



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente

Carrera de Ingeniería Agroindustrial

TEMA:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS *ARCOBACTER* SPP. A PARTIR DE MUESTRAS DE SUEROS LÁCTEOS PROCEDENTES DE LAS QUESERAS DE LA PARROQUIA SALINAS, CANTÓN GUARANDA, PROVINCIA BOLÍVAR.

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

AUTORES:

Pungaña Tualombo María Fernanda

Pungaña Azas Luis Stalin

DIRECTOR:

Ing. Iván Marcelo García Muñoz MSc.


Guaranda - Ecuador

2022

TEMA:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS *ARCOBACTER* SPP. A PARTIR DE MUESTRAS DE SUEROS LÁCTEOS PROCEDENTES DE LAS QUESERAS DE LA PARROQUIA SALINAS, CANTÓN GUARANDA, PROVINCIA BOLÍVAR”

REVISADO Y APROBADO POR:



Ing. Iván Marcelo García Muñoz MSc

DIRECTOR



Dr. Isidro Favian Bayas Morejón PhD

BIOMETRISTA



Dra. Herminia Sanaguano PhD

REDACCIÓN TÉCNICA

Certificado de Autoría



Nosotros, María Fernanda Pungaña Tualombo, portadora de la CI: 020214243-6 y Luis Stalin Pungaña Azas, portador de la CI: 025006360-9, declaramos que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional: y, que las referentes bibliográficas que incluye han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "María Fernanda Pungaña Tualombo", written over a dotted line.

María Fernanda Pungaña Tualombo

C.I. 020214243-6

AUTORA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luis Stalin Pungaña Azas", written over a dotted line.

Luis Stalin Pungaña Azas

C.I. 025006360-9

AUTOR

A large, stylized handwritten signature in blue ink, written over a dotted line.

Ing. Iván Marcelo García Muñoz MSc.

C.I. 020109396-0

DIRECTOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Isidro Favian Bayas Morejón", written over a dotted line.

Dr. Isidro Favian Bayas Morejón PhD

C.I. 10201841191-6

BIOMETRISTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Herminia del Rosario Sanaguano Salguero", written over a dotted line.

Dra. Herminia del Rosario Sanaguano Salguero PhD

C.I. 0601587280

REDACCIÓN TÉCNICA



Notaria Tercera del Cantón Guaranda
Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez
Notario

Henry Rojas Narvaez

No. ESCRITURA	20220201003P01353
---------------	-------------------



DECLARACION JURAMENTADA
OTORGADA POR:
LUIS STALIN PUNGAÑA AZAS Y
MARIA FERNANDA PUNGAÑA TUALOMBO
FACTURA: 001-002-000010310
DI: 2 COPIAS

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día veintiséis de julio de dos mil veintidós, ante mi **Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda**, comparecen los señores **LUIS STALIN PUNGAÑA AZAS**, soltero, domiciliado en la parroquia Salinas, cantón Guaranda, provincia Bolívar, con celular número 0980305515, correo electrónico 2hstalinrap@gmail.com; **MARIA FERNANDA PUNGAÑA TUALOMBO**, soltera, domiciliada en la parroquia Salinas, cantón Guaranda, provincia Bolívar, con celular número 0959561691, correo electrónico mafercitapun1997@gmail.com, por sus propios derechos. Los comparecientes son de nacionalidad ecuatoriana, mayores de edad, hábiles e idóneos para contratar y obligarse a quienes de conocerlos doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana, bien instruidos por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertidos de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presentan su declaración Bajo Juramento que dicen: **DECLARAMOS QUE EL PRESENTE PROYECTO DE TITULACIÓN DENOMINADO "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS ARCOBACTER SPP. A APARTIR DE MUESTRAS DE SUEROS LÁCTEOS PROCEDENTES DE LAS QUESERAS DE LA PARROQUIA SALINAS, CANTÓN GUARANDA, PROVINCIA BOLÍVAR."** previo la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, de la Universidad Estatal de Bolívar, es de nuestra autoría, este documento no ha sido previamente presentado por ningún grado de calificación profesional y que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas por los autores. Es todo cuanto podemos declarar en honor a la verdad, la misma que la hacemos para los fines legales pertinentes. **HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA.** La misma que queda elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que le fue a la compareciente por mí el Notario en unidad de acto, aquella se afirma y se ratifica de todo lo expuesto y firma conmigo en unidad de acto, quedando incorporado al protocolo de esta Notaria, la presente declaración, de todo lo cual doy fe.-

Stalin Pungaña

LUIS STALIN PUNGAÑA AZAS
C.C. 0250063609

Maria Fernanda

MARIA FERNANDA PUNGAÑA TUALOMBO
C.C. 020214243-6

Henry Rojas Narvaez

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ
NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA



Document Information

Analyzed document	TESIS CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ARCOBACTER SPP. Pungaña, Pungaña.docx (D142400782)
Submitted	7/25/2022 12:53:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fbayas@ueb.edu.ec
Similarity	5%
Analysis address	fbayas.ueb@analysis.arkund.com

Sources included in the report

Entire Document

Hit and source - focused comparison, Side by Side

Submitted text	As student entered the text in the submitted document.
Matching text	As the text appears in the source.



Ing. Ivan Marcelo Garcia Muñoz MSc.
DIRECTOR



Dra. Herminia Sanaguano PhD
REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

Este triunfo se la dedicó a mi Dios todo poderoso por iluminar, cuidar y guiarme durante este largo camino para conseguir uno de mis objetivos propuestos.

A mis queridos padres Camilo Pungaña y Cecilia Tualombo quienes fueron mi pilar fundamental en mi proceso de vida estudiantil, muchos de mis logros conseguidos han sido gracias a ustedes por su apoyo incondicional. A mi esposo Roberto y mi hija Camila por estar siempre junto a mí, quienes son mi motivo de superación para culminar una de mis etapas anheladas.

A mis hermanas/os, y a toda mi familia quienes permanentemente me apoyaron con espíritu alentador, a pesar de la distancia siempre están pendientes de mí, con su ejemplo de humildad y sencillez, este logro se los dedicó a todos ustedes y así puedan sentirse orgullosos de poderme ver profesional.

Fernanda Pungaña

DEDICATORIA

Este triunfo se la dedicó a dios todo poderoso por mantenerme con salud y permitirme conseguir uno de mis objetivos propuestos.

A mi madre, Marina Pungaña mi hermana Dolores Pungaña, por su apoyo incondicional y económico durante todo este tiempo, y de manera especial a mi mamá que ha sido mi inspiración y un gran ejemplo, motivándome día a día a seguir adelante y no dejarme vencer a pesar de los obstáculos presentados en el camino. Gracias por ser parte de mi vida, para ti mami es todo esto.

A mis hermanas/os, y a toda mi familia quienes permanentemente me apoyaron con espíritu alentador, con su ejemplo de humildad y sencillez, este logro se los dedicó a todos ustedes y así puedan sentirse orgullosos de poderme ver profesional.

Stalin Pungaña

AGRADECIMIENTO

A mi Dios por darnos la vida, y sobre todo su sabiduría y fuerzas para realizar este proyecto de titulación anhelado hace tiempo atrás.

Un eterno agradecimiento a mis padres, y a mi esposo por su apoyo económico, palabras de aliento, conmovedoras de luchar y salir adelante en todo el transcurso de mi vida profesional, siendo ellos mi pilar fundamental y quienes arriesgan yendo muy lejos, para poder descubrir lo lejos que podemos llegar.

Un infinito agradecimiento a la Universidad Estatal de Bolívar en especial a la Carrera de Ingeniería Agroindustrial, por formar profesionales capaces de prestar servicio a la sociedad.

Mi agradecimiento sincero a los miembros del tribunal de titulación en especial a los ingenieros: Marcelo García, Favian Bayas y Herminia Sanaguano por brindarnos sus conocimientos, sabiduría y sobre todo su disposición prestada en todo momento del proceso experimental y de redacción del proyecto investigativo. A mis compañeras/os de clases quienes se han convertido en mi segunda familia a lo largo de los años de estudio, con los que hemos compartido momentos únicos de felicidad y tristeza, quienes han sido de una y otra forma el apoyo para lograr uno de los objetivos anhelados.

Fernanda Pungaña

AGRADECIMIENTO

A mi Dios por darnos la vida, y sobre todo su sabiduría y fuerzas para realizar este proyecto de titulación anhelado hace tiempo atrás.

Un eterno agradecimiento a mi madre a mi hermana por su apoyo económico, palabras de aliento, conmovedoras de luchar y salir adelante en todo el transcurso de mi vida profesional, siendo ellos mi pilar fundamental y quienes arriesgan yendo muy lejos, para poder descubrir lo lejos que podemos llegar.

Un infinito agradecimiento a la Universidad Estatal de Bolívar en especial a la Carrera de Ingeniería Agroindustrial, por formar profesionales capaces de prestar servicio a la sociedad.

Mi agradecimiento sincero a los miembros del tribunal de titulación en especial a los ingenieros: Marcelo García, Favian Bayas y Herminia Sanaguano por brindarnos sus conocimientos, sabiduría y sobre todo su disposición prestada en todo momento del proceso experimental y de redacción del proyecto investigativo. A mis compañeras/os de clases quienes se han convertido en mi segunda familia a lo largo de los años de estudio, con los que hemos compartido momentos únicos de felicidad y tristeza, quienes han sido de una y otra forma el apoyo para lograr uno de los objetivos anhelados.

Stalin Pungaña

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTO.....	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVI
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY.....	XVIII
CAPITULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos.....	2
1.1.1. Objetivo General.....	2
1.1.2. Objetivos Específicos.....	3
1.2. Problema.....	4
1.2.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2.2. Situación problemáticas.....	4
1.2.3. Formulación del problema.....	4
1.2.4. Sistematización del problema.....	5
CAPÍTULO II	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Género <i>Arcobacter</i> spp.....	6
2.1.1. Antecedentes históricos.....	6
2.1.2. Taxonomía de <i>Arcobacter</i> spp.....	6
2.1.3. Características del género <i>Arcobacter</i> spp.....	7
2.1.4. Morfología.....	8
2.1.5. Distribución.....	9

2.2.	Transmisión y enfermedades	9
2.2.1.	Afecciones que provocan la especie <i>Arcobacter</i> spp	9
2.2.2.	Epidemiología.....	10
2.3.	Suero lácteo.....	10
2.3.1.	Producción	10
2.4.	Aislamiento microbiano.....	11
2.5.	Tinción de Gram	11
2.5.1.	Bacterias Gram negativa.....	12
2.5.2.	Bacterias Gram positiva.....	12
2.6.	Pruebas bioquímicas	12
2.6.1.	Catalasa.....	12
2.6.2.	Ureasa	13
2.6.3.	Reducción de nitrato	13
2.7.	Extracción y amplificación de ADN por PCR.....	13
2.7.1.	Extracción de ADN	13
2.7.2.	Caracterización molecular	13
2.7.3.	Amplificación por PCR	14
2.7.4.	Electroforesis	14
2.8.	Fluoroquinolonas	14
2.8.1.	Clasificación de las fluoroquinolonas	15
2.8.2.	Ciprofloxacino	15
2.8.3.	Levofloxacino	16
2.9.	Resistencia antimicrobiana	16
2.10.	Pruebas de susceptibilidad	16
2.11.	Normas de bioseguridad en los laboratorios microbiológicos	16
2.11.1.	Equipos de Seguridad (Barreras Primarias)	18
CAPÍTULO III	19

3. MARCO METODOLÓGICO	19
3.1. Ubicación de la investigación	19
3.2. Localización de la investigación.....	19
3.3. Situación geográfica y climática.....	19
3.4. Zona de vida.....	20
3.5. Materiales.....	20
3.5.1. Material Experimental	20
3.5.2. Materiales de laboratorio	20
3.5.3. Equipos	21
3.5.4. Reactivos	22
3.5.5. Materiales de oficina	23
3.6. Métodos	24
3.6.1. Factores en estudio	24
3.6.2. Combinación de tratamientos	24
3.6.3. Características del experimento.....	25
3.6.4. Diseño experimental.....	25
3.6.5. Analisis de varianza.....	25
3.6.6. Pruebas de rangos múltiples	26
3.7. Metodología experimental	26
3.8. Aislamiento de la bacteria <i>Arcobacter</i> spp	28
3.9. Condiciones de desarrollo de <i>Arcobacter</i> spp	28
3.10. Caracterización de <i>Arcobacter</i> spp mediante microscopía y pruebas bioquímicas	28
3.10.1. Proceso de tinción de Gram.....	28
3.10.2. Caracterización de microorganismos mediante pruebas bioquímicas.....	29
3.11. Extracción y amplificación de ADN mediante PCR.....	30
3.11.1. Extracción de ADN	30

3.11.2. Amplificación de ADN mediante la técnica de PCR	30
3.12. Actividad antimicrobiana frente fluoroquinolonas	32
CAPÍTULO IV.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Resultado del aislamiento de <i>Arcobacter</i> spp	34
4.2. Resultados del desarrollo de <i>Arcobacter</i> spp.....	35
4.3. Resultados de la caracterización mediante microscopia y pruebas bioquímicas..	39
4.3.1. Microscopia mediante tinción de Gram.....	39
4.3.2. Pruebas bioquímicas	42
4.4. Resultado de la extracción y amplificación de ADN por PCR.....	43
4.4.1. Concentración del ADN extraído	43
4.4.2. Amplificación del ADN de <i>Arcobacter</i> spp mediante PCR	45
4.5. Análisis de la actividad antimicrobiana	47
4.6. Comprobación de hipótesis.....	51
4.6.1. Hipótesis nula (H ₀).....	51
4.6.2. Hipótesis alterna (H ₁).....	51
4.6.3. Verificación de la hipótesis	51
4.7. Conclusiones y recomendaciones	52
4.7.1. Conclusiones.....	52
4.7.2. Recomendaciones	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	61
GLOSARIO.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	DESCRIPCIÓN	Pág
Tabla 1.	Taxonomía de <i>Arcobacter</i> spp.....	7
Tabla 2	Descripción general de la clasificación de las fluoroquinolonas.....	15
Tabla 3.	Localización de la investigación.....	19
Tabla 4.	Parámetros geográficos y climáticos de la provincia Bolívar	19
Tabla 5.	Factores en estudio para el cultivo de <i>Arcobacter</i> spp	24
Tabla 6.	Combinación de factores	24
Tabla 7.	Características del experimento.....	25
Tabla 8.	ADEVA (Análisis de varianza)	26
Tabla 9.	Lugares de recolección de muestra.....	27
Tabla 10.	Reactivos para la mezcla de reacción en PCR.....	31
Tabla 11.	Condiciones para la reacción de PCR.....	32
Tabla 12.	Criterios de interpretación	33
Tabla 13.	Codificación del número de muestras	34
Tabla 14.	Descripción de la identificación de los aislados obtenidos	35
Tabla 15.	Análisis de varianza para el crecimiento microbiano.....	37
Tabla 16.	Pruebas de LSD al 95% de confianza para el crecimiento microbiano.....	38
Tabla 17.	Identificación de la bacteria Gram negativa	39
Tabla 18.	Descripción de los resultados de las pruebas bioquímicas	42
Tabla 19.	Concentración del ADN	44
Tabla 20.	Actividad antimicrobiana frente a levofloxacina y ciprofloxacina frente <i>Arcobacter</i> spp.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	DESCRIPCIÓN	Pág
Figura 1.	Morfología del <i>Arcobacter</i> spp, 100 X por microscopia	8
Figura 2.	Crecimiento microbiano.....	38
Figura 3.	Interacción de AB	39
Figura 4.	Bacteria Gram positiva, microscopia de campo 100X.....	41
Figura 5.	Bacteria Gram negativa, microscopia de campo 100X.....	41
Figura 6.	Electroforesis de los resultados de PCR de aislados de <i>Arcobacter</i> spp	45
Figura 7.	Electroforesis de los resultados de PCR de aislados de <i>Arcobacter</i> spp	46
Figura 8.	Actividad antimicrobiana de <i>Arcobacter</i> spp frente a las flouroquinolonas.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°	DESCRIPCIÓN	Pág
Anexo 1.	Mapa de ubicación de la investigación	61
Anexo 2.	Codificación de las muestras recolectadas	62
Anexo 3.	Resultados de la identificación de los aislados obtenidos	63
Anexo 4.	Resultados de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	64
Anexo 5.	Resultado de las pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y reducción de nitrito) .	65
Anexo 6.	Resultados de la concentración del ADN	66
Anexo 7.	Resultados de la actividad antimicrobiana	67
Anexo 8.	Recolección de la materia prima.....	69
Anexo 9.	Aislamiento del <i>Arcobacter</i> spp	70
Anexo 10.	Condiciones de desarrollo del <i>Arcobacter</i> spp	71
Anexo 11.	Microscopia por tinción de Gram	72
Anexo 12.	Pruebas bioquímicas	73
Anexo 13.	Extraer y amplificar ADN por PCR	74
Anexo 14.	Actividad antimicrobiana	75

RESUMEN

Las bacterias del género *Arcobacter spp* fueron observados por primera vez en 1881 por el investigador alemán Escherich, desde aquel entonces a este patógeno se le asocia con enfermedades intestinales, tanto en personas como en animales, también se le ha incluido al grupo causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), ya que se encuentra con frecuencia en la cadena alimentaria. Por esta razón en nuestra investigación se planteó como objetivo, caracterizar molecularmente en los aislados *Arcobacter spp* a partir de muestras de sueros lácteos procedentes de las queseras de la parroquia Salinas, cantón Guaranda, provincia Bolívar, para lo cual se aisló la bacteria del género *Arcobacter* de muestras de suero lácteo en medio APT, luego se estudió las condiciones de desarrollo a 30 y 37°C en medio con y sin suplemento CAT (Cefoperazona-Amphotericina-B-Teicoplanina), se caracterizó al microorganismo mediante tinción de Gram y pruebas bioquímica de catalasa, ureasa y reducción de nitrato, posterior a ello se les extrajo el ADN y se amplificó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), finalmente se realizó la actividad antimicrobiana frente a dos flouroquinolonas. Tras la aplicación de los métodos descritos, los resultados fueron: de las 50 muestras de suero lácteo 28 muestras presentaron colonias translucidas y fueron incubadas a condiciones de microaerofilia, mediante tinción de Gram se determinó que la mayoría de aislados fueron Gram (-) y por pruebas bioquímicas se confirmó la existencia de *Arcobacter spp*. La concentración del ADN extraído fue de una media 12,1 ng/μL, tras la PCR, se confirmó que las 28 cepas pertenecían al género *Arcobacter*, en la actividad antimicrobiana, el microorganismo fue susceptible al antibiótico de control levofloxacina, mientras que para la ciprofloxacina algunas muestras presentaron resistencia al antibiótico.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, *Arcobacter spp*, tinción de Gram, ureasa, catalasa, colonias, alícuota, APT, cultivo nutritivo.

