

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Evolución de un nuevo ecotipo de *Lactobacillus* sp.

Trabajo de Investigación

Gabriela Isabel Gavilanes Rodríguez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 1 de diciembre de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Evolución de un nuevo ecotipo de *Lactobacillus* sp.

Gabriela Isabel Gavilanes Rodríguez

Calificación:

Gabriel Trueba, Ph.D.
Director de Proyecto de Titulación

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Coordinadora de Ing. en Procesos
Biotecnológicos

Paúl Cardenas, Ph.D.
Miembro del comité

Carlos Valle, Ph.D.
Miembro del comité

Quito, 1 de diciembre de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Gabriela Isabel Gavilanes Rodríguez

Código: 00110303

Cédula de Identidad: 1716989387

Lugar y fecha: Quito, 1 de diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios y María Auxiliadora por ser mis guías y fortaleza en todo momento.

A mis padres por su constante confianza, apoyo, enseñanzas a nivel académico y personal a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanos Sandra y Luis por su ejemplo de constancia en la consecución de sus metas.

A mi director de proyecto de titulación, Gabriel Trueba, por la confianza depositada en mí, motivación, tiempo, recursos y conocimientos impartidos para el desarrollo del presente proyecto y durante toda mi carrera.

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito por facilitar el uso de sus instalaciones para el desarrollo del proyecto.

A Paúl Cárdenas y Carlos Valle, miembros del comité de tesis, por sus consejos y acertadas sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

A María de Lourdes Torres, coordinadora de carrera, por su guía durante mi proceso de formación en el área de biotecnología.

A Sully Márquez, Kathy Parra, Lisseth Salinas y Deysi Parrales, por su ayuda incondicional, conocimientos y amistad.

A mis voluntarios Nathy, Sol y Ricky, por su trabajo y buen desempeño.

A Julia Muñoz, José Carrera Matute, Andrea Soria, Dayana Vinuesa, Jorge Álvarez y amigos en general por sus consejos, apoyo y amistad durante mis mejores años universitarios.

RESUMEN

Lactobacillus sp. son bacterias ácido lácticas que forman parte de la microbiota intestinal.

Estos, son conocidos por su alto potencial probiótico y su desempeño en cuanto a la colonización intestinal. Existen determinados factores evolutivos del microorganismo, tanto a nivel genotípico como fenotípico que desarrollan o inhiben su capacidad de colonización intestinal tras ser cultivados in vitro en medios artificiales y en condiciones diferentes a las del intestino. Mediante técnicas moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Genotipificación y Secuenciamiento de ADN, se evidencia las características genotípicas de *Lactobacillus sp.* wildtype extraídos de la microbiota de ratones CD-1 versus *Lactobacillus sp.* cultivados in vitro. Este estudio demuestra la rápida adaptación de *Lactobacillus sp.* a un nuevo nicho (medio artificial) dando lugar a un nuevo ecotipo de *Lactobacillus sp.* y demostrando la diferencia en cuanto a la viabilidad de crecimiento de los microorganismos dentro de un hábitat bajo condiciones óptimas versus un organismo adaptado a sobrevivir en un hábitat de mayor hostilidad. Este es un estudio piloto para comprender la viabilidad que posiblemente poseen los probióticos cultivados en medios artificiales y al ser introducidos en un nicho al cual no están adaptados, bajo condiciones de alta competitividad de espacio, nutrientes, antibióticos, etc., que inhiben el potencial adquirido en medios artificiales.

Palabras clave: *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus johnsonii*, Evolución, Ecotipo, Probióticos, MRS Agar, Rifampicina, Cámara de Petroff Hausser, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Secuenciamiento de ADN, Genotipificación.

ABSTRACT

Lactobacillus sp. are lactic acid bacteria, part of the intestinal microbiota. These are known for their high probiotic potential and performance in intestinal colonization. There are certain evolutionary factors of the microorganism at the genotypic and phenotypic levels that develop or inhibit their capacity for intestinal colonization after being cultured *in vitro* in artificial media and in conditions different from those of the intestine. Using molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), Genotyping and DNA Sequencing, the genotypic characteristics of *Lactobacillus* sp. wildtype extracted from the CD-1 mouse microbiota versus *Lactobacillus* sp. cultured *in vitro*. This study demonstrates the rapid adaptation of *Lactobacillus* sp. to a new niche (artificial medium) giving rise to a new ecotype of *Lactobacillus* sp. and showing the difference in the viability of growth of microorganisms within a habitat under optimum conditions versus an organism adapted to survive in a more hostile habitat. This is a pilot study to understand the potential viability of probiotics grown in artificial media and when they are introduced into a new niche where they are not adapted, under conditions of high competitiveness of space, nutrients, antibiotics, etc., the potential acquired in artificial means would be inhibited.

Key words: *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus johnsonii*, Evolution, Ecotype, Probiotics, MRS Agar, Rifampicin, Petroff Hausser Chamber, Polymerase Chain Reaction (PCR), DNA Sequencing, Genotyping.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. <i>Lactobacillus</i> sp.	11
1.2. Probióticos	11
1.3. Taxonomía y filogenia.....	12
1.4. Genotipificación	14
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. ÁREA DE ESTUDIO	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	16
5.1. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. del Intestino de Ratón CD-1	16
5.2. Identificación de cepas de <i>Lactobacillus</i> sp.	16
5.3. Obtención de cepas mutantes resistentes a Rifampicina de <i>Lactobacillus</i>	16
5.4. Ensayo de competencia: <i>Lactobacillus</i> sp (RR) vs. Wildtype.....	17
5.5. Antibiogramas	17
5.6. Siembra y pases diarios de mutantes (RR) en caldo MRS	17
5.7. Criopreservación de cepas	18
5.8. Extracción de ADN bacteriano por DNazol	18
5.9. PCR para gen 16S rRNA.....	18
5.10. Secuenciamiento de ADN e identificación de especie de <i>Lactobacillus</i> sp.	19
5.11. Genotipificación del gen más variable de <i>Lactobacillus</i> sp.....	19
5.12. Ensayo de crecimiento individual.....	19
5.13. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa inicial mutante (RR)	20
5.14. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa final mutante (RR)	20
5.15. Análisis estadístico.....	20
6. MÉTODOS	20
6.1. Obtención de <i>Lactobacillus</i> sp. del Intestino de Ratón CD-1	20
6.2. Identificación de cepas de <i>Lactobacillus</i> sp.	21
6.3. Obtención de cepas mutantes resistentes a Rifampicina de <i>Lactobacillus</i> sp.....	21
6.4. Ensayo de competencia: <i>Lactobacillus</i> sp (RR) vs. Wildtype.....	21
6.5. Siembra y pases diarios de mutantes (RR) en caldo MRS	22
6.6. Criopreservación de cepas	22
6.7. Extracción de ADN bacteriano por DNazol	23
6.8. PCR para gen 16S rRNA.....	23
6.9. Secuenciamiento de ADN e identificación de especie de <i>Lactobacillus</i> sp.	23
6.10. Genotipificación del gen más variable de <i>Lactobacillus</i> sp.....	24
6.11. Ensayo de crecimiento individual de Cepas mutantes iniciales (RR) y Cepas mutantes finales (RR).....	24
6.12. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa inicial mutante (RR)	25
6.13. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa final mutante (RR)	25
6.14. Análisis estadístico.....	25
7. RESULTADOS	26
7.1. Aislamiento e identificación de <i>Lactobacillus</i> sp.	26
7.2. Obtención de cepas mutantes de <i>Lactobacillus</i> sp. resistentes a Rifampicina....	27
7.3. Ensayo de competencia: <i>Lactobacillus</i> sp (RR) vs. Wildtype.....	27

