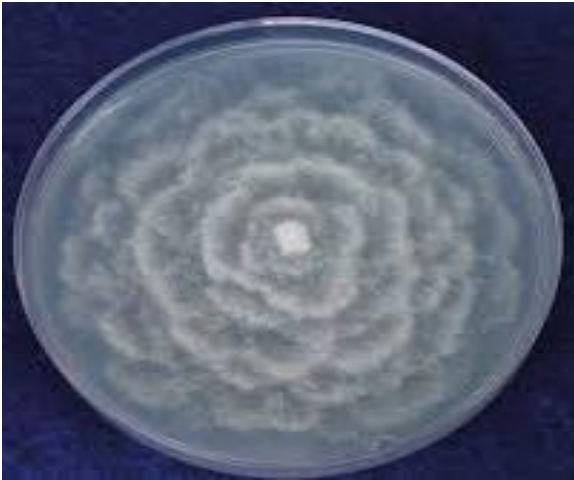


Imagen 9 : Phytophthora
Fuente: Medina 2007

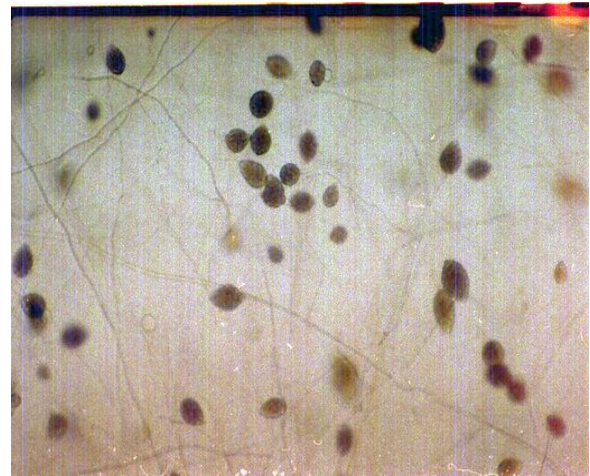


Imagen 10: vista microscópica
Fuente: Medina 2007

8.4.5 Rhizopus

Rhizopus spp. Es un Zygomyceto, comúnmente encontrado en el polvo de las casas, suelo, frutas, nueces y semillas, también se presenta en alimentos en proceso de descomposición. (Medina, 2007)



Imagen 11: Rhizopus
Fuente: Billy Rodríguez

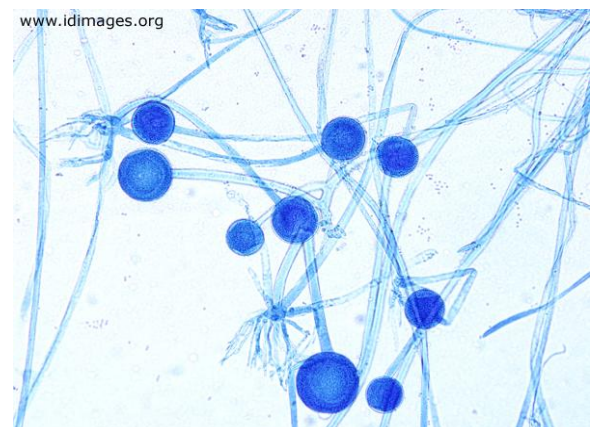


Imagen 12: vista microscópica
Fuente: Billy Rodríguez

8.5 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad. (Granada, 2007)

8.5.1 Tipos de medios de cultivo

Medios generales: Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. (Granada, 2007)

Medios de enriquecimiento: Son aquellos que favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento de los demás. (Granada, 2007)

Medios selectivos: Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás. (Granada, 2007)

Medios diferenciales: Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee. (Granada, 2007)

Preparación de medios de cultivo

En la actualidad, la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados; normalmente bajo la forma de liofilizados a los que es preciso rehidratar. En estos casos la preparación del medio de cultivo se reduce sencillamente a pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias termolábiles, se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes después de que estos hayan sido previamente esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente o a 40-50 ° C si se trata de medios con agar. (Granada, 2007)

Antes de su esterilización los medios líquidos se reparten en los recipientes adecuados (tubos, matraces, etc.). Si es un medio sólido y se ha de distribuir en tubos ó en matraces será necesario fundir el agar en baño María u horno microondas, una vez fundido y

homogenizado, se distribuye en caliente a los tubos o matraces (no en placas Petri) se tapa y se esteriliza en el autoclave. (Granada, 2007)

Una vez finalizada la esterilización los medios se dejaran enfriar a temperatura ambiente y en el caso de medios sólidos contenidos en tubos deberán, en su caso, inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado o pico de flauta (slant) si tal es su finalidad. (Granada, 2007)

8.5.2 Agua peptona

Medio utilizado como diluyente y para el enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. (Britania, 2014)

Medio de enriquecimiento no selectivo, en el cual la peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Permite recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a los que ha sometido el alimento. (Britania, 2014)

Además, puede ser utilizado como diluyente de muestras en reemplazo de solución fisiológica y como base para la fermentación de hidratos de carbono. En este último caso se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono en cuestión en concentración final al 1%. (Britania, 2014)

Cuadro 2: Fórmula de Agua Peptona

Formula (en gramos por litro)	
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0
pH final 7.2+- 0.2	

Instrucciones

Suspender 15 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar calentando hasta ebullición durante 1 minuto. Distribuir en recipientes apropiados. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Britania, 2014)

8.5.3 Agar papa dextrosa

Es utilizado para el cultivo de hongos. Este producto está conforme a los Requerimientos Armonizados de las Farmacopeas USP/EP/JP. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)

Resumen y Explicación del Producto

El Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)

Es recomendado para uso con métodos de conteo en placa para alimentos, productos lácteos 4-6 y pruebas realizadas en cosméticos.⁷ El Agar Papa Dextrosa (PDA) puede ser usado para el cultivo de levaduras y mohos clínicamente significativos. ⁸ La base (infusión de papa) nutricionalmente rica, estimula la esporulación de los mohos y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)

Principios del Procedimiento

Está compuesto por Infusión de Papa deshidratada y Dextrosa que fomentan el crecimiento exuberante de los hongos. El agar es adicionado como agente solidificante. Muchos procedimientos estándares usan una cantidad específica de ácido tartárico estéril (10%) para reducir el pH de este medio a $3,5 \pm 0,1$, y así inhibir el crecimiento bacteriano. No recalentar el medio acidificado, el calentamiento en estado ácido hidrolizará el agar. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)

Cuadro 3: Fórmula de Agar Papa Dextrosa

Fórmula / Litro	
Infusión de Papa (Potato Infusion) a partir de 200 g	4 g
Dextrosa (Dextrose)	20 g
Agar	15 g
4,0 g de extracto de papa es equivalente a 200 g de infusión de papas	
pH Final: $5,6 \pm 0,2$ a 25°C	

La fórmula puede ser ajustada y/o suplementada de acuerdo a los requerimientos para cumplir con las especificaciones de rendimiento o desempeño. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)

Procedimiento

1. Suspenda 39 g del medio de cultivo en un litro de agua purificada (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)
2. Caliente agitando frecuentemente y permita que hierva por un minuto para disolver completamente el medio. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)
3. Autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Vanderzant & Splittstoesser, 2007)

8.5.4 Agar MacConkey

El agar MacConkey, CS, se utiliza para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram-negativos de muestras que contengan cepas “swarming” de *Proteus* spp. en un entorno de laboratorio. El agar MacConkey, CS, no está destinado a ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos. (Dickinson, 2014)

El agar MacConkey se basa en el agar de sales biliares-rojo neutro-lactosa de MacConkey. El medio MacConkey original se utilizó para diferenciar cepas de *Salmonella typhosa* de los miembros del grupo de coliformes.

Cuadro 4: Fórmula de Agar MacConkey

Fórmula	Litro
Digerido enzimático de gelatina	17 g
Digerido enzimático de caseína	1.5 g
Digerido enzimático de tejido animal	1.5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	13.5 g

pH final: 7.1 ± 0.2 a 25°C

La fórmula se puede ajustar y/o complementar según sea necesario para cumplir con las especificaciones de rendimiento. (Dickinson, 2014)

Instrucciones

1. Suspenda 50 g del medio en un litro de agua purificada. (Dickinson, 2014)
2. Caliente con agitación frecuente e hierva durante un minuto para disolver completamente el medio. (Dickinson, 2014)
3. Autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Dickinson, 2014)

Tipos de muestras

Se trata de un medio selectivo para el aislamiento de Enterobacteriaceae y diversos bacilos gram negativos y puede utilizarse para todos los tipos de muestras clínicas y para una diversidad de materiales no clínicos. (Dickinson, 2014)

Características de rendimiento y limitaciones del procedimiento MacConkey Agar

En este medio crecerán todos los organismos de la familia Enterobacteriaceae y varios bacilos gram negativos, por ejemplo, Pseudomonas y otros géneros relacionados⁵⁻⁹. Los organismos no fermentadores y otros bacilos gram negativos sensibles a los componentes selectivos no crecen en este medio.