SUMMARY

Bacteria of the genus *Arcobacter* spp were observed for the first time in 1881 by the German researcher Escherich, since then this pathogen has been associated with intestinal diseases, both in people and in animals, it has also been included in the group that causes diseases foodborne diseases (ETAs), as it is frequently found in the food chain. For this reason, in our research, the objective was to characterize molecularly in the *Arcobacter* spp isolates from samples of dairy serums from the cheese factories of the Salinas parish, Guaranda canton, Bolívar province, for which the bacterium of the *Arcobacter* genus was isolated. from whey samples in APT medium, then the growth conditions were studied at 30 and 37°C in medium with and without CAT supplement (Cefoperazone-Amphotericin-B-Teicoplanin), the microorganism was characterized by Gram stain and tests biochemistry of catalase, urease and nitrate reduction, after which the DNA was extracted and amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction), finally the antimicrobial activity against two fluoroquinolones was performed. After the application of the methods described, the results were: of the 50 samples of whey, 28 samples presented translucent colonies and were incubated under microaerophilic conditions, by Gram staining it was determined that the majority of isolates were Gram (-) and by Biochemical tests confirmed the existence of *Arcobacter* spp. The concentration of the extracted DNA was of an average 12,1 ng/μL, after the PCR, it was confirmed that the 28 strains belonged to the *Arcobacter* genus, in the antimicrobial activity, the microorganism was susceptible to the control antibiotic levofloxacin, while for the Ciprofloxacin some samples showed resistance to the antibiotic.

Key words: Antimicrobial activity, *Arcobacter* spp, Gram stain, urease, catalase, colonies, aliquot, APT, nutrient culture.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años, se ha identificado gran número de enfermedades humanas, la mayoría de las enfermedades son de origen infeccioso e incluyen aquellas causadas por bacterias, virus, parásitos patógenos, incluso existen enfermedades no clasificadas como las encefalopatías espongiiformes, muchas de éstas son de origen animal, debido a la transmisión de patógenos de otros animales a los humano, tal es el caso de *Arcobacter spp*, una bacteria emergente, asociada a alimentos y de gran importancia en salud pública. (FAO & OPS, 2017, p. 29)

Existen muchas bacterias con diferentes estructuras, metabólicas y adaptación, el género *Arcobacter spp* se caracteriza por la presencia de microorganismos libres ampliamente distribuidos en el ambiente, así como su presencia en la microflora intestinal de diversos animales (Fernández & Jaramillo, 2016, p. 664). A este patógeno también se le ha incluido en el grupo causantes de las enfermedades transmitidas por alimento (ETAS), dado a que es considerado como un patógeno emergente con una distribución global, que se encuentra con frecuencia en la cadena alimentaria, este microorganismo sobrevive en los productos alimenticios, en el agua y por su resistencia al estrés creado durante el procesamiento y almacenamiento. (Ferreira *et al.*, 2019, p. 10)

Mediante técnicas de microscopia se puede clasificar las bacterias Gram negativas y Gram positivas, lo que permite tener una aproximación a la morfología de las bacterias, mediante la técnica de Tinción Gram, las bacterias Gram positivas y Gram negativas se tiñen de diferente color por medio de una serie de reactivos que genera una coloración que permite distinguirlas (Bastidas & Vaca, 2018, p. 23). Las pruebas bioquímicas permiten identificar microbios que han sido aislados de diferentes ambientes, de entre estas pruebas tenemos:

catalasa, ureasa, oxidasa, prueba de citrato, prueba de indol, prueba de la lactosa, reducción de nitrato, prueba del Rojo de Metil, Manitol-Movilidad. (Soto , 2018, p. 2)

La DNA polimerasa es muy importante en los procesos de amplificación por PCR, la cual permite la extensión de secuencias específicas de DNA o RNA, se emplea en distintas aplicaciones biológicas y en diversos campos como: la forense, la medicina, biotecnología, microbiología, algunas de las aplicaciones en la que se utiliza la técnica de PCR son el diagnóstico enfermedades genéticas, infecciones bacterianas y virales, investigación en evolución molecular, clonación, genética de poblaciones, identificación de individuos, expresión de genes. (Forero, 2017, p. 8)

El lactosuero o también conocido como suero de leche se obtiene a partir de la separación del coágulo de la leche en el proceso de elaboración del queso, es un líquido translúcido de color verde, se consigue mediante acción enzimática, tal es el caso de la renina (enzima digestiva de los rumiantes) que rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones (sólida y líquida), tiene una alta calidad nutrimental, contiene proteínas, grasa, minerales, vitaminas y una cantidad importante de aminoácidos esenciales. (Amador, 2020, p. 11)

Para el aislamiento e identificación bacteriana a partir de muestras de suero lácteo procedentes de las queseras de la parroquia Salinas y sus comunidades se plantearon los siguientes objetivos:

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

- Caracterizar molecularmente en los aislados *Arcobacter spp* a partir de muestras de sueros lácteos procedentes de las queseras de la parroquia Salinas, cantón Guaranda, provincia Bolívar.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Aislar bacterias del género *Arcobacter* a partir de muestras de sueros lácteos.
- Estudiar condiciones de desarrollo del microorganismo utilizando medios de cultivo y específicos.
- Caracterizar de forma inicial los microorganismos obtenidos mediante microscopia y pruebas bioquímicas.
- Extraer y amplificar ADN mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
- Realizar el estudio de la actividad antimicrobiana mediante la utilización de fluoroquinolonas mediante cultivo e inactivación del material genético obtenido.

1.2. Problema

1.2.1. Planteamiento del problema

El suero lácteo es un subproducto resultante de la elaboración del queso, la cual representa un 80 al 90% del volumen total de la leche y contiene un 50% de los nutrientes de la misma. (Amador, 2020, p. 11)

Dicho subproducto es utilizado en una amplia elaboración de bebidas lácteas, y en zonas rurales simplemente es vertido en los campos o es utilizado como suplemento alimenticio para los animales. El mal manejo del lacto suero puede suponer un foco de contaminación con los microorganismos patógenos y posteriormente ser transmitidas a las personas ocasionando enfermedades de salud pública.

1.2.2. Situación problemáticas

Se desconoce los microorganismos que están presentes en los sueros lácteos procedentes de las queseras de la parroquia Salinas y sus comunidades, además, no se ha realizado estudios de aislamiento e identificación del género *Arcobacter spp*, ya que es una bacteria emergente, asociada a alimentos y de gran importancia en la salud pública.

1.2.3. Formulación del problema

La presente investigación tiene como finalidad identificar al microorganismo *Arcobacter spp* en el suero lácteo, y mediante el análisis de actividad antimicrobiana dar a conocer el antibiótico eficaz para controlar al dicho microorganismo. Por lo tanto, la pregunta de investigación fue la siguiente:

¿Se identificaron microorganismos del género *Arcobacter spp* en las muestras de suero lácteo procedentes de las queseras de la parroquia Salinas y sus comunidades?

1.2.4. Sistematización del problema

Para la ejecución de la investigación y cumplir con el objetivo principal se plantearon las siguientes interrogantes:

¿Qué método se utiliza para el aislamiento microbiano?

¿Cuál es el suplemento y la temperatura de incubación para el crecimiento microbiano?

¿Qué técnica de microscopia y pruebas bioquímicas determina la identificación del microorganismo?

¿El ADN extraído confirma la presencia de *Arcobacter spp*?

¿Presentan resistencia a los antibióticos fluoroquinolonas?

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Género *Arcobacter* spp

Dentro de la familia *Campylobacteraceae* se encuentra el género *Arcobacter* spp, *Campylobacter* y *sulfurospirillum*, algunas de sus especies, especialmente *Arcobacter butzleri*, ha sido clasificado como un patógeno intestinal emergente y potencial agente zoonótico, el *Arcobacter* es una bacteria Gram negativa móvil y posee un flagelo polar en uno o en ambos lados de la célula, crecen en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en un amplio rango de temperaturas 15 a 42 °C, algunas especies del género *Arcobacter* spp han sido aisladas en las superficies de plantas de procesamiento cárnicos, en plantas de tratamiento de agua para la potabilización, en las alcantarillas de aguas servidas, en las aguas de río y de mar. (Montes, 2020, p. 18); (Fernández, 2018, p. 6)

2.1.1. Antecedentes históricos

Las bacterias del género *Arcobacter* spp fueron observados por primera vez en 1881 por el alemán Escherich a partir de heces de niños con diarrea, hace aproximadamente 20 años fue definido como el género *Campylobacter* y han tomado una gran importancia debido a que es considerado como enteropatógenos emergentes y potenciales agentes de carácter zoonótica. (Beltrán, 2018, p. 6)

2.1.2. Taxonomía de *Arcobacter* spp

El género *Arcobacter* spp incluye especies involucradas en la producción de enfermedades intestinales y sistémicas en animales y humanos, su taxonomía está basada principalmente en el análisis del gen ARNr 16S, los géneros en la actualidad comprenden 25 especies con una diversidad genética significativa. (Figueras *et al.*, 2018, p. 46)

Tabla 1***Taxonomía de Arcobacter spp***

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
Familia I	<i>Camphylobacteraceae</i>
Género I	<i>Arcobacter</i>
Género II	<i>Campylobacter</i>
Género III	<i>Sulfurospirillum</i>

Fuente: (Alveal, 2019, p. 6)

El género ***Arcobacter spp*** forma parte de la familia ***Camphylobacteraceae*** que junto con las familias ***Helicobacteraceae***, ***Hidrogenimonaceae*** conforman el orden ***Campylobactereceae*** de las ***Epsilonproteobacterias***, actualmente este género comprende 25 especies, aislados de una gran diversidad de hospedadores y nichos ecológicos, se transmiten generalmente a través de fuentes de agua y alimentos contaminados. (Sauca, 2018, p. 7)

2.1.3. Características del género *Arcobacter spp*

Es una bacteria Gram negativa con un tamaño de 0,2 a 0,9 µm de ancho y 0,5 a 3,0 µm de largo en forma de S cuando están en cultivos jóvenes y de forma conoide o esférica en cultivos viejos, es un organismo que se puede desarrollar óptimamente a 37 °C. (Andrade, 2017, p. 6)

Las colonias de ***Arcobacter spp*** generalmente carecen de pigmento, sus especies tienen actividad oxidasa, reaccionan negativamente con el rojo de metileno y con Voges-Proskauer, excepto ***A. mytili*** y ***A. molluscorum***, la mayoría de las especies reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato, son quimioattractivos y utilizan una variedad de fuentes de carbono, como ácidos orgánicos y aminoácidos (Alveal, 2019, p. 9)

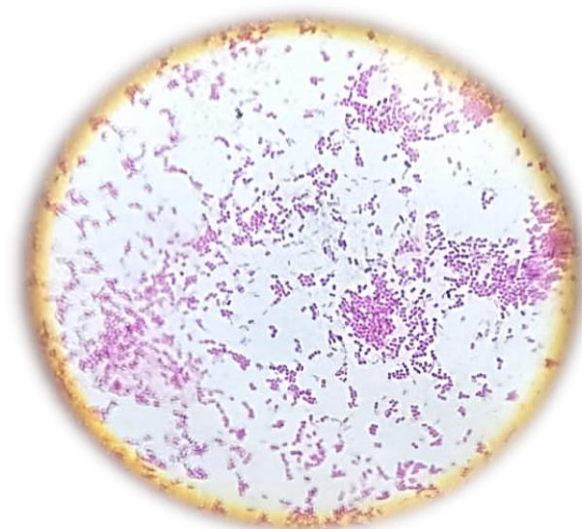
Entre sus características, a diferencia del género *Campylobacter*, se encuentra una especie que puede crecer en el rango de temperatura de 15 a 42 °C, en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, en el 2002, se describió como producto metabólico una bacteria marina autótrofa oxidante de azufre que podría producir hifas de azufre hidrofílicas, los análisis genéticos lo ubican en el género *Arcobacter spp* y se le ha denominado "*Candidatus Arcobacter sulfidicus*", pero aún no se dispone de una descripción oficial. (Rivera, 2015, p. 1)

2.1.4. Morfología

En la figura se muestra la morfología de *Arcobacter spp* mediante microscopia tinción de Gram 100X, bacilo Gram negativo ligeramente curvado y helicoidal.

Figura 1

Morfología del Arcobacter spp, 100 X por microscopia



Mediante tinción de Gram el género *Arcobacter spp*, reacciona al reactivo cambiando de coloración a morado lo cual se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo no esporulado, algunas especies poseen un movimiento de sacacorchos a través de un flagelo polar que se despegan de ambos extremos de la célula. (Ferreira *et al.*, 2017 p. 73)

2.1.5. Distribución

El género *Arcobacter spp* se encuentra en ganado vacuno, porcino, ovino, caprino, en pollo aves de corral, como también en fetos de aborto porcinos y bovinos, productos cárnicos, moluscos y leche, también se les ha encontrado en superficie de plantas procesadoras de carne, de agua potable, de alcantarillas, agua de río y de mar. (Ocampo, 2017, p. 25)

2.2. Transmisión y enfermedades

La infección puede ocurrir por contaminación cruzada durante la manipulación de alimentos, consumo de alimentos contaminados de origen animal, agua de bebida contaminada o por contaminación directa con heces, provocando un problema de salud pública y una causa importante de morbilidad, este problema se acrecienta con la aparición de nuevas formas de transmisión, en grupos poblacionales vulnerables, y el incremento de la resistencia bacteriana, las infecciones humanas causadas por agentes patógenos por ejemplo *Salmonella spp*, *E. coli* patogénica, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, las intoxicaciones provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, mohos productores de micotoxinas, entre otros, producen un gran número de muertes a nivel mundial (Palomino *et al.*, 2018 p. 484), la vía de trasmisión a las personas es a través oral, por la ingesta de carnes crudas o insuficientemente cocidas, leche sin pasteurizar, aguas y mariscos contaminados, provocando cuadros de diarrea. (Vásconez, 2019, p. 16)

2.2.1. Afecciones que provocan la especie *Arcobacter spp*

Mena (2018), menciona que la mayoría de las de las infecciones causadas por *Arcobacter spp* permanecen asintomáticos y solo pocas presentan condiciones clínicas, actualmente se desconoce las afecciones de esta especie de *Arcobacter spp* debido a la escasa información que existe, por otro lado Vidal (2017), en relación con enfermedades gastrointestinales en humanos establece en las especies *Arcobacter butzleri* y *Arcobacter*

cryaerophilus y en menor medida *Arcobacter skirrowii* y *Arcobacter thereius*, tanto en los estudios de población como en casos clínicos específicos, siendo el principal síntoma asociado con *A. butzleri* una diarrea acuosa crónica persistente en contraste con la diarrea aguda con sangre.