7.4.	Antibiogramas de cepas mutantes resistentes a rifampicina (RR).	28
7.5.	Siembra de <i>Lactobacillus</i> sp. mutantes resistentes a rifampicina (RR) en caldo MRS. 30	
7.6.	Extracción de ADN de cepas aisladas Wildtype y mutantes (RR) de <i>Lactobacillus</i> sp. por DNAzol.....	30
7.7.	Amplificación de región del gen 16S rRNA mediante la técnica molecular PCR	30
7.8.	Identificación de especie de <i>Lactobacillus</i> sp. a partir del secuenciamiento del producto de PCR de la región del gen 16S rRNA.....	31
7.9.	Genotipificación del gen más variable de <i>Lactobacillus johnsonii</i>	32
7.10.	Ensayo de crecimiento de Cepa inicial RR. y Cepa final RR.	33
7.11.	Ensayo de Competencia de Cepa wildtype versus Cepa Inicial RR.....	36
7.12.	Ensayo de Competencia de Cepa wildtype versus Cepa Final RR.	38
8.	DISCUSIÓN	40
8.1.	Aislamiento e Identificación de <i>Lactobacillus</i> sp.	40
8.2.	Obtención de cepas mutantes de <i>Lactobacillus</i> sp. resistentes a Rifampicina....	41
8.3.	Ensayo de competencia	41
8.4.	Antibiogramas	41
8.5.	Siembra de <i>Lactobacillus</i> sp. en medio artificial MRS.	42
8.6.	Extracción de ADN con DNAzol.	43
8.7.	Identificación molecular de cepas de <i>Lactobacillus</i> sp.	43
8.8.	Genotipificación del gen LJ0648	44
8.9.	Análisis de crecimiento	44
9.	CONCLUSIONES	46
10.	RECOMENDACIONES.....	47
11.	Bibliografía	49
12.	ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Colonias de <i>Lactobacillus</i> sp. aisladas.....	26
Tabla 2. Ensayo de competencia de las tres cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. aisladas	27
Tabla 3. Cuantificación de ADN total extraído de cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. mediante ® DNazol.	30
Tabla 4. Especies identificadas de las cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. aisladas mediante el alineamiento de región del gen 16S rRNA.....	32
Tabla 5. Conteo de <i>Lactobacillus johnsonii</i> en Cámara Petroff Hauser de la Cepa Inicial RR y Cepa Final RR.	34
Tabla 6. Calculo de UFC/ml de <i>Lactobacillus johnsonii</i> y cambio logarítmico.....	35
Tabla 7. Conteo de colonias de la competencia de <i>Lactobacillus johnsonii</i> (Cepa Wildtype versus Cepa Inicial RR) en caja petri con MRS y MRS con rifampicina.	37
Tabla 8. UFC/ml y cambio logarítmico del conteo en placa petri <i>Lactobacillus johnsonii</i> , cepa wildtype y cepa inicial RR.....	37
Tabla 9. Conteo de colonias de la competencia de <i>Lactobacillus johnsonii</i> (Cepa Wildtype versus Cepa Final RR) en caja petri con MRS y MRS con rifampicina.....	39
Tabla 10 UFC/ml y cambio logarítmico del conteo en placa petri <i>Lactobacillus johnsonii</i> , cepa wildtype y cepa inicial RR.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cultivo por extensión en placa de dilución 10^4 de competencia entre bacterias wildtype y RR de la cepa A. . A) Cultivo en agar MRS. B) Cultivo en agar MRS + Rifampicina.	27
Figura 2. Cultivo por extensión en placa de dilución 10^4 de competencia entre bacterias wildtype y RR de la cepa B. A) Cultivo en agar MRS. B) Cultivo en agar MRS + Rifampicina.	28
Figura 3. Cultivo por extensión en placa de dilución 10^4 de competencia entre bacterias wildtype y RR de la cepa C. A) Cultivo en agar MRS. B) Cultivo en agar MRS + Rifampicina.	28
Figura 4. Antibiogramas de la cepa A de <i>Lactobacillus</i> sp..	29
Figura 5. Antibiogramas de la cepa A de <i>Lactobacillus</i> sp..	29
Figura 6. Antibiogramas de la cepa A de <i>Lactobacillus</i> sp. aisladas, mediante la técnica Kirby-Bauer con un disco de rifampicina a una concentración de 5 microgramos.	29
Figura 7. Amplificación de la región del gen 16S rRNA..	31
Figura 8. Amplificación del gen LJ0648.	33
Figura 9. Box plot de crecimiento logarítmico (ufc/ml) de Cepa inicial y final RR.	35
Figura 10. Box plot de crecimiento logarítmico (ufc/ml) de Cepa Wildtype versus Cepa Inicial RR.	38
Figura 11 Box plot de crecimiento logarítmico (ufc/ml) de Cepa Wildtype versus Cepa Final RR.	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Lactobacillus* sp.

El género *Lactobacillus* es un grupo de bacterias ácido lácticas, Gram-positivas, no poseen la enzima catalasa y por tanto no pueden desdoblarse el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua. Presentan un proceso fermentativo de carbohidratos que genera como principal metabolito lactato (Amund *et al*, 2016). Estas bacterias anaerobias facultativas, no son productoras de esporas, en su gran mayoría son móviles, su morfología microscópica es en forma de varilla, aunque se pueden encontrar también a modo de cocobacilos. Su disposición en cuanto a organización es en cadenas (Pot *et al*, 2014).

Su rango térmico en función de su capacidad óptima de crecimiento es de 30 a 40 °C, mientras que su pH puede encontrarse entre valores de 5.5 a 6.2. Sus requerimientos nutricionales son bastante complejos: cantidades y presencia específica de aminoácidos, vitaminas, sales o ácidos grasos. Además, poseen una mayor prevalencia en ecosistemas donde existe una alta concentración de carbohidratos. Se los puede encontrar en la microbiota normal de la boca, en el tracto gastrointestinal y en órganos genitales de humanos y animales (Salvetii *et al*, 2012).

1.2. Probióticos

El tracto gastrointestinal constituye uno de los ecosistemas microbianos con mayor diversidad donde los microorganismos asociados desempeñan roles de protección frente a invasión por parte de aquellos que son considerados patógenos. De la misma manera, la microbiota intestinal crea mecanismos que promueven las actividades metabólicas como la recuperación de energía y nutrientes. En base a este conocimiento se sugiere que el aumento de la microbiota intestinal mediante alimentos enriquecidos con probióticos (bacterias ácido lácticas con características similares a la gastro-intestinales) generan una mayor protección de la mucosa intestinal (Ink *et al*, 2016).

Se denominan probióticos a aquellos microorganismos que cuando han sido administrados a un hospedador en una cantidad adecuada, pueden conferir o brindar beneficios

para la salud de este a través de diferentes mecanismos de acción tales como la mejora de la barrera intestinal que tiene características defensivas (Toyama, 2010). Un probiótico ha cumplido con su propósito cuando ha sido capaz de adherirse a la mucosa intestinal, sin embargo, en la actualidad no se ha podido demostrar que estos microorganismos sean viables en el intestino o que logren colonizar el mismo durante largos periodos de tiempo. Además, están involucrados en la modulación inmunológica mediante la regulación de los perfiles de citoquinas para que desencadenen una respuesta tolerogénica ante la microbiota comensal, o en su defecto una respuesta proinflamatoria ante la presencia de microbiota patogénica. Finalmente se piensa que los probióticos, son capaces de mejorar la eficiencia metabólica a través de la modificación de la actividad enzimática de proteínas intraluminales (Hernández et al., 2015).

La presencia de consorcios microbianos con características probióticas no afecta a la proporción de bacterias presentes dentro de la microbiota intestinal, ni a las especies presentes en la misma. Sin embargo, existen datos que indican que la presencia de probióticos puede afectar significativamente a la expresión metabólica de enzimas extra celulares y las implicaciones y afectaciones se dan directamente en el desdoblamiento de carbohidratos para el metabolismo microbiano o la absorción del huésped (McNulty et al., 2011)

1.3. Taxonomía y filogenia

El 16S rRNA es uno de los genes más conservados a nivel celular bacteriano, el cual permite identificar la similitud de secuencias de ADN entre organismos relacionados. Debido a estas características del gen, se lo utiliza con frecuencia para determinar taxonomía, filogenia (relaciones evolutivas) y para estimar rangos de divergencia entre especies bacterianas (Janda et al., 2007).

Durante los últimos años, un alto número de genomas de bacterias ácido lácticas han sido secuenciados y la disponibilidad de información genética de las mismas ha aumentado notablemente. De esta manera se ha logrado mejorar la comprensión de procesos fisiológicos de las mismas y adaptación a nichos ecológicos para su colonización, así como la historia evolutiva de estas bacterias (Pot et al., 2014).

Las bacterias también presentan ventajas en el estudio de procesos evolutivos en comparación con organismos multicelulares que se basa en la relativa simplicidad de su

genoma, altas tasas de replicación y la disponibilidad de datos altamente consistentes de su información genética. De esta manera se puede estudiar la adaptación evolutiva que poseen los microorganismos para crecer en diferentes ecosistemas y adaptarse a innumerables nichos ecológicos (Pot et al, 2014).

