



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**OBTENCIÓN DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS SPP.* DEL
ESTÓMAGO DEL CHAME (*Dormitator latifrons*) COMO
POTENCIAL PROBIÓTICO EN ALIMENTACIÓN AGROPECUARIA**

AUTORES:

**ANTHONY GABRIEL MACÍAS MARTÍNEZ
RONY ROBERTO ESPINOZA CASTILLO**

TUTOR:

Blgo. NAVARRETE ALAVA JHONNY MANUEL, MGTR.

CALCETA, JULIO 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

ESPINOZA CASTILLO RONY ROBERTO con cédula de ciudadanía 1315513034 Y **MACÍAS MARTÍNEZ ANTHONY GABRIEL** con cédula de ciudadanía 1314066109, declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **OBTENCIÓN DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS SPP.* DEL ESTÓMAGO DEL CHAME (*Dormitator latifrons*) COMO POTENCIAL PROBIÓTICO EN ALIMENTACIÓN AGROPECUARIA**, es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración concedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.

**RONY ROBERTO ESPINOZA
CASTILLO**

**ANTHONY GABRIEL MACÍAS
MARTÍNEZ**

C.C. 131551303-4

C.C. 131406610-9

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

ESPINOZA CASTILLO RONY ROBERTO con cédula de ciudadanía 1315513034 y **MACÍAS MARTÍNEZ ANTHONY GABRIEL** con cédula de ciudadanía 1314066109, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **OBTENCIÓN DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS SPP.* DEL ESTÓMAGO DEL CHAME (*Dormitator latifrons*) COMO POTENCIAL PROBIÓTICO EN ALIMENTACIÓN AGROPECUARIA**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

Rony Espinoza

**RONY ROBERTO ESPINOZA
CASTILLO**

C.C. 131551303-4

AG

**ANTHONY GABRIEL MACÍAS
MARTÍNEZ**

C.C. 131406610-9

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

BLGO. JHONNY MANUEL NAVARRETE ÁLAVA, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **OBTENCIÓN DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS SPP.* DEL ESTÓMAGO DEL CHAME (*Dormitator latifrons*) COMO POTENCIAL PROBIÓTICO EN ALIMENTACIÓN AGROPECUARIA**, que ha sido desarrollado por **ESPINOZA CASTILLO RONY ROBERTO Y MACÍAS MARTÍNEZ ANTHONY GABRIEL**, previo a la obtención del título de ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

BLGO. JHONNY MANUEL NAVARRETE ALAVA, MGTR

C.C. 1705254041

TUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: **OBTENCIÓN DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS SPP.* DEL ESTÓMAGO DEL CHAME (*Dormitator latifrons*) COMO POTENCIAL PROBIÓTICO EN ALIMENTACIÓN AGROPECUARIA**, que ha sido desarrollado por **ESPINOZA CASTILLO RONY ROBERTO Y MACÍAS MARTÍNEZ ANTHONY GABRIEL**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

ING. EDISON FABIAN MACÍAS ANDRADE, PhD.

CC: 0910715218

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

ING. FRANCISCO DEMERA L., Mgtr.

CC: 1313505214

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

ING. GUILBER VERGARA V., Mgtr.

CC: 1307843860

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que nos dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual hemos forjado nuestros conocimientos profesionales día a día.

Gracias también a cada uno de los docentes que nos instruyeron en todos los semestres de nuestra carrera, por haber sido pacientes y amables en el proceso de enseñanza y aprendizaje, y por brindarnos su honesta amistad.

Además, a Dios por darnos fortaleza en el camino recorrido y por habernos permitido tener buena experiencia y sabiduría en la universidad para el cumplimiento de nuestros logros.

Agradecemos también a nuestros padres por ser ese gran apoyo incondicional en nuestros días difíciles.

A nuestro Tutor Blgo. Jhonny Navarrete Álava por ayudarnos a corregir cada uno de los errores que hemos tenido, motivándonos a diario para alcanzar cada uno de nuestros objetivos propuestos.

Finalmente, agradecer a nuestros familiares y amigos que nos apoyaron en este proceso académico.

ESPINOZA CASTILLO RONY ROBERTO

MACÍAS MARTÍNEZ ANTHONY GABRIEL

DEDICATORIA

Dedicamos el presente trabajo de investigación a Dios, pues gracias a él hemos logrado cumplir con una más de nuestras metas propuestas; de la misma manera a nuestra familia quienes nos han apoyado para poder llegar a estas instancias de nuestros estudios, brindándonos siempre el soporte necesario para seguir siendo mejores personas en cada ámbito de nuestras vidas.

ESPINOZA CASTILLO RONY ROBERTO

MACÍAS MARTÍNEZ ANTHONY GABRIEL

CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
CONTENIDO GENERAL	viii
CONTENIDO DE TABLAS.....	x
CONTENIDO DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
PALABRAS CLAVE:	xi
ABSTRACT	xii
KEY WORDS.....	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4. IDEA A DEFENDER.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. CHAME (Dormitator latifrons).....	5
2.1.1. TAXONOMÍA DEL CHAME	5

2.1.2. ESTÓMAGO DEL CHAME	5
2.2. MEDIOS DE CULTIVO	6
2.2.1. TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO	7
2.2.2. UTILIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	8
2.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	9
2.2.4. INOCULACIÓN.....	9
2.3. ACTIVIDAD PROBIÓTICA.....	9
2.4. AGAR AGAR	10
2.5. AGUA PEPTONADA.....	10
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	11
3.1. UBICACIÓN.....	11
3.2. DURACIÓN.....	11
3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS	11
3.3.1. MÉTODOS	11
3.3.2. TÉCNICAS	12
3.4. VARIABLES EN ESTUDIO	12
3.4.1. VARIABLE DEPENDIENTE	12
3.5. PROCEDIMIENTO.....	12
3.6. MUESTREO	14
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
3.7.1. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL	14
3.7.2. MEDIA GEOMÉTRICA	15
3.7.3. MEDIDAS DE DISPERSIÓN.....	15
3.7.4. DESVIACIÓN ESTÁNDAR	15
3.7.5. PRUEBA T-STUDENT	16