2.2.2. Epidemiología

El género *Campylobacter spp* es un patógeno alimentario que pone resistencia a los antibióticos, siendo considerado como agente etiológico de diarrea en humanos en los países desarrollados y en los países en vía de desarrollo, son mundialmente conocidos por generar *Campilobacteriosis*, enfermedad que puede transmitirse entre animales y seres humanos (zoonosis). (Mardones & López, 2017, p. 74)

Los mecanismos de patogenicidad de las diferentes especies de *Arcobacter spp*, son pocos conocidas, la adhesión, invasión y citotoxicidad contribuyen al potencial patogénico de estas bacterias, provocando diarrea agudas en las personas, el principal contagio de estas bacterias es provocado por consumo de carne de ave mal cocida y es más frecuente en niños de corta edad, en América Latina existen casos de estudios sobre la prevalencia de esta bacteria en caninos y aves de corral, así mismo en Ecuador no existe datos sobre su frecuencia. (Paguanquiza, 2016, p. 18)

2.3. Suero lácteo

El lacto suero es un líquido translúcido con una coloración verdoso, subproducto de la industria quesera obtenida de la separación del coágulo de leche resultado de la elaboración de quesos. (Ronquillo & Tigse, 2016, p. 14)

2.3.1. Producción

La industria láctea produce alrededor de 200 millones de toneladas de suero de leche anualmente a través de la producción de queso. Las estadísticas muestran que una gran parte de estos desechos se vierten como aguas residuales, lo que crea un grave problema ambiental

porque afecta la composición física y química del suelo, reduce el rendimiento de los cultivos agrícolas y al verterse en el agua, reduce la vida acuática por agotar las sustancias disueltas. (Rodríguez *et al.*, 2020, p. 168)

En la provincia Bolívar, los principales productores de la leche se encuentra en el sector de la Parroquia Salinas del cantón Guaranda, entre ella la empresas comunitarias de Salinas y la Cooperativa de Producción Agropecuaria el Salinerito (PRODUCCOOP), proveen la producción diaria de leche, de la cual el 18% se emplea en la elaboración de quesos frescos, 80% en quesos maduros y el 2% para yogurt natural y con sabor a fresa y durazno, del cual el suero lácteo representa el 80 al 90% del volumen total de la leche. (Jiménez *et al.*, 2016, p. 12)

2.4. Aislamiento microbiano

Es separar un tipo de microorganismo a partir de una población heterogénea de microorganismos con el objetivo de obtener colonias bien separadas de las que se conseguirá un cultivo puro, para estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, de un microorganismo en particular, se debe tener en cuenta que el aislamiento se da en un medio sólido de cultivo, mientras que el medio líquido sirve para enriquecer para el desarrollo microbiano. (Mora & Bravo, 2017, p. 29)

2.5. Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica muy adecuada en el análisis microbiológico. Destaca como técnica de tinción diferencial porque, gracias al uso de colorantes, permite agrupar las bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas. Esta técnica fue desarrollada en 1884 por el científico danés Hans Christian Gram y en la actualidad se considera uno de los métodos de eliminación de manchas más utilizados debido a su eficacia, sencillez y bajo costo. (Moncada, 2022, p. 11)

2.5.1. Bacterias Gram negativa

Este tipo de bacterias está formado por membrana citoplasmática, espacio periplasmático o periplasma, varían de Gram positivas debido a que toman el último colorante utilizado en la técnica Gram, que es la safranina, por lo que pueden tornarse rojas, esta coloración se debe a que las bacterias Gram negativas poseen una fina capa de peptidogluano. (Maldonado, 2018, p. 5)

2.5.2. Bacterias Gram positiva

Su principal ventaja es la presencia de varias capas de peptidoglicano con ácidos teicoicos, cuya estructura consiste en polímeros de fosfato de rebitol o fosfato de glicerol unidos al ácido acetilmurámico, lo que permite a la célula estabilizar la pared celular, también puede actuar como antígenos de superficie y unirse a receptores específicos que se encuentran en las células huésped, por las razones anteriores, es posible reconocer bacterias Gram positivas, y se puede observar un color púrpura en su citoesqueleto, debido a que tienen varias capas de su propio peptidoglicano. (Samudio, 2017, p. 17)

2.6. Pruebas bioquímicas

Nos permiten estudiar la clasificación de los microorganismos, por lo general se puede determinar su sexo, y en algunos casos se puede determinar su especie, tienen un conjunto de pruebas confiable a las cepas de *Agrobacterium*. (Tandapilco, 2020, p. 45)

2.6.1. Catalasa

La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromos, los organismos que no poseen el sistema de citocromos, carecen de la enzima catalasa, dicha enzima descompone el peróxido de hidrógeno en O₂ y H₂O, químicamente es una hemoproteína, de estructura similar a la hemoglobina. (Alarcón *et al.*, 2017, p. 1561)

2.6.2. Ureasa

Una prueba diseñada para identificar la enzima ureasa, realizada utilizando el medio de cultivo de urea de Christensen, en el que las bacterias utilizan la urea como única fuente de nitrógeno. Se utiliza para detectar bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Proteus* que resulten positivas para esta prueba. (Silva, 2020, p. 13)

2.6.3. Reducción de nitrato

Se utiliza para asignar bacterias a la familia *Enterobacteriaceae*, y la identificación de bacilos Gram positivos Aerobios, el nitrato se utiliza como fuente de nitrógeno para muchas bacterias y hongos, pero la molécula tiene que ser degradada para ser utilizada, y se aplica para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos. (Jimbo, 2018, p. 36)

2.7. Extracción y amplificación de ADN por PCR

2.7.1. Extracción de ADN

Para el método tradicional de extracción se utiliza solventes orgánicos para separar a las proteínas y lípidos del ADN con el fin de aislar por precipitación con un solvente, estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede durar varias horas, y están basados en membrana de sílica, lo que facilita la adsorción de ADN a la membrana cargada positivamente para lograr el aislamiento de ADN integro con calidad y cantidad adecuadas, libre de contaminantes e inhibidores; garantizando el diagnóstico molecular, disminuyendo falsos negativos, y mejorando su sensibilidad. (Tarqui *et al.*, 2019, p. 424)

2.7.2. Caracterización molecular

Hace referencia al uso de marcadores moleculares, como el ADN, el ARN y las proteínas, para determinar las características genéticas de una célula o tejido, es una herramienta útil para medir la diversidad genética, estos revelan polimorfismo a nivel de

ácido desoxirribonucleico (ADN), pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta y se encuentran en todo el ADN del individuo. (Pérez et al., 2019, p. 174)

2.7.3. Amplificación por PCR

La PCR es una técnica rápida, sensible y específica que amplifica exponencialmente el ADN de una sola especie en diferentes ciclos y temperaturas a partir de un par de cebadores, sin embargo, existe una variación de la PCR clásica, la PCR multiplex en tiempo real (PCR cuantitativa, qPCR), que permite la amplificación de dos o más secuencias de ADN en una sola reacción (Arias *et al.*, 2018, p. 113). La amplificación *in vitro* de ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta útil en el diagnóstico microbiológico. (Chero *et al.*, 2017, p. 681)

2.7.4. Electroforesis

Es una técnica de alta resolución que permite la separación de complejas mezclas de proteínas, la separación ocurre en dos etapas, e la primera instancia las proteínas son separadas en función de su carga a lo largo de un gel con gradiente de pH, cada proteína avanza en el campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH donde su carga es igual a cero, en la segunda instancia las proteínas son separadas de acuerdo a su peso molecular, a partir de esta separación se genera un patrón de proteínas que es digitalizado con una imagen mediante el escaneo del gel. (Villegas *et al.*, 2019, p. 77)

2.8. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son un grupo de antibióticos frecuentemente prescritos y de amplio espectro que actúan inhibiendo a las enzimas encargadas de la replicación, transcripción, reparación y recombinación del ADN bacteriano, estos grupos antimicrobianos que ha presentado un aumento progresivo de consumo ambulatorio a través de los años. (González *et al.*, 2018, p. 577)

2.8.1. Clasificación de las fluoroquinolonas

Las quinolonas o fluoroquinolonas se clasifican en cuatro generaciones con base a su actividad antimicrobiana y sus parámetros farmacéuticos.

Tabla 2

Descripción general de la clasificación de las fluoroquinolonas

Generación	Fluoroquinolona	Actividad microbiológica
Primera	Ácido nalidíxico	Enterobacterias
Segunda	Lomefloxacino	Enterobacterias, cobertura mejorada contra gramnegativos, patógenos atípicos, <i>pseudomonas aeruginosa</i>
	Norfloxacino	
	Ofloxacino	
	Ciprofloxacino	
Tercera	Levofloxacino	<i>Enterobacterias, estreptococos,</i> patógenos atípicos
	Gemifloxacino	
	Gatifloxacino	
Cuarta	Moxifloxacino	<i>Enterobacterias, estreptococos,</i> patógenos atípicos, <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> <i>meticilino</i> susceptibles, anaerobios
	Trovafloxacino	
Otros	Grepafloxacino Cinoxacina Enoxacina	<i>Streptococos,</i> patógenos atípicos, <i>Enterobacterias</i>

Fuente: (Chávez, 2020, pp. 3)

2.8.2. Ciprofloxacino

Se prescribe para tratar o prevenir determinadas infecciones bacterianas, tiene amplio espectro de acción según el nivel de actividad, es una fluoroquinolona de segunda generación, por lo que tiene mayor actividad ante gérmenes. (González *et al.*, 2018, p. 579)

2.8.3. Levofloxacin

El levofloxacin es el L-isómero del ofloxacin, ha demostrado actividad mejorada de cierta forma contra Gram positivos, sin embargo, los datos de susceptibilidad muestran al levofloxacin como menos potente que ciprofloxacino contra agentes Gram negativos como *pseudomonas aeruginosa* y cierto tipo de *enterobacterias*. (Martinez *et al.*, 2020, p. 608)

2.9. Resistencia antimicrobiana

Los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones para sobrevivir, y esta adaptación les permite adquirir mecanismos de resistencia a la ATM (antimicrobiano) que dan como resultado la inactivación terapéutica, objetivos celulares alterados o permeabilidad alterada. Por lo tanto, la resistencia a los antibióticos determina el éxito del tratamiento contra *H. pylori*. Esta bacteria es la principal responsable de reducir las tasas de erradicación. (Guzmán, 2016, p. 19)

2.10. Pruebas de susceptibilidad

Una prueba de susceptibilidad a los antibióticos identifica el patrón de susceptibilidad o resistencia de un organismo a un grupo de ATM (antimicrobiano) según la determinación de la MIC (concentración mínima inhibidora), que se define como la concentración más baja de un antibiótico que puede inhibir el crecimiento microbiano visible después de la incubación. (Hilarión, 2020, p. 3)

2.11. Normas de bioseguridad en los laboratorios microbiológicos

La seguridad biológica constituye un conjunto de medidas científicas organizativas y técnicas destinadas a proteger al trabajador en las instalaciones del laboratorio microbiológico, así como a la comunidad y el medio ambiente del riesgo que entraña el trabajo con agentes biológicos (Vásquez *et al.*, 2019, p. 65).

Centro de Control y Prevención de Enfermedades (2018), determina los siguientes parámetros de bioseguridad que se debe cumplir en laboratorio microbiológico.

- lavar las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio.
- No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo.
- Los alimentos se almacenan fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores designados y utilizados con este único fin.
- Está prohibido pipetear con la boca; se utilizan dispositivos pipeteadores mecánicos.
- Se instituyen políticas para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.
- Todos los procedimientos se llevan a cabo con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.
- Las superficies de trabajo se descontaminan como mínimo una vez por día y luego de todo derrame de material viable.
- Todos los cultivos, stocks y otros desechos reglamentados se descontaminan antes de ser desechados mediante un método de descontaminación aprobado
- Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato se embalan de conformidad con las normas locales, estatales y federales aplicables antes de retirarlos del establecimiento.
- Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio cuando se encuentren presentes agentes infecciosos.

2.11.1. Equipos de Seguridad (Barreras Primarias)

- Se recomienda el uso de delantales o uniformes de laboratorio a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar.
- Se deben usar guantes si existen lastimaduras en las manos o si la piel presenta alguna erupción. Deben existir alternativas disponibles al uso de guantes de látex empolvados.
- Se debe utilizar protección ocular para los procedimientos en los que se puedan producir salpicaduras de microorganismos u otros materiales peligrosos.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación de la investigación

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio General de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente e instalaciones del Departamento de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar.

3.2. Localización de la investigación

En la presente tabla, se detalla la localidad donde se realizó la investigación.

Tabla 3

Localización de la investigación

Ubicación	Localidad
País	Ecuador
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Veintimilla
Sector campus	Laguacoto II
Dirección	Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

3.3. Situación geográfica y climática

Se detalla los parámetros geográficos y climáticos del lugar de investigación.

Tabla 4

Parámetros geográficos y climáticos de la provincia Bolívar

Parámetro	Valor
Altitud	2640 msnm
Latitud	01°34'15" S
Longitud	79°0'02" W
Temperatura mínima	8°C
Temperatura media anual	14.8°C
Temperatura máxima	21°C
Humedad relativa promedio	75%

Fuente. Tomados de INAMHI (2020)

3.4. Zona de vida

Laboratorio General de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente y los laboratorios de Departamento de Investigación y Vinculación der la Universidad Estatal de Bolívar, lugar donde se desarrolló la investigación, según Leslie Holdridge, corresponde a la zona de bosque húmedo montano bajo (BHMB).

3.5. Materiales

3.5.1. Material Experimental

- Suero lácteo

3.5.2. Materiales de laboratorio

- Material de vidrio y plástico
- Pipetas
- Cajas Petri
- Asas de siembra
- Mechero
- Torundas
- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf
- Microtubos eppendorf
- Medios de cultivo
- Tampones de carga y reacción en gel
- Tampón 1X
- dNTPs: 0,2 mM/cada
- MgCl₂: 1,5mM
- Iniciadores: 0,5 μM/cada

- Taq Polimerasas: 5U
- Marcadores de peso moleculares
- Kit de extracción de ADN
- Micropipetas
- Micropuntas

3.5.3. Equipos

- Autoclave (Biobase, B7511, China)
- Termoblock (Rocker, Sahara 320, Taiwan)
- Microcentrífuga (Labnet, D810704, USA)
- Congelador (LG, 707TRCN06731, Corea del Sur)
- Nanodrop (Thermo Scientific, AZY17073808, USA)
- Agitador Vortex (Fisher Scientific, E193271, China)
- Balanza digital (Ohaus, B705643621, USA)
- Termociclador (Techne, TC300, EE.UU)
- Incubadora (Mettler, Alemania)
- Cámara de flujo laminar (Inglobal, Colombia)
- Transiluminador (Uvitec, 08200896, Japón)
- Panel de UV (Dark reader, 14736, USA)
- Panel de electroforesis (Clever scientific, 170523012, USA)
- Plancha magnética
- Cuenta colonias
- Termómetro

3.5.4. Reactivos

- Filtro de membrana (Oxoid, 1789, España)
- Arcobacter Broth (Oxoid, CM0965, Inglaterra)
- Bacto Agar (Bd, 214010, USA)
- Campy-Gen (Thermo Scientific, CN0025A, USA)
- Mueller Hinton (Acumedia, 71014, Alemania)
- CAH1am 5'- TTAACCCAACATCTCACGAC - 3' (Forward) (Eurofins)
- CAH1b 5'- AACACATGCAAGTCGAACGA - 3' (Reverse) (Eurofins)
- DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, 00631669, Lituania)
- Water, nuclease – free (Thermo Scientific, 00623393, Lituania)
- Buffer TAE 50X (Invitrogen, 24710-030, USA)
- Agarose (Molecular Biology Grade, A049-100GM, USA)
- Blue/Orange 6X (Promega, G190A, USA)
- 5X Green GoTaq® (Pomega, M891A, USA)
- Diamod™ (Promega, H118A, USA)
- Agua peptona tamponada (APT)
- Alcohol 69%
- Levofloxacin
- Ciprofloxacina
- Agua destilada
- Violeta de genciana
- Lugol
- Fucsina básica / Safranina
- Aceite de inmersión
- Peróxido de oxígeno

- Extractó de levadura
- Fosfato mono potásico
- Fosfato disódico
- Urea
- Rojo fenol
- Agar manitol (Oxoid, CM0085, Inglaterra)
- Nitrato de potasio
- Cristal violeta
- Genomic Elution Buffer
- Nuclei Lysis Solution
- Proteinase K Solution
- RNase OUT™ Recombinante
- Etanol 50%
- Genomic Wash Buffer I
- Wash Buffer I
- Genomic Wash Buffer II
- Wash Buffer II

3.5.5. Materiales de oficina

- Libreta de apuntes
- Computadora
- Impresora
- Papel bond
- Esferográficos
- Cámara fotográfica digital
- Memoria flash y calculadora

3.6. Métodos

3.6.1. Factores en estudio

Para el desarrollo de la presente investigación, en el aislamiento de microorganismos del género *Arcobacter spp* se tomó en cuenta los siguientes factores de estudio.