Actualmente, existen un sinnúmero de técnicas moleculares que permiten una caracterización precisa de un microorganismo secuenciando de genes tales como: Multilocus Sequence Typing (MLST), 16S rRNA y 23S rRNA, gel de electroforesis de campo pulsado (PFGE) (Sunil, 2016).

A lo largo del tiempo los avances tecnológicos han generado una preferencia por el uso de métodos moleculares sobre los métodos clásicos y convencionales que han sido utilizados durante la historia en base a la fisiología y pruebas bioquímicas que se esperan en base a un determinado género o especie. El tiempo o la efectividad de identificación son grandes enemigos al momento de realizar una correcta identificación del microorganismo (Pot *et al*, 2014).

En investigaciones previas se han realizado comparaciones entre métodos moleculares y fenotípicos para la identificación de bacterias ácido lácticas y muestran que en base a esta última, un análisis en base a fermentación de azúcares puede llegar a ser bastante incierto y subjetivo dada la alta tasa de microorganismos que son capaces de variar en su metabolismo con pocos cambios en su genoma. El análisis del gen 16S rRNA es útil para determinar especie, pero es insuficiente para determinar clonalidad debido a que es demasiado conservado. La naturaleza conservada y la presencia universal de la secuencia del gen 16S rRNA, ha mostrado propiedades tales que ha permitido análisis de reloj molecular y al aplicarse dentro de estudios filogenéticos de especies (Sunil, 2016).

El análisis del contenido de ADN es altamente recomendable para la descripción de nuevas especies de *Lactobacillus*, donde su contenido de G-C no debe ser mayor al 50%, además la variación de esta relación no debe ser mayor al 5% dentro de una especie; y no mayor al 10% dentro de género (Canchaya, 2006).

1.4. Genotipificación

Los protocolos de genotipificación se basan en secuencias (de nucleótidos) completas o parciales de genes, los cuales son utilizados para diferenciar e identificar diferentes aislados de una misma especie microbiana. En los últimos años esta técnica se la ha desarrollado con el fin de entender y visualizar la evolución existente en una determinada bacteria (Tong et al, 2014).

El fundamento teórico de la técnica y su aplicación a estudios evolutivos tiene sus restricciones, sobretodo en grupos bacterianos recientes donde la variación genética es mínima (Tong et al, 2014). Dentro del análisis de árboles filogenéticos, la alineación de las secuencias de ADN de genes de cepas analizadas se las puede realizar a través de programas bioinformáticas (Claesson et al, 2006). Es importante mencionar que a la fecha casi ningún esquema debidamente estandarizado para MLST se encuentra disponible para *Lactobacillus*. Sin embargo, para *Lactobacillus salivarium* un esquema compuesto de cinco genes está disponible en PubMed (Pot et al, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La adaptación de los organismos a nuevos nichos ha sido un tema de mucho interés, ya que, por un lado, la adaptabilidad de organismos a nuevos nichos puede causar una pérdida de adaptación al nicho original de este organismo (Elena y Sanjuán,2017) y por otro lado, la adquisición de esta capacidad en microorganismos ambientales puede representar un riesgo dentro de ambientes hospitalarios, debido a la adaptación de estas bacterias a tejidos humanos.

El presente estudio tiene la finalidad de documentar la evolución de una mayor aptitud a crecimiento en medio artificial de una bacteria de la microbiota intestinal de un ratón.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El presente proyecto de titulación se llevó a cabo en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, Laboratorio de Bacteriología, Colegio de Ciencias Biológicas Ambientales, Cumbaya, Ecuador.; desde de junio de 2016 a junio de 2017.

Las cepas de *Lactobacillus* sp. utilizadas en el presente estudio, se aislaron a partir de intestino delgado un ratón CD-1.

La genotipificación, así como la secuenciación de ADN se realizó por medio de la empresa Functional Biosciences (USA).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar cambios evolutivos fenotípicos y genotípicos de *Lactobacillus* sp. intestinales cuando son cultivados en medios artificiales.

4.2. Objetivos específicos

- Aislar e identificar por microscopia cepas de *Lactobacillus* sp. extraídas de intestino de ratón CD-1.
- Seleccionar mutantes resistentes a la rifampicina.
- Identificar especie de *Lactobacillus* sp. genotípicamente por medio de técnicas moleculares.
- Realizar 150 pases en medio artificiales de las cepas intestinales y luego verificar el grupo clonal mediante métodos moleculares.
- Comparar la capacidad de replicación de las cepas de *Lactobacillus* sp. antes y después de ser cultivadas en medios artificiales.

5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

5.1. Obtención de *Lactobacillus* sp. del Intestino de Ratón CD-1

- Ratón CD-1
- Kit de disección
- Cloroformo
- Alcohol al 90%
- Caldo MRS Broth
- Agar MRS
- Caja hermética
- Jarra GasPack
- Incubadora

5.2. Identificación de cepas de *Lactobacillus* sp.

- Agar MRS
- Kit de Tinción Gram
- Microscopio óptico
- Aceite de inmersión
- Incubadora
- Peróxido de hidrógeno
- Test de oxidasa

5.3. Obtención de cepas mutantes resistentes a Rifampicina de *Lactobacillus*

- Etanol
- Rifampicina
- NaOH
- Agar MRS
- Caldo MRS
- Tubos
- Hisopos
- Kit de Tinción Gram
- Peróxido de hidrógeno
- Test de oxidasa

- Tubos crio
- Incubadora

5.4. Ensayo de competencia: *Lactobacillus* sp (RR) vs. Wildtype

- Rifampicina
- Etanol
- NaOH
- Agar MRS
- Caldo MRS
- Tubos
- Hisopos
- Kit de Tinción Gram
- Peróxido de hidrógeno
- Test de oxidasa
- Tubos crio
- Incubadora

5.5. Antibiogramas

- Agar MRS
- Disco de rifampicina (5 μ g)
- Solución McFarland 0,5

5.6. Siembra y pases diarios de mutantes (RR) en caldo MRS

- Caldo MRS
- Puntas estériles
- Puntas 100-1000ul
- Micropipeta
- Agar MRS
- Solución de Rifampicina
- Kit de Tinción Gram
- Peróxido de hidrógeno
- Test de oxidasa
- Tubos crio

- Incubadora

5.7. Criopreservación de cepas

- Tubos crio
- Agar MRS
- Solución de rifampicina
- BHI
- Glicerol
- Palillos estériles
- Ultracongelador (-80°C)

5.8. Extracción de ADN bacteriano por DNAzol

- Agar MRS
- NanoDrop
- PBS 1X
- Microtubos Eppendorf
- Centrifuga
- Caldo MRS
- DNAzol
- Alcohol (100%)
- Etanol 75%
- Agua de PCR

5.9. PCR para gen 16S rRNA

- Primers EubB (27F) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
- Primer (1492R) GGTTACCTTTTACGACTT
- Buffer MgCl₂
- dNTPs (10mM)
- Taq Polimerasa
- Agua PCR
- Termociclador BioRad nuevo
- Agarosa

- Bromuro de etidio
- TBE 1X
- Cámara de electroforesis

5.10. Secuenciamiento de ADN e identificación de especie de *Lactobacillus* sp.

- Amplicones
- Parafilm

5.11. Genotipificación del gen más variable de *Lactobacillus* sp

- Primer F TAATGCCAATCTTTGAACTG
- Primer R GGATGCACTAGATAAAGA
- Buffer MgCl₂
- dNTPs (10mM)
- Taq Polimerasa
- Agua PCR
- Termociclador BioRad nuevo
- Agarosa
- Bromuro de etidio
- TBE 1X
- Cámara de electroforesis

5.12. Ensayo de crecimiento individual

- Agar MRS
- Caldo MRS
- Asas de vidrio
- Alcohol al 96%
- Cámara Petroff-Hauser
- Puntas estériles
- Micropipetas

5.13. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa inicial mutante (RR)

- Agar MRS
- Caldo MRS
- Solución de rifampicina
- Alcohol al 90%
- Asas de vidrio

5.14. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa final mutante (RR)

- Agar MRS
- Caldo MRS
- Solución de rifampicina
- Alcohol al 90%
- Asas de vidrio

