

PROGRAMA DE MEJORA DE LA CALIDAD
PLAN ESTRATEGICO GENERAL 2013-2018
Planes de formación e innovación

MEMORIA DE RESULTADOS

Título del Proyecto

Desarrollo de materiales didácticos para la enseñanza/aprendizaje de los procesos de fermentación y seguimiento de poblaciones bacterianas en alimentos de origen vegetal

Referencia

ID2018/129

Profesor responsable

M^a Encarnación Velázquez Pérez

Otros participantes

Pedro F. Mateos González, Belén Rubio Pérez, Eustoquio Martínez Molina, Carmen Tejedor Gil, José David Flores Félix, Paula García Fraile, José Manuel González Buitrago, Fernando Sánchez Juanes

Introducción

Uno de los objetivos principales de la asignatura Biotecnología Farmacéutica es el aprendizaje, tanto teórico como práctico, de los procesos de fermentación microbiana que tienen lugar durante la producción de alimentos funcionales. La adquisición de conocimientos prácticos sobre estos procesos va necesariamente ligada a la de destrezas manuales adquiridas en el laboratorio, imprescindibles en el proceso de enseñanza-aprendizaje de la Biotecnología.

En el presente proyecto nos planteamos que los alumnos puedan llevar a cabo en el laboratorio de prácticas un proceso de fermentación, así como un seguimiento a lo largo del tiempo de las bacterias implicadas en dicho proceso. Uno de los procesos más sencillos es la fermentación de la col para producir chucrut, que es llevada a cabo por bacterias lácticas, cuyas poblaciones se pueden seguir a lo largo del proceso de fermentación.

El seguimiento de las poblaciones de bacterias lácticas se puede llevar a cabo por diversas técnicas, pero en este caso, como se indicó en la solicitud del presente proyecto, se utilizó MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry), ya que permite de una manera fácil y rápida la identificación de bacterias lácticas, debido a que en la base de datos Biotyper están incluidas la mayoría de sus especies. En los casos en los que no se pueda asegurar la identificación a nivel de especie utilizando MALDI-TOF MS, se llevó a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S.

En ambos procesos de identificación hay partes que pueden ser realizadas en el laboratorio de prácticas, como es la preparación del chucrut, el aislamiento de las bacterias lácticas y la preparación de las muestras para MALDI-TOF MS y secuenciación de genes, pero el resto de estos dos procesos ha de ser llevado a cabo en servicios especializados, ya que este tipo de técnicas precisan de unas instalaciones y un equipamiento imposibles de implementar en un laboratorio de prácticas, y a que han de ser manejados por personal especializado.

Por lo tanto, para que los alumnos puedan adquirir los conocimientos sobre el proceso completo de identificación por ambas técnicas es necesario desarrollar materiales didácticos para la enseñanza/aprendizaje del seguimiento de las poblaciones de bacterias lácticas durante un proceso de fermentación fácil de ser realizado por los propios alumnos en el laboratorio de prácticas, como es el caso de la obtención de chucrut a partir de la col.

Estos materiales didácticos incluyen un video-tutorial en el que se explica a los alumnos cómo es el proceso de fermentación de la col para obtener chucrut y cómo se pueden identificar a lo largo del tiempo las poblaciones de bacterias lácticas en dicho producto. Estos video-tutoriales son muy útiles en las prácticas de las asignaturas que requieren el manejo de microorganismos, ya que permiten a los alumnos observar la forma correcta de manipularlos y aprender diferentes técnicas básicas para su identificación. Además, se pueden subir a plataformas informáticas, como Studium, desde las que los alumnos pueden acceder a ellos fácilmente y desde cualquier lugar.

Desde la implantación del Grado de Farmacia, con el apoyo de varios proyectos de innovación docente, se han implementado diferentes prácticas en la asignatura Biotecnología Farmacéutica encaminadas a la identificación de los microorganismos responsables de los procesos de fermentación en alimentos probióticos como yogur y kefir. En estas prácticas se parte de probióticos comerciales y la identificación se lleva a cabo en el producto final que se adquiere ya preparado. La innovación que supone el presente proyecto es la realización en el laboratorio de prácticas de un proceso de fermentación completo y el seguimiento de las poblaciones implicadas en el mismo a lo largo del tiempo. Este proceso se ha grabado en un vídeo-tutorial accesible a través de Studium junto con un esquema para la identificación de bacterias lácticas y un test que permite la evaluación de los conocimientos adquiridos por los alumnos.