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1. ANÁLISIS DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS EN EL ESTÓMAGO DEL CHAME.....	17
4.1.1. PRUEBA DE TINCIÓN DE GRAM.....	17
4.1.2. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.....	18
4.1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS.....	20
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	23
5.1. CONCLUSIONES	23
5.2. RECOMENDACIONES	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXOS.....	27

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del chame	5
Tabla 2. Plan de muestreo.....	14
Tabla 3. UFC de muestras del estómago del Chame en hembras y machos.	18
Tabla 4. Distribución normal de los tratamientos	18
Tabla 5. Prueba T para la igualdad de medias	19
Tabla 6. Prueba T para la igualdad de medias	19
Tabla 7. Identificación de microorganismo del estómago del Chame.	20

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Tinción de Gram sin dilución en el microscopio.....	17
Figura 2. Tinción de Gram por dilución en el microscopio.....	17
Figura 3. Prueba de ADN de alta calidad.....	20

RESUMEN

En la presente investigación se buscó aislar cepas de *Lactobacillus spp.* del estómago del chame (*Dormitator Latifrons*) como potencial probiótico para la alimentación agropecuaria, se utilizaron métodos bibliográficos y descriptivos para la realización de la investigación, así mismo para el proceso de identificación del tipo de *Lactobacillus spp.* se realizó una prueba de identificación molecular de microorganismos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dando como resultado la obtención de *Lactiplantibacillus plantarum* dentro del tracto digestivo del chame (*Dormitator Latifrons*) dando como resultado un microorganismo probiótico apto para ser utilizado dentro de la industria alimentaria, así como para la alimentación animal agropecuaria, debido a los grandes beneficios en la conversión alimentaria como de su salud, previniendo problemas gastrointestinales.

PALABRAS CLAVE:

Lactiplantibacillus plantarum, probióticos, microbiología, agar agar

ABSTRACT

In the present research we sought to isolate strains of *Lactobacillus spp.* from the stomach of the chame (*Dormitator Latifrons*) as a potential probiotic for agricultural feed, bibliographic and descriptive methods were used to carry out the research, as well as for the process of identification of the type of *Lactobacillus spp.* a molecular identification test of microorganisms was performed by polymerase chain reaction (PCR) resulting in obtaining *Lactiplantibacillus plantarum* within the digestive tract of chame (*Dormitator Latifrons*) giving us as a result a probiotic microorganism suitable for use in the food industry, as well as for agricultural animal feed, due to the great benefits in food conversion and health, preventing gastrointestinal problems.

KEY WORDS

Lactiplantibacillus plantarum, probiotics, microbiology, agar agar

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la investigación de AQUAHOY (2020) aquellas partes del pescado que no son usadas rutinariamente para el consumo humano tales como las cabezas, las pieles, escamas y vísceras son referidas como desechos de pescado, a su vez este tipo de desechos representan más del 50% del peso del pescado.

Los probióticos contribuyen al equilibrio microbiano intestinal mejorando la degradación de los alimentos y a su vez favoreciendo una mayor absorción de los nutrientes, se dice que en el Ecuador existen aproximadamente 951 especies de peces de agua dulce distribuidas a lo largo de ríos y lagos, destacando que estos no tienen un protagonismo relevante en el sector alimentario del país, a diferencia de los peces pertenecientes al mar, los cuales cuentan con un gran mercado en el sector industrial, haciendo que estos sean más fáciles de encontrar en los mercados y supermercados del país, lo contrario a lo que sucede con los peces de agua dulce, que estos en la mayoría de sus casos se encuentran comercializados por los habitantes de los sectores cercanos a su hábitat, como sería el caso del *Dormitator latifrons* conocido como chame (Pacheco y Mora, 2020).

La acuicultura ha sido la principal actividad que ha afectado el ecosistema manglar en el Ecuador, de manera que para el desarrollo de esta actividad se talaron amplias áreas de manglar, según registros en el año de 1969 el país posee aproximadamente 204.000 hectáreas de manglar, cantidad que disminuyó considerablemente, ya que en el año 2016 registraron 161.000 hectáreas de manglar en todo el país (Verá, 2021).

La intensificación de la producción acuícola ha incrementado la aparición de patógenos y enfermedades en los cultivos, esto ha llevado a implementar dietas enriquecidas con probióticos para mejorar la degradación del alimento, aumentar el crecimiento, estimular el sistema inmune de los organismos y a su vez mejorar la

productividad de los animales sin producir efectos negativos para el consumidor (Nutrivet, 2009 citado por Bermúdez et al., 2020).

Con lo manifestado anteriormente se plantea la siguiente interrogante:

¿Se podrá caracterizar los *Lactobacillus* del estómago del chame (*Dormitator latifrons*) como potencial probiótico en la alimentación agropecuaria?

1.2.JUSTIFICACIÓN

Según Merino *et al.* (2018), el chame es un pez cuya presencia prevalece en el agua dulce, esto ayuda a que se encuentre en muchos lugares donde puede cultivarse y cuidarse; se emplean en pozas, estanques, canales, piscinas, como fuentes adicionales a los humedales naturales. Su alta adaptabilidad y capacidad de supervivencia le han permitido resistir a las variaciones de su hábitat, donde se incluyen factores como temperatura, pH, salinidad, entre otras.

El cultivo del chame constituye como una de las opciones acuícolas más importantes para diversificar los medios de vida de las comunidades rurales costeras, este pez al ser una de las especies más resistente a enfermedades, mínimos impactos ambientales, aportando con un rol ecológico muy importante, este pez transforma la energía potencial del detritus en energía utilizable por niveles tróficos superiores donde se ubican otros peces (Subsecretaría de acuicultura, 2010 citado por Freire, 2013).