5.15. Análisis estadístico

- Excel
- Minitab

6. MÉTODOS

6.1. Obtención de *Lactobacillus* sp. del Intestino de Ratón CD-1

Para dar inicio al estudio se solicitó al Departamento PROPAD del INSPI la adquisición de un ratón de laboratorio CD-1, la cual se realizó con un mes de anticipación. En el bioterio se procedió a colocar al ratón en una caja que contenía un papel empapado con cloroformo para sacrificar al ratón. Posterior a esto, se colocó al ratón en una bandeja, se limpió su abdomen con alcohol al 90%, además de esto, el kit de disección y pinzas también fueron esterilizados con alcohol al 90%. Una vez estériles se cortó la piel del abdomen del ratón de manera vertical; cortada la piel externa se esterilizó nuevamente el kit con alcohol al 90% y se flameó para cortar el tejido envolvente de los órganos. Se identificó la posición del estómago e intestino delgado al cual se lo realizó un corte de 1 cm y se lo colocó en un tubo con 1 ml de caldo MRS (Anexo 1) El tubo fue incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Posterior a esto se realizó un pase con hisopos a dos cajas Petri con agar MRS (Anexo 2): una caja fue estriada

con una porción de intestino delgado mientras que la otra con muestra del caldo. Estas cajas se incubaron en una jarra GasPack con una vela en su interior para generar un ambiente microaerófilico con CO₂ en su interior durante 5 días a 37°C en la incubadora #6 del Instituto de Microbiología. Los restos orgánicos del ratón diseccionado se eliminaron dentro del grupo de desechos infecciosos para un correcto tratamiento de los mismos.

6.2. Identificación de cepas de *Lactobacillus* sp.

Una vez que existieron colonias aisladas en cada una de las cajas Petri anteriormente sembradas, se procedió a realizar tinción Gram (Anexo 3) para la identificación de la morfología microscópica de cada colonia. Se aisló dos colonias de cada caja que tengan las características de ser bacilos Gram positivos, a las cuales se las sembró en agar MRS por 24h a 37°C en condiciones anaeróbicas. Una vez que existió crecimiento se confirmó su morfología microscópica, se complementó con pruebas bioquímicas: catalasa y oxidasa, y se almacenaron en congelación (Protocolo de criopreservación véase punto 6.7).

6.3. Obtención de cepas mutantes resistentes a Rifampicina de *Lactobacillus* sp.

Las cepas confirmadas fueron sembradas en caldo MRS por 24h a 37°C en condiciones anaeróbicas. Luego de este tiempo, se colocó 10 ml de caldo con rifampicina (hasta alcanzar 100 µg/ml). Se agitó levemente los tubos y se los incubó a las condiciones anteriormente mencionadas.

Posteriormente se preparó cajas Petri con agar MRS con rifampicina (100 µg/ml) y se sembró a modo de antibiograma (hisopado tipo césped). Estas cajas fueron incubadas por 24h a 37°C con la finalidad de seleccionar mutantes.

Aquellas que presentaron crecimiento en las cajas con antibiótico, se les realizó tinción Gram y pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa) para confirmar su género bacteriano. Las cepas confirmadas como *Lactobacillus* sp. se criopreservaron.

6.4. Ensayo de competencia: *Lactobacillus* sp (RR) vs. Wildtype

Una vez obtenidas las bacterias wildtype como también las bacterias mutantes resistentes a rifampicina (RR), se realizó un ensayo de competencia en caldo MRS con rifampicina (100 µg/ml), para después cultivarlas en agar con antibiótico y sin antibiótico y realizar un conteo

de cada una de las cajas respectivamente e identificar el número de colonias wildtype y mutantes resistentes a rifampicina. Para este ensayo, se utilizó la misma cantidad de células bacterianas tanto wildtype como mutantes resistentes a rifampicina, considerando una misma concentración inicial de bacterias mediante una escala McFarland 0.5 con solución salina (0.9%).

En 20 ml de caldo MRS se vertieron 2 ml de solución McFarland 0.5 tanto de bacterias wildtype como mutantes (RR). Se incubaron por 24h a 37°C en condiciones anaeróbicas. Posterior a esto se realizó una siembra en extensión en placa tomando 100 µl del caldo y sembrándola en agar MRS con rifampicina (100 µg/ml) y en otra caja sin antibiótico con el motivo de asegurar la viabilidad de las células y que exista una proporción 1:1 de ambos tipos de bacterias (resistentes y no resistentes al antibiótico).

Las cepas que compitieron entre sí y presentaron una relación de crecimiento 1:1 al ser cultivadas en agar, fueron seleccionadas para continuar con la fase experimental del proyecto; así mismo estas fueron criopreservadas (cepas iniciales mutantes). A las cepas mutantes (RR) se les realizó antibiogramas mediante el método de Kirby-Bauer. El medio de cultivo a utilizarse fue MRS y el disco de rifampicina a una concentración de 5 microgramos. Para la siembra en el medio se realizó una solución McFarland 0.5.

6.5. Siembra y pases diarios de mutantes (RR) en caldo MRS

Se preparó tubos de capacidad de 100 ml con 20 ml de caldo MRS y con un hisopo se seleccionó una colonia de cada cepa mutante, se inoculó individualmente por separado y se incubó por 24h en condiciones anaeróbicas a 37°C. Diariamente se procedió a tomar 200 µl de caldo cultivado y se realizaron pases a caldo MRS estéril. Se incubó bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar cada semana se cultivó el contenido de los caldos en agar MRS + rifampicina (100 µg/ml) para realizar a las colonias tinción GRAM y pruebas bioquímicas para verificar que sean *Lactobacillus* sp y que mantengan su resistencia a rifampicina, Estas cepas fueron criopreservadas semanalmente hasta llegar al pase número 150.

6.6. Criopreservación de cepas

La criopreservación de cepas se realizó partiendo de un cultivo de las bacterias en tubos con agar MRS + rifampicina (100 µg/ml) en pico de flauta, a las colonias visibles en los tubos

se agregó 1.500 µl de BHI + glicerol (20%) y con la ayuda de un palillo se despegaron las colonias del agar y estas quedaron suspendidas en la solución y se trasladó el contenido a tubos de crioconservación debidamente rotulados y colocados en un ultracongelador a -80°C.

6.7. Extracción de ADN bacteriano por DNazol

Se cultivó en agar MRS + rifampicina las cepas de *Lactobacillus* crio-preservadas: tipo salvaje, mutantes iniciales y finales para que se encuentren en fase logarítmica luego de 24 h de incubación a 37°C y condiciones anaeróbicas. El protocolo se detalla en el Anexo 5. Posteriormente, se midió la concentración de ADN de las muestras amplificadas mediante el equipo NanoDrop Thermo Scientific, para verificar que la extracción fue correctamente realizada.

6.8. PCR para gen 16S rRNA

Se consideró el número de reacciones a prepararse en función del número de muestras obtenidas donde se incluyó un control positivo (ADN de *Salmonella* sp.) y uno negativo (sin ADN). Se utilizaron los primers EubB (27F) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y (1492R) GGTTACCTTGTTACGACTT. Las concentraciones de reactivos para la PCR por reacción, considerando un volumen final de 10 µl, se detallan en el Anexo 6.

La programación del termociclador para el gen 16S rRNA se detalla en el Anexo 7, con un tiempo estimado de 3h15min de duración.

Para la electroforesis se elaboró un gel de agarosa al 1.5%, con 1 µl de Bromuro de Etidio y se programó el equipo a 80 V, 200 mA durante 45 minutos.

6.9. Secuenciamiento de ADN e identificación de especie de *Lactobacillus* sp.

Una vez obtenidos los amplicones se los selló con parafilm y se los rotuló para enviarlos a la empresa Functional Biosciences (Estados Unidos). Las secuencias recibidas, tanto Forward como Reverse, de la región 16S rRNA fueron alineadas en el programa bioinformático MEGA 7.0 (Kumar et al, 2015) y se generó una secuencia consenso la cual fue analizada en la base de datos del NCBI© con la herramienta BLAST (Altschul,1990), la cual determinó la especie de

las bacterias enviadas a secuenciar de acuerdo al porcentaje de similitud del 16S rRNA con respecto a las secuencias del Gen Bank (Anexo 8).

Con la información obtenida se procedió a realizar árboles filogenéticos para determinar la cercanía entre las especies a partir de secuencias reverse, forward y la combinación de ambas.