Metodología aplicada

Se grabó en video el proceso completo de fermentación del chucrut a partir de col que se cortó y se sumergió en agua, sal y/o vinagre manteniéndose en un bote de vidrio bien cerrado durante una semana. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo de las que se prepararon diluciones decimales seriadas sembrándose en medio MRS comúnmente utilizado para el recuento y aislamiento de bacterias lácticas. Las colonias con diferente morfología macroscópica se pasaron a placas nuevas conteniendo el mismo medio y se hizo un recuento de las colonias a diferentes tiempos. La identificación de las bacterias aisladas se llevó a cabo mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S utilizando la metodología convencional cuya descripción, que ya se ha incluido en otros proyectos de innovación docente previamente financiados, se resume a continuación.

Para llevar a cabo MALDI-TOF MS las colonias aisladas se resuspendieron en 300 μ l de agua MilliQ estéril y se añadieron 900 μ l de etanol, centrifugándose a 15.500 g durante 2 min. El precipitado se secó al aire durante 1 h y se le añadieron 50 μ l de ácido fórmico (70% v/v), mezclándose cuidadosamente antes de añadir 50 μ l de acetonitrilo. Se centrifugó de nuevo a 15.500 g durante 2 min y 1 μ l del sobrenadante se colocó sobre la placa de acero dejándose secar a temperatura ambiente antes de proceder al análisis mediante MALDI-TOF MS. Los resultados de la identificación se basan en una escala de valores que proporciona la casa comercial (Bruker en este caso). Valores entre 2.3 y 3.0 indican buena identificación a nivel de especie; valores entre 2.0 y 2.299 indican buena identificación a nivel de género y una posible buena identificación a nivel de especie, valores entre 1.7 y 1.999 indican buena identificación a nivel de género, pero no de especie y valores menores de 1.7 indican no identificación.

Para llevar a cabo la secuenciación de ácidos nucleicos se partió de colonias en cultivo puro que se suspendieron en 100 μ l de una solución sarkosyl al 0,1% y se centrifugó a 12000 rpm durante 6 min. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 100 μ l de NaOH 0,05M utilizando vortex y se mantuvo a 96°C durante 5 min para lisar las células. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 4 minutos y se separó el sobrenadante que se diluyó diez veces con agua milliQ estéril. Con el DNA extraído se llevó a cabo la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los primers universales que permiten la amplificación del gen ribosómico 16S en todas las bacterias y una mezcla comercial que contiene la DNA polimerasa (Taq) y los nucleótidos. Una vez finalizada la PCR, que se llevó a cabo utilizando los ciclos adecuados para

amplificar el gen ribosómico 16S, los productos se sometieron a electroforesis en un gel horizontal de agarosa al 1% durante 2h a 6v/cm que se tiñó en una solución de bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a dicho gen se cortaron del gel y se purificaron utilizando unas columnas que contienen un filtro que retiene la agarosa y permite filtrar el DNA que queda listo para la secuenciación. Para ello se utiliza este DNA molde y una serie de primers universales para la secuenciación de este gen y se lleva a cabo otra PCR utilizando nucleótidos marcados con fluorocromos de diferentes colores lo que permite la lectura automática por una cámara CDC incorporada en el secuenciador automático.

La grabación del video se realizó utilizando una cámara Réflex Nikon D5300 con un sensor de imagen de 24,2 megapíxeles y objetivo AF-P 18-55 f/3.5-5.6G para fotografía y grabación y un objetivo AF-S DX MICRO nikkor 40m f/2.8G para microfotografía, y una videocámara Sony DCR-SR77E con zoom óptico de 50x y sistema de grabación en alta definición. A continuación, se utilizó el programa informático Windows Live Movie Maker 14.0.8091.0730 en un ordenador HP a6641es con procesador Intel Core 2 Quad Q8200 a 2,33GHz. Tras la edición y maquetado del archivo de video se procedió a realizar la grabación en formato CD haciendo uso del programa informático CyberLink PowerStarter 7.0.2216

Se han diseñado materiales didácticos interactivos con la aplicación de Moodle que se han volcado a la plataforma Studium incluyendo todo el proceso de fermentación de la col y de identificación de las bacterias lácticas implicadas en este proceso, así como un test que permite la evaluación de los conocimientos adquiridos por los alumnos.