8.5.5 Triptone soy agar

Es un medio de enriquecimiento recomendados para el cultivo de una gran variedad de microorganismos. (Soria, 2009)

- **Principio**

Se utiliza para el cultivo de bacterias aerobias, así como de bacterias anaerobias facultativas y algunos hongos. El Tryptone Soy Agar (TSA), es el medio más frecuentemente utilizado, está indicado para el mantenimiento de cultivos de referencia, y está incluido en los métodos de análisis de aguas y alimentos. (Soria, 2009)

Cuadro 5: Fórmula de Triptone soy agar

Composición por litro de medio en agua purificada	
Cloruro sódico	5,0 g
Hidrolizado pancreático de caseína	17,0 g
Hidrolizado pancreático de harina de soja..	3,0 g
Agar	15,0 g
pH= 7,3 +/- 0,2	

Precauciones

Este producto es para uso exclusivo de profesionales. No debe ser utilizado en caso de presentar contaminación microbiana, roturas u otros signos de deterioro. Las muestras clínicas a procesar pueden presentar otros patógenos importantes, por lo que la esterilización de los materiales antes de desechar es obligatoria. (Soria, 2009)

8.5.6 .Sabouraud Dextrose Agar

El Agar Sabouraud Dextrosa es un medio originalmente desarrollado para el cultivo de dermatofitos. Hoy en día se utiliza para el aislamiento y cultivo de todo tipo de hongos. La peptona es la fuente de nitrógeno necesaria para conseguir crecimientos conjuntamente con la Glucosa a alta concentración. Esta alta concentración de Glucosa favorece a los hongos frente a las bacterias que no toleran estas concentraciones. (Soria, 2009)

El pH ácido es óptimo para el crecimiento fúngico, pero no para las bacterias en general salvo las acidó filas. Este medio está recomendado para el estudio de las características morfológicas de las colonias de los hongos. (Soria, 2009)

- **Principios**

La dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro con efecto inhibitor para una amplia variedad de bacterias Gram negativas y positivas cuando se agrega a la fórmula. (Soria, 2009)

Cuadro 6: Fórmula de Sabouraud Dextrose Agar

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g

8.6 Postulados de Koch

- El organismo sospechoso de causar la enfermedad debe encontrarse asociado, en forma consistente, a especímenes con la sintomatología de la posible enfermedad o lo que es igual el patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen. (Rivera. C, 2007)
- El organismo debe aislarse en un medio nutritivo y obtenerse como cultivo puro, para registrar sus características morfológicas, bioquímicas o moleculares. Visto de otra manera, el patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parásito no obligado) o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parásito obligado) registrando su presencia y los efectos que produzca. (Rivera. C, 2007)
- El organismo debe inocularse en plantas sanas de la misma especie o variedad donde se observó originalmente el problema y debe producirse los mismos síntomas observados al iniciar el proceso o debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
- El organismo debe ser re aislado a partir de la planta inoculada en cultivo puro y sus características deben corresponder a las observadas o anotadas en el segundo punto. (Rivera. C, 2007)

Según Rivera. (2007) todos los postulados de Koch son verificables, aunque no siempre se cumplen con patógenos tales como hongos, bacterias, plantas superiores parásitas, nematodos, algunos virus, entre otros. Estos organismos pueden aislarse y cultivarse, o bien

purificarse, y entonces ser introducidos a las plantas y causar la enfermedad. Sin embargo, con los demás patógenos como virus, algunos viroides, micoplasmas, bacterias fastidiosas vasculares y protozoarios, aun no es posible hacer un cultivo o purificación de ellos y con frecuencia no es posible reintroducirlos en las plantas para reproducir la enfermedad. Así, como estos patógenos, no se pueden llevar a la práctica los postulados de Koch, por lo que su aceptación como los patógenos de las enfermedades con las que se asocian es más o menos hipotética o tentativa. Koneman. (2008)

8.6.1 ¿Siempre es posible cumplir los postulados de Koch?

En qué casos no es posible:

- virus
- factores ambientales patogénicos

8.7 Fisiopatías

Los factores causantes pueden ser: cambios bruscos de temperatura, crecimiento vegetativo excesivo, bajada de la humedad relativa, estrés hídrico en el momento de la floración, exceso de temperatura, exceso de fertilización nitrogenada o tratamientos fitosanitarios que, sin llegar a ser fitotóxicos, dañen la flor. (Infoagro, 2007)

Este problema puede confundirse enfermedades, por lo que hay que recurrir al análisis. No se conoce el agente causal, pero se han definido algunos de los factores que influyen en su aparición: bajada brusca de la humedad relativa y temperatura. (Infoagro, 2007)

Debido a factores externos y naturales como, por ejemplo, la exposición a temperaturas extremas o los desbalances nutricionales, las frutas y verduras pueden presentar daños fisiológicos que repercuten sobre su calidad, como: (Ibérica, 2015)

8.7.1 Daños por frío

Pese a que las temperaturas bajas ayudan a conservar en mejor estado las frutas y verduras, siempre debe haber un control. La exposición a heladas o temperaturas bajo cero de manera constante puede desarrollar síntomas negativos en los frutos como sabores amargos, olores fuertes, deterioro de los tejidos, etc. (Ibérica, 2015)

8.7.2 Daño por altas temperaturas

Al igual que el frío excesivo, las temperaturas demasiado elevadas también influyen en la calidad de los frutos. Las altas temperaturas modifican el efecto del etileno acelerando el proceso de envejecimiento. También favorecen la germinación de esporas de los hongos, lo que ayuda al desarrollo de patógenos. Las temperaturas altas provocan que los frutos experimenten una pérdida acelerada de agua que puede terminar en la pérdida de la cosecha. (Ibérica, 2015)

8.7.3 Daños por bajos niveles de oxígeno

Bajos niveles de O₂ en el ambiente pueden inducir procesos de fermentación en las frutas ocasionando la producción de malos olores y sabores, así como el deterioro del producto. Esto es habitual cuando la ventilación del ambiente en el cual se encuentran las frutas o verduras es deficiente, y se pueden ver favorecidos por las altas temperaturas. (Ibérica, 2015)

8.7.4 Daños por altos niveles de CO₂

La acumulación de dióxido de carbono puede retrasar el proceso normal de ablandamiento y pérdida de verdosidad. En otros casos, los síntomas que se observan son la decoloración, así como un deterioro interno por la acumulación de este gas. El exceso de CO₂ también puede producir en algunas frutas mal sabor y marcas en la piel. (Ibérica, 2015)

8.7.5 Daños físicos

Pueden ser lesiones ocasionadas por golpes, caídas o cualquier tipo de rotura de la piel del fruto. Como consecuencia de esto se producen una serie de reacciones físicas que pueden mostrarse en forma de tejido dañado, ennegrecimiento de la piel, malos olores, etc. (Ibérica, 2015)

9.- PREGUNTA CIENTÍFICA

¿En el almacenamiento del chocho verde se presenta enfermedades y fisiopatías?

9.1 Operacionalización de variables

Cuadro 7: Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADORES	INSTRUMENTO
Enfermedades	Incidencia	Recuento de placas totales
	Caracterización de los agentes causales.	Claves taxonómicas
Fisiopatías	Descripción organoléptica morfológica.	Días transcurridos

Elaborado por Luis Chanaluisa (2018)

9.2 Variables a evaluar

9.2.1 Incidencia de enfermedades (Tabla 1)

Se realizó el recuento de microorganismos viables, el cual se basa en determinar la presencia de microorganismos como son: Coliformes totales, Escherichia coli, mohos y levaduras. Se utilizó medios de cultivos específicos para cada tipo de microorganismo.

9.2.3 Caracterización de patógenos

Se determinará mediante claves taxonómicas y técnicas de identificación a los diferentes microorganismos presentados, como son: bacterias, mohos y levaduras. Para ello será necesario en sustento de artículos científicos, libros, páginas web, plataformas digitales de microbiología, etc.

9.2.2 Descripción organoléptica morfológica.

Se determinó las fisiopatías mediante características organolépticas morfológicas como: rugosidad en la cáscara del chocho, olor desagradable, viscosidad al tacto y cambio de coloración. En el transcurso de los días.

10.- METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

10.1. Materiales

Materiales de campo

- Hoz o tijeras de podar.
- Costal
- Balanza digital.

Materiales y Equipos de laboratorio

- Mandil
- Cofia
- Guantes quirúrgicos
- Mortero de porcelana
- Balanza analítica científica
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora / Cámara de crecimiento
- Microscopio
- Centrífuga
- Pera de succión
- Pipetas
- Erlenmeyer 250 ml
- Frascos de vidrio 250 ml
- Cuenta colonias
- Estufa
- Cajas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo
- Porta objetos
- Cubre objetos.

Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol

- Lugol
- Violeta
- Safranina
- Azul de metileno

10.2 Ubicación del Área de estudio

Este proyecto de investigación, se realizó en el laboratorio de poscosecha y microbiología vegetal del Campus Experimental Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Barrio: Salache

Parroquia: Eloy Alfaro

Cantón: Latacunga

Condiciones climáticas

Longitud: 78° 37' 19" oeste

Latitud: 0° 59' 47" sur

Precipitación: 300 – 350 mm Anuales.

Humedad: Posee una humedad del 40 %.

Luminosidad: Tiene de 8 – 9 horas diarias de luminosidad.

Temperatura: Fluctúa entre los 14–20°C

Altitud: 2757 m.s.n.m.

10.3 Diseño metodológico

Tipo de Investigación

Descriptiva.

Esta investigación es de tipo descriptiva porque consistió en describir y caracterizar los signos y el agente causal de las enfermedades y también se determinó las fisiopatías del chocho verde en el almacenamiento.

Cuantitativa

Esta técnica sirvió para contabilizar colonias propagadas en cajas Petri, específicamente para el recuento de placas.

Cualitativa

Este tipo de técnica consistió en describir las características macro y microscópicas de bacterias, mohos y levaduras. Así como también las fisiopatías en el almacenamiento en percha del chocho verde desamargado.

Comparativa

Mediante esta técnica se realizó comparaciones a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas, para la identificación de patógenos propagados en el chocho verde desamargado.

10.3.1 Metodología

Métodos

Bibliográfico

La investigación dispuso de material bibliográfico y documental que sirvió de base para el contexto de marco teórico. Las fuentes como libros, revistas, tesis de grado, artículos científicos entre otras, fortalecieron el conocimiento para mejorar el proceso del trabajo.