6.10. Genotipificación del gen más variable de *Lactobacillus* sp

Una vez que se identificó que el gen 16S rRNA fue el mismo para la cepa wildtype, mutante inicial y mutante final; se procedió a realizar una genotipificación del gen más variable de la especie de *Lactobacillus* encontrada. El gen más variable se seleccionó a partir de literatura y datos publicados en el Gen Bank. En caso de que la especie de *Lactobacillus* fue previamente estudiada, se buscó un MLST y se seleccionó uno de sus genes más variables. En caso de que la secuencia del gen, no haya estado descrita en el Gen Bank, se procedió a sintetizar primers específicos para un determinado gen.

Una vez solicitados los primers, se procedió a realizar la extracción de ADN de la cepa de estudio tanto wildtype, como mutante inicial y final para realizar una PCR con dichos primers (Anexo 9 y 10) y se envió a secuenciar los amplicones obtenidos a la empresa Functional Bioscience.

Obtenidas las secuencias del gen más variable, se alinearon en MEGA 7.0 (Kumar et al,2015); y se verificará si la bacteria wildtype, mutante inicial y final son la misma, es decir, si fueron clones (Anexo 11).

6.11. Ensayo de crecimiento individual de Cepas mutantes iniciales (RR) y Cepas mutantes finales (RR).

Con la finalidad de determinar la tasa de crecimiento y variabilidad de la misma, se realizaron conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias mutantes iniciales y finales. Para esto se cultivó a los *Lactobacillus* en caldo MRS en tubos independientes y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} . Para el conteo se utilizó la técnica de células vivas en cámara de Petroff - Hausser. Se trabajó con tres réplicas en cada dilución para aumentar el valor estadístico. Estos datos se procesaron en Excel para la determinación de su promedio, varianza, desviación estándar y cambio a logaritmo.

6.12. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa inicial mutante (RR)

Para identificar la tasa de crecimiento de cepas wildtype versus cepas iniciales, se realizó un conteo en placa, donde se visualizó la tasa de crecimiento de estas cepas en dos tipos de medio: agar MRS + rifampicina, y agar MRS sin antibiótico. De esta forma se pudo visualizar el diferencial de células iniciales mutantes de aquellas wildtype y así establecer el porcentaje de eficiencia de crecimiento en función de los dos tipos de bacterias. El ensayo se realizó por triplicado y en diluciones seriadas hasta 10^{-5} .

6.13. Ensayo de competencia: Cepa wildtype (RS) vs. Cepa inicial mutante (RR)

Se realizó un conteo en placa, donde se visualizó la tasa de crecimiento de estas cepas en dos tipos de medio: agar MRS + rifampicina, y agar MRS sin antibiótico. De esta forma observar el diferencial de células iniciales mutantes de aquellas wildtype y establecer el porcentaje de eficiencia de crecimiento en función de los dos tipos de bacterias. El ensayo se realizó por triplicado y en diluciones seriadas hasta 10^{-5} .

6.14. Análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos de crecimiento microbiano en función de los ensayos de competencia de células wildtype versus mutantes iniciales y finales; así como las tasas de crecimiento individual. Se realizó una sumatoria de los datos experimentales y se los cambio a logaritmos para con estos datos realizar los análisis estadísticos requeridos, considerando que el crecimiento bacteriano es en una base exponencial o logarítmica. Así mismo, se trabajó solo con los datos contables, es decir que en las diluciones donde las colonias o células fueron incontables no fueron consideradas. Considerando esto, se procedió a realizar un ensayo de Levene Test para identificar homogeneidad de las varianzas para de esta manera realizar un ensayo t-student donde se identificó las diferencias significativas entre tratamientos y se determinó si la hipótesis nula fue aceptada o rechazada, la misma que enuncia que las medias de crecimiento microbiano son iguales. Se consideró un nivel de significancia del 0.05%. Para este análisis se utilizó el paquete estadístico RStudio (RStudio Team, 2015), que muestra valores tabulados, experimentales, *p*-value, gráficas box-plot, valores de la mediana y cuartiles.

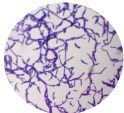
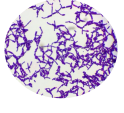

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp.

En la fase de aislamiento de *Lactobacillus* sp., donde se cultivó por 24h dos cajas Petri se pudo observar crecimiento microbiano en ambas. Sin embargo, únicamente se logró encontrar presencia de *Lactobacillus* en la caja Petri donde se realizó un hisopado directo del intestino del ratón. Esto se corroboró mediante pruebas bioquímicas y tinción Gram, donde se observó bacterias en forma de bacilos y de coloración violeta (tabla 1).

La morfología observada bajo el microscopio de bacterias sugerentes de *Lactobacillus* sp. fue de bacilos Gram positivos y se confirmó el género bacteriano con pruebas bioquímicas cuyos resultados fueron catalasa y oxidasa negativas. De esta manera se aislaron tres colonias con las características antes mencionadas luego de 24 h de incubación. Las colonias descritas fueron criopreservadas a -80°C .

Tabla 1. Colonias de *Lactobacillus* sp. aisladas.

Cepa	Tinción Gram	Pruebas Bioquímicas		Fotografía Aumento: 1000X
		Catalasa	Oxidasa	
A	BG+	Negativo	Negativo	
B	BG+	Negativo	Negativo	
C	BG+	Negativo	Negativo	

7.2. Obtención de cepas mutantes de *Lactobacillus* sp. resistentes a Rifampicina.

Las tres cepas seleccionadas para el estudio posterior a la exposición con rifampicina (100 µg/ml) mostraron resistencia a dicho antibiótico luego de 24h de incubación, pues se evidenció crecimiento de varias colonias en MRS + rifampicina (100 µg/ml). Una vez identificada la morfología bacteriana se criopreservaron dichas cepas mutantes.

7.3. Ensayo de competencia: *Lactobacillus* sp (RR) vs. Wildtype

A las 24 h de incubación posterior al inicio de competencia entre cepas wildtype vs. su correspondiente mutante resistente a rifampicina (RR), la proporción de crecimiento fue equivalente a 1:1. Esto se llegó a inferir dado que el número de bacterias que crecieron en MRS sin antibiótico fueron el doble de aquellas que crecieron en MRS con rifampicina. Por tanto, en el primer ensayo crecieron bacterias wildtype y mutantes; mientras que en el segundo únicamente aquellas resistentes a rifampicina. En la tabla 2 se describe los datos numéricos de colonias contadas y la dilución utilizada para cada cepa al momento de realizar la técnica de extensión en placa tanto en agar MRS y agar MRS+ Rifampicina.

Tabla 2. Ensayo de competencia de las tres cepas de *Lactobacillus* sp. aisladas

Cepa A			Cepa B			Cepa C		
Dilución	Conteo		Dilución	Conteo		Dilución	Conteo	
	MRS	MRS+RIF		MRS	MRS+RIF		MRS	MRS+RIF
10 ³	inc	inc	10 ³	inc	inc	10 ³	inc	inc
10 ⁴	670	318	10 ⁴	533	249	10 ⁴	436	226

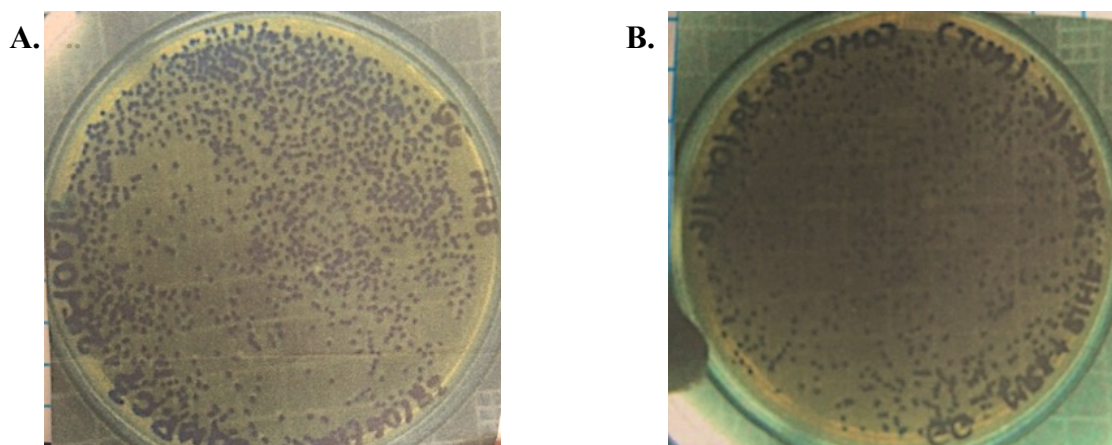


Figura 1 Cultivo por extensión en placa de dilución 10⁴ de competencia entre bacterias wildtype y RR de la cepa A. . **A)** Cultivo en agar MRS. **B)** Cultivo en agar MRS + Rifampicina.