Resultados

Los resultados obtenidos en función de los objetivos del presente proyecto se exponen a continuación:

1. Elaboración de un tutorial en video digital sobre el proceso de obtención de chucrut a partir de col y el seguimiento de poblaciones de bacterias lácticas utilizando MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S que recoge:

- La preparación del chucrut a partir de col fresca (*Brassica oleracea* var capitata)
- El aislamiento y recuento de bacterias lácticas en medio MRS
- La preparación de las muestras para cada uno de los dos procesos de identificación.
- El análisis mediante MALDI-TOF MS, que permitió la identificación de la mayoría de las cepas aisladas.
- La amplificación, secuenciación y análisis del gen ribosómico 16S, que permitió la identificación a nivel de especie de las cepas que no se identificaron a ese nivel utilizando MALDI-TOF MS.

2. En las prácticas en laboratorio real se implementarán únicamente los tres primeros pasos (ver abajo), ya que el resto del proceso los alumnos deben visualizarlo una vez grabado en video.

- La preparación del chucrut a partir de col fresca (*Brassica oleracea* var

capitata)

- El aislamiento y recuento de bacterias lácticas en medio MRS
- La preparación de las muestras para cada uno de los dos procesos de identificación.

3. Elaboración de un material docente accesible a través de Studium sobre el proceso de identificación de bacterias lácticas en chucrut que incluye:

- El video-tutorial sobre el proceso de fermentación del chucrut, así como el aislamiento, recuento e identificación de bacterias lácticas mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S.

- Un test de 11 preguntas sobre la información ofrecida en el video-tutorial que permita evaluar el grado de aprendizaje de los alumnos.

A continuación, se exponen los puntos básicos del video-tutorial sobre la fermentación de la col para obtener chucrut y sobre el aislamiento, recuento e identificación de las bacterias lácticas.

1. Materiales para la preparación del chucrut y para el aislamiento de las bacterias (A) y el resultado final de la fermentación (B)

A

B

2. Para preparar el chucrut la col se corta en juliana y se añade sal al agua para la fermentación

A

B



fermentación, se aprieta bien la col para que no quede aire y se le puede añadir un poco de vinagre suave (A) antes de cerrar bien el bote (B), que se mantendrá en oscuridad durante una semana.

A



B



4. A diferentes tiempos se tomaron muestras del chucrut con y sin vinagre para aislar las bacterias lácticas en medio MRS después de hacer diluciones seriadas (A) y proceder al recuento de las mismas (B).

A



B



5. Se seleccionaron las colonias con diferente morfología macroscópica (A) y se extrajeron las proteínas para identificarlas mediante MALDI-TOF MS.

A



B

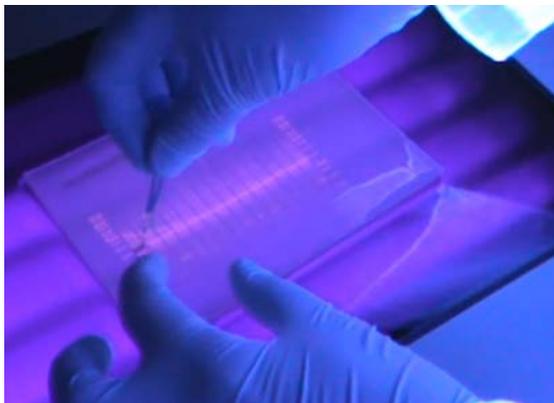
6. Después de comparar los espectros de cada cepa con los depositados en la base de datos Biotyper, el sistema ofrece los resultados marcados en verde para valores superiores a 2.0, que implican una buena identificación a nivel de especie si son superiores a 2.3 y una buena identificación a nivel de género y muy probable a nivel de especie si los valores están entre 2.0 y 2.3. Los valores marcados en amarillo, que están entre 1.7 y 2.0, indican una buena identificación a nivel de género, pero no se puede asegurar la especie.