Descriptivo

Se utilizó el método descriptivo con el cual se describieron las características de los microorganismos y fisiopatías en el transcurso de almacenamiento de chocho verde en poscosecha.

De Laboratorio

La investigación se centró en la fase de laboratorio ya que permitió utilizar herramientas que ayudaron a identificar los agentes causales de la enfermedad en chocho verde y también conocer las fisiopatías durante el almacenamiento en poscosecha.

10.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Observación

Permitió la relación directa con el objeto de estudio el cual fue de mucha importancia, ya que así se pudo identificar las causas ocasionadas de la enfermedad o fisiopatías.

Registro de datos

Esta técnica nos permitió recopilar datos válidos, fiables para realizar una descripción de los signos de enfermedades y ciertos cambios que se dan en el transcurso del almacenamiento en poscosecha.

10.5 Manejo específico del experimento

10.5.1 Fase de Campo

Se realizó labores pre culturales (arado, rastrado, surcado, fertilización, plantación de semillas) y culturales (deshierba, aporque y fertilización vía foliar)

10.5.2 Cosecha

La cosecha se lo realizó a los 165 días, para la recolección se utilizó una hoz y un costal grande, con la hoz se cortaron las vainas de una sola coloración. Las vainas cortadas se las colocaba en el costal.

10.5.3 Poscosecha

Se desgranó el chocho verde manualmente, una vez desgranado se clasificó en una mesa clasificadora de granos, después se procedió a colocar en costales pequeños para posteriormente pesarlos en una balanza digital.

A continuación, se realizó el proceso de desamargo del chocho verde, teniendo en cuenta las fases que deben considerarse para la obtención del alimento en condiciones óptimas para el consumo humano las cuales son: hidratación, cocción, lavado.

10.5.3.1 Fases de des amargo del chocho verde (Anexo 6)

- **Hidratación**

En un tanque de 50 litros, colocar 30 litros de agua, después sumergir 4 costales de 2 kilogramos de chocho verde previamente pesados, posteriormente dejarlos reposar durante 24 horas, agregar agua si es necesario para cubrir los costales.

- **Cocción**

Pasadas las 24 horas de hidratación, se procede a escurrir el agua durante 2 minutos, para a continuación colocar los costales de chocho verde en una olla con agua. Dejar hervir durante 45 minutos aproximadamente hasta que el agua se torne totalmente verde.

- **Lavado**

Una vez realizado el proceso de cocción se retira el chocho verde para escurrirlo durante 5 minutos. Una vez escurrido se coloca en un recipiente con agua limpia y fría. Se realiza el cambio de agua dos veces al día, durante cuatro días.

Después que se realizó el proceso de desamargo del chocho verde, se almacenó en tarrinas en los cuartos fríos de poscosecha a una temperatura de 5°C.

10.5.4 Laboratorio

En el laboratorio se realizó la técnica de aislamiento de cámaras húmedas y disoluciones decimales. Esta última se trabajó con medios de cultivo (Mac Conkey, Tryptone Soy Agar, Sabouraud Destroxe Agar) los cuales ayudaron a identificar los microorganismos en el chocho verde. Para bacterias (MC), (TSA) y para mohos y levaduras (SDA), (PDA).

- **Aislamiento**

Se realizó un triturado de la muestra para colocarlo en el matraz Erlenmeyer que contenía 90 ml de agua peptona. Posteriormente se realizó disoluciones 10^{-1} hasta 10^{-5} , después se colocó y homogeneizó las disoluciones en cajas Petri, por último se colocó el medio de cultivo respectivo.

- **Reproducción**

Se procedió a colocar las muestras en la incubadora en el lapso de 2 días, para el caso de bacterias se calibró a una temperatura de 37°C (coliformes totales), 41°C (*Escherichia coli*) y una humedad relativa de por otra parte para mohos y levaduras se calibró una temperatura de 26°C .

- **Purificación**

Con la ayuda de una aguja flameada y desinfectada extraer una pequeña porción de colonia bacteriana en el medio de cultivo (Mac Conkey y Tryptone Soy Agar), de igual manera flamear y desinfectar la aguja para extraer colonias o esporas de los mohos, levaduras y colocar en (Sabouraud Dextrose Agar y Potato Dextrose Agar), después Incubar durante 2 días. Todo este procedimiento con el fin de obtener cultivos puros.

- **Obtención del inóculo**

Se colocó agua destilada esterilizada en la caja con la muestra (bacteria, mohos, levaduras) y con la ayuda de una varilla de vidrio esterilizada se procedió a homogeneizar, para posteriormente colocar la muestra en una disolución (agua destilada esterilizada, almidón de yuca y sacarosa).

- **Inoculación**

Se colocó los chochos verdes esterilizados con hipoclorito de sodio (NaClO), al 0.5 % en tarrinas plásticas para posteriormente, con la ayuda de un rociador, inocular los microorganismos (bacterias, mohos, levaduras) en el chocho verde.

- **Comparación**

Se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas.

10.6 Manejo Específico del Experimento Fase de Laboratorio

10.6.1 Técnicas para propagación de microorganismos viables.

Cámaras húmedas. (Anexo 7)

Diluciones decimales. (Anexo 8)

10.6.2 Protocolos para identificación de microorganismos

Protocolo para identificación de hongos. (Anexo 9)

Protocolo para observación de levaduras. (Anexo 10)

Protocolo método de Tinción Gram en bacterias. (Anexo 11)

Protocolo para observación de Flagelos en bacterias. (Anexo 12)

10.6.3 Protocolo para obtención del inóculo (Anexo 13)

11.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

11.1 Signos de las enfermedades del chocho verde, en poscosecha.

No se pudo apreciar la presencia de microorganismos visibles a simple vista. Por lo que se procedió a realizar técnicas de aislamiento para cumplir con los objetivos establecidos como son las descripciones de los signos, caracterización de los patógenos y los postulados de Koch.

Las técnicas usadas para el aislamiento son:

Cámaras húmedas, en esta técnica solo se pudo apreciar la presencia de pudrición ocasionadas por bacterias saprofitas. Y debido a que solo se trabajó con el medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) para cultivo de las mismas, no se pudo apreciar con exactitud la morfología macroscópica de las colonias.

Disoluciones decimales, fue una técnica factible debido a que se pudo realizar un conteo de microorganismos en placa, para saber la incidencia de los mismos. Se utilizó medios de cultivo sólidos (MacConkey, Tryptone Soy Agar, Sabouraud Dextrose Agar) específicos para identificar bacterias, mohos y levaduras.

11.2 Caracterización de los agentes patógenos.

Mediante la observación y basado en sustento bibliográfico, se pudo determinar la presencia de mohos, levaduras y bacterias en el chocho verde desamargado.

11.2.1 Caracterización macro y microscópicas del moho.

Caracterización morfológica macroscópica del moho *Penicillium italicum*

- Las colonias del moho tuvieron un crecimiento efímero.
- Al principio tenían un color blanco y con el pasar del tiempo tomó una coloración azul, azul verdoso, verde, gris.
- Se pudo apreciar que los bordes tenían una pequeña banda de micelio blanco.
- En el reverso de la placa se pudo notar un amarillamiento cremoso.
- La textura presentada fue algodonosa con presencia de gotas de exudado.

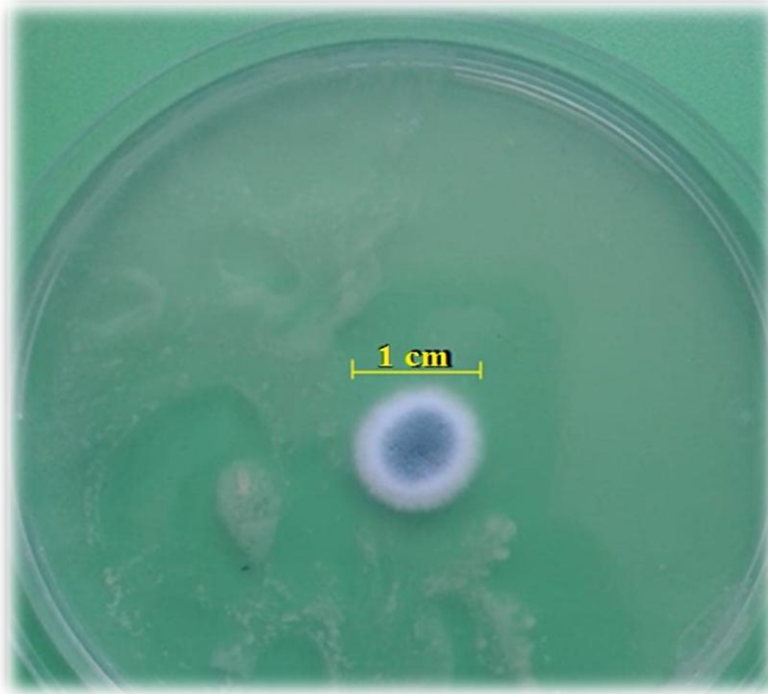


Imagen 13: Moho Azulado 2 días de incubación
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019



Imagen 14 : Moho Azulado a los 5 días de incubación.
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

Caracterización Microscópica del moho *Penicillium italicum*

- Hifas septadas
- Ramificación biverticilada
- Presencia de métula
- Presencia de fiálides
- Presencia de conidios o esporas.
- Forma de pincel o penacho.

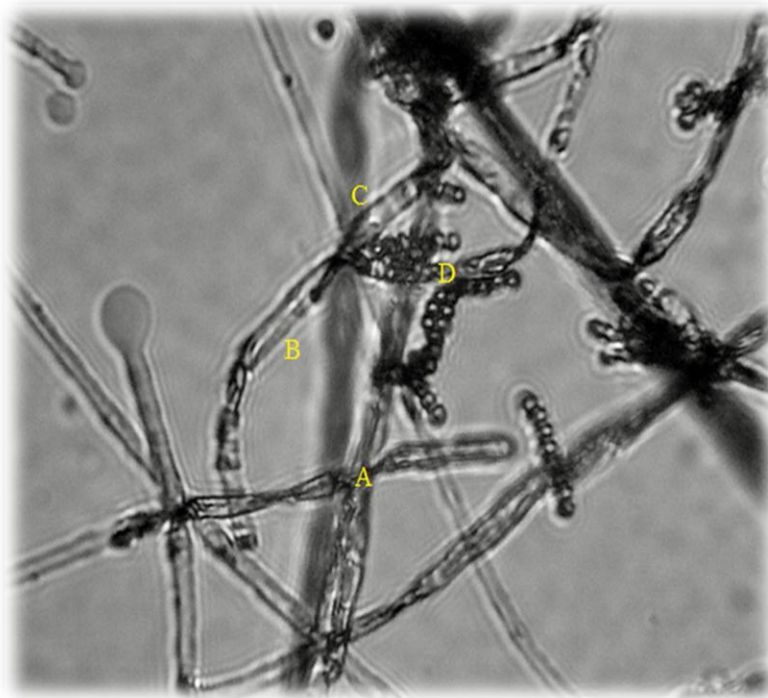


Imagen 15: *Penicillium Italicum* vista 100 X

A: Septos

B: Métula

C: Fiálides

D: conidios o esporas

Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

11.2.2 Caracterización macro y microscópicas de las levaduras.

Caracterización morfológica macroscópica de levadura

- La presencia de levaduras fue posible en gran parte al medio de cultivo Sabouraud Destroxe Agar, el cual permitió y favoreció la nutrición de las mismas. Las características que presenta este tipo de levaduras son las siguientes:
- Sus colonias presentan color anaranjado
- Forma de la colonia irregular.
- Consistencia de la colonia viscosa.



Imagen 16 : Levadura en placa
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

Caracterización Microscópica

- Para la observación en el microscopio se realizó el proceso de método de tinción para levaduras.
- En aumento de 100x en el microscopio.
- La forma que presentan estas levaduras en este caso son de tipo esférica.
- su reproducción es por gemación.



Imagen 17 : Levaduras 100 X
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

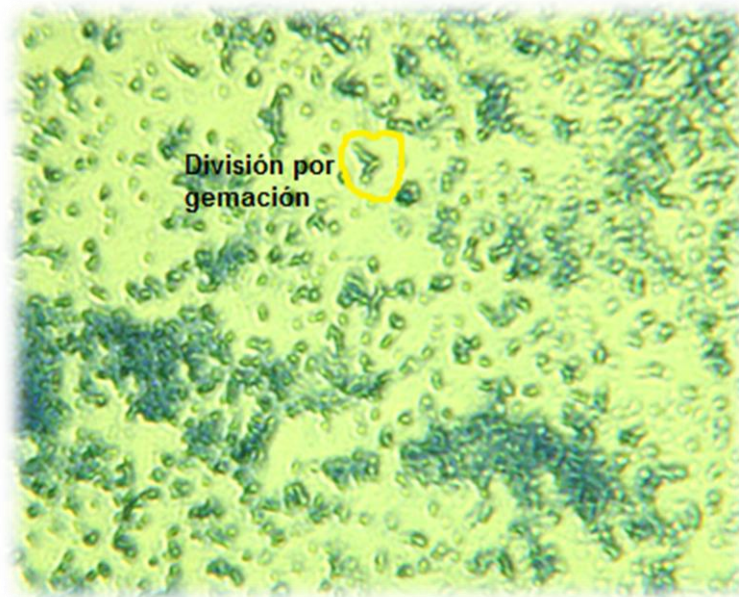


Imagen 18 : Levaduras 100 X
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

11.2.3 Caracterización macro y microscópicas de las bacterias.

Caracterización morfológica macroscópica de bacterias

- El tamaño de las colonias es de 1 milímetro (puntiformes) y de 4 milímetros (mediano).
- Las formas de las colonias son circulares con bordes enteros.
- La elevación o superficie de las colonias es convexa baja.
- La consistencia de las colonias es viscosa.
- Son de color beige algunas también presentan una tonalidad fucsia.

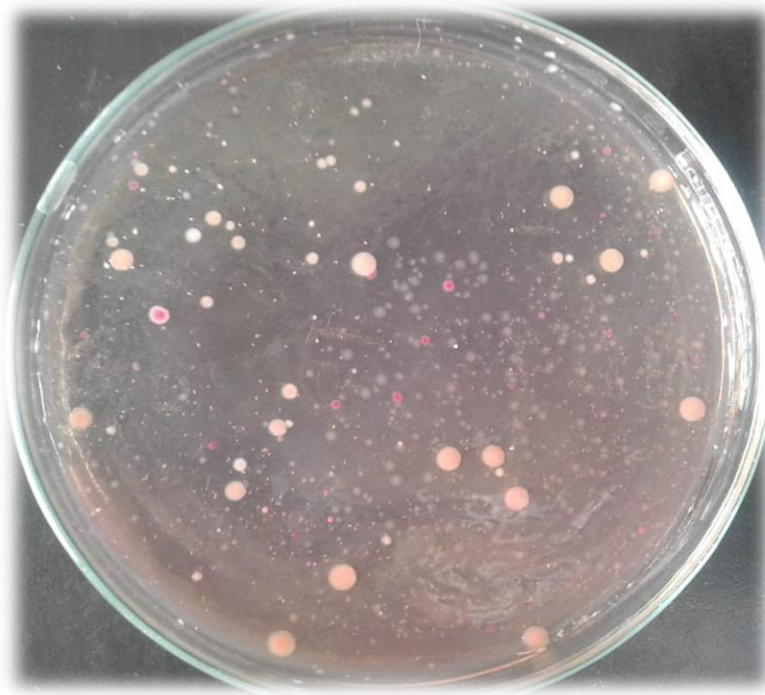


Imagen 19: Bacteria *Escherichia Coli* en placa

Elaborado por: Chanaluísa Luis, 2019

Caracterización Microscópica de bacterias

- Para la observación de bacterias en el microscopio se realizó el método de tinción de Gram, el cual permite ver su forma y su coloración para observar si son Gram positivas o Gram negativas. En este caso las bacterias son bacilos Gram negativos.
- Forma de bacilos
- Pigmentación que toman las bacterias (rosas)

- Gram negativas.

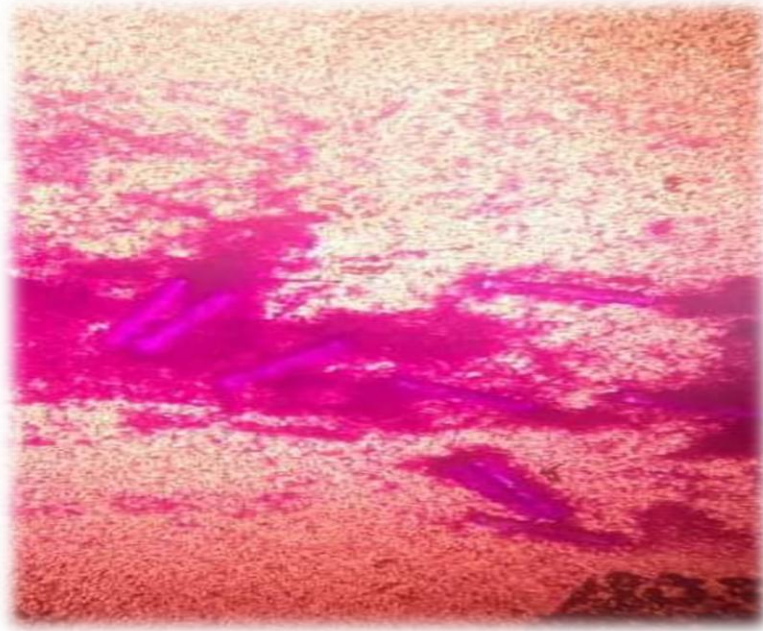


Imagen 20: Bacterias 100 X
A: Bacilos
B: Gram Negativos
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

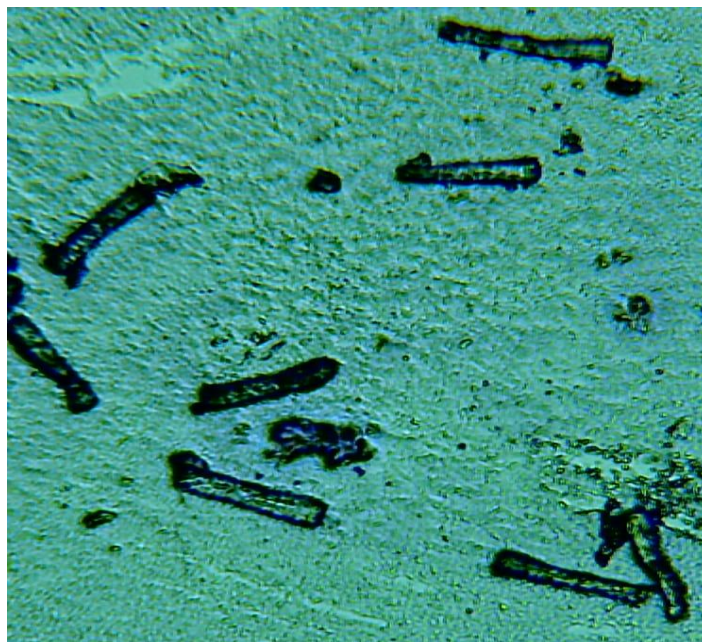


Imagen 21: Tinción para observación de flagelos

11.3 Comprobación mediante los postulados de Koch, de las enfermedades causadas por patógenos en chocho verde.

Para la comprobación de los agentes patógenos encontrados, primeramente, se realizó una asepsia de las tarrinas y del chocho verde, posteriormente se inoculó los chochos verdes con la ayuda de un rociador.