El mercado del chame es aún localizado en Ecuador, con una incipiente incursión en el mercado internacional (Estados Unidos) localmente el mercado nacional acepta peces de más de 20 cm, los que son capturados ya sea en su medio ambiente (río manglar) o en los lugares de cultivo (chameras), en Ecuador se vende chame vivo en todos los mercados de Manabí, incluyendo Esmeraldas y Guayas. En Manabí, el conocimiento y consumo de chame es masivo, considerándose Chone como el principal centro de distribución del chame (FAO, 2010).

Mediante investigaciones realizadas se ha llegado a concluir que el *Dormitator latifrons* es un organismo filtrador que se alimenta preferentemente de detritus y restos vegetales, sin embargo, esto varía según la ubicación geográfica, disponibilidad de alimento y estación del año en el que se encuentre, integrando a su alimentación anélidos, copépodos, entre otra microfauna, comportándose también como consumidor primario omnívoro (Yáñez et al, 1976 citado por Vaca, 2020).

Los microorganismos probióticos una vez que están asentados en el tracto intestinal, inhiben otras poblaciones bacterianas, comúnmente patógenos oportunistas, y aumentan sus productos terminales, especialmente aminoácidos libres que favorecen el sistema inmune de los peces (Lara et al., 2002 citado por Bermúdez et al., 2020).

Mediante la adición de preparados microbianos ricos en bacterias ácido-lácticas (BAL) es posible modificar o alterar los procesos fermentativos sólidos, con el fin de mejorar la calidad e inocuidad de estos (Borrás et al., 2017).

1.3.OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener cepas de *Lactobacillus spp.* del estómago del chame (*Dormitator latifrons*) como potencial probiótico en alimentación agropecuaria.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar los *Lactobacillus spp.* con actividad probiótica del estómago del chame (*D. latifrons*).
- Sembrar los *Lactobacillus spp.* en medios de cultivos selectivos para el crecimiento y desarrollo de los *Lactobacillus*.

- Conservar las cepas de *Lactobacillus spp.* con actividad probiótica del estómago del chame (*D. latifrons*) como potencial probiótico en la alimentación agropecuaria.

1.4. IDEA A DEFENDER

Es posible obtener del estómago del chame (*Dormitator latifrons*) *Lactobacillus spp.* con actividad probiótica para el uso agropecuario.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. CHAME (*Dormitator latifrons*)

Es un pez típico de los estuarios, estos peces presentan una gran fuente de características importantes tales como, resistencia a variaciones significativas de salinidad y temperatura, sobrevivencia en ambientes acuáticos con poco oxígeno disuelto, e incremento en la concentración de hemoglobina en ambientes que contengan poca oxigenación (Sandoval et al., 2014 citado por Merino et al., 2018).

2.1.1. TAXONOMÍA DEL CHAME

Nombre común	Chame
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Eleotridae
Género	Dormitator
Especie	Dormitator latifrons

Fuente: (FAO, 2010)

2.1.2. ESTÓMAGO DEL CHAME

En un estudio realizado por Machuca y Rodríguez (2022) se realizaron análisis del contenido estomacal basándose en tres categorías de alimento:

1. Algas microscópicas: (diatomeas, clorofilas, crisófitas, cianófitas, euglenófitas), rotíferos y copépodos.
2. Restos vegetales: fibra proveniente de plantas acuáticas más comunes en su hábitat: lechuga de agua (*Pistia stratiotes*), Jacinto de agua (*Eichhornia cassipes*) y chorro (*Ceratophyllum sp.*).

3. Materia no determinada, encontrando organismos que podrían ser restos de larvas de insectos. También se encuentran en cantidades considerables restos de materia orgánica (detritus) y materia orgánica no identificada.

- **PROBIÓTICOS**

En la actualidad se encuentran probióticos a base de bacterias, hongos, microorganismos formadores y no formadores de esporas, entre este grupo se encuentran los probióticos autóctonos, que son los utilizados por microorganismo que se encuentran en la flora indígena del tracto digestivo de los animales, como es el caso de las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como también los probióticos que usan microorganismos que normalmente no están presentes dentro del tubo digestivo de los animales, como sería el caso de las levaduras (Bajagai et al., 2016).

- **LACTOBACILLUS SPP.**

Están catalogados como el principal grupo de bacterias ácido lácticas, se caracterizan por producir ácido láctico a consecuencia del metabolismo de los carbohidratos, este género tiene una morfología de bacilos o cocobacilos, en donde sus requerimientos nutricionales son muy complejos, encontrándose principalmente en plantas o frutos, así como también en alimentos fermentados y organismo de los animales incluyendo el de nuestro objeto de estudio el chame (Sun et al., 2015 citado por Rodríguez et al., 2021).

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Son preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, que constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales necesidades como ser vivo (Herrera, 1985 citado por Nápoles et al., 2006).

Según la Normativa Técnica Ecuatoriana [NTE INEN] 1529, (2013) nos indica que para la preparación de medios de cultivo sea más uniforme y aumenten la eficacia de los resultados se deben utilizar componentes básicos o medios de cultivo

deshidratados, la misma norma nos indica que para un correcto uso de estos se deberá seguir rigurosamente las instrucciones del fabricante.

2.2.1. TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO

Según Barrero (2016) con respecto a la proporción de agar, existen tres tipos:

1. Líquidos (caldos). No contiene ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen por todo el medio. El crecimiento en este tipo de medios es más rápido puesto que la movilidad permite acceder de una forma más fácil a los nutrientes.
2. Sólidos. Tienen una proporción de agar de, aproximadamente, el 1,5%. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Estos medios pueden depositarse en placas de Petri o en tubos de ensayo.
3. Semisólidos. Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%. Se utilizan para pruebas bioquímicas y de movilidad.

Para el mismo autor, en microbiología diagnóstica existen cuatro tipos, según su utilidad:

1. Nutritivos. Permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy generales. Como ejemplo de este tipo de medios están el agua de peptona y el caldo de tripticasa-soja.
2. De enriquecimiento. Contienen componentes adicionales (además de los básicos) para permitir el desarrollo de microorganismos exigentes, que no crecerían en un medio general.
3. Selectivos. Presentan algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea cultivar lo haga con mayor facilidad. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias gramnegativas.
4. Diferenciales. Contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica de la especie o grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (*lactosapositivas*) aparecen de color rosa intenso, mientras que las no fermentadoras de lactosa son incoloras.

2.2.2. UTILIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

De acuerdo con Rodríguez y Zhurbenko (2018), en muchos campos de la ciencia y en diferentes esferas del desarrollo, de manera directa o indirecta se utilizan los medios de cultivo. Sus principales aplicaciones son:

Diagnóstico clínico en medicina humana y veterinaria

Detección de microorganismos patógenos a partir de muestras de fluidos, tejidos y excretas y sus toxinas causantes de enfermedades.

Industria farmacéutica y biotecnológica

- Cultivo masivo de microorganismos productores de metabolitos (proteínas, factores de crecimiento, aminoácidos, péptidos, antibióticos, etc.)
- Control de la calidad (control de proceso, materias primas, productos terminados, aguas, residuales y ambiente).

Industria alimenticia

- Cultivo masivo de microorganismos productores de sustancias nutritivas y alimentos (proteínas y compuestos saborizantes entre otros).
- Obtención de alimentos fermentados (yogur, otros productos lácteos y alimenticios).
- Control de la calidad (control de proceso, materias primas, productos terminados, ambiente).

Otras industrias y sectores productivos (agricultura, química)

- Cultivo masivo de microorganismos (obtención de polímeros, azúcares y otros).
- Control de la calidad (control de proceso, materias primas, productos terminados, ambiente).

Control del medio ambiente

- Control de las aguas y fuentes de abasto
- Control ambiental (aire, suelos).
- Control de residuales.

Investigaciones

- Estudios morfológicos, funcionales, sistemáticos y de otro tipo, dirigidos al conocimiento de la flora microbiana.

- Investigaciones relacionadas con el desarrollo de sustancias o productos en las industrias y sectores anteriormente señalados.

2.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Mdm Científica (2019) manifiesta que, entre las características o condiciones importantes con las que debe contar un medio de cultivo están:

Temperatura: los microorganismos crecen de forma óptima en temperaturas variadas que depende del tipo de cultivo. Los cultivos deben proveer estas temperaturas ideales.

pH: el pH mide la acidez o alcalinidad. Muchos de los cultivos crecen mejor con un pH neutro, aunque hay otros que requieren medios más ácidos.

Medios estériles: los medios de cultivos deben ser completamente estériles para evitar alterar, cubrir o incluso impedir el crecimiento microbiano normal.

Luz ambiental: los medios de cultivo deben estar ubicados donde no estén expuesto a luz solar. La luz siempre debe ser controlada.

Humedad: las condiciones de humedad deben ser las adecuadas tanto para el medio como para el ambiente donde se encuentra. Para muchos microorganismos se requiere un mínimo nivel de humedad.

2.2.4. INOCULACIÓN

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Microbac, 2017).

2.3. ACTIVIDAD PROBIÓTICA

Según la FAO y la OMS definen a los probióticos como organismos vivos, que cuando son incorporados al huésped en proporciones apropiadas le aportan beneficios para la salud (FAO/WHO, 2001 citado por Villanueva, 2015).

Villanueva (2015) indica que, en 1965 Lilly y Stillwell introdujeron el término probiótico, definiéndolo como un factor de origen microbiológico el cual estimula el desarrollo de otros organismos. Parker en 1979 describe la palabra probiótico como

el consorcio de organismos y sustancias que favorecen el balance intestinal microbiano y en el año 1989 Fuller resaltó que los probióticos producen un efecto benéfico en el huésped.

2.4. AGAR AGAR

Es un polisacárido coloidal hidrófilo de origen vegetal que se extrae de determinadas cepas de algas rojas marinas de la familia Gelidiaceae y Gracilariaceae, este medio de cultivo sirve como un gelificante, estabilizante y espesante natural en aplicaciones alimentarias (Mirás, 2017). Desde el punto de vista de Cedeño (2015) menciona que es un medio de cultivo enriquecido sin aditivos que sirve para la recuperación y aislamiento de toda clase de microorganismos, hongos y levaduras que no requieran elementos especiales para el crecimiento de los mismo, es utilizado principalmente para el mantenimiento de cepas y la realización de subcultivos para confirmar la pureza de los aislamientos.

2.5. AGUA PEPTONADA

Es un medio de cultivo microbiano que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio para un balance osmótico, además, este medio tiene un gran valor nutritivo para enriquecer las muestras, permitiendo la reparación de las bacterias maltratadas, principalmente para las bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, teniendo también la función de homogeneizar y reparar las células que han sido sometidas a procesos industriales (Vitola, 2019).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La investigación se realizará en el laboratorio de microbiología de la carrera de Medicina Veterinaria perteneciente a la Universidad Politécnica Agropecuaria de Manabí “ESPAM MFL” para los análisis de detección de *lactobacilos*, la cual se encuentra ubicada en el sitio “El Limón” a dos kilómetros de la ciudad de Calceta ubicada geográficamente entre las coordenadas 0°49’39” S 80°11’13” W a 18 msnm (Google Earth, 2021).

3.2. DURACIÓN

La presente investigación tendrá una duración de 22 semanas a partir de la aprobación del proyecto de tesis.

3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.3.1. MÉTODOS

- **MÉTODO BIBLIOGRÁFICO**

El proceso de investigación bibliográfica se debe contar con material confiable e informativo tales como libros, revistas de divulgación o de investigación científica, sitios Web y demás informaciones necesarias para iniciar una búsqueda que ayuden al investigador con su trabajo planteado (Gómez et al., 2014). Este método ayuda a buscar información científica acerca del uso del chame y del estómago de este; además, de qué tipo de *Lactobacillus* existen o están identificados para el uso en el ámbito agroindustrial.

- **MÉTODO DESCRIPTIVO**

Carlos Sabino (1992) en su obra “el proceso de investigación”, define a este método como “el tipo de investigación que tiene como objetivo describir algunas características fundamentales de conjuntos homogéneos de fenómenos, utilizando

criterios sistemáticos que permiten establecer la estructura o el comportamiento de los fenómenos en estudio, proporcionando información sistemática y comparable con la de otras fuentes” (Martínez, 2018 citado por Guevara et al., 2020).

3.3.2. TÉCNICAS

– PREPARACIÓN MEDIO AGAR AGAR

Para la NTE INEN 2015 indica que para la preparación del agar agar se deben seguir los siguientes pasos:

- Se disolvieron los componentes en 1 litro de agua destilada, dejando en reposo por un tiempo de 15 minutos, ajustando el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$.
- Se calentó hasta ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución.
- Se procedió a distribuir de la manera adecuada y esterilizar 15 minutos a 121°C

– MUESTRA

La cantidad total que se utilizó para la investigación fue de 200 g del estómago de chame (*Dormitator latifrons*).

3.4. VARIABLES EN ESTUDIO

3.4.1. VARIABLE DEPENDIENTE

Lactobacillus spp.

3.5. PROCEDIMIENTO

Para el cumplimiento de los objetivos, se realizaron los siguientes pasos, dividiéndose en dos etapas, las cuales fueron de extracción del estómago del chame y el aislamiento del mismo.

Extracción del estómago del chame (*Dormitator latifrons*)

Obtención de los peces: Los peces fueron obtenidos del humedal La Segua ubicado en el cantón Chone.

Limpieza del chame: El chame pasó por un proceso de desinfección, en el cual se limpió con agua destilada y cloruro de sodio al 0.9%.

Corte en la zona estomacal: Se procedió a cortar la zona estomacal del chame con la ayuda de una hoja de un bisturí nº 24.

Extracción del estómago: Con la ayuda de pinzas y tijeras de disección se extrajo el estómago del chame para el respectivo proceso de obtención de los microorganismos a evaluar.

Aislamiento del estómago del chame

- Se adicionó una solución de agua peptonada al 25% a un matraz (50 ml).
- Con la ayuda de las pinzas se introdujo una parte del estómago del chame dentro del matraz con la solución de agua peptonada.
- Se procedió a agitar la solución de agua peptonada junto al estómago del chame por un tiempo de 24h a 30°C.
- Con la ayuda de una pipeta se extrajo 10 ml de la solución y se agregó en 90 ml de caldo MRS (Man, Rogosa, Sharpe).
- Se llevó la muestra a estufa.
- Se procedió a sembrar en un medio MRS sólido (Agar Agar) la solución obtenida de la muestra.
- Se colocó la caja petri dentro de una jarra anaeróbica para impedir la oxigenación, luego de esto se esperó de 48 a 72h para observar la presencia de las bacterias lácticas.
- Como existió crecimiento de microorganismos en la caja Petri, se realizó la prueba de catalasa (agua oxigenada) para conocer si son *bacillus* o *Lactobacillus*.

- Posteriormente se enviaron los análisis respectivos en la cabina de análisis microbiológicos para caracterizar qué tipo de *Lactobacillus* se aislaron dentro del estómago del chame.

Conservación: El producto obtenido se mantuvo en medios de cultivos enriquecidos en refrigeración, a una temperatura extrema de 4 a 8°C hasta su posterior uso una vez que hayan sido reconocidas la especie de *lactobacilos*.

Cabe indicar que los *Lactobacillus* se los pudo reconocer sembrando la muestra en medio de cultivos selectivos para *Lactobacillus* como el M.R.S (Man, Rogosa, Sharpe) que es un medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas, también mediante la tinción de Gram o mediante la prueba de catalasa, manteniendo siempre las cepas en medios o equipos anaeróbicos como jarra o estufa anaeróbica.

Para el cumplimiento de los objetivos específicos se detalló este procedimiento en el cual se realizó la ejecución de la obtención y análisis de los *Lactobacillus* a estudiar dentro del estómago del chame.

3.6. MUESTREO

Tabla 2. Plan de muestreo

Análisis	Cantidad de animales en estudio	Número de toma de muestras	Repeticiones	Frecuencia de toma de datos	Total
Análisis PCR	4	1	3	1	12

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la ejecución de esta investigación se utilizó un análisis estadístico descriptivo en el cual se emplearon los siguientes parámetros:

3.7.1. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL

Son utilizadas para describir cómo se resumen la localización de los datos, ubicando e identificando el punto alrededor del cual se centran los datos (Ruiz, 2020). En

efecto en esta investigación se utilizó para informar cuál es el centro sobre el cual se ubicó el conjunto de datos.

3.7.2. MEDIA GEOMÉTRICA

La media geométrica es una medida de tendencia central que puede utilizarse para mostrar los cambios porcentuales en una serie de números positivos, esta se define como la raíz índice n del producto de n términos (Stephen et al., 2009 citado por Barraza et al., 2019). Esta medida fue de gran importancia para determinar el promedio de los resultados de cada tratamiento para detallarlos en un cuadro condensado.

3.7.3. MEDIDAS DE DISPERSIÓN

Son también llamadas como medidas de variabilidad, estas muestran las variables de una distribución, indicando por medio de un número si las diferentes puntuaciones de una variable están muy alejadas de la media, interpretándose en que, si mayor es el valor, mayor será la variabilidad, y cuanto menor sea, más homogénea será la media. Así se sabe si todos los casos son parecidos o varían muchos entre ellos (Instituto Claret de Temuco, 2020).