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación	Organismo (segundo mejor candidato)	Puntuación
H1 (+++)(B)	Brulv 03	Lactobacillus plantarum	2.532	Lactobacillus plantarum	2.521
H10 (++)(A)	Brulv 04	Lactococcus lactis	2.079	Lactococcus lactis	2.001
H11 (++)(A)	Brulv 02	Lactococcus lactis	2.071	Lactococcus lactis	2.046
H12 (+)(B)	Brulv 01	Leuconostoc mesenteroides	1.909	Leuconostoc mesenteroides	1.786
H13 (+)(B)	Brulv 05	Leuconostoc mesenteroides	1.948	Leuconostoc mesenteroides	1.748
H14 (++)(A)	Brulv 06	Lactococcus lactis	2.127	Lactococcus lactis	2.127
H15 (+)(B)	Brulv 07	Leuconostoc mesenteroides	1.825	identificación poco fiable	1.648
H2 (+++)(B)	Brul 04	Lactobacillus plantarum	2.48	Lactobacillus plantarum	2.417
H3 (+++)(B)	Brul 02	Lactobacillus plantarum	2.563	Lactobacillus plantarum	2.547
H4 (+++)(B)	Brul 01	Lactobacillus plantarum	2.507	Lactobacillus plantarum	2.506

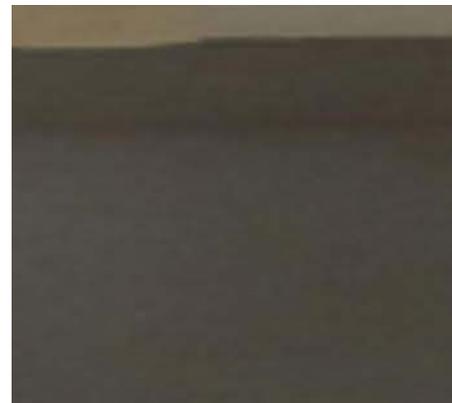
Los resultados de la identificación mediante MALDI-TOF mostraron que en el chucrut hay bacterias lácticas que pertenecen las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* (marcadas en color verde). En el caso de *Leuconostoc mesenteroides* para algunas de las cepas aisladas la identificación a nivel de especie no se puede asegurar (marcadas en color amarillo). Estas cepas fueron identificadas mediante el análisis del gen ribosómico 16S.

7. Una vez extraído el DNA y amplificado el gen ribosómico 16S, las bandas se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se cortaron (A), para posteriormente purificarse y secuenciarse en un secuenciador automático (B).

A



B



Las secuencias de los genes correspondientes a las cepas que no se identificaron a nivel de especie mediante MALDI-TOF MS se compararon frente a las depositadas en bases de datos públicas como el Genbank en las que están depositadas las secuencias del gen

ribosómico 16S para todas las cepas tipo de las diferentes especies de bacterias. En este caso, los resultados de la identificación se obtienen en forma de porcentajes de similitud entre las secuencias testadas y las de la base de datos, de modo que similitudes cercanas al 100% indican una buena identificación a nivel de especie.