Tabla 5

Factores en estudio para el cultivo de Arcobacter spp

Factores	Código	Niveles
Enriquecimiento del medio	A	a ₁ = Sin suplemento a ₂ = CAT (cefoperazona-amphotericina-B-teicoplanina)
Temperaturas de incubación	B	b ₁ = 30 °C b ₂ = 37 °C

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

3.6.2. Combinación de tratamientos

En la tabla 6, que se presenta a continuación, se describe las combinaciones de los factores A×B, el cual consta de enriquecimiento del medio y temperatura de incubación.

Tabla 6

Combinación de factores

	Código	Descripción de combinación de factores	
		A	B
1	a ₁ b ₁	Medio sin suplemento	Incubado a 30°C
2	a ₁ b ₂	Medio sin suplemento	Incubado a 37°C
3	a ₂ b ₁	Medio en CAT	Incubado a 30°C
4	a ₂ b ₂	Medio en CAT	Incubado a 37°C

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

3.6.3. Características del experimento

En la siguiente tabla se detallan las características del experimento, donde cada unidad experimental estaba formada por 100 mL de suero.

Tabla 7

Características del experimento

Detalle	
Factor en estudio	2
Factor A	2
Factor B	2
Tratamientos	4
Repeticiones	3
Unidades experimentales	12
Tamaño unidad experimental	100 mL

Tamaño experimental; las muestras fueron preparadas en 90 mL agua peptonada (APT) + 10 mL suero lácteo. *Experimentales*. (Pungaña & Pungaña, 2022)

3.6.4. Diseño experimental

El modelo que se aplicó la presente investigación, fue bajo el diseño DCA sin arreglo factorial de combinación $2 \times 2 \times 3$.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Siendo: μ es el efecto global, A_i efecto de i -ésimo nivel del factor A; $i = 1, \dots, a$, B_j efecto de j -ésimo nivel del factor B; $j = 1, \dots, b$, AB_{ij} efecto de la interacción entre los factores AB y E_{ijk} es el error experimental de la unidad ji .

3.6.5. Análisis de varianza

En la presente tabla se presenta el análisis de varianza (Anova), para los diferentes factores y niveles de estudio.

Tabla 8*ADEVA (análisis de varianza)*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	F tablas
Factor A	$a - 1$	SC_A	CM_A	CM_A/CM_E	gl_A/gl_E
Factor B	$b - 1$	SC_B	CM_B	CM_B/CM_E	gl_B/gl_E
Interacción AB	$(a-1)(b-1)$	SC_{AB}	CM_{AB}	CM_{AB}/CM_E	gl_{AB}/gl_E
Error	$ab(n - 1)$	SC_E	CM_E		
Total	$nab - 1$	SC_T			

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

3.6.6. Pruebas de rangos múltiples

Para establecer las medias del mejor tratamiento, se aplicó pruebas de diferencia mínima significativa (LSD).

Modelo de LSD

$$LSD = t_{n-k; \alpha/2} \sqrt{\hat{S}_E^2 \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

Siendo: LSD es la diferencia mínima significativa, k número de observaciones, n_i n_j tamaño muestrales de los niveles i e j , \hat{S}_E^2 estimación de la varianza de error o residual.

3.7. Metodología experimental

▪ Obtención de la muestra

Las muestras se obtuvieron de las diferentes queseras de la parroquia de Salinas y sus comunidades perteneciente al cantón Guaranda de la provincia Bolívar, como se evidencia en la Tabla 9.

- **Tipo de muestreo**

Las muestras recolectadas fueron los sueros lácteos obtenidos después de la elaboración del queso de forma aleatorio simples, Tabla 9.

En la tabla de muestreo, se da a conocer los lugares donde se recolectaron el suero lácteo.

Tabla 9

Lugares de recolección de muestra

Lugares	Codificación	# muestras
Salinas	S	6
Capina	C	1
Verdepamba	V	11
Pambabuela	P	1
Mercedes de Pumin	M	4
Apahua	A	4
San Vicente	Sv	3
Ramos	R	3
Natahua	N	3
Pachancho	Pch	3
Arrayanes	Arr	2
Yavubiana	Y	3
Yurauksha (Andes)	A	3
Gramalote	G	3
Total		50

Nota: De las 28 comunidades que conforma Salinas, se recolectaron muestras de suero de 14 comunidades, del cual una comunidad pertenece a clima cálido (Gramalote).

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

- **Transporte y conservación**

Los sueros lácteos fueron recolectados en recipientes de plástico previamente esterilizados, etiquetados y trasladados en un cooler hasta el Laboratorio de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar en un lapso de 6 horas, finalmente se colocaron en refrigeración hasta su posterior estudio.

3.8. Aislamiento de la bacteria *Arcobacter* spp

Para el aislamiento de *Arcobacter* spp se tomaron en total 50 muestras de suero lácteo de las diferentes queseras de las comunidades de Salinas.

Las muestras de suero lácteo recolectadas, se homogenizo en 90 mL de APT (Agua peptona tamponada) + 10 mL de suero láctico, las cuales fueron colocadas en 50 tubos eppendorf y conservadas durante 24 h bajo condiciones de refrigeración.

3.9. Condiciones de desarrollo de *Arcobacter* spp

Para el desarrollo microbiano se tomó de la investigación realizada por Vázquez (2021). Las alícuotas de suero lácteo más APT fueron colocados sobre filtro de membrana (Oxoid, 1789, España) previamente colocados en cajas Petri de *Arcobacter* spp agar con 5% de sangre de oveja (agar sangre) con suplemento y sin suplemento de acuerdo al diseño establecido, de las cuales, cada uno de las 50 muestras fueron pipeteadas en 150 μ L del medio enriquecido (APT + suero) y posteriormente colocados sobre filtro de la membrana, para finalmente incubar a 37 °C durante 5 min. Transcurrido este tiempo, los filtros de membrana fueron retirados con una pinza estéril y los medios fueron dejados a incubar en una jarra de anaerobiosis bajo condiciones microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) que se genera utilizando el Campy-Gem e incubados a 30°C y 37 °C por 48 h conforme al diseño. Finalmente, las cajas con crecimiento de colonias translucidas de *Arcobacter* spp fueron trasladadas a refrigeración para ser analizadas mediante microscopía y pruebas bioquímicas.

3.10. Caracterización de *Arcobacter* spp mediante microscopía y pruebas bioquímicas

3.10.1. Proceso de tinción de Gram

Para la caracterización microscópica de *Arcobacter* spp, de las cajas Petri se tomaron una porción de colonia bacteriana el cual se procedió a fijar en el porta objetos colocando con una gota de agua destilada y se dejó reposar durante 10 min, posteriormente se aplicó

una gota de violeta genciana dejando actuar durante 60 seg, luego se procedió a incorporar una gota de lugol dejando actuar por 60 seg más, se realizó el primer lavado con agua destilada, siguiendo con el proceso, se agregó alcohol de 65 a 70% y se dejó actuar durante 30 seg, para posteriormente colocar fucsina básica dejando actuar durante 180 seg luego se realizó el segundo lavado con agua destilada. La muestra se observó en el microscopio utilizando el objetivo 40X y 100X en la que se distinguió al *Arcobacter spp* en forma de bastones y de color rosada o rojas, en el caso del objetivo 100X se utilizó aceite de inmersión.

3.10.2. Caracterización de microorganismos mediante pruebas bioquímicas

- **Catalasa**

De la caja Petri, se tomó una colonia aislada de cultivo bacteriano y se colocó en un porta objetos, dejando caer sobre ella una gota de peróxido de hidrogeno. Esta prueba se considera positiva si se produce la formación de burbujas, caso contrario es negativa.

- **Ureasa**

Se procedió a formar un caldo de urea modificado que está compuesto por 500 mL de agua destilada, 10g de urea al 100%, 0,05g de rojo fenol y 0,2 mL de ácido clorhídrico al formar el compuesto se vertió en el medio de cultivo, para luego ser pasada a los tubos de ensayo, en la que se le diluyó una porción de colonia bacteriana llevándolas a incubación a 37 °C por 24 h. Para la observación de los resultados, es positivo cuando el color toma a rojo cereza debido a la alcalinización del mismo por producción de amonio y es negativo se mantiene al color inicial del medio.

- **Reducción de nitrato**

Preparar el medio agar manitol (Oxoid, CM0085, Inglaterra) con 1 g/L de nitrato de potasio para revelar la presencia de nitritos, sembrar en el medio las colonias de *Arcobacter spp* aisladas con una simple estría e incubar a 37 °C por 24 h. Para la interpretación de los

resultados se observa cambio de coloración, si es positivo es ligeramente amarillo o blanquecino, negativo su color no ha cambiado.

3.11. Extracción y amplificación de ADN mediante PCR

3.11.1. Extracción de ADN

Las unidades de centrifugación son: Svedberg ($1S=10^{-3}$ segundos), FCR =11,17*
Rmax (RPM/100)², Se tomaron las cepas de las colonias bacterianas y se centrifugaron a 5000 xg por 10 min en la que se le añadió 20 μ L de proteínasa K (BioBasic, 12352202, USA), las cuales fueron incubadas a 56 °C por 30 min, posteriormente se homogenizó en el vortex (Thermo Scientific, M37615, China) con 20 μ L de RNase, y 200 μ L de solución de lisado para seguidamente añadir 400 μ L de etanol a 50%. Para la extracción del ADN se utilizó el kit (GeneJET Genomic DNA Purification) (Invitrogen, 2337897, EE.UU) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Este sistema combina las ventajas de una base de silicio con un formato de micro-columna, eliminando la necesidad de resinas costosas y compuestos orgánicos peligrosos, la presencia de sales caotrópicas fuertes inactivan las nucleasas intracelulares, mientras que los tampones de extracción protegen los ácidos nucleicos aislados de la destrucción de nucleótidos. (Bayas, 2016)

▪ Medición de la concentración del ADN

Para la medición de la concentración del ADN microbiano se realizó en el equipo espectrofotómetro UV Nanodrop (Thermo Scientific, AZY17073808, USA) en el cual, con una micropipeta se colocó 1 μ L de muestra en el pedestal y en la pantalla se mostró la concentración final.

3.11.2. Amplificación de ADN mediante la técnica de PCR

Para determinar la identidad de los aislados de *Arcobacter spp*, se realizó un ensayo de PCR, en la que se utilizó un volumen final de 50 μ L, la cual contiene 45 μ L de la mezcla y 5 μ L de ADN molde.

En la siguiente tabla se muestra la concentración de los reactivos para formar la mezcla.

Tabla 10

Reactivos para la mezcla de reacción en PCR

Reactivos		Concentración
Tampón	Sigma-Aldrich, USA	1X
DNTPs	Sigma-Aldrich, USA	0,2 mM/cada
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, USA	1,5 mM
Iniciadores	Sigma-Aldrich, USA	0,5 μM/cada
Taq polimerasa	Sigma-Aldrich, USA	5 U

X: concentración; mM: número de moles de cada uno; μM: micromol; U: unidades.

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

La mezcla se realizó a partir de una solución a base de agua Mill Q y adicionada los reactivos antes mencionados, continuando con el proceso la mezcla más el ADN molde se procedió a llevar al termociclador según las condiciones que se especifica en la tabla 10.

Para la amplificación mediante PCR se utilizó un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, utilizando los siguientes parámetros.

- **CAH1am:** 5'- TTAACCCAACATCTCACGAC - 3' (Forward)
- **CAH1b:** 5'- AACACATGCAAGTCGAACGA - 3' (Reverse)

En la siguiente tabla se detalla el proceso de ampliación, que se ejecutó según las condiciones que se especifica.

Tabla 11*Condiciones para la reacción de PCR*

Nº de ciclos	T °C	Tiempo	Fases
1	94	2 min	Desnaturalización
	94	30 seg	Desnaturalización
30	52	30 seg	Unión de iniciadores
	72	90 seg	Extensión
1	72	10 min	Extensión

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

- **Técnicas de electroforesis de ADN**

Los productos que se formaron resultantes de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa molecular biology grade al 1,2 % en tampón TAE 1 X (Sigma-Aldrich, USA), con la adición de 1 µL de Green golanq (Invitrogen™ 24710-030, USA,), la cual fue expuesta a 100 voltios durante 60 min, Se utilizó 1 µL de producto de PCR previamente mezclado con 2 µL de tampón de carga, para poder estimar el tamaño de los fragmentos del ADN amplificados, en cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares de 100-pb Bench Top 100-pb (Promega, G829B, USA), finalmente los fragmentos se observaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV).

3.12. Actividad antimicrobiana frente fluoroquinolonas

Para el análisis de la actividad antimicrobiana, se realizó con los antibióticos Ciprofloxacino y Levofloxacino del grupo fluoroquinolonas frente a los aislados de *Arcobacter spp*, para los antibióticos se utilizó el método de difusión en disco placa de (Kirby Bauer).

En un tubo eppendorf se colocó 1000 µL de agua destilada y se añadió una porción de la bacteria *Arcobacter spp* hasta obtener un color blanquecino, posteriormente se realizó

la siembra en el medio agar Mueller Hinton se procedió a realizar poros en el centro del medio para colocar los antibióticos según corresponda a las concentraciones de 10-15-20 mg/1ml, posteriormente fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Finalmente, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición de los discos y los resultados fueron interpretados de acuerdo a los criterios establecidos para *Campylobacter* según el Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2020) dado que los géneros *Arcobacter spp* y *Campylobacter* pertenecen a la misma familia.

En la siguiente tabla se detalla los criterios de sensibilidad según (CLSI, 2020).

Tabla 12

Criterios de interpretación

Antibiótico	Concentración	Diámetro (mm)			CMI (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
Ciprofloxacino	5 µg	26	22-25	21	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacino	5 µg	26	-	16	≤ 1	2	≥ 4

S: sensible; R: resistente; I: intermedia

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultado del aislamiento de *Arcobacter* spp

Se tomaron un total 50 muestras de suero lácteo de las diferentes queseras de las comunidades de la parroquia de Salinas y fueron trasladadas al laboratorio de Investigación y Vinculación, posteriormente al Laboratorio General de la Universidad Estatal de Bolívar.

Para el aislamiento microbiano, se tomó como referencia el método de Vásquez (2021), con la siguiente modificación, 90 mL de APT + 10 mL de suero lácteo y se logró obtener una alícuota de 1,5 μ L.

Tabla 13

Codificación del número de muestras

Lugar de procedencia	Código	Número Muestras
Salinas	S	6
Capina	C	1
Verdepamba	V	11
Pambabuela	P	1
Mercedes de Pumín	M	4
Apahua	A	4
San Vicente	Sv	3
Ramos	R	3
Natahua	N	3
Pachancho	Pch	3
Arrayanes	Arr	2
Yavubiana	Y	3
Yurauksha (Andes)	A	3
Gramalote	G	3
Total		50

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

4.2. Resultados del desarrollo de *Arcobacter* spp

En la siguiente tabla se muestra los resultados del crecimiento microbiano.

Tabla 14

Descripción de la identificación de los aislados obtenidos

N°	Código	Procedencia	Cultivo inicial	Colonias translucidas	N° Colonias
1	M1	S	+	?	0
2	M2	C	+	?	1
3	M3	M	+	?	1
4	M4	P	-	-	0
5	M5	V	+	-	0
6	M6	An	+	-	0
7	M7	S	+	?	0
8	M8	M	+	+	2
9	M9	V	+	+	1
10	M10	An	+	?	1
11	M11	M	+	-	0
12	M12	An	+	+	0
13	M13	V	-	-	0
14	M14	M	+	?	0
15	M15	V	-	-	0
16	M16	A	+	+	2
17	M17	V	+	+	0
18	M18	V	+	?	0
19	M19	V	+	?	1
20	M20	V	+	+	0
21	M21	V	+	+	2
22	M22	S	+	-	1
23	M23	S	+	+	1
24	M24	S	+	-	0
25	M25	S	+	-	0
26	M26	Sv	+	-	0
27	M27	Sv	+	+	1
28	M28	Sv	+	+	1
29	M29	R	+	-	0
30	M30	R	+	+	1
31	M31	R	+	-	0
32	M32	N	+	-	0
33	M33	N	+	+	1
34	M34	N	+	+	2
35	M35	Pch	-	-	0
36	M36	Pch	+	+	1
37	M37	Pch	+	+	1
38	M38	V	-	-	0
39	M39	V	-	?	1
40	M40	Arr	-	-	0
41	M41	Arr	-	-	0
42	M42	Y	-	+	0
43	M43	Y	-	-	0
44	M44	Y	+	+	1
45	M45	A	-	-	0
46	M46	A	+	+	1
47	M47	A	+	+	1
48	M48	G	+	+	1
49	M49	G	-	-	0
50	M50	G	-	-	0

En la tabla 14, se evidencia las 50 muestras aisladas de *Arcobacter spp*, obtenidas de las diferentes comunidades de las queseras de Salinas, donde se evidencia el código, número de muestras, la existencia y la no existencia de crecimiento microbiano.