11.3.1 Resultado de inocular *Penicillium italicum*.

El moho empieza con la presencia de micelio blanco algodonoso, después de tres días empieza a tornarse de color azul. Se pudo apreciar la presencia del moho azul en todos los chochos colocados en la tarrina.



Imagen 22: Moho azul
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

11.3.2 Resultado de inocular Levaduras

En este caso los chochos comenzaron a emanar olores desagradables más fuertes que en el caso de los mohos. Se pudo apreciar una apariencia lechosa y mucosa alrededor de los chochos.



Imagen 23: Inoculación de levaduras
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

11.3.3 Resultado de inocular Bacterias

Los chochos más pequeños empezaron a secarse debido a la temperatura que esta bacteria requiere es decir a los 41° C. Se puede apreciar pequeños puntos de color rojo y rosado en la superficie de la cascara.



Imagen 24: Inoculación de la bacteria *Escherichia coli*
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

11.4. Fisiopatías del chocho verde, en poscosecha.

Las fisiopatías encontradas en el chocho verde son las siguientes:

- Textura: La cáscara empezó a arrugarse debido a la deshidratación y en algunos casos la cascara se tornó viscosa.
- Olor: A partir del tercer día el chocho empezó a emanar olores desagradables.
- Viscosidad: Hubo viscosidad en la cascara a partir del 5 día.
- Color: Cambió de coloración de tono verde claro a verde oscuro a los 5 días y negro a los 7 días.



Imagen 25 : chocho verde desamargado a los 3 días de almacenamiento
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019



Imagen 26: chocho verde desamargado a los 5 días de almacenamiento
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019



Imagen 27: chocho verde desamargado a los 7 días de almacenamiento
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

12. CONCLUSIONES

- Se pudo evidenciar la presencia de microorganismos como son: bacterias, mohos y levaduras (podredumbres). Específicamente se encontró la presencia de bacterias Gram negativas: del género *Escherichia* (*Escherichia coli*), moho azul del género (*Penicillium italicum*) y por último la presencia de levaduras.
- En textura hubo cambios en la cápsula protectora del chocho (arrugamiento), por la deshidratación. En cuanto al olor, se apreció olores desagradables a partir del tercer día. La coloración cambio al quinto día, de verde lima paso a un color verde oscuro, y al séptimo día a una tonalidad negra.

13. RECOMENDACIONES

- Poner énfasis en la esterilización en estudios de laboratorio. Para que no se desarrollen o contaminen las placas con enfermedades que no correspondan al objeto en estudio.
- Se recomienda desinfectar con (al 0,5 %) el chocho verde desamargado, dado que, con la desinfección se puede controlar: bacterias, mohos y levaduras.
- Para conservar el chocho, según el índice de cosecha aplicado; investigar en sistemas de almacenamiento por tres días (apto para el consumo humano) considerando temperatura, humedad y ventilación.

14. BIBLIOGRAFÍA

Barria Olivo, K. (2013). *Identificar una especie de hongo filamentoso Procedimiento*. Recuperado el 11 de enero de 2019, de [www.academia.edu](http://www.academia.edu/4213597/Identificaci%C3%B3n_de_HongosObjetivo_Identificar_una_especie_de_hongo_filamentoso_Procedimiento_Observaci%C3%B3n_macrosc%C3%B3pica_de_mohos_Determinar): https://www.academia.edu/4213597/Identificaci%C3%B3n_de_HongosObjetivo_Identificar_una_especie_de_hongo_filamentoso_Procedimiento_Observaci%C3%B3n_macrosc%C3%B3pica_de_mohos_Determinar

Britania. (2014). *www.britanialab.com*. Obtenido de Ficha tecnica del Agua Peptona: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/up1_5a280db392c81.pdf

Caicedo, C., & Peralta, E. (2001). *INIAP*. Obtenido de http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Plagas_enfermedades_chocho.pdf

Cárdenas. (2015). *www.dbbe.fcen.uba.ar*. Recuperado el 10 de Octubre de 2018, de Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Teo2Conceptos2018x4.pdf>

Carrillo, L. (2011). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. España: tecnicoagricola.

Cevallos, A. (2006). *módulo de Avalúos y Peritajes U.A. (CAREN), (recopilado)*. Ecuador: Primera edición.

Chamorro, D. (2015). *Caracterización de Poblaciones de Botrytis cinerea Resistentes a Fungicidas en rosas en la provincia de cotopaxi*. Recuperado el 16 de diciembre de 2019, de [metroflorcolombia](http://www.metroflorcolombia.com/rev/art/BOTRYTIS%20CINEREA%20BASES%20EPIDEMIOLOGICAS%20Y%20CONTROL%20(BAYER).pdf): [http://www.metroflorcolombia.com/rev/art/BOTRYTIS%20CINEREA%20BASES%20EPIDEMIOLOGICAS%20Y%20CONTROL%20\(BAYER\).pdf](http://www.metroflorcolombia.com/rev/art/BOTRYTIS%20CINEREA%20BASES%20EPIDEMIOLOGICAS%20Y%20CONTROL%20(BAYER).pdf)

Delgado Arce, R., & Pérez Iarza, G. (2014). Características biológicas del género, *Penicillium digitatum*, *P. italicum* Y *P. ulaiense* en poscosecha. Montevideo, Uruguay.

Dickinson, B. (2014). *Neogen*. Recuperado el 10 de diciembre de 2018, de Instrucciones de uso- Medios de cultivo en placa listos : <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>

Fernández Olmos, A., García, C., Saéz Nieto, J., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. España: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.

Fuentes Castillo, C. (2007). *LOS POSTULADOS DE KOCH: REVISIÓN HISTÓRICA Y PERSPECTIVA*. Obtenido de Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM: <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/RCCV0707230262A/22655>

García Bona, L. M. (2013). *Microbiología*. Recuperado el 26 de diciembre de 2018, de Identificación de Hongos:

http://www.academia.edu/4213597/Identificaci%C3%B3n_de_HongosObjetivo_Identificar_una_especie_de_hongo_filamentoso_Procedimiento_Observaci%C3%B3n_macrosco%C3%B3pica_de_mohos_Determinar

Granada. (2007). *Medios de cultivo para hongos*. Bogota: <http://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>.

Ibérica. (Noviembre de 2015). *Principales Daños y Enfermedades en el proceso de poscosecha*. Obtenido de <https://www.deccoiberica.es/principales-danos-enfermedades-en-postcosecha/>

Infoagro. (2007). *Fisiopatías y enfermedades del frijol*. Obtenido de http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_judia_habichuela_o_frijol_parte_ii_.asp

Koneman. (2008). *Diagnostico microbiológico*. España: texto y atlas, panamericana, 6ed.

Loja Illescas , N., & Orellana Romero, S. (2010). *Repositorio Institucional de la universidad de Cuenca*. Obtenido de [dspace.ucuenca.edu.ec: http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1569/1/tgas32.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1569/1/tgas32.pdf)

Loja, N., & Orellana, S. (2011). Aporte nutricional, procesamiento y almacenamiento del chocho. *Propuesta gastronomica de aplicación innovadora del chocho*. Ecuador.

Medina, Y. (2007). *fao.org*. Obtenido de *Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control.*: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>

Nordeste, U. N. (2006). *Estudio cuantitativo de bacterias*. Obtenido de *Microbiología General- Carrera Farmacia* : <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>

Olmos Fernández, A. (2010). *Procedimientos de microbiología clínica. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Alicante, España: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.

Pavón Moreno, M., & González Alonso, I. (2012). *Importancia del género Alternaria como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades*. Madrid, España.

Rivera. C, G. (2007). *Conceptos introductorios a la fitopatología*. San José de Costa. En R. C. G., *Conceptos introductorios a la fitopatología*. San José de Costa.

Rocabado, D. (2011). *Morfología de los hongos*. Recuperado el 03 de noviembre de 2018, de *researchgate.net*: https://www.researchgate.net/publication/324015186_Los_Hongos

Soria, F. (octubre de 2009). *Difco*. Recuperado el 30 de enero de 2019, de tryptone soy broth y tryptone soy agar: http://f-soria.es/Inform_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/TUBOS%20DIFCO/FT%20TRYP TONE%20SOY%20BROTH.pdf

Trejo, E. (2014). *Manejo postcosecha y prevención de pérdidas de alimento Universidad Tecnológica Del Valle Del Mezquital*. Recuperado el 14 de noviembre de 2018, de www.milenio.com: <http://opinion/varios-autores/universidad-tecnologica-del-valle-del-mezquital/manejo-postcosecha-y-prevencion-de-perdidas-de-alimentos>

Vanderzant, C., & Splittstoesser, D. (2007). *Agar Papa Dextrosa*. Recuperado el 01 de febrero de 2019, de https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf

Vázquez, S., Selva, F., & Neill, O. (2013). *Micro de los Alimentos*. Obtenido de <http://mikroalimentos.blogspot.com/2008/10/coliformes-totales-y-fecales.html>

15. ANEXOS

HOJA DE VIDA




DATOS PERSONALES									
NACIONALIDAD	CÉDULA	PASAPORTE	AÑOS DE RESIDENCIA	NOMBRES	APELLIDOS	FECHA DE NACIMIENTO	LIBRETA MILITAR	ESTADO CIVIL	
ECUATORIANA	1802267037	1802267037		GIOVANA PAULINA	PARRA GALLARDO	28/07/1969		DIVORCIADA	
DISCAPACIDAD	N° CARNÉ CONADIS	TIPO DE DISCAPACIDAD	MODALIDAD DE INGRESO	FECHA DEL PRIMER INGRESO AL SECTOR PÚBLICO	FECHA DE INGRESO A LA INSTITUCIÓN	FECHA DE INGRESO AL PUESTO	GENERO	TIPO DE SANGRE	
						01.04/1998	FEMENINO		
TELÉFONOS			DIRECCIÓN DOMICILIARIA PERMANENTE						
TELÉFONO DOMICILIO	TELÉFONO CELULAR	CALLE PRINCIPAL	CALLE SECUNDARIA	N°	REFERENCIA	PROVINCIA	CANTÓN	PARROQUIA	
032588381	0958964433	Pasaje Carlos Toro	Ricardo Flores	s/n	TRAS LA PUCESA	TUNGURAHUA	AMBATO	HUACHI CHICO	
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL				AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA					
TELÉFONO DEL TRABAJO	EXTENSIÓN	CORREO ELECTRÓNICO INSTITUCIONAL	CORREO ELECTRÓNICO PERSONAL	AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA	ESPECIFIQUE NACIONALIDAD INDÍGENA	ESPECIFIQUE SI SELECCIONÓ OTRA			
32252346		giovana.parra@utc.edu.ec	giovana.parra@utc.edu.ec	MESTIZO					
FORMACIÓN ACADÉMICA									
NIVEL DE INSTRUCCIÓN	No. DE REGISTRO (SENECYT)	INSTITUCIÓN EDUCATIVA	TÍTULO OBTENIDO	EGRESADO	AREA DE CONOCIMIENTO	PERIODOS APROBADOS	TIPO DE PERIODO	PAIS	
TERCER NIVEL		UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO	INGENIERA AGRÓNOMA		AGRICULTURA SILVICULTURA Y PESCA	10	SEMESTRES	ECUADOR	
4TO NIVEL - MAESTRÍA		UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO	MAGISTER EN GERENCIA DE EMPRESAS AGRÍCOLAS Y MANEJO DE POSCOSECHA		AGRICULTURA	4	SEMESTRES	ECUADOR	
4TO NIVEL - DIPLOMADO		PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE AMBATO	DIPLOMADO EN TECNOLOGÍAS PARA LA GESTIÓN Y PRÁCTICA DOCENTE.		EDUCACIÓN	2	SEMESTRES	ECUADOR	
4TO NIVEL - DIPLOMADO		PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE AMBATO	MAESTRÍA EN TECNOLOGÍAS PARA LA GESTIÓN Y PRÁCTICA DOCENTE (EGRESADA)		EDUCACIÓN	4	SEMESTRES	ECUADOR	
TRAYECTORIA LABORAL RELACIONADA									
NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN / ORGANIZACIÓN	UNIDAD ADMINISTRATIVA (DEPARTAMENTO / ÁREA /DIRECCIÓN)	DENOMINACIÓN DEL PUESTO	TIPO DE INSTITUCIÓN	FECHA DE INGRESO	FECHA DE SALIDA	FECHA DE RE INGRESO	MOTIVO DE SALIDA		
UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI	FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES	DOCENTE	PÚBLICA OTRA	01/03/1998	CONTÍNUA				
_____ Firma									

Anexo 2: Curriculum Vitae del primer lector

 Universidad Técnica de Cotopaxi				Unidad de Administración de Talento Humano				 SIITH Sistema Informático Integrado de Talento Humano	
FICHA SIITH									
									
DATOS PERSONALES									
NACIONALIDAD	CÉDULA	PASAPORTE	AÑOS DE RESIDENCIA	NOMBRES	APELLIDOS	FECHA DE NACIMIENTO	LIBRETA MILITAR	ESTADO CIVIL	
ECUATORIANO	1801902907			GUADALUPE DE LAS MERCEDES	LOPEZ CASTILLO	01/01/1964		DIVORCIADA	
TELÉFONOS				DIRECCIÓN DOMICILIARIA PERMANENTE					
TELÉFONO DOMICILIO	TELÉFONO CELULAR	CALLE PRINCIPAL	CALLE SECUNDARIA	N°	REFERENCIA	PROVINCIA	CANTÓN	PARROQUIA	
32808431	0984519333	PRIMERO DE ABRIL	ROOSEVELT	S/N	INGRESO A BETHEMITAS	COTOPAXI	LATACUNGA	IGNACIO FLORES	
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL				AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA					
TELÉFONO DEL TRABAJO	EXTENSIÓN	CORREO ELECTRÓNICO INSTITUCIONAL	CORREO ELECTRÓNICO PERSONAL	AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA	ESPECIFIQUE NACIONALIDAD INDÍGENA	ESPECIFIQUE SI SELECCIONÓ OTRA			
32266164		guadalupe.lopez@utc.edu.ec	gualomercedeslopez@hotmail.com	MESTIZO					
FORMACIÓN ACADÉMICA									
NIVEL DE INSTRUCCIÓN	No. DE REGISTRO (SENESCYT)	INSTITUCIÓN EDUCATIVA	TÍTULO OBTENIDO	EGRESADO	ÁREA DE CONOCIMIENTO	PERIODOS APROBADOS	TIPO DE PERIODO	PAÍS	
TERCER NIVEL		UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO	INGENIERO AGRÓNOMO		AGRICULTURA		OTROS	ECUADOR	
4TO NIVEL - MAESTRIA		UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI	MAGISTER EN GESTIÓN DE LA PRODUCCIÓN				OTROS	ECUADOR	

FIRMA

Anexo 3: Curriculum Vitae del segundo lector

FICHA SIITH								
								
DATOS PERSONALES								
NACIONALIDAD	CÉDULA	PASAPORTE	AÑOS DE RESIDENCIA	NOMBRES	APELLIDOS	FECHA DE NACIMIENTO	LIBRETA MILITAR	ESTADO CIVIL
Ecuatoriana	1709561102		llene si extranjero	Klever Mauricio	Quimbiulco Sanchez	17/08/1968		casado
				01/04/2017	12/04/2017	12/04/2017	masculino	OrH+
TELÉFONOS		DIRECCIÓN DOMICILIARIA PERMANENTE						
TELÉFONO DOMICILIO	TELÉFONO CELULAR	CALLE PRINCIPAL	CALLE SECUNDARIA	N°	REFERENCIA	PROVINCIA	CANTÓN	PARROQUIA
22787077	987294064	Sucre	Atahualpa	S 204	San Vicente	Pichincha	Quito	Alanagasi
FORMACIÓN ACADÉMICA								
NIVEL DE INSTRUCCIÓN	No. DE REGISTRO (SENESCYT)	INSTITUCIÓN EDUCATIVA	TÍTULO OBTENIDO	EGRESADO	AREA DE CONOCIMIENTO	PERIODOS APROBADOS	TIPO DE PERIODO	PAIS
4TO NIVEL - MAESTRÍA	1079-15-86066432	ESPE	Master en Agricultura Sostenible	<input type="checkbox"/>	Agricultura			Ecuador
EVENTOS DE CAPACITACIÓN								
TIPO	NOMBRE DEL EVENTO (TEMA)	EMPRESA / INSTITUCIÓN QUE ORGANIZA EL EVENTO	DURACIÓN HORAS	TIPO DE CERTIFICADO	FECHA DE INICIO	FECHA DE FIN	PAÍS	
CURSO	Marketing Institucional	ESPE	19	APROBACIÓN	22-nov-06	22-nov-06	Ecuador	
PROGRAMA	Entrenamiento en manejo de empresas Lecheras	Verhoef Dairy	240	APROBACIÓN	01/03/2007	30/03/2007	Canada	
PASANTÍA	Manejo de granjas modelo	Polar Genetics INC	120	APROBACIÓN	01/05/2007	15/05/2007	Canada	
PROGRAMA	Manejo de Fertilizantes Agroecologicos	Universidad del Sur de China	360	APROBACIÓN	03/06/2009	14/07/2009	China	
PROGRAMA	Tecnologias de Agroecologia Permacultura	Universidad Nacional de Loja	20	APROBACIÓN	09/12/2011	11/12/2011	Ecuador	

FIRMA

Anexo 4: Curriculum Vitae del tercer lector

DATOS PERSONALES								
NACIONALIDAD	CÉDULA	PASAPORTE	AÑOS DE RESIDENCIA	NOMBRES	APELLIDOS	FECHA DE NACIMIENTO	LIBRETA MILITAR	ESTADO CIVIL
ECUATORIANO	0500494117		llene si es extranjero	SEGUNDO JOSE	ZAMBRANO SARABIA	28/08/1950		divorciado
			NOMBRIAMIENTO		07/04/1997		MASCULINO	ORH+
TELÉFONOS			DIRECCIÓN DOMICILIARIA PERMANENTE					
TELÉFONO DOMICILIO	TELÉFONO O CELULAR	CALLE PRINCIPAL	CALLE SECUNDARIA	Nº	REFERENCIA	PROVINCIA	CANTÓN	PARROQUIA
32266193	995488434	Vía a la Merced		s/n	Refugio Puthzalagua	Cotopaxi	Latacunga	Belisario Quevedo
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL				AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA				
TELÉFONO DEL TRABAJO	EXTENSIÓN	CORREO ELECTRÓNICO INSTITUCIONAL	CORREO ELECTRÓNICO PERSONAL	AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA	ESPECIFIQUE NACIONALIDAD INDÍGENA	ESPECIFIQUE SI SELECCIONA OTRA		
32810296		segundo.zambrano@utc.edu.ec	sarabiautc@hotmail.com	Mestizo				
FORMACIÓN ACADÉMICA								
NIVEL DE INSTRUCCIÓN	No. DE REGISTRO (SENECYT)	INSTITUCIÓN EDUCATIVA	TÍTULO OBTENIDO	EGRESADO	ÁREA DE CONOCIMIENTO	PERIODOS APROBADOS	TIPO DE PERIODO	PAÍS
TERCER NIVEL	1005-04-475016	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR	INGENIERO AGRÓNOMO	<input type="checkbox"/>				Ecuador
4TO NIVEL - ESPECIALIDAD	1020-07-668512	UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTO	MAGISTER PRODUCCIÓN	<input type="checkbox"/>				Ecuador
4TO NIVEL - DIPLOMADO	1020-10-714013	UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI	DIDÁCTICA DE EDUCACIÓN SUPERIOR	<input type="checkbox"/>				Ecuador
TRAYECTORIA LABORAL RELACIONADA AL PUESTO								
NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN / ORGANIZACIÓN	UNIDAD ADMINISTRATIVA (DEPARTAMENTO / ÁREA / DIRECCIÓN)	DENOMINACIÓN DEL PUESTO	TIPO DE INSTITUCIÓN	FECHA DE INGRESO	FECHA DE SALIDA	FECHA DE REINGRESO	MOTIVO DE SALIDA	
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI	UNIDAD CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES	DOCENTE	PÚBLICA OTRA	01/08/1997	01-04-2010	RESTITUCIÓN	POR REMOCIÓN	
MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA	TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA PROGRAMACIÓN Y SANIDAD AGROPECUARIA	INGENIERO AGRÓNOMO	PÚBLICA OTRA	01-05-1976	01/08/2008		SUPRESIÓN DEL PUESTO	
ACTIVIDADES ESCENCIALES								

FIRMA

Anexo 5: Curriculum Vitae del autor

FICH SIHT								
								
DATOS PERSONALES								
NACIONALIDAD	CÉDULA	PASAPORTE	AÑOS DE RESIDENCIA	NOMBRES	APELLIDOS	FECHA DE NACIMIENTO	LIBRETA MILITAR	ESTADO CIVIL
ECUATORIANO	050334951-6			CHANALUISA	LUIS ERNESTO	14/05/1993		SOLTERO
TELÉFONOS		DIRECCIÓN DOMICILIARIA PERMANENTE						
TELÉFONO DOMICILIO	TELÉFONO CELULAR	CALLE PRINCIPAL	CALLE SECUNDARIA	N°	REFERENCIA	PROVINCIA	CANTÓN	PARROQUIA
	0998720257	IMBABURA			BARRIO MOLLEPAMBA	COTOPAXI	SAQUISILI	
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL				AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA				
TELÉFONO DEL TRABAJO	EXTENSIÓN	CORREO ELECTRÓNICO INSTITUCIONAL	CORREO ELECTRÓNICO PERSONAL	AUTOIDENTIFICACIÓN ÉTNICA	ESPECIFIQUE NACIONALIDAD INDÍGENA		ESPECIFIQUE SI SELECCIONÓ OTRA	
		luis.chanaluisa6@utc.edu.ec	neto_2d@outlook.com	MESTIZO				
FORMACIÓN ACADÉMICA								
NIVEL DE INSTRUCCIÓN	No. DE REGISTRO (SENESCYT)	INSTITUCIÓN EDUCATIVA	TÍTULO OBTENIDO	EGRESADO	ÁREA DE CONOCIMIENTO	PERIODOS APROBADOS	TIPO DE PERIODO	PAÍS
SEGUNDO NIVEL		INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR "VICENTE LEÓN"	BACHILLER		QUÍMICO BIOLÓGICAS	6	AÑOS	ECUADOR
TERCER NIVEL		UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI	INGENIERO AGRÓNOMO		AGRICULTURA	10	SEMESTRES	ECUADOR
TRAYECTORIA LABORAL RELACIONADA AL PUESTO								
<p>_____</p> <p>Firma</p>								

Anexo 6: Fase de desamargo del chocho verde



Almacenamiento en tarrinas (poscosecha)

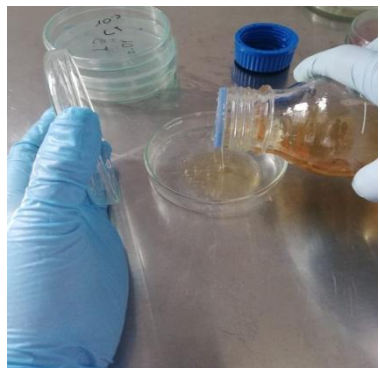


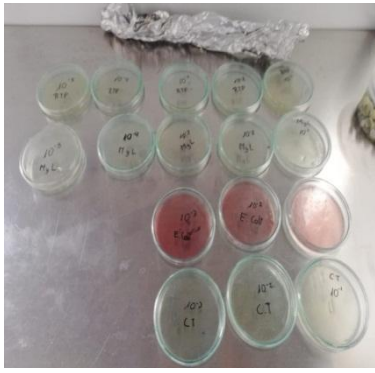
Anexo 7: Camaras numedias



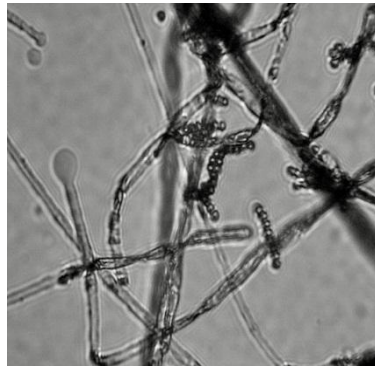


Anexo 8: Disoluciones Decimales

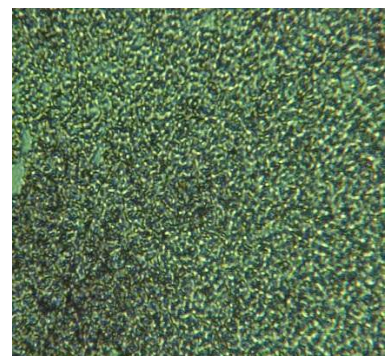




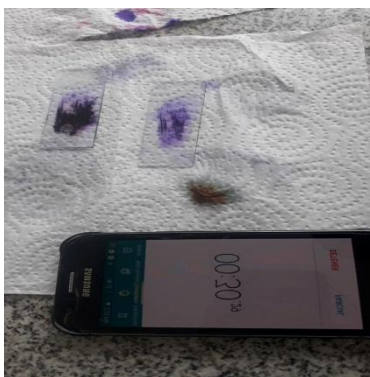
Anexo 9: Identificación de hongos



Anexo 10: Identificación de levaduras.



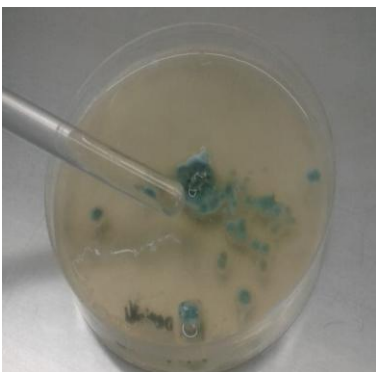
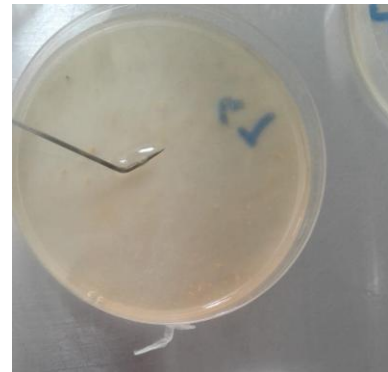
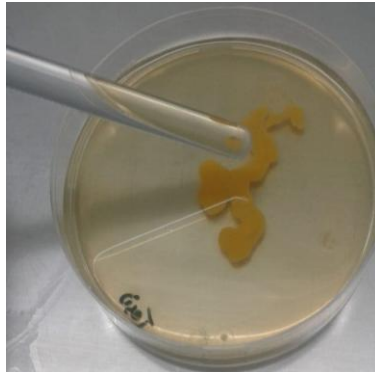
Anexo 11: Tinción Gram en bacterias.



Anexo 12: Tinción para observación de flagelos



Anexo 13: Obtención y aplicación del inoculo



Aplicación del inoculo en el chocho verde desamargado.



Tabla 1: Recuento de placas

Recuento de unidades formadoras de colonias a los dos y cinco días de incubación del chocho Verde des amargado en poscosecha a (5° C).

RECuento DE MUESTRAS A LOS 2 DIAS					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Recuento total en placa	R. Incontable	R. Incontable	315×10^3 ufc/g	115×10^4 ufc/g	No se presenta
mohos	R. Incontable	R. Incontable	215×10^3 ufc/g	No se puede diferenciar	No se presenta
levaduras	R. Incontable	R. Incontable	310×10^3 ufc/g	No se puede diferenciar	No se presenta
coliformes totales	R. Incontable	R. Incontable	111×10^3 ufc/g	-----	-----
<i>Escherichia Coli</i>	R. Incontable	R. Incontable	56×10^3 ufc/g	-----	-----

RECuento DE MUESTRAS A LOS 5 DIAS					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Recuento total en placa	R. Incontable	R. Incontable	315×10^3 ufc/g	115×10^4 ufc/g	6×10^5 ufc/g
mohos	R. Incontable	R. Incontable	215×10^3 ufc/g	40×10^4 ufc/g	4×10^5 ufc/g
levaduras	R. Incontable	R. Incontable	310×10^3 ufc/g	30×10^4 ufc/g	No se presenta
coliformes totales	R. Incontable	R. Incontable	111×10^3 ufc/g	-----	-----
<i>Escherichia Coli</i>	R. Incontable	R. Incontable	56×10^3 ufc/g	-----	-----

Tabla 2: Recuento de placas

Recuento de unidades formadoras de colonias a los dos y cinco días de incubación del chocho tierno des amargado en poscosecha a (18°C).

RECuento DE MUESTRAS A LOS 2 DIAS					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Recuento total en placa	R. Incontable	R. Incontable	406 x 10 ³ ufc/g	161 x 10 ⁴ ufc/g	10 x 10 ⁵ ufc/g
mohos	R. Incontable	R. Incontable	360 x 10 ³ ufc/g	68 x 10 ⁴ ufc/g	7 x 10 ⁵ ufc/g
levaduras	R. Incontable	R. Incontable	411 x 10 ³ ufc/g	80 x 10 ⁴ ufc/g	12 x 10 ⁵ ufc/g
coliformes totales	R. Incontable	R. Incontable	173 x 10 ³ ufc/g	----- -	----- -
<i>Escherichia Coli</i>	R. Incontable	R. Incontable	87 x 10 ³ ufc/g	----- -	----- -

RECuento DE MUESTRAS A LOS 5 DIAS					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Recuento total en placa	R. Incontable	R. Incontable	406 x 10 ³ ufc/g	161 x 10 ⁴ ufc/g	10 x 10 ⁵ ufc/g
mohos	R. Incontable	R. Incontable	360 x 10 ³ ufc/g	68 x 10 ⁴ ufc/g	7 x 10 ⁵ ufc/g
levaduras	R. Incontable	R. Incontable	411 x 10 ³ ufc/g	80 x 10 ⁴ ufc/g	12 x 10 ⁵ ufc/g
coliformes totales	R. Incontable	R. Incontable	173 x 10 ³ ufc/g	----- -	----- -
<i>Escherichia Coli</i>	R. Incontable	R. Incontable	87 x 10 ³ ufc/g	----- -	----- -

Anexo 7: Protocolo de la elaboración de cámaras húmedas

Equipos

- Cámara de flujo Laminar
- Incubadora

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Alcohol
- Agua destilada
- Material vegetal
- Cajas Petri
- Para film
- Marcador permanente
- Papel Filtro
- Parafilm

Procedimiento

- Realizar la limpieza de la cámara de flujo laminar para realizar la práctica.
- Cortar papel filtro a la medida para las cajas Petri.
- Colocar el papel filtro dentro de las Cajas Petri.
- Chorrear un poco de agua destilada en el papel filtro.
- Colocar los chochos des amargados en la caja Petri.
- Sellar las cajas Petri con el parafilm y con un marcador poner fecha al reverso de la muestra.
- Llevar las muestras a la incubadora durante 2 días a una temperatura de 25° C.

Anexo 8: Protocolo para la Preparación de las diluciones decimales

Equipos

- Microscopio
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora o cámara de crecimiento
- Cuenta colonias

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Pipetas estériles
- Goma para pipeta
- Erlenmeyer 250 ml
- Cajas Petri
- Porta objetos
- Cubre objetos.

Reactivos

- Agua destilada
- Agua peptona

Medios de Cultivo

- Agar MacConkey
- Triptone Soy Agar
- Sabouraud Destroxe Agar

Procedimiento

- Para la obtención de los microorganismos se procedió a triturar 10g de muestra de chocho verde en el mortero de porcelana, para posteriormente colocar la muestra en 90 ml de agua peptonada esterilizada y obtener una dilución primaria 10^{-1} .

- Transferir 0.1 ml de la dilución primaria en tubos de ensayo para obtener una dilución de 10^{-2} de igual manera se realiza el mismo proceso para la obtención de 10^{-3} y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^{-5} .
- Homogenizar cuidadosamente cada nueva dilución.
- Utilizar pipetas diferentes para cada dilución.
- El volumen transferido a la caja Petri debe ser el 10% de la capacidad total de la pipeta. Es decir 0.1 ml para cada dilución.
- Incubar a temperaturas adecuadas para cada microorganismo: Bacterias (37°C a 41°) mohos y levaduras (24° a 26°C)

Anexo 9: Protocolo para identificación de hongos

Equipos

- Microscopio

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Cinta adhesiva transparente
- Cajas Petri con mohos
- Porta objetos
- Cubre objetos.

Reactivos

- Lugol

Procedimiento 1

- Con una cinta adhesiva transparente extraer con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del moho.

- Colocar la cinta con moho sobre el porta objeto.
- Colocar en el microscopio y observar.

Procedimiento 2

- Con la ayuda de una aguja extraer una pequeña porción de la colonia de moho.
- Depositar la muestra en la cinta adhesiva transparente.
- Colocar la cinta con la muestra en el porta objeto.
- Visualizar en el microscopio.

Anexo 10: Protocolo para observación de levaduras.

Equipos

- Microscopio

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Aguja de disección
- Cajas Petri con levaduras
- Porta objetos
- Cubre objetos.

Reactivos

- Azul de metileno.
- Agua destilada

Procedimiento

- Colocar una gota de levadura en el porta objeto.
- Poner una gota de agua destilada en la muestra.
- Con la ayuda de la pinza estéril remover hasta homogenizar.
- Colocar una gota de azul de metileno durante 10 minutos.

- Colocar el cubre objetos con una inclinación de 45°
- Secar con papel absorbente lo que sobresale de la muestra.
- Colocar en el microscopio y observar.

Anexo 11: Protocolo de método de Tinción de GRAM

Equipo

- Microscopio

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Aguja de disección
- Cajas Petri con bacterias
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Mechero de alcohol

Reactivos

- Violeta
- Lugol
- Agua destilada
- Safranina

Procedimiento

- Colocar una gota de bacteria en el porta objetos (frotis)
- Secar a flama con la ayuda del mechero, esto sirve para detener el metabolismo celular de las bacterias.
- Aplicar violeta durante 1 minuto.
- Lavar con agua destilada.
- Aplicar lugol durante 1 minuto.
- Decolorar con alcohol.

- Lavar con agua destilada.
- Aplicar safranina durante 2 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Secar con papel.
- Por ultimo colocar el cubre objetos y observar.

Anexo 12: Protocolo para observación de Flagelos en bacterias.

Equipos

- Microscopio

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Aguja de disección
- Cajas Petri con bacterias
- Porta objetos
- Cubre objetos.

Reactivos

- Violeta
- Lugol

Procedimiento

- Colocar una gota de bacteria en el porta objetos (frotis)
- Secar al aire.
- Aplicar lugol durante 5 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Aplicar violeta durante 2 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Secar al aire.
- Por ultimo colocar el cubre objetos y observar

Anexo 13: Protocolo de elaboración de Inóculos.

Equipo

- Refrigeradora
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Balanza

Materiales

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- varilla de vidrio
- 3 Cajas Petri con el patógeno
- 30 gr almidón de yuca
- 30 gr sacarosa
- 3 frascos de plástico de 1 litro.

Reactivos

- 1000 ml Agua estilada estéril

Procedimiento

- Tener un litro de agua destilada esterilizada
- Colocar 10 ml de agua destilada esterilizada en la caja Petri
- Con la ayuda de una varilla de vidrio remover la muestra hasta homogeneizar.

- En un recipiente pesar 30gr de almidón de yuca,30 gr de sacarosa.
- Colocar la solución de almidón de yuca y sacarosa en el autoclave por 25 minutos.
- Extraer de las cajas Petri el líquido homogeneizado, para posteriormente colocar en los frascos de plástico con disolución (agua destilada esterilizada almidón de yuca y la sacarosa)
- Conservar el inóculo en una refrigeradora.

Anexo 14: Presupuesto

1. MATERIALES DE CAMPO	CANTIDAD	UNIDAD	VALOR UNITARIO \$	VALOR TOTAL \$
Pirola en rollo	1	Unidad	1,50	1,50
Estacas	10	Unidad	1	10

Flexómetro	1	m	1	15
Libro de campo	1	Unidad	1,75	1,75
Lápiz	4	Unidad	0,30	1,20
Borrador	2	Unidad	0,20	0,40
SUBTOTAL:				29,85
2. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO				
Mandil	1	Unidad	15	15
Cofia	1	Unidad	1	1
Guantes quirúrgicos	10	Unidad	0,80	8
Cuenta colonias	1	ufc	1,200	1,200
Balanza analítica científica	1	g	1,700	1,700
Estufa	1	°C	3,800	3,800
Cámara de flujo laminar	1	Unidad	7,500	7,500
Pipetas	6	ml	4,20	25,20
Cajas Petri	20	Unidad	2,50	50,00
Pera de succión	1	Unidad	8	8
Microscopio	1	um	2,500	2,500
Autoclave	1	Unidad	4,100	4,100
Incubadora / Cámara de crecimiento	1	Unidad	3,160	3,160
Erlenmeyer 250 ml	1	100 ml	6,50	6,50
Frascos de vidrio 250 ml	3	500 ml	4,90	14,70
Mortero de porcelana	1	Unidad	5,10	5,10
Tubos de ensayo	10	10 ml	0,27	2,70
Porta objetos y Cubre objetos.	20	Unidad	0,25	5

SUBTOTAL				23,983
3. RECURSOS TECNOLÓGICOS				
Cámara fotográfica	1	MP	100	100
SUBTOTAL:				100
4. SERVICIOS				
Internet	10	Mes	300	300
Copiadora	250	Copias	0,5	12,50
Imprenta (Empastados y anillados)	8	Empastados y anillados	7	56
SUBTOTAL				372,50
5. MOVILIZACION Y ALIMENTACION				
Transporte	365	Días	2	730
Alimentación	365	Días	2,25	821,25
SUBTOTAL:				1551,25