8. En la imagen se muestran los resultados para una de las cepas que no se pudieron identificar a nivel de especie por MALDI-TOF MS denominada Brulv05. Como se puede apreciar se confirmó la identificación como *Leuconostoc mesenteroides*, una especie que contiene varias subespecies que no están incluidas en la base Biotyper, que puede ser la causa de que para algunas cepas la identificación a nivel de especie no estuviera clara mediante MALDI-TOF MS.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain DSM 20484, complete genome	2861	11446	100%	0.0	100.00%	CP012009.1
Leuconostoc mesenteroides strain ATCC 8293 16S ribosomal RNA, partial sequence	2861	2861	100%	0.0	100.00%	NR_074957.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293, complete genome	2861	11446	100%	0.0	100.00%	CP000414.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. longgaibkimchii strain DRC1506 chromosome, complete genome	2856	11424	100%	0.0	99.94%	CP014611.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. longgaibkimchii strain DRC1506 16S ribosomal RNA, complete sequence	2852	2852	99%	0.0	99.94%	NR_157602.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. suionicum strain DSM 20241, complete genome	2850	11402	100%	0.0	99.87%	CP015247.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain JCM 9700	2758	2758	96%	0.0	100.00%	LC096223.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain JCM 6124	2741	2741	95%	0.0	100.00%	LC071839.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain JCM 16943	2730	2730	95%	0.0	99.87%	LC097081.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain NBRC 100495 16S ribosomal RNA, partial sequence	2726	2726	95%	0.0	100.00%	NR_113911.1
Leuconostoc pseudomesenteroides gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain JCM 9696	2724	2724	96%	0.0	99.66%	LC096220.1
Leuconostoc mesenteroides strain JCM 6124 16S ribosomal RNA, partial sequence	2721	2721	95%	0.0	100.00%	NR_113251.1
Leuconostoc gasicomitatum LMG 18811 complete genome, type strain LMG 18811T	2704	10812	100%	0.0	98.19%	FN822744.1
Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum strain TB 1-10 16S ribosomal RNA, complete sequence	2700	2700	99%	0.0	98.19%	NR_074997.2
Leuconostoc gelidum subsp. aeniomaticum strain POUF4d 16S ribosomal RNA, partial sequence	2693	2693	99%	0.0	98.19%	NR_133769.1
Leuconostoc kimchii IMSNU 11154, complete genome	2682	10729	100%	0.0	97.93%	CP001758.1
Leuconostoc kimchii strain IMSNU 11154 16S ribosomal RNA, complete sequence	2678	2678	99%	0.0	97.93%	NR_075014.2
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain NCFB 529 16S ribosomal RNA, partial sequence	2676	2676	93%	0.0	100.00%	NR_040817.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris strain NCFB 543 16S ribosomal RNA, partial sequence	2673	2673	93%	0.0	99.86%	NR_040818.1
Leuconostoc suionicum strain LMG 8159 16S ribosomal RNA, partial sequence	2645	2645	92%	0.0	99.86%	NR_109003.1
Leuconostoc pseudomesenteroides strain NRIC 1777 16S ribosomal RNA, partial sequence	2636	2636	93%	0.0		

El video-tutorial se subió a la plataforma Studium y se diseñó un seminario virtual utilizando la aplicación de Moodle para el diseño de seminarios autoevaluables con características interactivas y videos didácticos, que se subió también a la plataforma Studium, desde donde los alumnos pueden realizar un test, que permite la evaluación de los conocimientos adquiridos.

9. El seminario virtual ofrece al alumno una serie de esquemas sobre el procedimiento global de identificación, sobre el que versarán las preguntas del test, junto con la parte del vídeo-tutorial de cada paso del proceso. Las preguntas del test se exponen a continuación:

1. El chucrut es un alimento fermentado a partir de la col por: a) bacterias lácticas b) bacterias acéticas c) levaduras d) hongos filamentosos.
2. El MALDI-TOF MS se basa en: a) la obtención de bandas de proteínas en un gel b) la obtención de espectros de proteínas mediante espectrometría de masas c) la obtención de secuencias de proteínas d) la valoración cuantitativa de proteínas totales mediante espectrometría UV
3. La identificación utilizando MALDI-TOF MS se basa en: a) la comparación de secuencias de proteínas frente a una base de datos b) la comparación de los espectros de proteínas de una muestra problema frente a los espectros de una base

de datos (Biotyper) c) el cálculo de similitudes que se traducen a una puntuación numérica d) la b y la c son correctas

4. Los valores de similitud indican: a) buena identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2.3 y 3 b) probable identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2 y 2.3 c) buena identificación a nivel de genero cuando oscilan entre 2 y 2.3 d) probable identificación a nivel de género cuando oscilan entre 1.7 y 2

5. Utilizando MALDI-TOF MS se han identificado en la muestra de chucrut analizada la especie de bacterias lácticas: a) *Lactococcus lactis* b) *Leuconostoc mesenteroides* c) *Lactobacillus plantarum* d) la a y la c son correctas