Los resultados obtenidos de las 50 muestras, se evidenció que las 11 muestras no crecieron en el cultivo inicial (-) procedente de (P, V, Arr, A, G), mientras que 10 muestras mostraron crecimiento múltiple, aunque no se identificaron colonias translucidas procedentes de (M, V, A, N, S, Sv, Pch, Arr, Y). Por otro lado, 20 muestras mostraron crecimiento absoluto (+) procedentes de (S, C, M, V, A, R, Sv, N, Pch, Y, G) y 9 muestras fueron de posible crecimiento (?) procedentes de (S, C, M, V).

Las colonias de *Arcobacter spp* presentaron características morfológicas concretas como tamaño pequeño o puntiformes y de aspecto traslúcido, las mismas características que identifico Vásquez (2021), en el estudio realizado de la detección de la presencia de *Arcobacter spp* y *Helicobacter pylori* en vegetales orgánicos. En nuestro estudio se puede demostrar probablemente que la temperatura de 30 y 37 °C es un factor fundamental para el crecimiento de *Arcobacter spp*, no obstante, el suplemento CAT (cefoperazona-amphotericina-B-teicoplanina) como facilitador del crecimiento si influye significativamente en el desarrollo del microorganismo y sus etapas metabólicas. En el trabajo de Hualpa *et al.*, (2020), demostraron también que el suplemento CAT es un factor preponderante al momento de aislar bacterias del género *Arcobacter spp*, de forma contrapuesta en la investigación realizada por Goyes (2020), demostró que el suplemento CAT no influye en el crecimiento de *Arcobacter spp*, de igual manera Simaluiza *et al.*, (2020), demostró que la incubación a 30 °C en el caldo de enriquecimiento CAT, no influyen en el crecimiento de la bacteria.

Por otro lado, en la investigación desarrollada por Sauca (2018), realizó un aislamiento de *Arcobacter spp* a partir de leche cruda de las 50 muestras extraídas, la misma

cantidad a la de nuestra investigación, dando como resultado 41 muestras positivas al microorganismo, mientras que en nuestro trabajo, de las 50 muestras se aislaron 37 muestras del microorganismo, la diferencia de este resultado se debe a la materia de estudio y al lugar de procedencia.

Tabla 15

Análisis de varianza para el crecimiento microbiano

Fuente de variación	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Razón-F	Valor-ρ
Modelo	52	33,80	0,65	2,08	0,0003
Muestras de suero lácteo	49	20,55	0,42	1,34	0,0935
Factor A	1	12,01	12,01	38,37	0,0001*
Factor B	1	0,84	0,84	2,70	0,01024*
AB	1	0,41	0,41	1,29	0,2571NS
Error	147	45,99	0,31		
Total	199	79,80			

*= *Diferencia significativa*

NS= *Diferencia estadística no significativa*

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la tabla se evidencia el análisis de varianza del crecimiento microbiano, donde el valor-ρ muestra que existe diferencia estadística con un 95% de confiabilidad para el factor A (Enriquecimiento del medio) y para el factor B (Temperatura de incubación) dado que su valor es menor a 0,05; por lo tanto, se determinó que existe diferencia estadística significativa sobre el crecimiento microbiano con un 95% de nivel de confianza, este resultado concuerda con Alveal (2019), donde informa que la temperatura de incubación y el suplemento CAT influye en el crecimiento microbiano, beneficiando directamente en el desarrollo de colonias numerosas.

Para determinar el nivel de incidencia en los factores sobre el crecimiento microbiano, se aplicó prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD), debido a que existe en un factor diferencia significativa con un 95% de nivel de confianza.

Tabla 16

Pruebas de LSD al 95% de confianza para el crecimiento microbiano

Tratamiento	Casos	Media LS	E.E	Grupos Homogéneos
a ₂ b ₂	50	1,96	0,08	A
a ₂ b ₂	50	1,74	0,08	A
a ₂ b ₁	50	1,38	0,08	B
a ₁ b ₁	50	1,34	0,08	B

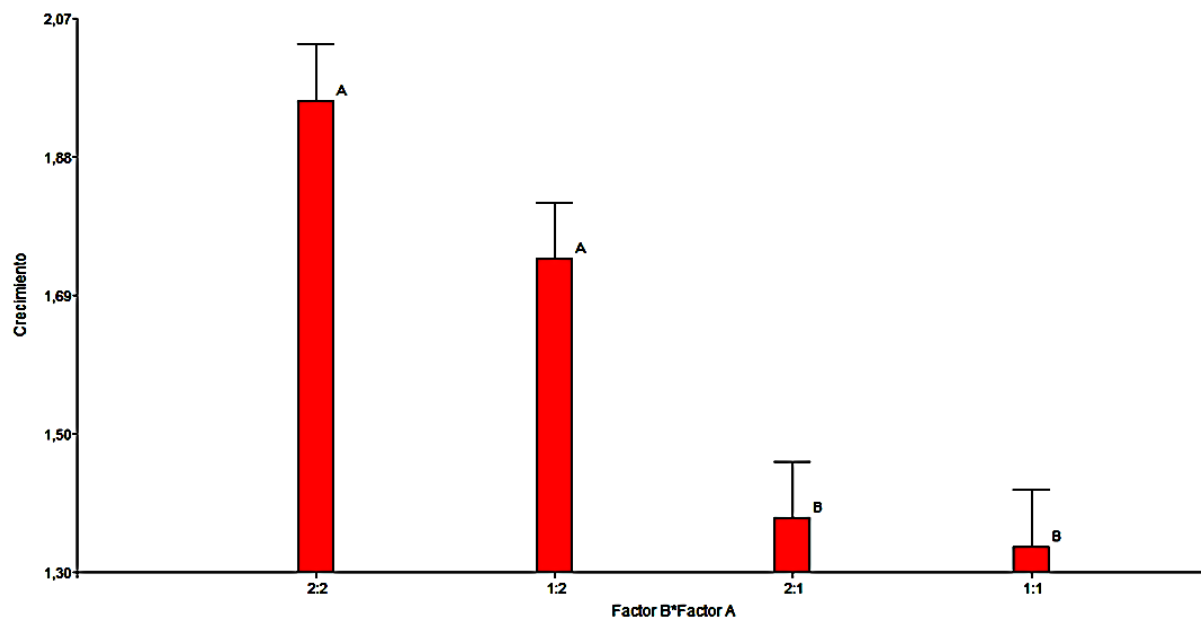
Interpretación de las medias. 1= crecimiento nulo, 2=crecimiento medio, 3= crecimiento bueno

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la tabla se muestra que dos tratamientos son iguales en dos grupos homogéneos, pero cabe destacar que la media más alta corresponde al tratamiento a₂b₂ (T4) con un valor de 1,96 con un crecimiento microbiano medio.

Figura 2

Crecimiento microbiano

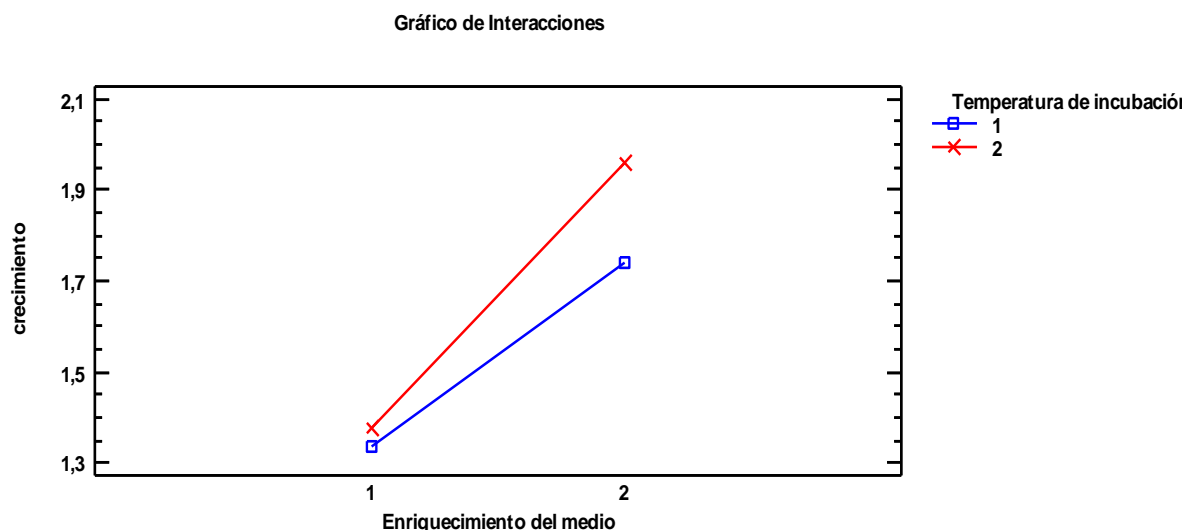


Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

De manera gráfica se representa el crecimiento microbiano, donde que se observa que el factor A incide en el desarrollo del microorganismo.

Figura 3

Interacción de AB



Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la figura 3, se observa que las líneas de tendencia si presentan interacción, tanto del factor A y del factor B.

4.3. Resultados de la caracterización mediante microscopia y pruebas bioquímicas

4.3.1. Microscopia mediante tinción de Gram

De las 50 muestras aisladas, 22 muestras presentaron crecimiento bacteriano y se analizaron mediante tinción de Gram para confirmar si se trata de la bacteria Gram negativo.

Tabla 17

Identificación de la bacteria Gram negativa

Nº	Código	Procedencia	Nº Colonia	Reacción
1	M2	C	1	G-
2	M3	M	1	G-
3	M8	M	1	G-
4	M8	M	2	G-
5	M9	V	1	G-
6	M16	A	1	G-

7	M16	A	2	G-
8	M19	V	1	G+
9	M21	V	1	G-
10	M21	V	2	G-
11	M22	S	1	G-
12	M23	S	1	G-
13	M27	Sv	1	G-
14	M28	Sv	1	G+
15	M30	R	1	G+
16	M34	N	1	G+
17	M34	N	2	G-
18	M36	Pch	1	G-
19	M37	Pch	1	G-
20	M39	V	1	G-
21	M46	A	1	G-
22	M48	G	1	G-

Color verde claro: Representa más un aislado bacteriano de una misma muestra

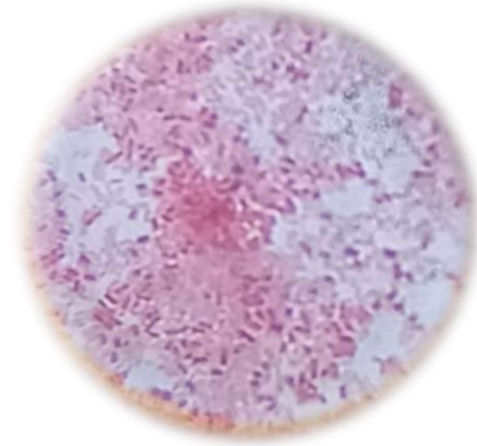
Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la tabla 17, se muestra el resultado de microscopia mediante tinción de Gram realizadas a las 18 muestras con sus 22 aislados resultantes tras cultivo (cuya característica de colonia es su translucidez), en la que se observa que 18 aislados de 16 muestras fueron Gram (-) y 4 aislados bacterianos fueron Gram (+). Los Gram (-) corresponden a la bacteria *Arcobacter spp* y está presente en la mayoría de las muestras procedentes de las queseras de las comunidades de Salinas. Loor *et al.*, (2021), mencionan que los bacilos Gram negativos son productores de β -lactamasas, provocando infecciones del tracto urinario, gastrointestinales, intraabdominales, nosocomiales, neumonía y meningitis.

En la siguiente figura se observa la bacteria Gram (+) y Gram (-) mediante tinción de Gram.

Figura 4

Bacteria Gram negativa, microscopia de campo 100X

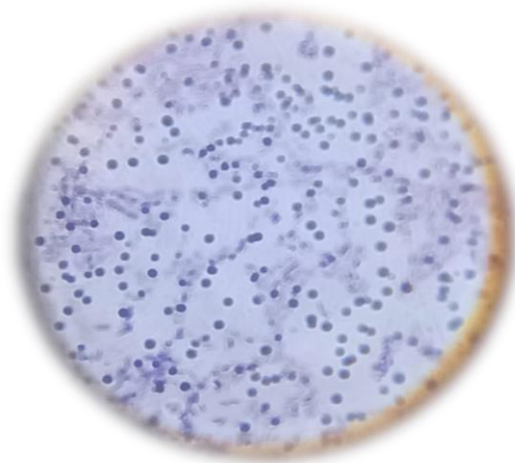


Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la figura 3, se observa la morfología microscópica de la bacteria Gram negativa, indicador de la presencia de *Arcobacter spp*, al presentar una coloración rosado tras realizar la tinción de Gram, posee características típicas de la bacteria en forma de bastones, curvados. En el análisis realizado mediante tinción de Gram por Rodriguez & Arenas (2018), manifiesta las mismas características identificadas en nuestra investigación, en efecto la posibilidad de la existencia de *Arcobacter spp* en la muestra de suero lácteo es de alta probabilidad.

Figura 5

Bacteria Gram positiva, microscopia de campo 100X



Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la figura se evidencia la morfología microscópica mediante tinción de Gram y se identifica que es una bacteria Gram positiva al presentar puntos de color violeta que se adquiere tras la reacción a la tinción de Gram, por lo tanto, las muestras de la presente coloración son desechadas de la investigación. Zeballos (2017), mediante tinción de Gram demostró que las bacterias Gram positivas, cambian de coloración a puntos de color violeta.

4.3.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas para ureasa, catalasa y reducción de nitrito confirmaron la identificación de este agente patógeno.

Tabla 18

Descripción de los resultados de las pruebas bioquímicas

Nº	Código	Procedencia	Nº Colonia	Catalasa	Ureasa	R. Nitrito
1	M2	C	1	+	+	+
2	M3	M	1	+	-	+
3	M8	M	1	-	+	+
4	M8	M	2	+	-	+
5	M9	V	1	+	+	+
6	M16	A	1	+	-	+
7	M16	A	2	-	-	+
8	M19	V	1	+	+	+
9	M21	V	1	+	-	+
10	M21	V	2	+	+	+
11	M22	S	1	-	+	-
12	M23	S	1	+	+	+
13	M27	Sv	1	+	+	+
14	M28	Sv	1	+	+	+
15	M30	R	1	+	+	-
16	M34	N	1	+	+	-
17	M34	N	2	+	+	+
18	M36	Pch	1	+	+	+
19	M37	Pch	1	-	-	+
20	M39	V	1	-	-	+
21	M46	A	1	+	+	-
22	M48	G	1	+	-	+

+: Positivo a *Arcobacter spp*; - : negativo a *Arcobacter spp*

Experimentales. (Pungaña & Pungaña, 2022)

De los 22 aislados presuntivos de *Arcobacter spp* de la tabla 18 se evidencia la reacción genómica de catalasa, ureasa y reducción de nitrato.

Las colonias de *Arcobacter spp* carecen de pigmentos, presentan actividad oxidativa y reaccionan negativamente al rojo metilo, la mayoría de las especies de este patógeno reducen nitratos. (Alveal, 2019)

Catalasa: 17 aislados positivos (+) para ya que se observaron formación de burbujas índice que muestra que es positivo y 5 negativos (-) ya que no existió dicha reacción.

Ureasa: 14 aislados dieron positivos (+) ya que su coloración fue rojo cereza y 8 negativos (-) se mantiene de color amarillo inicial del medio.

Reducción de nitrato: 18 aislados se observó ligeramente amarillo o blanquecino índice de ser positivo (+) y 4 negativos (-) no cambian de coloración.

Chiapparrone (2018), realizó pruebas bioquímicas de catalasa, ureasa, reducción de nitrito, en donde los signos positivos indican el crecimiento de bacterias de género *Campilobacter*, *Arcobacter spp*, *Helicobacter* y el signo negativo indica la ausencia del crecimiento del microorganismo además, Alveal (2019), realizó los mismos análisis de pruebas bioquímicas, en las que identificó ser positivos (+) en pruebas de catalasa, ureasa y reducción de nitrito de la especie *Arcobacter spp*, en otro estudio realizado por Mena (2018), se determinó la presencia de *Arcobacter spp* mediante pruebas bioquímicas, la identificación del microorganismo por análisis bioquímicas es complicado ya que dichos organismos son metabólicamente inertes, por lo tanto, el método PCR es el más adecuado para la identificación del mismo.

4.4. Resultado de la extracción y amplificación de ADN por PCR

4.4.1. Concentración del ADN extraído

En la tabla 19, se evidencia la concentración del ADN, de las cuales, 28 muestras se identificaron la concentración óptima del ADN para realizar amplificación mediante PCR.

Tabla 19*Concentración del ADN*

Nº	Código	Procedencia	Concentración
1	M1	S	54,2 ng/μL
2	M2	C	30,9 ng/μL
3	M3	M	23,8ng/μL
4	M8	M	20,6 ng/μL
5	M9	V	12,1 ng/μL
6	M10	An	20,0 ng/μL
7	M16	A	16,1 ng/μL
8	M18	V	14,0 ng/μL
9	M19	V	43,4 ng/μL
10	M21	V	35,7 ng/μL
11	M22	S	27,5 ng/μL
12	M23	S	13,4 ng/μL
13	M27	Sv	23,3 ng/μL
14	M28	Sv	15,5 ng/μL
15	M30	R	26,6 ng/μL
16	M31	R	21,1 ng/μL
17	M33	N	27,9 ng/μL
18	M34	N	22,5 ng/μL
19	M36	Pch	27,0 ng/μL
20	M37	Pch	29,2 ng/μL
21	M38	V	32,3 ng/μL
22	M39	V	32,7 ng/μL
23	M43	V	13,6 ng/μL
24	M45	A	33,9 ng/μL
25	M46	A	25,6 ng/μL
26	M47	A	25,8 ng/μL
27	M48	G	22,7 ng/μL
28	M49	G	13,8 ng/μL

Experimentadores. (Pungaña & Pungaña, 2022)

Los resultados de la concentración del ADN extraído de *Arcobacter spp*, se muestra en la tabla anterior, donde se evidencia la concentración de las 28 muestras aisladas de *Arcobacter spp* con una cantidad suficiente para ser analizada mediante PCR.

Los resultados de la concentración del ADN extraído de *Arcobacter spp* son superiores a 5 ng/μL, por lo que se puede decir, que la concentración de ADN es óptima para realizar pruebas de amplificación de ADN mediante la técnica PCR según Guamán (2017), además, en la investigación realizada de la concentración del ADN extraído de *Arcobacter spp* provenientes de muestras de quesos realizada por Goyes (2020), obtuvo valores superiores a 5,1 ng/μL, por lo tanto, en nuestro trabajo de investigación se extrajeron valores superiores a 12,1 ng/μL de concentración de ADN, es decir que dichas condiciones son ideales para la amplificación del ADN mediante PCR.

4.4.2. Amplificación del ADN de *Arcobacter spp* mediante PCR

El ADN extraído de los aislados bacterianos fue analizado y amplificado mediante la técnica PCR, donde se observaron los fragmentos en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV), como se evidencia en la figura 5 las 15 primeras de las 28 muestras analizadas.

Figura 6

Electroforesis de los resultados de PCR de aislados de Arcobacter spp



Nota. Amplificación del gen ARN de aislados de *Arcobacter spp* con gel de agarosa, C: marcador de pesos molecular 50 pb; L1: M1S; L2: M2C; L3: M3M; L4: M8M; L5: M9V; L6: M10An; L7: M16A; L8: M18V; L9: M19V; L10: M21V; L11: M22S; L12: M23S; L13: M27Sv; L14: M28Sv; L15: M30R.

En la figura se detalla el análisis de la PCR observadas mediante electroforesis donde L representa el número de aislados bacterianos, de las cuales 13 aislados resultaron positivo al microorganismo *Arcobacter spp* y 2 aislados, L7 y L12 mostraron ser negativos al microorganismo de interés, por lo tanto, en los sueros lácteos extraídos de las diferentes comunidades de Salinas se evidencia la presente del patógeno, a excepción de la muestra L7 (M16 Apahua) y L12 (M23 Salinas), pero eso no quiere decir que esté libre de otros microorganismos, porque el análisis realizado fue específicamente para el *Arcobacter spp*.

A continuación, en la figura 6, se muestra los resultados de electroforesis de los 13 aislados restantes de las 28 muestras.

Figura 7

Electroforesis de los resultados de PCR de aislados de Arcobacter spp



Nota. Amplificación del gen ARN de aislados de *Arcobacter spp* con gel de agarosa, C: marcador de pesos molecular 50 pb; L16: M32R; L17: M33N; L18: M34N; L19: M36Pch; L20: M37Pch; L21: M38V; L22: M39V; L23: M34V; L24: M45A; L25: M46A; L26: M47A; L27: M48G; L28: M49G

En la figura 6, se muestra los fragmentos amplificados resultantes de la PCR, donde se observan que todos los 13 son positivos al género *Arcobacter spp*, por lo tanto, en todas las muestras de lacto suero se evidencia la presencia del microorganismo de interés.

En la investigación realizada por Goyes (2020), confirmó la presencia de *Arcobacter spp* en quesos provenientes de mercados de Guaranda, en la que fueron sometidos a PCR y reconocidos mediante electroforesis, dichos resultados son muy similares al de nuestra investigación ya que obtuvieron 26 casos positivos al microorganismo.

Por otro lado, Mena (2018), afirma que la identificación y detección de la presencia de *Arcobacter spp*, se realiza de manera más confiable mediante técnicas moleculares, siendo la PCR una de las más específicas en la detección de especies de *Arcobacter spp*, en otra investigación realizada por Mottala *et al.*, (2021), detectaron una amplia presencia de *Arcobacter spp* en suelos, agua, heces, alimentos listos para el consumo y plantas de procesamiento, su contaminación se da por el mal proceso y mala manipulación, se puede decir que el microorganismo está presente en el suero lácteo procedentes de las mayorías de las muestras extraídas de las queseras de la parroquia Salinas y sus comunidades, para disminuir la contaminación de *Arcobacter spp* con los productos lácteos aplicar buenas prácticas de manufactura.

4.5. Análisis de la actividad antimicrobiana

A partir de los resultados de la PCR, en la que se demostró que 26 aislados fueron positivas para el *Arcobacter spp* de las cuales se realizó la actividad antimicrobiana frente a la Levofloxacin y Ciprofloxacina.

La interpretación de resultados se realizó según las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, 2020) y Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2019) para el género *Campylobacter spp*.

Tabla 20*Actividad antimicrobiana frente a levofloxacin y ciprofloxacina frente Arcobacter spp*

Código	Levofloxacin			Ciprofloxacina	
	mg/mL	Halo (mm)	Susceptibilidad	Halo (mm)	Susceptibilidad
M1S	10	34	S	31	S
	15	38	S	28	S
	20	37	S	20	R
M2C	10	39	S	32	S
	15	38	S	27	S
	20	39	S	29	S
M3M	10	34	S	16	R
	15	37	S	16	R
	20	38	S	20	R
M8M	10	36	S	33	S
	15	37	S	27	S
	20	35	S	32	S
M9V	10	33	S	26	S
	15	37	S	31	S
	20	39	S	28	S
M10An	10	36	S	30	S
	15	38	S	35	S
	20	40	S	36	S
M18V	10	36	S	31	S
	15	39	S	30	S
	20	38	S	28	S
M19V	10	37	S	20	R
	15	41	S	22	I
	20	40	S	28	S
M21V	10	37	S	24	I
	15	36	S	29	S
	20	38	S	34	S
M22S	10	34	S	34	S
	15	35	S	31	S
	20	37	S	37	S
M27Sv	10	33	S	25	I
	15	36	S	25	I
	20	37	S	24	I
M28Sv	10	32	S	32	S
	15	36	S	31	S
	20	31	S	32	S
M30R	10	36	S	30	S
	15	39	S	34	S
	20	38	S	20	R
M31R	10	36	S	30	S
	15	38	S	35	S
	20	40	S	36	S
M33N	10	37	S	28	S
	15	37	S	30	S
	20	39	S	25	I
M34N	10	32	S	29	S
	15	37	S	26	S
	20	37	S	29	S

M36Pch	10	36	S	24	I
	15	38	S	20	R
	20	39	S	21	R
M37Pch	10	36	S	19	R
	15	37	S	25	I
	20	36	S	30	S
M38V	10	35	S	32	S
	15	34	S	33	S
	20	36	S	32	S
M39V	10	36	S	30	S
	15	38	S	35	S
	20	40	S	36	S
M43V	10	35	S	23	I
	15	36	S	30	S
	20	35	S	26	S
M45A	10	38	S	30	S
	15	39	S	27	S
	20	38	S	29	S
M46A	10	37	S	30	S
	15	37	S	25	I
	20	39	S	34	S
M47A	10	34	S	31	S
	15	33	S	30	S
	20	35	S	33	S
M48G	10	37	S	24	I
	15	38	S	26	S
	20	36	S	21	R
M49G	10	38	S	27	S
	15	39	S	25	I
	20	38	S	26	S

R: Resistente, I: Intermedio, S: Susceptible.

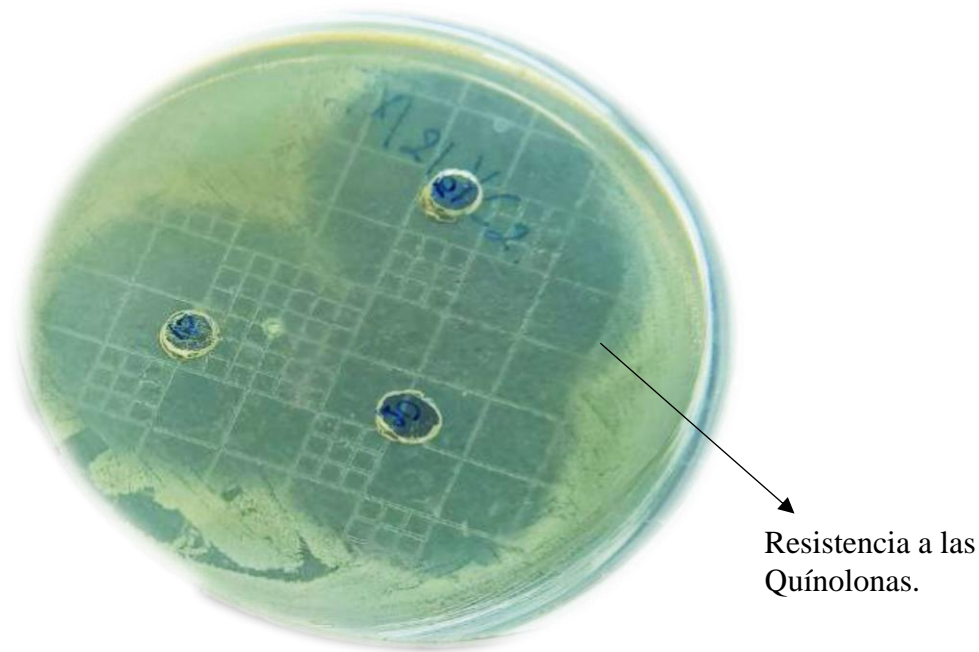
Experimentadores. (Pungaña & Pungaña, 2022)

En la tabla 20, se muestra los halos de inhibición de las fluoroquinolonas a diferentes concentraciones frente a aislados de *Arcobacter spp*, donde se detalla que las 26 muestras resultantes de la PCR todas son susceptibles al antibiótico de control levofloxacina, mientras que para la ciprofloxacina se evidenció que en algunas muestras existió resistencia intermedio a este antibiótico. EUCAST (2020), considera la susceptibilidad del género *Campylobacter* frente a los grupos de antibióticos fluoroquinolonas con un diámetro de halo ≥ 26 mm, del mismo modo el CLSI (2019). La familia *Enterobacteriaceae* pertenece al género Gram negativas en la que se encuentra el *Arcobacter spp*, determina la resistencia del microorganismo al antibiótico de control levofloxacina con halos de inhibición ≤ 16 mm de diámetro, de igual manera el CLSI (2020), comprueba la susceptibilidad del género

Campylobacter frente a la ciprofloxacina con halos de inhibición ≥ 26 mm de diámetro. En otro estudio realizado por Abbasi *et al.*, (2018), informaron la susceptibilidad del 65,6% del antibiótico ciprofloxacina frente al microorganismo, por lo tanto, considerando nuestros resultados y los antecedentes bibliográficos, podemos decir que los antibióticos ciprofloxacina y levofloxacina son de alta eficiencia para el control de bacterias del género *Arcobacter spp* presente en el suero lácteo, para los antibióticos de primera y segunda generación es necesario realizar la susceptibilidad antibiótica frente a estos microorganismos.

Figura 8

Actividad antimicrobiana de Arcobacter spp frente a las fluoroquinolonas



Experimentadores. (Pungaña & Pungaña, 2022)

4.6. Comprobación de hipótesis

4.6.1. Hipótesis nula (H₀)

Mediante las técnicas de PCR no se detecta al menos un 30% de positividad de patógenos del género *Arcobacter spp* en suero en la Industria de Quesos de Salinas.

4.6.2. Hipótesis alterna (H₁)

Mediante las técnicas de PCR se detecta al menos un 30% de positividad de patógenos del género *Arcobacter spp* en suero en la Industria de Quesos de Salinas.

4.6.3. Verificación de la hipótesis

De las 50 muestras analizadas en 26 muestras se identificó la presencia de *Arcobacter spp*, en consecuencia, se demostró una presencia del 52% de positividad del patógeno, por lo tanto, supera lo planteado en la hipótesis, de tal forma que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.7. Conclusiones y recomendaciones

4.7.1. Conclusiones

- De las 50 muestras de suero lácteo recolectadas de la parroquia de Salinas y sus comunidades 28 muestras presentaron crecimiento microbiano, las cuales fueron cultivadas en medios con suplemento CAT y sin suplemento CAT a 30, 37 °C, por lo tanto, se registra el 52% de positividad del patógeno.
- Las condiciones de cultivo con suplemento CAT a una temperatura de 37 °C permitieron un mejor desarrollo y cultivo de microorganismo obteniéndose colonias translucidas.
- Mediante microscopía por el método de tinción de Gram se pudo identificar al grupo de microorganismos Gram negativos a la que pertenece el género *Arcobacter spp* y descartar a los Gram positivos, por medio de las pruebas bioquímicas de catalasa, ureasa y reducción de nitritos se confirmó de forma inicial que las colonias pertenecen al género de interés.
- Con el análisis molecular de ADN extraídos de los aislados bacterianos (PCR), se evidenció que en dos muestras de suero lácteo procedentes de Apahua (M16) y Salinas (M23) no se encontró la presencia de *Arcobacter spp*, mientras que en las muestras restantes se confirmó la presencia del patógeno, demostrando ser el método más sensible y fiable para la caracterización del microorganismo.
- En el efecto inhibitorio, casi todos los aislados demostraron la susceptibilidad a los antibióticos de control, lo que demuestra la gran efectividad de ciprofloxacina y levofloxacina frente al microorganismo.

4.7.2. Recomendaciones

- Realizar aislamiento de microorganismos del grupo Gram negativas como la *E. coli* y la *salmonella*, también del grupo Gram positivas como la *staphylococcus aureus* y *listeria* de muestras de sueros lácteos procedentes de distintas queseras.
- Utilizar otro tipo de suplemento como el TSA (triptona de soja agar) para el crecimiento microbiano e incubar a temperaturas superiores a 37°C a condiciones de microaerofilia.
- Mediante Tinción de Gram y pruebas bioquímicas identificar y caracterizar los diferentes microorganismos existentes en el suero lácteo y en la leche de las queseras de las comunidades de salinas, ya que dichos productos pueden ser contaminados por un mal manejo del mismo.
- Realizar estudios en otros tipos de productos procedentes de la parroquia Salinas y determinar la presencia de estos microorganismos mediante diferentes métodos de microscopia.
- Analizar la acción antimicrobiana con antibióticos de cuarta generación como la moxifloxacino y comparar los halos inhibitorios con los antibióticos de tercera y segunda generación.
- Durante el ordeño tener cuidado que la leche no se contamine con agentes extraños y transportarlos en recipientes sellados hasta las queseras.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, E., Belkum, A., & Ghaznavi, E. (2018). Quinolone and Macrolide-Resistant *Campylobacter jejuni* in Pediatric Gastroenteritis Patients from Central Iran. *Microbial Drug Resistance*, 25(7), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0455>
- Alarcón, M., Oyarzo, C., Escudero, C., & Cerda, F. (2017). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. *Medicina Chile*, 1559-1564. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v145n12/0034-9887-rmc-145-12-1559.pdf>
- Alveal, B. (2019). Actualización de la portación del género *Arcobacter* en animales domésticos. *Tesis Pregrado*. Universidad de Chile, Talca. Obtenido de <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/12092/5/20190141.pdf>
- Amador, I. (2020). Desarrollo de una bebida a base de suero concentrado para personas con requerimientos proteicos. *Tesis pregrado*. Universidad de las Américas, Quito. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/13049>
- Andrade, S. (2017). Determinación de la prevalencia y la resistencia antimicrobiana de *Campylobacter* spp. En caninos de las parroquias Urbanas de la ciudad de Quito. *Tesis pregrado*. Universidad Central del Ecuador, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10150>
- Arias, J., Velásquez, L., & Varela, R. (2018). Estandarización de una prueba múltiple de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la identificación de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. vasorum*. *Biomédica*, 111-119. doi:<https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3407>
- Bastidas, Y., & Vaca, J. (2018). Caracterización de los microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de suelos de los cantones Quito y Rumiñahui. *Tesis pregrado*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16074>
- Bayas, I. (2016). Aportaciones a la epidemiología de *Arcobacter* y *Helicobacter* spp.: aplicación de métodos moleculares a su detección e identificación en alimentos. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/75087>
- Beltrán, L. (2018). Prevalencia de *Arcobacter* spp en niños con diarrea y sin diarrea de la ciudad de Loja. *Tesis pregrado*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja. Obtenido de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/22468>

- CDC. (2018). *Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomedicina*. Obtenido de https://www.uib.cat/digitalAssets/195/195210_cdc_bmbl_4.pdf
- Chávez, V. (2020). Caracterización del mecanismo de resistencia a quinolonas conferido por el orf131 del plásmido pUM505. *Tesis pregrado*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia. doi:http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/5597
- Chero, A., Rosadio, R., Geraldine, M., Diaz, G., Jiménez, R., & Castro, Y. (2017). Identificación Molecular de Salmonella Typhimurium en Cuyes al Primer Parto mediante la Técnica de PCR Múltiple. *Investigación Veterinaria Perú*, 679-686. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28.i3.13288>
- Chiapparrone, M. (2018). Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Campylobacter fetus* aisladas de rodeos bovinos. *Tesis doctoral*. Universidad Nacional del Centro.
- CLSI. (2019). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (29 ed., Vol. 39).
- CLSI. (2020). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (30 ed.).
- EUCAST. (2020). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Obtenido de https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
- FAO, & OPS. (10 de Junio de 2017). *Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile. doi:<https://doi.org/10.37774/9789275319727>
- Fernández, H., & Jaramillo, A. (2016). *Arcobacter butzleri*. *Revista chilena de infectología*, 663-664. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000600008>
- Fernández, J. (2018). Prevalencia de especies *Arcobacter spp.* en heces de animales porcino y bovino de la ciudad de Loja. *Tesis pregrado*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja. Obtenido de <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/22473>
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2017). *Arcobacter spp.* in Food Chain - From Culture to Omics. *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, 73-117. doi:<https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch4>
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Dominguez, F. (2019). Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. *Current Opinion in Food Science*, 26, 9-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.013>

- Figueras, M., Pèrez , A., Fernàndez, A., & Salas , N. (2018). Taxonomìa y epidemiologia de los gèneros *Aeromonas* y *Arcobacter*. *Unidad de Biologia y Microbiologia*(65). Obtenido de https://www.sem microbiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/21-Aeromonas_Arcobacter.pdf
- Forero, L. (2017). Aislamiento y caracterizacion de microorganismo termófilos con potencial biotecnológico del manantial termomineral Santa Mónica del municipio de Choachi (Cundinamarca). *Tesis pregrado*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. Obtenido de <http://hdl.handle.net/11349/6578>
- Gonzáles, C., Rosales, R., Pavez, D., Fuenzalida, L., Soto, A., Pérez, R., . . . Pinto, E. (2018). Seguridad de las fluoroquinolonas: riesgos habitualmente olvidados para el clínico. *Chilena de Infectología*, 34(6), 577-582. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000600577>
- Goyes, L. (2020). Análisis de susceptibilidad a fluoroquinolonas de arcobacter aislados a partir de quesos frescos, obtenidos de los mercados municipales de guaranda. *Tesis de pregrado*. Universidad Estatal de bolivar, Guaranda. Obtenido de <dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/3701/3/Proyecto%20de%20Investigaci3n.pdf>
- Guamàn, J. (2017). Implementaci3n de un mètodo de extracci3n de AND bacteriano para la detecci3n de *Helicobacter Pylori* en muestras de heces humanas. *Tesis posgrado*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/26143>
- Guzmán, L. (2016). Actividad antimicrobiana de un nuevo peptido aislado de tetramorium sobre cepas caracterizadas de *helicobacter pylori* aisladas de paciente peruanos. *Tesis pregrado*. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12866/470>
- Hilari3n, G. (2020). Suceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escheriachia coli* 0157:h7 y *Escheriachia coli* enteropatogeno aisladas en ni3os menores de 5 a3os con diarrea. *Tesis pregrado*. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. Obtenido de https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8208/Susceptibilid3d%20_Hilari%20C3%B3nNaupari_Gianina.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hualpa, D., Simaluiza, R., Sauca, W., & Fernandez, H. (2020). *Arcobacter butzleri*, un agente zoon3tico en leche bovina. *Microbiologia*, 54(2), 151-164. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v54n2/v54n2a06.pdf>

- Jimbo, F. (2018). Aplicación de pruebas bioquímicas microbiológicas a hongos levaduriformes, como apoyo en el diagnóstico de micosis en el paciente del hospital Carlos Andrade Marín Duarte en el periodo Febrero-Julio del año 2017. *Tesis pregrado*. Universidad Central del Ecuador, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15469>
- Jiménez, A., Calderón, A., Gómez, E., & Altuna, J. L. (2016). Situación de la producción lechera en Bolívar. Parroquia Salinas, Guaranda. *International Journal of Applied Science and Technology*, 6(1), 11-16. Obtenido de http://www.ijastnet.com/journals/Vol_6_No_1_February_2016/2.pdf
- Loor, J., Parraga, C., & Lucas, E. (2021). Betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos: caracterización y prevalencia por tipo de infección. *Kasmera*, 49, 20.
- Maldonado, M. (2018). Caracterización de microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de suelos de los cantones Quito y Rumiñahui. *Tesis pregrado*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16074/1/UPS-QT13247.pdf>
- Mardones, G., & López, J. (2017). Implicancias de *Campylobacter spp.* como patógeno alimentario. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 73-83. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v33n1/0719-3890-chjaasc-02005.pdf>
- Martínez, R., Gastélum, M., Guerrero, P., & Ayala, R. (2020). Actividad antimicrobiana de ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam contra bacilos gramnegativos clínicamente relevantes aislados en México. *Gaceta médico de México*, 604-609. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/gmm/v156n6/0016-3813-gmm-156-6-604.pdf>
- Mena, D. (2018). Prevalencia de *Arcobacter spp.*, en caninos y aves de corral en la ciudad de Loja. *Tesis pregrado*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja. Obtenido de <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/22522/1/Mena%20Valladarez%20c%20Dayanara%20Margo.pdf>
- Moncada, A. (2022). Importación de la tinción de Gram en la identificación de patógenos presentes en el cultivo de *Lipotenaeus Vannamei*. *Tesis pregrado*. Universidad Técnica de Machala, Machala. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18554/1/ECUACA-2022-IAC-DE00006.pdf>

- Montes, M. (2020). Efecto Antimicrobiano de Extractos y Aceites Esenciales de Uvilla (*Physalis peruviana L*) Sobre Bacterias Aisladas (*Arcobacter*, *Salmonella* y *E. Coli*) Perteneciente al Banco de Microorganismos de la Universidad Estatal de Bolívar. *Tesis pregrado*. Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda. Obtenido de <http://dspace.ueb.edu.ec/handle/123456789/3617>
- Mora, A., & Bravo, E. (2017). Aislamiento de microorganismos electrogènicos con potencial para reducir cromo hexavalente. *Acta biològica Colombiana*, 27-36. doi:<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.57189>
- Mottala, A., Ciccarese, G., Sinisi, C., Savarino, A., MarchettiPatrizia, & Terio, V. (2021). Ocurrencia y caracterización de *Arcobacter spp.* de verduras listas para comer producidas en el sur de Italia. *Italian Journal of Food Sfety*, 10(1). doi:<https://doi.org/10.4081%2Fijfs.2021.8585>
- Ocampo, L. (2017). Correlación entre la tincion gran interrumpida y el cultivo con filtros con la técnica de la Klebsiella en la identificación presuntiva de campylobacter sp. En muestras de heces de niños de un hospital nacional de lima en el periodo julio 2015 junio 2016. *Tesis pregrado*. Universidad Norbert Wiener, Lima. Obtenido de <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/1267>
- Paguanquiza, J. (2016). Genotipificación del gen Flagelar A en *Campylobacter jejuni* provenientes de los procesos de faenamamiento industrial de pollos broiler. *Tesis pregrado*. Universidad Central del Ecuador, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11620>
- Palomino, C., Gonzales, Y., Pèrez, E., & Aguilar, V. (2018). Metodología Delphi en la gestión de la inocuidad alimentaria y prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. *Salud pública*, 483-490. doi:<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3086>
- Pérez, V., Morales, C., Vásquez, J., Valladares, B., Cortéz, T., & Cuervo, J. (2019). Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* de triatominos recolectados en los municipios del Estado de Hidalgo, México. *Nova Scientia*, 11(1), 171-185. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v11n22/2007-0705-ns-11-22-171.pdf>
- Rivera, G. (2015). Determinación de la presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en diferentes medios de crecimiento, temperaturas y condiciones atmosféricas. *Tesis pregrado*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.

- Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4655/1/AGI-2015-036.pdf>
- Rodríguez, A., Abad, C., Pèrez, A., & Dièguez, K. (2020). Elaboración de una bebida a base de suero lácteo y pulpa de *Theobroma grandiflorum*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 18(2), 166-175. doi:[https://doi.org/10.18684/bsaa\(18\)166-175](https://doi.org/10.18684/bsaa(18)166-175)
- Rodriguez, P., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *DCMQ*, 16(2), 166-167. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Ronquillo, E., & Tigse, G. (2016). “Ice Cream Sigcholac”. *Tesis pregrado*. Universidad Tècnica de Cotopaxi, Latacunga. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/3597>
- Samudio, M. (2017). Utilidad diagnòstica de la coloración de Gram para las queratitis infecciosas. *Científica de la UCSA*, 4(3), 12-19. Obtenido de https://web.archive.org/web/20180412194220id_/http://scielo.iics.una.py/pdf/ucsa/v4n3/2409-8752-ucsa-4-03-00012.pdf
- Sauca, W. (2018). Aislamiento y detección de *Arcobacter* en leche cruda por medio de la tècnica de multiplex PCR. *Tesis pregrado*. Universidad Tècnica Particular de Loja, Loja. Obtenido de <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/22448>
- Silva, E. (2020). Carcaterización de cepas bacterianas Psicrolifas de laos glaceares tropicales en el volcàn Chimborazo. *Tesis pregardo*. Escuela Superior Politècnica de Chimborazo, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14618/1/236T0526.pdf>
- Simaluiza, R., Fernàndez, J., & Fernàndez, H. (2020). Prevalencia de especies zoonóticas de *Arcobacter* en cerdos a nivel de matadero en Ecuador. *MVZ Còrdova*, 25(2), 1-5. doi:<https://doi.org/10.21897/rmvz.1798>
- Soto , J. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *Ciencia Ergo Sum*, 25, 1-11. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10453975006>
- Tandapilco, J. (2020). Aislamiento y caracterización microbiologica, bioquimica y molecular *Agrobacterium tumefaciens* de a partir de tejidos vegetales infectados. *Tesis pregrado*. Escuela Superior Politècnica de Chimborazo, Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14554/1/236T0522.pdf>

- Tarqui, K., Molina, J., Beltrán, M., Zevallos, S., & Mayta, E. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN *Giardia* spp. medidos por PCR convencional. *Peru Med Exp Salud Publica*, 423-432. doi:<http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4160>
- Vasconez, F. (2019). Estudio de la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacina y Estreptomycin en los Géneros *Escherichia* y *Arcobacter* Aislados de Agua y Alimentos de Origen Animal. *Tesis pregrado*. Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda. Obtenido de <http://dspace.ueb.edu.ec/handle/123456789/3395>
- Vásquez, A., Ayala, I., Domenech, I., Martínez, I., & Rodríguez, R. (2019). Riesgo biológico en los laboratorios de Microbiología de las instituciones de salud. *Panorama Cuba y Salud*, 14(1), 65-70. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cubaysalud/pes-2019/pes191j.pdf>
- Vásquez, J. (2021). Detección de la presencia de *Arcobacter* y *Helicobacter pylori* en vegetales orgánicos por métodos de cultivo y mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Tesis pregrado*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10251/170894>
- Vázquez, J. (2021). Detección de la presencia de *Arcobacter* y *Helicobacter pylori* orgánicos por métodos de cultivo y mediante R en vegetales eacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Tesis pregrado*. Universitat Politècnica de Valencia, Valencia. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/170894/Vazquez%20-%20Deteccion%20de%20la%20presencia%20de%20Arcobacter%20y%20Helicobacter%20pylori%20en%20vegetales%20organicos%20po....pdf?sequence=2>
- Vidal, B. (2017). Comparación de la resistencia antibiótica y potencial patogénico en cepas de *Arcobacter butzleri* obtenidas en producción avícola industrial y doméstica. *Tesis pregrado*. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2017/fcv649c/doc/fcv649c.pdf>
- Villegas, G., Torres, M., Rothlisberger, S., & Delgado, E. (2019). Procesamiento de imágenes de electroforesis bidimensional. *Scientia et Technica Año XXIV*, 24(1), 76-84. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6888650>
- Zeballos, M. (2017). Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales. *Tesis pregrado*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6199>

ANEXOS

Anexo 1

Mapa de ubicación de la investigación



Fuente. Google maps (2021)

Anexo 2

Codificación de las muestras recolectadas

Lugar de procedencia	Símbolo	Numero Muestras
Salinas	S	6
Capina	C	1
Verdepamba	V	11
Pambabuela	P	1
Mercedes de Pumín	M	4
Apahua	A	4
San Vicente	Sv	3
Ramos	R	3
Natahua	N	3
Pachancho	Pch	3
Arrayanes	Arr	2
Yavubiana	Y	3
Yurauksha (Andes)	A	3
Gramalote	G	3
Total		50

Anexo 3

Resultados de la identificación de los aislados obtenidos

N°	Código	Procedencia	Cultivo inicial	Colonias translucidas	N° Colonias
1	M1	S	+	?	0
2	M2	C	+	?	1
3	M3	M	+	?	1
4	M4	P	-	-	0
5	M5	V	+	-	0
6	M6	An	+	-	0
7	M7	S	+	?	0
8	M8	M	+	+	2
9	M9	V	+	+	1
10	M10	An	+	?	1
11	M11	M	+	-	0
12	M12	An	+	+	0
13	M13	V	-	-	0
14	M14	M	+	?	0
15	M15	V	-	-	0
16	M16	A	+	+	2
17	M17	V	+	+	0
18	M18	V	+	?	0
19	M19	V	+	?	1
20	M20	V	+	+	0
21	M21	V	+	+	2
22	M22	S	+	-	1
23	M23	S	+	+	1
24	M24	S	+	-	0
25	M25	S	+	-	0
26	M26	Sv	+	-	0
27	M27	Sv	+	+	1
28	M28	Sv	+	+	1
29	M29	R	+	-	0
30	M30	R	+	+	1
31	M31	R	+	-	0
32	M32	N	+	-	0
33	M33	N	+	+	1
34	M34	N	+	+	2
35	M35	Pch	-	-	0
36	M36	Pch	+	+	1
37	M37	Pch	+	+	1
38	M38	V	-	-	0
39	M39	V	-	?	1
40	M40	Arr	-	-	0
41	M41	Arr	-	-	0
42	M42	Y	-	+	0
43	M43	Y	-	-	0
44	M44	Y	+	+	1
45	M45	A	-	-	0
46	M46	A	+	+	1
47	M47	A	+	+	1
48	M48	G	+	+	1
49	M49	G	-	-	0
50	M50	G	-	-	0

Anexo 4

Resultados de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

N°	Código	Procedencia	N° Colonia	Reacción
1	M2	C	1	G-
2	M3	M	1	G-
3	M8	M	1	G-
4	M8	M	2	G-
5	M9	V	1	G-
6	M16	A	1	G-
7	M16	A	2	G-
8	M19	V	1	G+
9	M21	V	1	G-
10	M21	V	2	G-
11	M22	S	1	G-
12	M23	S	1	G-
13	M27	Sv	1	G-
14	M28	Sv	1	G+
15	M30	R	1	G+
16	M34	N	1	G+
17	M34	N	2	G-
18	M36	Pch	1	G-
19	M37	Pch	1	G-
20	M39	V	1	G-
21	M46	A	1	G-
22	M48	G	1	G-

Anexo 5

Resultado de las pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y reducción de nitrito)

Nº	Código	Procedencia	Nº Colonia	Catalasa	Ureasa	R. Nitrito
1	M2	C	1	+	+	+
2	M3	M	1	+	-	+
3	M8	M	1	-	+	+
4	M8	M	2	+	-	+
5	M9	V	1	+	+	+
6	M16	A	1	+	-	+
7	M16	A	2	-	-	+
8	M19	V	1	+	+	+
9	M21	V	1	+	-	+
10	M21	V	2	+	+	+
11	M22	S	1	-	+	-
12	M23	S	1	+	+	+
13	M27	Sv	1	+	+	+
14	M28	Sv	1	+	+	+
15	M30	R	1	+	+	-
16	M34	N	1	+	+	-
17	M34	N	2	+	+	+
18	M36	Pch	1	+	+	+
19	M37	Pch	1	-	-	+
20	M39	V	1	-	-	+
21	M46	A	1	+	+	-
22	M48	G	1	+	-	+

Anexo 6

Resultados de la concentración del ADN

Nº	Código	Procedencia	Concentración
1	M1	S	54,2 ng/μL
2	M2	C	30,9 ng/μL
3	M3	M	23,8ng/μL
4	M8	M	20,6 ng/μL
5	M9	V	12,1 ng/μL
6	M10	An	20,0 ng/μL
7	M16	A	16,1 ng/μL
8	M18	V	14,0 ng/μL
9	M19	V	43,4 ng/μL
10	M21	V	35,7 ng/μL
11	M22	S	27,5 ng/μL
12	M23	S	13,4 ng/μL
13	M27	Sv	23,3 ng/μL
14	M28	Sv	15,5 ng/μL
15	M30	R	26,6 ng/μL
16	M31	R	21,1 ng/μL
17	M33	N	27,9 ng/μL
18	M34	N	22,5 ng/μL
19	M36	Pch	27,0 ng/μL
20	M37	Pch	29,2 ng/μL
21	M38	V	32,3 ng/μL
22	M39	V	32,7 ng/μL
23	M43	V	13,6 ng/μL
24	M45	A	33,9 ng/μL
25	M46	A	25,6 ng/μL
26	M47	A	25,8 ng/μL
27	M48	G	22,7 ng/μL
28	M49	G	13,8 ng/μL

Anexo 7*Resultados de la actividad antimicrobiana*

Código	Levofloxacin			Ciprofloxacin	
	mg/mL	Halo (mm)	Susceptibilidad	Halo (mm)	Susceptibilidad
M1S	10	34	S	31	S
	15	38	S	28	S
	20	37	S	20	S
M2C	10	39	S	32	S
	15	38	S	27	S
	20	39	S	29	S
M3M	10	34	S	16	S
	15	37	S	16	S
	20	38	S	20	S
M8M	10	36	S	33	S
	15	37	S	27	S
	20	35	S	32	S
M9V	10	33	S	26	S
	15	37	S	31	S
	20	39	S	28	S
M10An	10	36	S	30	S
	15	38	S	35	S
	20	40	S	36	S
M18V	10	36	S	31	S
	15	39	S	30	S
	20	38	S	28	S
M19V	10	37	S	20	S
	15	41	S	22	S
	20	40	S	28	S
M21V	10	37	S	24	S
	15	36	S	29	S
	20	38	S	34	S
M22S	10	34	S	34	S
	15	35	S	31	S
	20	37	S	37	S
M27Sv	10	33	S	25	S
	15	36	S	25	S
	20	37	S	24	S
M28Sv	10	32	S	32	S
	15	36	S	31	S
	20	31	S	32	S
M30R	10	36	S	30	S
	15	39	S	34	S
	20	38	S	20	S
M31R	10	36	S	30	S
	15	38	S	35	S
	20	40	S	36	S
M33N	10	37	S	28	S
	15	37	S	30	S
	20	39	S	25	S
M34N	10	32	S	29	S
	15	37	S	26	S
	20	37	S	29	S

M36Pch	10	36	S	24	S
	15	38	S	20	S
	20	39	S	21	S
M37Pch	10	36	S	19	S
	15	37	S	25	S
	20	36	S	30	S
M38V	10	35	S	32	S
	15	34	S	33	S
	20	36	S	32	S
M39V	10	36	S	30	S
	15	38	S	35	S
	20	40	S	36	S
M43V	10	35	S	23	S
	15	36	S	30	S
	20	35	S	26	S
M45A	10	38	S	30	S
	15	39	S	27	S
	20	38	S	29	S
M46A	10	37	S	30	S
	15	37	S	25	S
	20	39	S	34	S
M47A	10	34	S	31	S
	15	33	S	30	S
	20	35	S	33	S
M48G	10	37	S	24	S
	15	38	S	26	S
	20	36	S	21	S
M49G	10	38	S	27	S
	15	39	S	25	S
	20	38	S	26	S

Anexo 8

Recolección de la materia prima



Recepción de la materia prima



Transporte por cooler



Codificación



Muestras a ser analizadas

Anexo 9

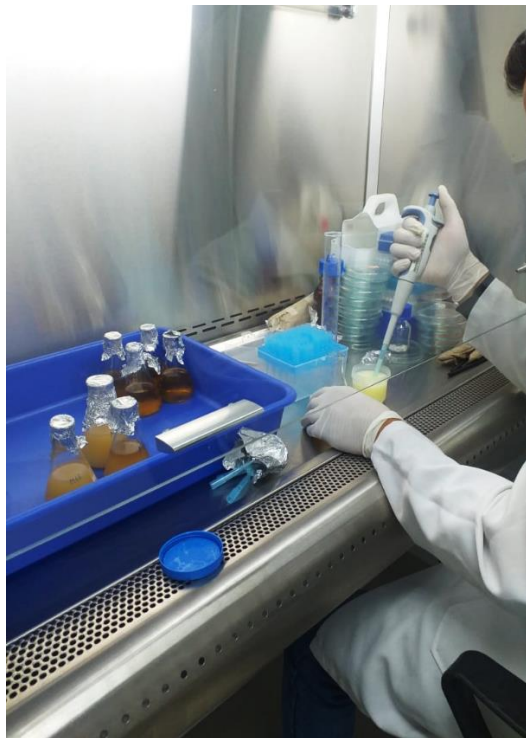
Aislamiento del *Arcobacter spp*



Pesado del APT



Autoclavado del medio



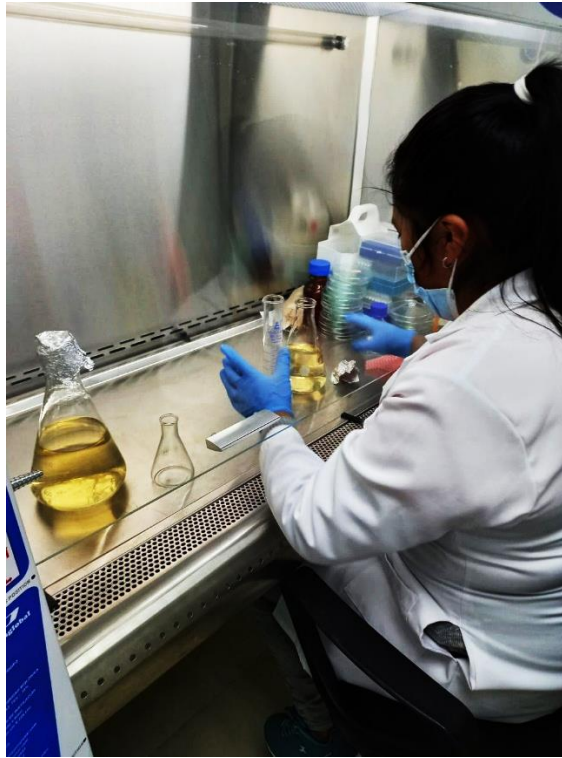
Preparación del medio



Formación de alícuota

Anexo 10

Condiciones de desarrollo del Arcobacter spp



Preparacion del medio



Siembra del medio



Incubación en jarra de anaerobiosis



Incubación

Anexo 11

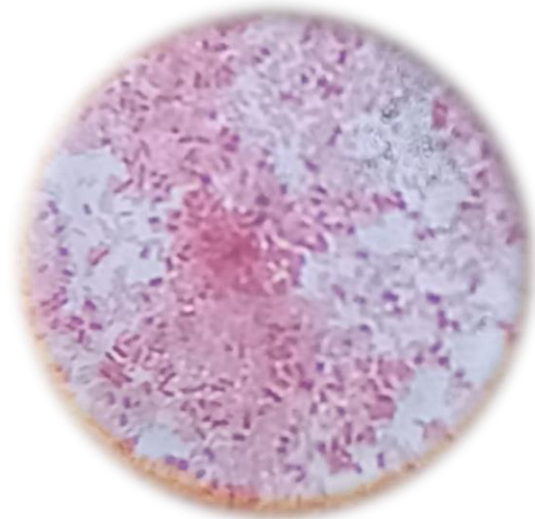
Microscopia por tinción de Gram



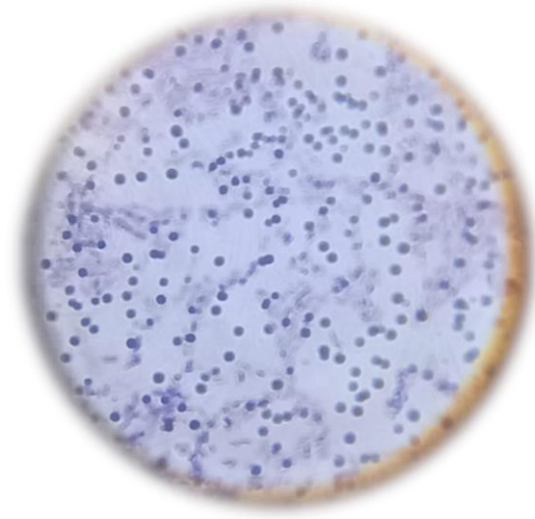
Siembra de colonias



Proceso tincion de Gram



Bacteria Gram negativas



Bacteria Gram positivas

Anexo 12

Pruebas bioquímicas



Catalasa



Ureasa



Reducción de nitrito



Resalta su coloración

Anexo 13

Extraer y amplificar ADN por PCR



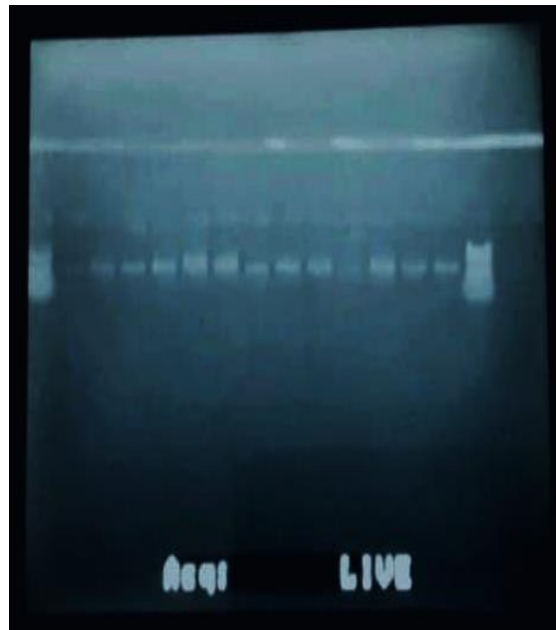
Pesado de agares



Preparacion del medio



Panel de electroforesis



PCR para *Arcobacter* spp

Anexo 14

Actividad antimicrobiana



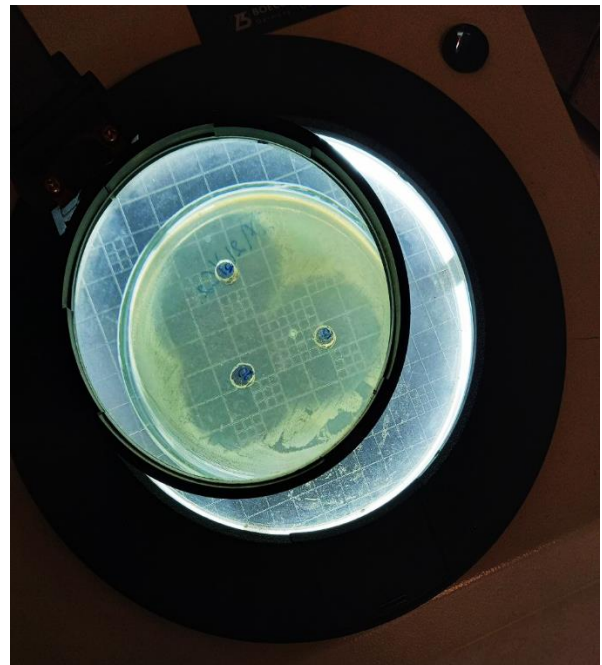
Muestra de *Arcobacter* spp



Siembra y colocacion del antibiotico



Incubación 24 h a 37°C



Medición de halos

GLOSARIO

ADN cadena simple: Polímero no ramificado, que consta de cuatro tipos de subunidades: desoxirribonucleótidos que contienen fracciones de adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

ADN polimerasa: Son enzimas que catalizan la incorporación de nucleótidos complementarios en la hebra molde durante la replicación del ADN.

Agar nutritivo: Es un medio de cultivo de uso común para todo tipo de bacterias es ventajoso porque permanece estable incluso a temperaturas relativamente altas, el crecimiento de bacterias en este agar es superficial, lo que facilita la identificación de pequeñas colonias.

Alícuota: Es la fracción de muestra tomada de un volumen inicial alícuota líquida o de una masa, destinada a ser utilizada en pruebas de laboratorio, de propiedades físicas, químicas y de composición, representan las de la sustancia original.

Arcobacter: Las especies del género *Arcobacter* son pequeños bacilos, de 0,2 a 0,9 μm de ancho y de 1,0 a 3,0 μm de largo, son helicoidales o en forma de "S", Gram negativas y no simuladas.

APT: Es la molécula principal que transporta energía para toda la vida (bacterias, levaduras, mohos, algas, plantas y células animales), todos los cuales contienen APT, por ello, la concentración de APT en una determinada muestra nos da información directa sobre su biomasa.

Bacteria: Son microorganismos unicelulares, forman parte de vida desde la antigüedad conocidas en el planeta, existen tipos diferentes de bacterias y pueden vivir en todos los medios en todo el mundo.

Catalasa: Es una enzima que se encuentra en los organismos vivos y que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

CAT: Cefoperazona-Amphotericina-B-Teicoplanina, es un suplemento de cultivo para mejorar el rendimiento de crecimiento microbiano.

Caja Petri: Es un recipiente de vidrio redondo que se puede colocar encima y cubrir con una tapa, pero no hermético.

Cepas: Es un grupo de microorganismos de un tipo, derivados de una sola célula o de una muestra particular, y generalmente propagados por clonación.

Colonia bacteriana: Son organismos extremadamente pequeños que se miden en micrómetros y solo es observable de manera macroscópica.

Electroforesis: Técnica de separación de moléculas mediante una corriente, a través de un gel que contienen las moléculas de interés.

Gram positivas: Bacterias que se tiñen de azul o púrpura oscuro con la tinción de Gram, esta propiedad química está estrechamente relacionada con la estructura de la envoltura celular, lo que refleja un patrón natural de organización bacteriana.

Gram negativas: Es una sustancia que no se tiñe de azul oscuro o púrpura por tinción de Gram, por lo que tiene un color ligeramente rosado.

PCR: Es un método muy rápido y preciso para diagnosticar una serie de enfermedades infecciosas y modificadas genéticamente, pruebas que detectan ADN o ARN de patógenos (patógenos) o células anormales en una muestra.

Quinolonas: Son antibióticos sintéticos que se utilizan para el tratamiento de amplio espectro de infecciones bacterianas.

Siembra de microorganismos: Colocación artificialmente una porción de un espécimen (inoculación) en un medio adecuado.

Tinción de Gram: Es una prueba que busca bacterias en lugares donde se sospecha una infección, como la garganta, los pulmones, los genitales o lesiones en la piel, también se puede usar para detectar bacterias en ciertos fluidos corporales, como la sangre o la orina.

Ureasa: Es una prueba de laboratorio utilizada para identificar bacterias mediante la detección de la actividad enzimática, además, es la enzima responsable de descomponer la urea en amoníaco y bicarbonato, elevando el pH de su sitio y favoreciendo su difusión.