3.7.4. DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Esta es una medida de dispersión el cual nos permite determinar con un grado de precisión alto, donde están localizados los valores de una distribución de frecuencias con relación a la media, también es conocida como la raíz cuadrada positiva de la varianza (Patiño, 2002).

Para el estudio de los resultados no paramétricos se utilizará un análisis de regresión logística binaria que servirá para determinar la presencia o ausencia de los lactobacillus spp. después de haber realizado la prueba de catalasa o mediante la tinción de gram de las muestras estudiadas.

3.7.5. PRUEBA T-STUDENT

De acuerdo con Sánchez (2015) la prueba t-student se clasifica en dos partes, la primera es la distribución de la normalidad y la segunda en que las muestras sean independientes, está a su vez se utiliza para determinar si existen diferencias entre las medias de dos grupos.

Para esta investigación se aplicará esta prueba mediante el software SPSS LIBRE 25 para comparar el antes y después de la extracción de lactobacilos del chame (*Dormitator latifrons*) macho y hembra.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS EN EL ESTÓMAGO DEL CHAME

4.1.1. PRUEBA DE TINCIÓN DE GRAM

Se realizó la prueba de tinción de Gram para verificar la presencia de microorganismos existentes, el cual dio como resultado positivo, una vez que se verifica la presencia de estos se pudieron observar varios tipos de microorganismos, entre los microorganismos existentes se pudieron apreciar los *bacillus*, *lactobacillus*, *estreptococos*, entre otros, como se observa a continuación.

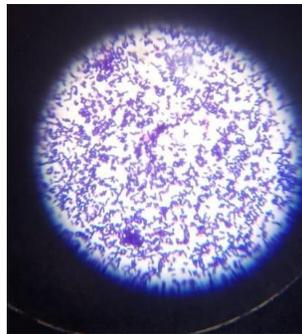


Figura 1. Tinción de Gram sin dilución en el microscopio.

Para la obtención de los resultados deseados se procedió a realizar 10 diluciones al primer resultado para la purificación de los *Lactobacillus* como se observa en la siguiente imagen.



Figura 2. Tinción de Gram por dilución en el microscopio.

4.1.2. UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Para los resultados obtenidos se llevó a cabo un conteo de unidades formadoras de colonias en las instalaciones del laboratorio de microbiología de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí utilizando cuatro muestras del estómago del chame como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. UFC de muestras del estómago del Chame en hembras y machos.

Muestra por tratamiento	Pruebas solicitadas	Aceptable	No aceptable	Resultados
Muestra 1 Chame hembra (jarra anaeróbica)	Determinación de Lactobacillus spp.	Presencia	-	760 UFC/10 ⁸
Muestra 2 Chame macho (jarra anaeróbica)	Determinación de Lactobacillus spp.	Presencia	-	860 UFC/10 ⁸
Muestra 3 Chame macho	Determinación de Lactobacillus spp.	Presencia	-	1104 UFC/10 ⁸
Muestra 4 Chame hembra	Determinación de Lactobacillus spp.	Presencia	-	1128 UFC/10 ⁸

Fuente: Laboratorio de microbiología Espam (2022)

Los datos de cada tratamiento poseen una distribución normal (tabla 4).

Tabla 4. Distribución normal de los tratamientos

Género	Género	Estadístico	gl	Sig
Con Jarra anaeróbica	Chame Hembra	1.000	3	1.000
	Chame Macho	1.000	3	1.000
Sin Jarra anaeróbica	Chame Hembra	1.000	3	1.000
	Chame Macho	1.000	3	1.000

Fuente: IBM SPSS v25

Para comparar la distribución de los datos obtenidos en la determinación de *Lactosbacillus spp.* se procedió a realizar la prueba estadística t-student para comparar las medias de estos microorganismos con y sin jarra anaeróbica, tanto de las hembras como de los machos (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba T para la igualdad de medias

UFC	Género	Media	Desviación tip.	t	Gl	Sig
Con Jarra anaeróbica	Chame Hembra	760.0	5	15.492	4	0.000
	Chame Macho	860.0	10			
Sin Jarra anaeróbica	Chame Hembra	1104.0	4	-4.648	4	0.10
	Chame Macho	1128.0	8			

Fuente: IBM SPSS v25

A continuación, se muestra en la tabla 6 la prueba t aplicada para comparar los datos entre las variables con y sin jarra anaeróbica.

Tabla 6. Prueba T para la igualdad de medias

UFC	Media	Desviación tip.	Correlac.	t	gl	Sig
Con jarra anaeróbica	810.0	55.22	0.881	17.367	4	0.000
Sin jarra anaeróbica	1116.0	14.311				

La muestra t de muestras relacionadas indica que hay diferencias entre las unidades formadoras de colonias con y sin jarra anaeróbica ($p < 0.005$).

En la investigación de Fečkaninová *et al.* (2019) se obtuvieron varios aislamientos de LAB de 60 muestras del contenido intestinal de truchas arcoíris sanas (*Oncorhynchus mykiss*). Las cepas aisladas tenían las características típicas de las

bacterias del ácido láctico (LAB), que son Gram positivas, en forma de bastón; no forma esporas, no es móvil y catalasa negativa.

4.1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS

Los resultados obtenidos en la investigación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dieron como resultado la obtención de *Lactiplantibacillus plantarum* con un porcentaje de calidad elevado como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Identificación de microorganismo del estómago del Chame.

Código	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de Identidad	N° Accesoión
B378	M3D8N	1068	97,8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	RpoB	99,8	CP039121.1
B379	M3D8	1061	99,2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	RpoB	99,9	CP039121.1

Fuente: Idgen (2022).

Como resultado se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de PCR convencional, donde se ensambló la reacción de PCR visualizándose fragmentos de aproximadamente 1200 pb en las muestras amplificadas con los primers rpoB-F / rpoB-R como se muestra a continuación.