6. El DNA se extrae habitualmente con soluciones: a) acuosas a pH ácido b) acuosas a pH neutro c) acuosas a pH básico d) orgánicas

7. La PCR permite: a) la amplificación de proteínas b) la amplificación de RNA c) la amplificación de DNA d) de todas ellas

8. La Taq polimerasa es una enzima que copia: a) DNA a DNA b) DNA a RNA c) RNA a DNA d) RNA a proteína.

9. Los amplicones obtenidos tras la PCR: a) se separan mediante electroforesis horizontales b) se separan utilizando geles de agarosa c) se separan a voltajes de aproximadamente 6v/cm d) todas son correctas

10. Después de la electroforesis: a) el gen 16S rRNA corresponde a una banda en el gel b) las bandas se purifican mediante centrifugación utilizando columnas de purificación c) el producto purificado se utiliza para la secuenciación del gen d) todas son correctas

11. La secuencia obtenida tras la secuenciación del gen 16S de la cepa Brulv05 corresponde a la especie: a) *Leuconostoc lactis* b) *Leuconostoc mesenteroides* c) *Leuconostoc kimchii* d) *Leuconostoc paramesenteroides*

10. Para poder responder a esta última pregunta, se facilita a los alumnos en formato texto la secuencia del gen ribosómico 16S obtenido para la cepa Brulv05 (ver la pantalla abajo), que no se identificó correctamente mediante MALDI-TOF MS, así como las instrucciones concretas para poder analizar esta secuencia en el Genbank. Una vez contestadas las preguntas del seminario virtual, el sistema califica el ejercicio para cada uno de los alumnos que lo hayan llevado a cabo.

Secuenciación del gen 16S de una cepa no identificada con MALDI-TOF MS

Después de realizar la secuenciación del gen 16S rRNA de la cepa Brulv05 cuya identificación fue dudosa a nivel de especie mediante MALDI-TOF MS se obtuvo la siguiente secuencia:

Secuencia:

```
TTGAGATTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGC
GAAAGGTGCTTGCACTTTCAAGTGAAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACACCTGCCTCAAGGCT
GGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGAATAAACTAGTGTGCGATGACACAAAGTTAAAAGG
CGCTTCGGCTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCTATTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAAGC
AATGATGCATAGCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGG
GAGGCTGCAATAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCTGTGTGATGAAGG
CTTTGGGCTGAATAAGACTGTTGATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAATGATTTAGTTTGAACGGTA
CCATACAGAAAGGAGCGGCTAAATACGTGCCAGCACGCCGGTAATACGTATGTCGCCGAGCGTTATCCG
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGAGGTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCGGGACTCAACTCCG
GAATGGCATTTGGAACTGGTTAACTTGAAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAA
GCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTTGAAGGCTGAA
AGTGTGGGTAGCAACAGGATAGATACCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTTGTAGG
AGGTTTCGCGCTTTAGTGCCGAAGCTAACGCTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGBTG
AAACTCAAAGGAATGACGGGACCCGCAAGCGGTTGGATGTTAAATGGAAGCAACCGCGAAG
AACCTTACCAAGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAAGTGTCTCTTCGGAGCAAAAGTGA
AGTGGTGCATGGTCTGCTCAGCTGCTGCTGCTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCT
TATTGTTAGTTGCCAGCATTAGATGGGACTTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGAAGGAAAGCGGG
GACGACGTGATCATGCCCCCTTATGACTGGGCTACACAGCTGCTACAATGGCGTATACAAAGGAT
TGCCAAACCGGAGGGTGAAGTAACTCTTAAAGTACGCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTGACT
ACATGAAGTGGAACTGCTAGTAACTGCGGACTGACGACCGCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACA
CACCGCCGTGACACATGGGAGTTTGTAAATGCCAAAGCGGGTGGCTAACCTTTTAGGAAGGAGCGGT
CTAAGGCAAGGAGATGACTGGGTTGAAGTGTAAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG
CTCCTTTCT
```

Para identificar la cepa siga los siguientes pasos: