

# 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**

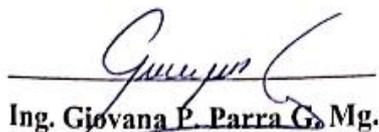
## AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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 Unaucho 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

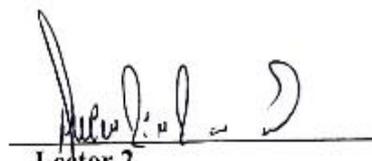
Para constancia firman:



Lector 1

**Ing. Mg. Guadalupe López**

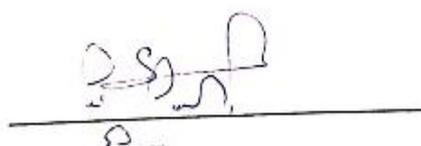
**CC: 180190290-7**



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 Chanaluisa***

## **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 presenció: 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



CENTRO  
DE IDIOMAS

## 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<br>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 <sub>2</sub>        | 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

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

## ÍNDICE DE IMÁGENES

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

## INDICE DE ANEXOS

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

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1:</b> Recuento de placas _____ | 65 |
| <b>Tabla 2:</b> 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 utilizó 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

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

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

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

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

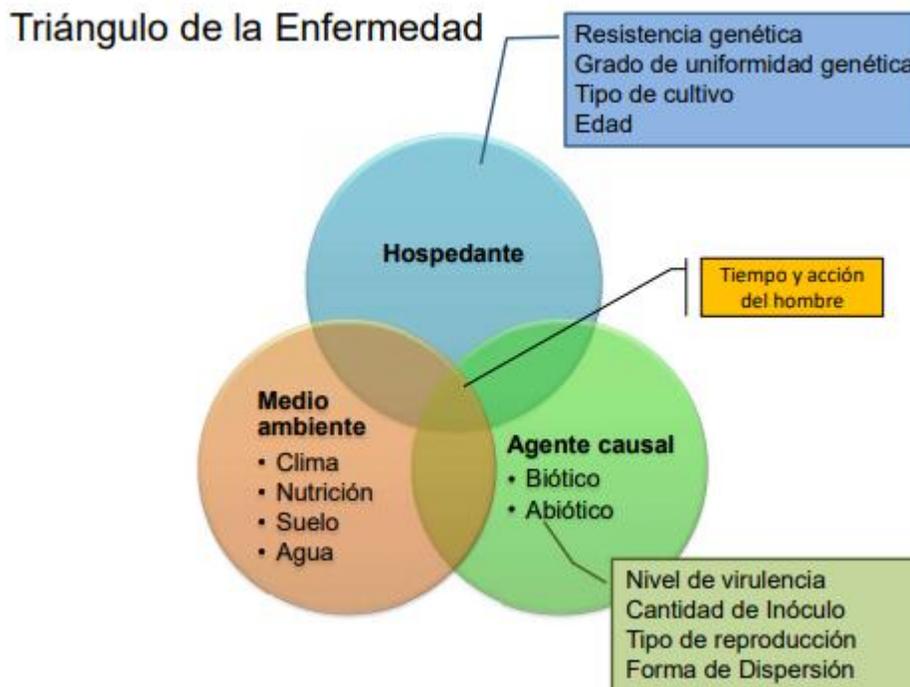
## 8 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

### 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 (miceliares 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 CO<sub>2</sub> 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)

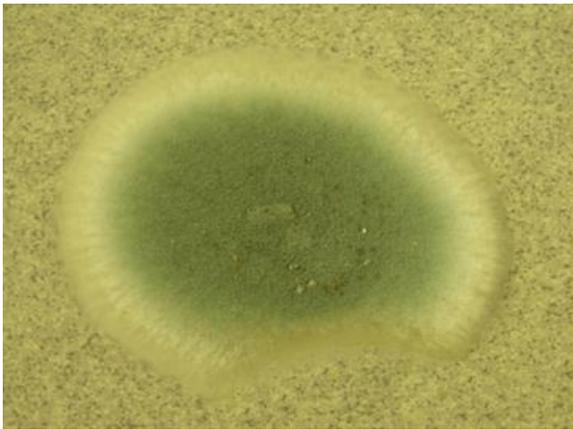
##### **8.4.1 *Penicillium* sp.**

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)



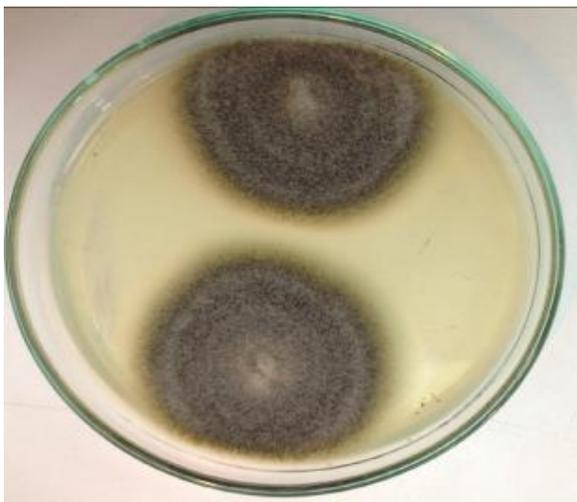
**Imagen 3:** Moho azul  
Fuente: Alexander Dávila 2009



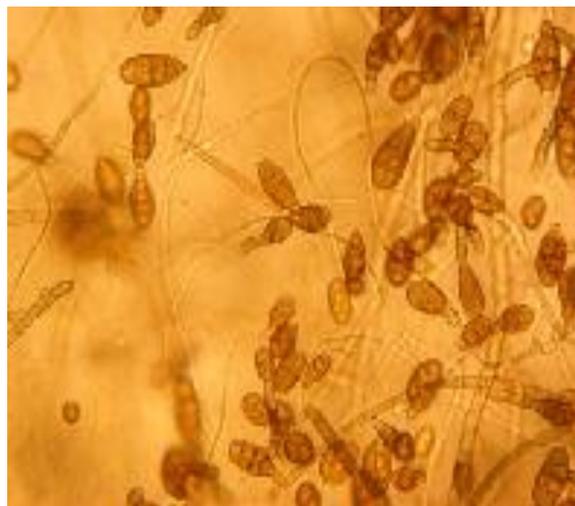
**Imagen 4:** vista microscópica  
Fuente: Fernando Huerta 2014

#### 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



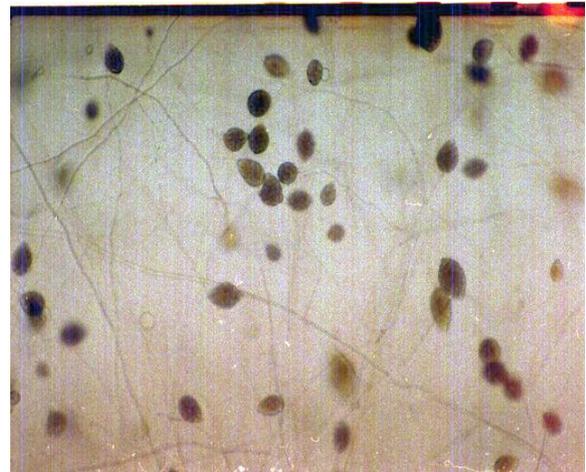
**Imagen 8:** vista microscópica  
Fuente: María López

#### 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**

| <b>Formula (en gramos por litro)</b> |      |
|--------------------------------------|------|
| 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.<sup>7</sup> El Agar Papa Dextrosa (PDA) puede ser usado para el cultivo de levaduras y mohos clínicamente significativos. <sup>8</sup> 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**

| <b>Fórmula</b>                       | <b>Litro</b> |
|--------------------------------------|--------------|
| 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:  $7.1 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$

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  $121^{\circ}\text{C}$  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 relacionados<sup>5-9</sup>. Los organismos no fermentadores y otros bacilos gram negativos sensibles a los componentes selectivos no crecen en este medio.

#### **8.5.5 Tryptone 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 Tryptone soy agar**

| <b>Composición por litro de medio en agua purificada</b> |        |
|--|--------|
| 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 Destroxe 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 Destroxe Agar**

|   |
|---|
| <b>Fórmula aproximada* por litro de agua purificada</b> |
|---|

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
|                                   |        |
| 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 O<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub>**

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 CO<sub>2</sub> 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  $37^{\circ}\text{C}$  (coliformes totales),  $41^{\circ}\text{C}$  (*Escherichia coli*) y una humedad relativa de por otra parte para mohos y levaduras se calibró una temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$ .

- **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 ( $\text{NaClO}$ ), 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 utilizaron medios de cultivo sólidos (MacConkey, Tryptone Soy Agar, Sabouraud Dextrose Agar) específicos para identificar bacterias, mohos y levaduras.

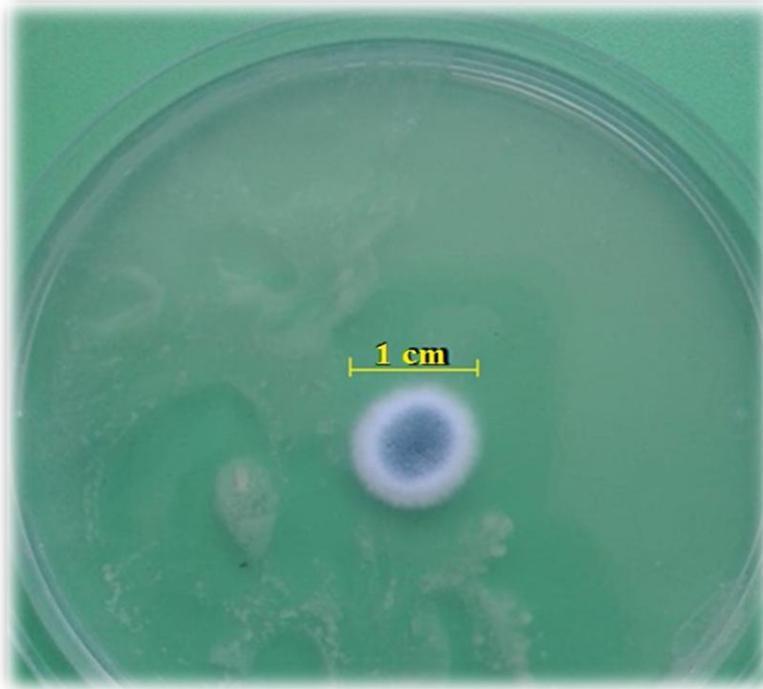
### **11.2 Caracterización de los agentes patógenos.**

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.



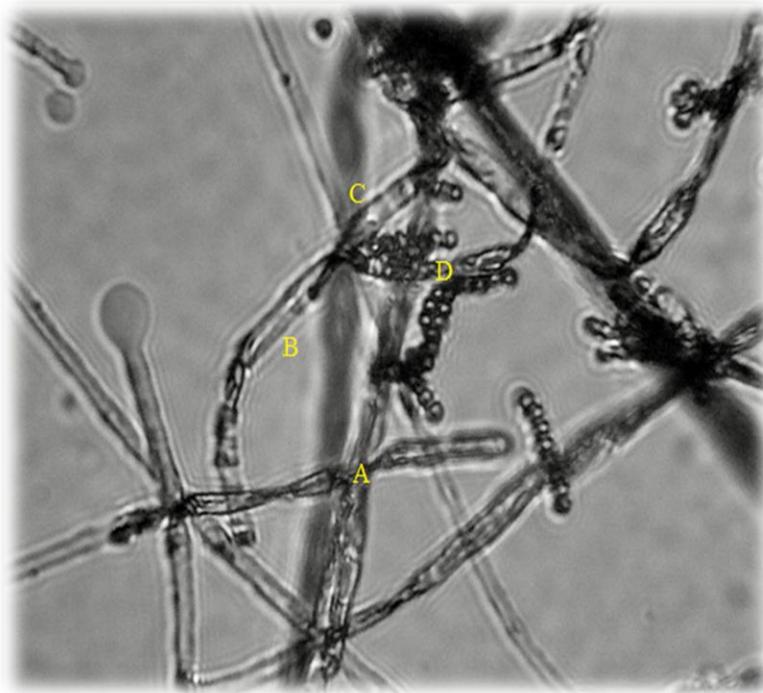
**Imagen 13:** Moho Azulado 2 días de incubación  
**Elaborado por:** Chanaluisa Luis, 2019



**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.



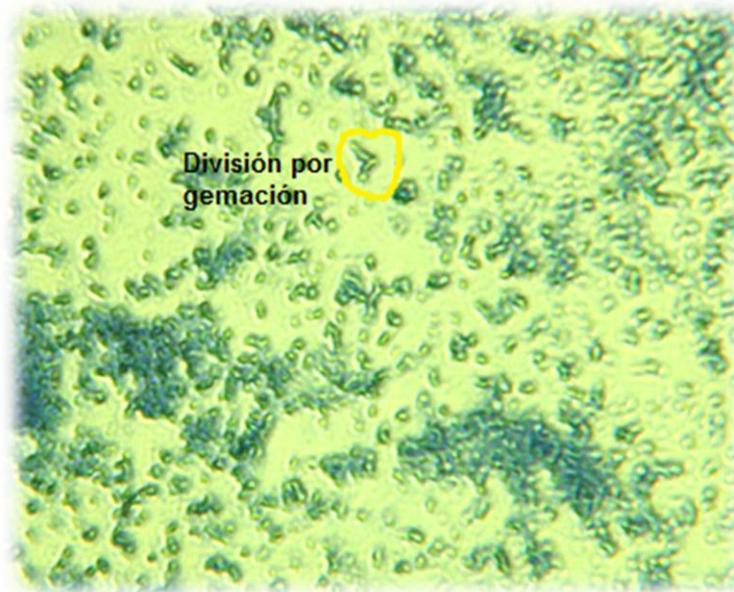
**Imagen 16** : Levadura en placa  
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

#### 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

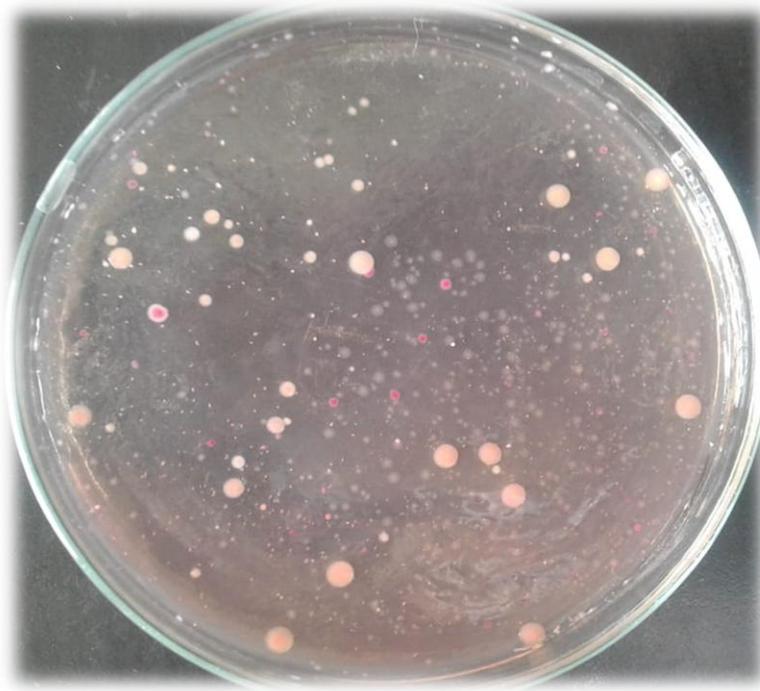


**Imagen 18 :** Levaduras 100 X  
Elaborado por: Chanaluisa Luis, 2019

### 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.



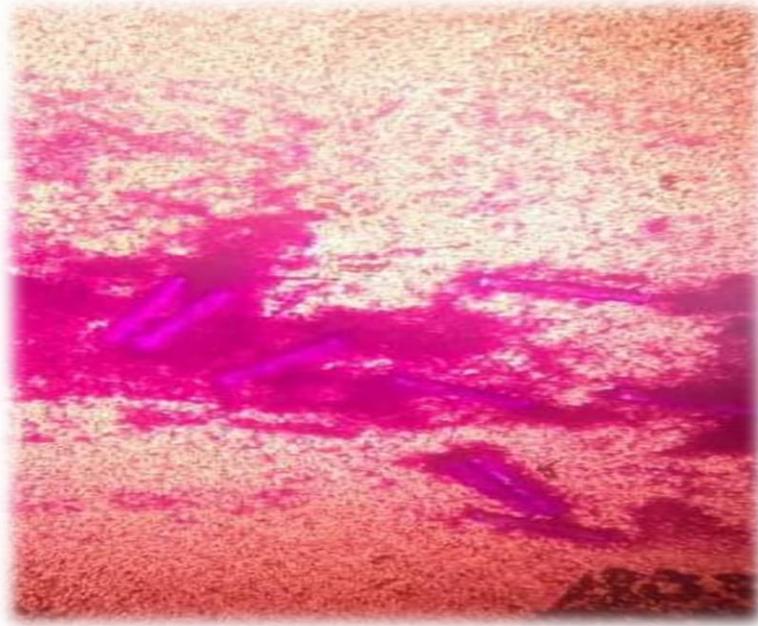
**Imagen 19:** Bacteria *Escherichia Coli* en placa

Elaborado por: Chanaluísa Luis, 2019

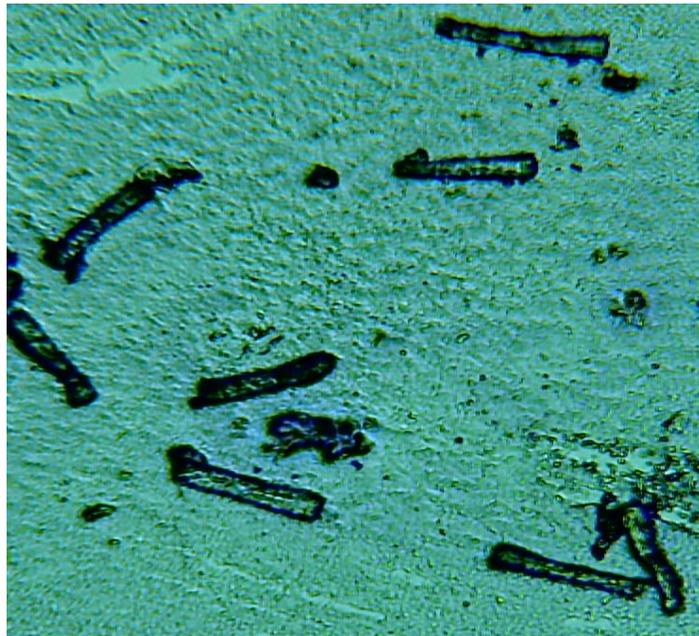
#### Caracterización Microscópica de bacterias

- 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](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](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](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.com](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](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](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](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](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://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](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                          |                                |                  |                |  |
| _____<br>Firma                          |   |   |   |  |                                   |                                |                  |                |  |

## Anexo 2: Curriculum Vitae del primer lector

|  Universidad<br>Técnica de<br>Cotopaxi |                            |  |                                      | Unidad de Administración de Talento Humano |                                   |                                |                 |  SIITH<br>Sistema Informático<br>Integrado de Talento<br>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   | ROOSVELT                             | 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  |                            | <a href="mailto:guadalupe.lopez@utc.edu.ec">guadalupe.lopez@utc.edu.ec</a> | 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                                  |   | <a href="mailto:segundo.zambrano@utc.edu.ec">segundo.zambrano@utc.edu.ec</a> | <a href="mailto:sarabiautc@hotmail.com">sarabiautc@hotmail.com</a> | 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  |              |
|  |                            | <a href="mailto:luis.chanaluisa6@utc.edu.ec">luis.chanaluisa6@utc.edu.ec</a> | 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        |                            |  |                             |                           |                                   |                     |   |              |
| <hr style="width: 20%; margin: auto;"/><br>Firma |                            |  |                             |                           |                                   |                     |   |              |

## Anexo 6: Fase de desamargo del chocho verde



Almacenamiento en tarrinas (poscosecha)

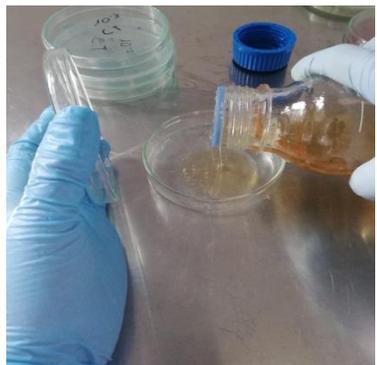
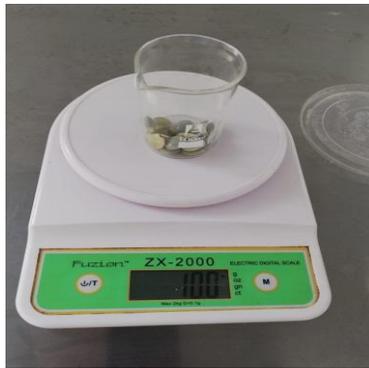


Anexo 7: Camaras numedias



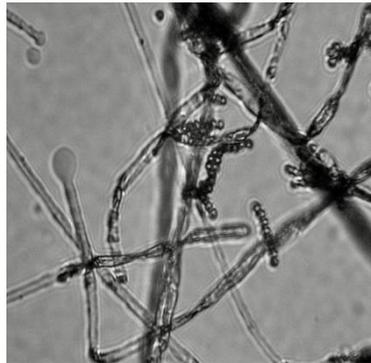


**Anexo 8: Disoluciones Decimales**

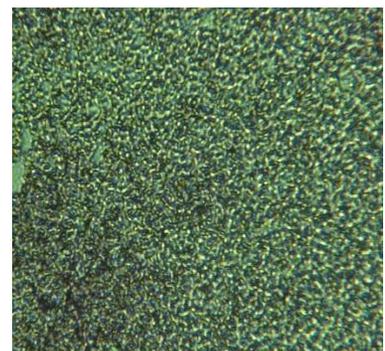




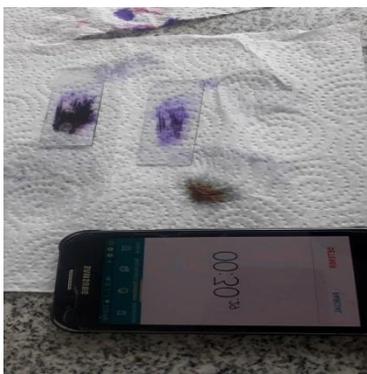
**Anexo 9: Identificación de hongos**



**Anexo 10: Identificación de levaduras.**



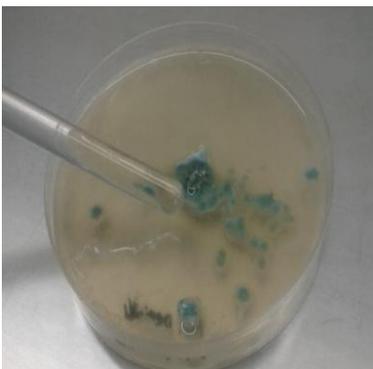
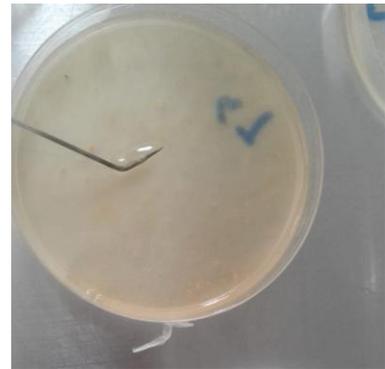
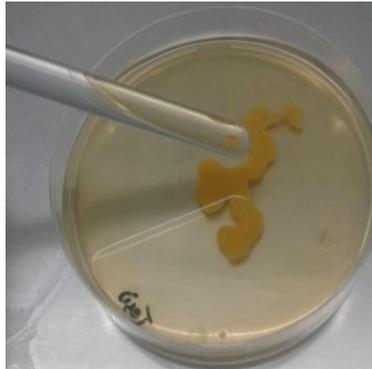
**Anexo 11: Tinción Gram en bacterias.**



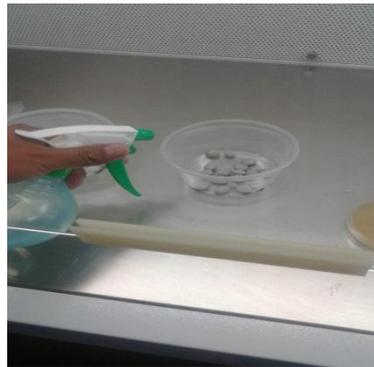
**Anexo 12: Tinción para observación de flagelos**



### 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).**

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

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

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

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

**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 ( $37^{\circ}\text{C}$  a  $41^{\circ}$ ) mohos y levaduras ( $24^{\circ}$  a  $26^{\circ}\text{C}$ )

## **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

| <b>1. MATERIALES DE CAMPO</b> | <b>CANTIDAD</b> | <b>UNIDAD</b> | <b>VALOR UNITARIO \$</b> | <b>VALOR TOTAL \$</b> |
|-------------------------------|-----------------|---------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>Pirola en rollo</b>        | 1               | Unidad        | 1,50                     | 1,50                  |
| <b>Estacas</b>                | 10              | Unidad        | 1                        | 10                    |

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

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