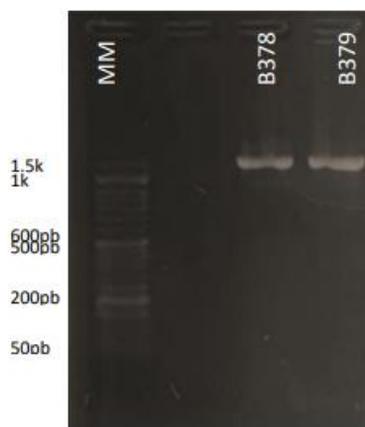


Figura 3. Prueba de ADN de alta calidad.

Fuente: Idgen (2022)

En investigaciones similares respecto a la extracción de *Lactobacillus* Rodríguez *et al.* (2021) aislaron y caracterizaron 36 BAL del género *Lactobacillus* a partir de cacao fermentado. Por otro lado, en la investigación de Fečkaninová *et al.* (2019) extrajeron seis cepas de *Lactobacillus* aisladas del contenido intestinal de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) en Eslovaquia se identificaron como *L. plantarum* (R1, R2, R4), *L. fermentum* (R3, R5) y *L. brevis*.

Por su parte de 30 colonias, Quijal *et al.* (2020) observaron una actividad proteolítica en 7 de las cepas aisladas, que pertenecen al género *Lactobacillus*, y las dos cepas más activas se identificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como *L. plantarum*.

Se puede evidenciar que son uno de los microorganismos probióticos más utilizados en la industria alimentaria ya que sirve para alargar la vida útil de los productos, mejorar la composición nutricional y las actividades antimicrobianas. Así mismo Yilmaz *et al.* (2022) indica que las cepas de *Lactobacillus plantae* tienen un gran potencial probiótico, que mejora el microbiota, regula el sistema inmunológico, reduce los altos niveles de colesterol que se encuentran en la sangre y el riesgo del cáncer inhibiendo la producción de aflatoxinas.

En un estudio realizado por Vera *et al.* (2018) sobre el efecto de *Lactobacillus plantarum* como probiótico en cerdos al destete, en el cual utilizaron 3 tratamientos, donde el t1 los animales se alimentaban con una dieta establecida, mientras que el t2 y t3 se le adicionó el probiótico (t2: 10 mL y t3: 20 mL por animal) se observó que en cuanto a los valores de la conversión alimenticia el t3 tuvo un mejor comportamiento con la adición del probiótico, mientras que en los indicadores de salud el t2 y t3 se redujo la incidencia de diarreas en un 14.29% y 28,57% a diferencia del t1 que obtuvo un 57.14%.

En la investigación realizada por Jurado *et al.* (2021) la cual trato de la adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulados en alimento para pollos, esta nos dice que la alimentación con dieta comercial obtuvo un mayor proceso inflamatorio acompañado de hiperproducción de moco o mucinas, las cuales serían alteraciones

patogénicas que podrían hacer daño a la alimentación humana en comparación del alimento que contiene los *Lactobacillus plantarum*.

Con este breve estudio realizado se evidencia que el microorganismo probiótico encontrado en el tracto digestivo del chame (*Dormitator Latifrons*) si tiene influencia en la alimentación agropecuaria.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- En virtud de lo argumentado, podemos concluir que se logró aislar cepas de *Lactobacillus Spp.* utilizando métodos y medios de cultivos selectivos para su posterior crecimiento y desarrollo.
- A partir de la evidencia recolectada, se realizó la caracterización de *Lactobacillus Plantarum* para identificar género y especie del mismo.
- Las cepas de *Lactobacillus Plantarum* se conservaron en refrigeración en medios de cultivos enriquecidos mediante una temperatura controlada, hasta su posterior uso.

5.2. RECOMENDACIONES

- Mantener las siembras aisladas a una temperatura de 10°C para su adecuada conservación.
- Es importante continuar con más estudios e investigaciones similares con la finalidad de obtener mayores resultados para conocer los beneficios que brinda el *Lactobacillus Plantarum*. en la alimentación agropecuaria.

BIBLIOGRAFÍA

- AQUAHoy. (27 de marzo de 2020). Aprovechamiento de los desechos del pescado en la alimentación animal. *Revista digital AquaHoy*. <https://www.aquahoy.com/i-d-i/valor-nutricional/34390-aprovechamiento-desechos-pescado-alimentacion-animal>
- Bajagai, Y., Klieve, A., Dart, P., & Bryden, W. (2016). *PROBIOTICS IN ANIMAL NUTRITION Production, impact and regulation*. FAO. <https://www.fao.org/3/i5933e/i5933e.pdf>
- Barraza, E., Domínguez, L., & Herrera, R. (2019). Cálculo del índice de capacidad de procesos usando media geométrica. *Unisimon*. http://revistas.unisimon.edu.co/index.php/innovacioning/article/view/2851/4631#citations/article_citation_14
- Barrero Cuevas, L. (2016). *Microbiología clínica*. Editorial Síntesis. Universidad Europea de Madrid. 40-41. <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Bermúdez, A., Lucas, G. V., Vélez, J., Cruz, Y., Mesías, A., Vásconez, Y., Santana, A. (2020). Efecto de dos probióticos comerciales en la ganancia de peso, parámetros hematológicos e histología intestinal del chame *Dormitator latifrons*. *Aquatechnica*, 23-30.
- Borrás, L., Valiño, E., y Rodríguez, C. (2017). Preparado microbiano con actividad ácido láctica como acelerante biológico en los procesos de fermentación para alimento animal. *Ciencia y Agricultura*, 7-13.: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/5600/560062845001/560062845001.pdf>
- Cedeño, j. (2015). *Agar nutritivo*. <https://www.labmedibac.com.ec/wp-content/uploads/2015/04/AGAR-NUTRITIVO-MEDIBAC-LAB.pdf>
- FAO. (2010). *Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo*: <https://www.fao.org/3/i1773s/i1773s.pdf>
- Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Schusterová, P., Maruščáková, I. C., & Popelka, P. (2019). Characterization of two novel lactic acid bacteria isolated from the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Slovakia. *Aquaculture*, 506, 294-301.
- Gómez, E., Navas, F., Aponte, G., & Betancourt, L. (2014). Metodología para la revisión bibliográfica y la gestión de información de temas científicos, a través de su estructuración y sistematización. *Redalyc*. <https://www.redalyc.org/pdf/496/49630405022.pdf>
- Google Earth. (2021). *Ubicación del campus politécnico - ESPAM MFL*. <https://earth.google.com/web/@-0.82716438,-80.18636648,15.74582205a,488.07824471d,35y,18.52652668h,44.97979702t,0r>
- Guevara, G., Verdesoto, A., & Castro, N. (2020). Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación-acción). *Recimundo*. 10.26820/recimundo/4.(3).julio.2020.163-173

- Instituto Claret de Temuco. (2020). *medidas de dispersión*. <https://institutoclaret.cl/wp-content/uploads/2020/10/PPT-MEDIDAS-DE-DISPERSI%C3%93N.pdf>
- Mdm Científica. (2019). *Los medios de cultivo para microbiología más usados*. <https://mdmcientifica.com/medios-cultivo-microbiologia-mas-usados/>
- Machuca C; Rodríguez J. (2022). Crecimiento de chame (*Dormitator latifrons* R.) bajo tres densidades de siembra, con tecnología Bio loc. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 87 pp.
- Merino, M., Osejos, M., Jaramillo, J., y Merino, C. (2018). Factores ecológicos y su incidencia en los ecosistemas del chame (*dormitator latifrons*) en la Segua de Canuto, cantón Chone-Ecuador. *Ciencia digital* <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v2i2.92>
- Microbac. (2017). *Tipos de siembras. Aislamiento de colonias mediante siembra en placa*. <https://www.labmicrobac.com/tipos-de-siembras/>
- Mirás, R. (2017). *Ficha técnica Agar-Agar en polvo*. <https://www.tendaecologica.com/pdf/690563.pdf>
- Normativa Técnica Ecuatoriana [NTE INEN] 1529. (2013). Control microbiológico de los alimentos, preparación de medios de cultivo y reactivos. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-1-1R.pdf>
- Pacheco, X., y Mora, M. (2020). *Análisis culinario del chame (dormitator latifrons) en el cantón Tosagua de la provincia de Manabí y sus usos culinarios*. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/49558/1/BINGQ-GS-20P44.pdf>
- Patiño, R. (2002). *Medidas de posición*. <http://iqcelaya.itc.mx/~roosph/pye/u2/eu2t3.pdf>
- Martí-Quijal, F. J., Príncipe, A., Tornos, A., Luz, C., Meca, G., Tedeschi, P., ... & Mañes, J. (2020). Isolation, Identification, and investigation of fermentative bacteria from sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Evaluation of antifungal activity of fermented fish meat and by-products broths. *Foods*, 9(5), 576.
- Rodríguez Martínez, C., y Zhurbenko, R. (2018). *Manual BioCen de medios de cultivo*. (4ta edición, pág. 16). <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Rodríguez, C., Guzmán, A., Lara, M., Castillo, E., & Brandao, P. (2021). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* spp. (LACTOBACILLACEAE) resistentes a Cd(II) Y As(III) recuperados de fermento de cacao. *Scielo*, 26. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n1.83677>
- Ruiz, L. (2020). *Material didáctico de estadística*. https://www.uaeh.edu.mx/division_academica/educacion-media/repositorio/2010/6- semestre/estadistica/medidas-tendencia-central.pdf
- Sánchez, R. (2015). t-Student. Usos y abusos. *Scielo*. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmc/v26n1/v26n1a9.pdf>
- Vaca, J. (2020). *Hábitos alimenticios del chame (Dormitator latifrons) en un canal artificial del Cantón Durán*. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/48680/1/Vaca%20Lisette%202020.pdf>

- Vera, J. (2021). *Estudio de engorde del chame (Dormitator latifrons) en jaulas flotantes con miras a producciones sustentables*. [Tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.pucese.edu.ec/bitstream/123456789/2688/1/Vera%20Portilla%20Jahaira%20Marlene.pdf>
- Vitola, A. (2019, September 18). *Conoce todos los beneficios que tiene el agua peptonada* – MDM Científica. MDM Científica. <https://mdmcientifica.com/beneficios-agua-peptonada/>
- Yilmaz, B., Punia, S., Echegaray, N., & Suri, S. (2022, Abril). The Impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the Functional Properties of Fermented Foods: A Review of Current Knowledge. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/359985336_The_Impacts_of_Lactiplantibacillus_plantarum_on_the_Functional_Properties_of_Fermented_Foods_A_Review_of_Current_Knowledge
- Vera, R., Vega, E., & Sánchez, L. (2018). Efecto de *Lactobacillus plantarum* como probiótico en cerdos al destete. *Scielo*. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v40n3/2224-4700-rsa-40-03-e01.pdf>
- Jurado, H., Zambrano, E., & Pazos, A. (2021). Adición de un probiótico de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado en el alimento para pollos. *Researchgate*. https://www.researchgate.net/publication/351337703_Adicion_de_un_probiotico_de_Lactobacillus_plantarum_microencapsulado_en_el_alimento_para_pollos
- Villanueva, R. (2015). Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. *Revista Ingeniería Industrial* (33), 265-275.

ANEXOS

Anexo 1. Limpieza del Chame



Anexo 2. Disección de la caja torácica



Anexo 3. Extracción del tracto digestivo



Anexo 4. Enriquecimiento en agua peptonada



Anexo 5. Muestra en jarra anaeróbica



Anexo 6. Caja Petri con microorganismos