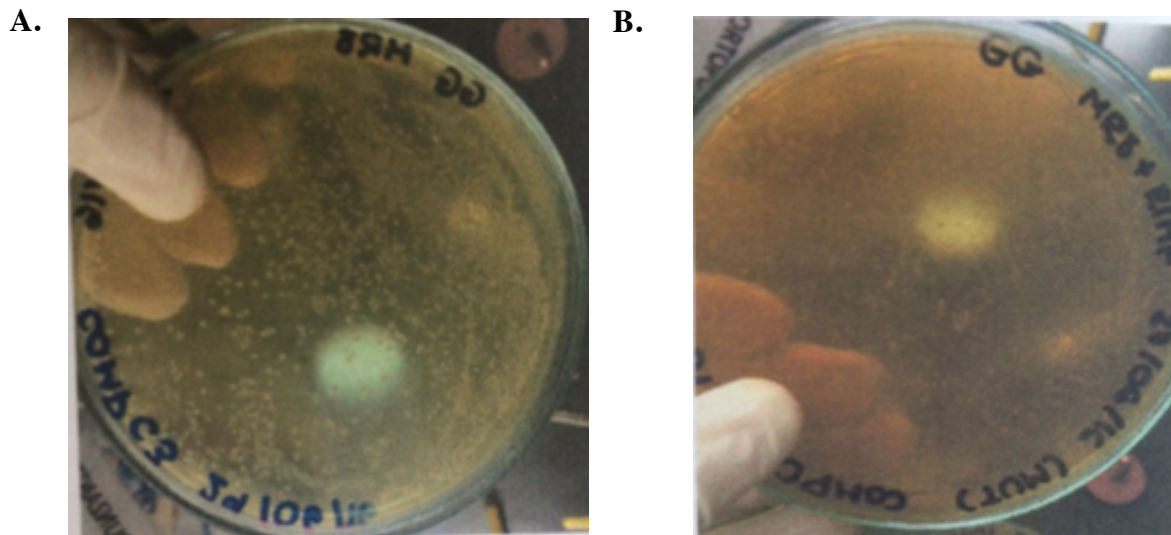


Figura 2. Cultivo por extensión en placa de dilución 10^4 de competencia entre bacterias wildtype y RR de la cepa B. **A)** Cultivo en agar MRS. **B)** Cultivo en agar MRS + Rifampicina.

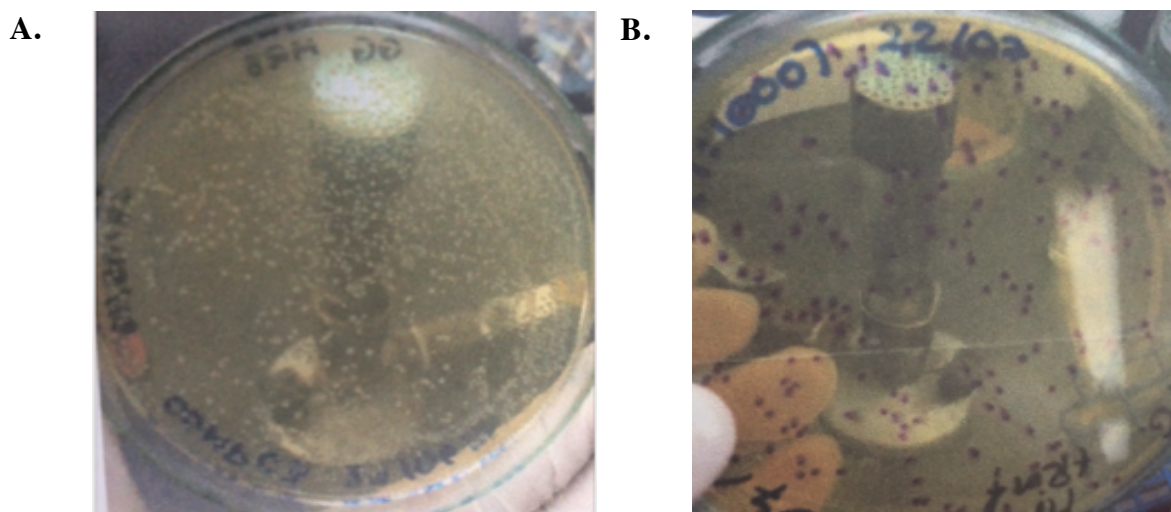


Figura 3. Cultivo por extensión en placa de dilución 10^4 de competencia entre bacterias wildtype y RR de la cepa C. **A)** Cultivo en agar MRS. **B)** Cultivo en agar MRS + Rifampicina.

7.4. Antibiogramas de cepas mutantes resistentes a rifampicina (RR).

Se obtuvieron tres antibiogramas correspondientes a las tres cepas aisladas con anterioridad. Luego de 24 h de incubación no se evidenció presencia de halos de inhibición de crecimiento por parte del antibiótico en disco, lo cual indica que las tres cepas aisladas son resistentes a rifampicina, corroborando las condiciones deseadas para el estudio.



Figura 4. Antibiogramas de la cepa A de *Lactobacillus* sp. aisladas, mediante la técnica Kirby-Bauer con un disco de rifampicina a una concentración de 5 microgramos.



Figura 5. Antibiogramas de la cepa A de *Lactobacillus* sp. aisladas, mediante la técnica Kirby-Bauer con un disco de rifampicina a una concentración de 5 microgramos.

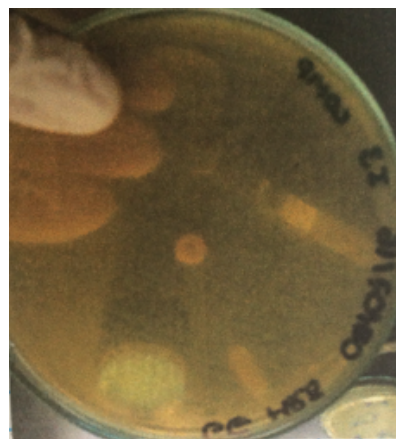


Figura 6. Antibiogramas de la cepa A de *Lactobacillus* sp. aisladas, mediante la técnica Kirby-Bauer con un disco de rifampicina a una concentración de 5 microgramos.

7.5. Siembra de *Lactobacillus* sp. mutantes resistentes a rifampicina (RR) en caldo MRS.

Durante 150 días se realizaron pases periódicos a nuevo caldo MRS estéril, el crecimiento positivo de las cepas se infirió a través de turbidez en el medio de cultivo. Sin embargo, a partir del pase 72 empezó a existir adherencia de las cepas bacterianas a la pared del tubo de cultivo, dando lugar a una mayor turbidez del medio. Las pruebas semanales de confirmación de pureza del cultivo (tinción Gram y pruebas bioquímicas) mostraron la presencia de bacilos Gram + y estas fueron criopreservadas semanalmente, verificando ausencia de contaminación.

7.6. Extracción de ADN de cepas aisladas Wildtype y mutantes (RR) de *Lactobacillus* sp. por DNAzol

Luego de 24 horas de revivir las cepas criopreservadas se realizó el proceso de extracción de ADN mediante DNAzol. Se verificó la presencia de ADN genómico mediante la cuantificación del mismo en un equipo Nanodrop, en el cual se verificó una concentración de ADN en un rango estimado de 2,9 – 10,3 ng/μl. En cuanto a la relación 260/280 existieron valores entre 1,6 a 2, indicando un ADN de buena calidad. Así mismo la relación 260/230 tuvo valores inferiores a 1,5; lo que indicó que la extracción era útil para la realización de una posterior PCR (tabla 4).

Tabla 3 Cuantificación de ADN total extraído de cepas de *Lactobacillus* sp. mediante DNAzol.

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
A (Wildtype)	5,1	1,68	1,47
B (Wildtype)	3,1	1,63	1,23
C (Wildtype)	10,3	1,89	1,33
A (RR inicial)	3,7	1,95	1,42
B (RR inicial)	5,00	1,98	1,34
C(RR inicial)	11,4	1,98	1,47
A (RR final)	3,6	2,00	1,42
B (RR final)	3,3	1,88	1,44
C (RR final)	2,9	1,63	1,38

7.7. Amplificación de región del gen 16S rRNA mediante la técnica molecular PCR

Se amplificó una región específica del gen 16S rRNA mediante primers universales para 16S rRNA primers EubB (27F) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y (1492R)

GGTTACCTTGTTACGACTT). Los productos amplificados se los observó al utilizar electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se visualizó un fragmento de peso molecular de aproximadamente 1490 pb (Figura 10). Se descartó amplificaciones inespecíficas, pues el control positivo amplificó correctamente y en el control negativo no se evidenció ningún producto que demuestre contaminación.

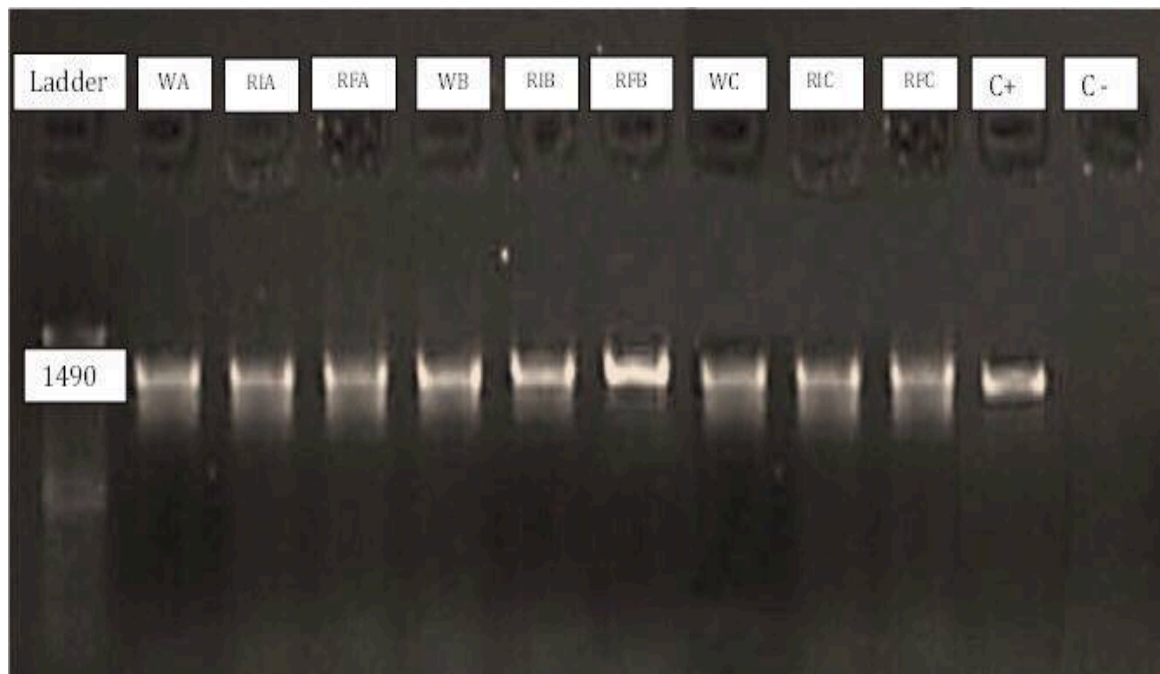


Figura 7. Amplificación de la región del gen 16S rRNA. Gel de Electroforesis al 1,5% de agarosa de amplificación de región del gen 16S rRNA. L: (Ladder de 100 pb INVITROGEN ©), Cepas de *Lactobacillus* sp.: A, B, C, (Wildtype, R. Inicial, R. final), C+: Control positivo de *Salmonella* sp. y C- control negativo. Tamaño del amplicón ~1490.

7.8. Identificación de especie de *Lactobacillus* sp. a partir del secuenciamiento del producto de PCR de la región del gen 16S rRNA.

Los productos de PCR (amplicones) se envió a secuenciar a la empresa Functional Biosciences (Estados Unidos). Una vez obtenidas las secuencias de interés, estas fueron alineadas en el programa bioinformático MEGA 7.0 (Kumar et al, 2015) y se generó una secuencia consenso la cual fue analizada en la base de datos del NCBI© con la herramienta BLAST (Altschul,1990) y de esta manera se determinó el género y la especie específica de *Lactobacillus* de cada cepa aislada en el estudio (Tabla 5).

Tabla 4. Especies identificadas de las cepas de *Lactobacillus* sp. aisladas mediante el alineamiento de región del gen 16S rRNA.

CEPAS	MUESTRAS	ESPECIES
CEPA A	A (Wildtype)	<i>L. johnsonii</i>
	A (RR inicial)	<i>L. murinus</i>
	A (RR final)	<i>L. murinus</i>
CEPA B	B (Wildtype)	<i>L. johnsonii</i>
	B (RR inicial)	<i>L. johnsonii</i>
	B (RR final)	<i>L. johnsonii</i>
CEPA C	C (Wildtype)	<i>B. cereus</i>
	C (RR inicial)	<i>L. murinus</i>
	C (RR final)	<i>L. murinus</i>

Al obtener los resultados de la tabla 5, se decidió trabajar con las bacterias correspondientes a la cepa B, pues estas fueron las únicas que pertenecían a la misma especie (*L. johnsonii*), después de todo el procedimiento realizado. Las otras cepas (A y C), se descartaron del estudio.

7.9. Genotipificación del gen más variable de *Lactobacillus johnsonii*.

Al realizar una búsqueda bibliográfica del gen más variable de *L. johnsonii*, se verificó que no existe información de un MSLT de *L. johnsonii* en el Gen Bank. Sin embargo, según Buhnik-Rosenblau, K y colaboradores; indican que el gen más variable de *L. johnsonii* es LJ0648. Para la genotipificación de este gen se sintetizó primers específicos con la finalidad de amplificar la región correspondiente al gen LJ0648. Los primers utilizados fueron: primer F (TAA TGC CAA TCT TTG AAC TG) y primer R (GGA TGC ACT AGA TAA AGA). Al utilizar estos primers para realizar PCR y amplificar el gen de interés, se obtuvo productos de aproximadamente 522 pb, tamaño del gen LJ0648 (Figura 11). Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar a Functional Biosciences (Estados Unidos).

Una vez obtenidas las secuencias de la amplificación, se procedió a alinearlas en Mega 7.0 (Kumar et al, 2015) y observar si estas secuencias eran iguales y no poseían diferencias. Al alinear, todas las muestras enviadas a secuenciar fueron homologas en su totalidad, por lo cual se identificó que la Cepa B; correspondiente a las tres muestras de *Lactobacillus johnsonii* eran posibles clones; considerando el análisis de un solo gen.

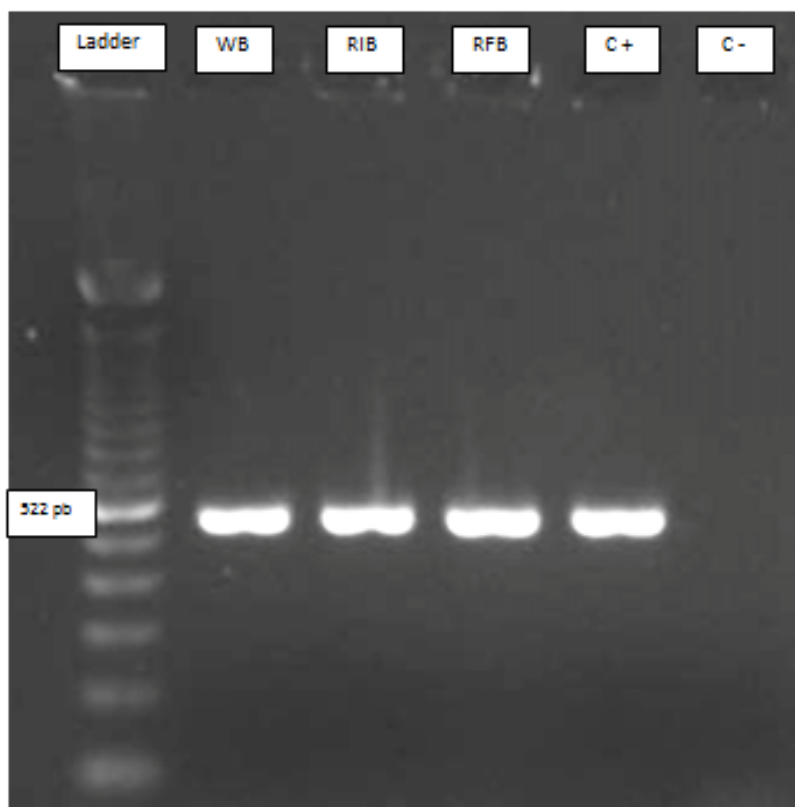


Figura 8. Amplificación del gen LJ0648. Gel de Electroforesis al 1,5% de agarosa de amplificación de región del gen LJ0648.L: (Ladder de 100 pb INVITROGEN ©), Cepas de *Lactobacillus johnsonii.*: Wildtype, R. Inicial, R. final, C+: Control positivo y C-: Control negativo. Tamaño del amplicón ~522 pb

7.10. Ensayo de crecimiento de Cepa inicial RR. y Cepa final RR.

Al contabilizar el número de células (UFC/ml) en una cámara Petroff Hauser, se obtuvo valores numéricos por triplicado de cuatro distintas diluciones (Tabla 6). Estos valores se utilizaron para realizar un test de Levene y T-student. Al realizar la prueba de Levene, se obtuvo un valor P de 0.1781, el cual no rechaza la hipótesis nula y demuestra que tanto la varianza de la cepa inicial RR como la varianza de la cepa final RR son homogéneas (Anexo 12), esto indica que se cumplió el parámetro para realizar el siguiente test (t-student). Al aplicar el t-student test, se verificó que la hipótesis nula (H_0) se rechaza; ya que el valor P es menor a 0,05; pues P posee un valor de $1.409e-06$, lo cual es significativo para este ensayo y demuestra que la cepa inicial posee una media de crecimiento diferente a la cepa final (Anexo 13). En otras palabras al rechazar la hipótesis nula, que dice que las medias son iguales, se comprueba estadísticamente que las cepas crecen a una tasa de UFC/ml diferente. Así mismo, al observar la figura 6, correspondiente a un box plot del ensayo realizado, se verifica que el último cuartil

de cepa Inicial RR, no alcanza al primer cuartil de la cepa final RR, pues esta posee un crecimiento mayor, lo cual también se verifica en la diferente mediana de cada cepa al visualizar el Box blot (figura 6).

Tabla 5. Conteo de *Lactobacillus johnsonii* en Cámara Petroff Hauser de la Cepa Inicial RR y Cepa Final RR.

	Cepa Inicial RR			Cepa Final RR		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
Dilución 1:10	330	396	304	450	487	304
	210	174	206	444	404	322
	140	303	322	487	396	403
	198	278	204	314	303	377
	177	197	184	402	378	339
Dilución 1:100	35	28	40	50	47	42
	18	22	16	46	44	38
	22	26	28	48	51	29
	16	14	18	30	34	55
	19	35	26	39	39	37
Dilución 1:1000	3	1	3	5	7	5
	1	0	2	3	2	5
	3	5	3	1	4	2
	7	1	1	3	5	6
	1	2	1	6	2	4
Dilución 1:10000	0	1	0	0	1	0
	1	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	2
	0	0	0	1	0	0

Al obtener los datos numéricos del conteo de cepas Iniciales RR y finales de RR, se realizó las respectivas sumatorias de las replicas y se obtuvo datos numéricos en unidades de

UFC/ml. Además se calculó el logaritmo de estos valores para identificar mediante una escala logarítmica el crecimiento de las dos cepas, como se observa en la tabla 7.

Tabla 6. Calculo de UFC/ml de *Lactobacillus johnsonii* y cambio logarítmico.

Crecimiento de Cepa Inicial RR y Cepa Final RR				
Diluciones	Cepa Inicial RR		Cepa FinalRR	
	UFC/ml	Log (UFC/ml)	UFC/ml	Log (UFC/ml)
10^{-1}	527500	5,72	1048500	6,02
	674000	5,82	984000	5,99
	610000	5,78	872500	5,94
10^{-2}	550000	5,74	1065000	6,02
	625000	5,79	1075000	6,03
	640000	5,80	1005000	6
10^{-3}	750000	5,87	900000	5,95
	450000	5,65	1000000	6
	500000	5,69	1100000	6,04
10^{-4}	500000	5,69	1000000	6
	1000000	6	1500000	6,17
	500000	5,69	1000000	6

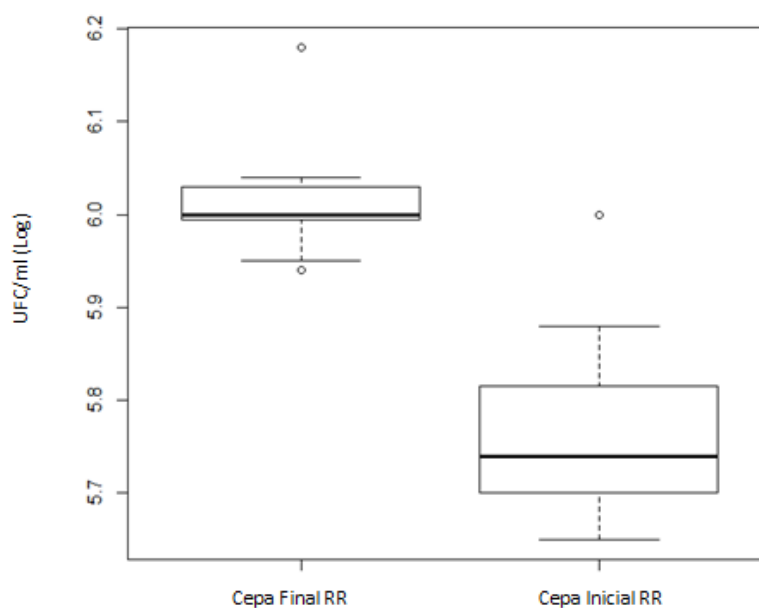


Figura 9. Box plot de crecimiento logarítmico (ufc/ml) de Cepa inicial y final RR.

7.11. Ensayo de Competencia de Cepa wildtype versus Cepa Inicial RR.

Con la finalidad de observar la diferencia en cuanto a la tasa de crecimiento de cepas wildtype versus Cepas iniciales RR, se procedió a observar los resultados en dos cajas petri con agar MRS (una sin antibiótico y la otra bajo una concentración de 100 µg/ml rifampicina). Los resultados se observaron a las 24 horas de incubación y se realizó en conteo de UFC en cada caja. Los datos obtenidos del conteo se aplicaron para los análisis estadísticos, considerando que en la caja que no poseía antibiótico teníamos crecimiento de las dos cepas y en la caja con antibiótico solo presencia de la cepa resistente, por lo cual fue necesario considerar esta diferencia de colonias y obtener el número de UFC/ml de ambas cepas. Los resultados obtenidos de forma numérica fueron sometidos a una prueba de Levene (varianzas homogéneas) para verificar si las varianzas de los datos de ambas cepas son homogéneas en el presente estudio y de esta manera aplicar una prueba T-student que indique la diferencia de las medias de crecimiento bacteriano de *Lactobacillus johnsonii*.

Los resultados obtenidos en la prueba de Levene en el programa Rstudio se encuentran descritos en el Anexo 12. En este se observa que el valor P posee un valor de 0,9426; lo que indica que la hipótesis nula, la cual menciona que las varianzas son homogéneas, no se rechaza, siendo estas iguales. Una vez que se identificó que las varianzas fueron iguales, se procedió a la realización de una prueba T-student en el programa Rstudio. En cuanto a esta prueba y según se observa en el Anexo 13, el valor P es de 0.5827; lo cual indica que las medias son iguales, considerando un valor de significancia de 0,05. Estos resultados demuestran que tanto la cepa wildtype como la cepa Inicial RR, poseen la misma tasa de crecimiento, como se observa en la figura 7. Así mismo, en dicha figura, correspondiente a un box plot del presente ensayo, se observa que tanto el cuartil inicial como el final de la cepa wildtype son valores que se solapan con los valores de los cuartiles de la cepa inicial RR, por lo cual no existe diferencia ni un mayor o menor crecimiento por parte de ninguna de las dos cepas.

Tabla 7. Conteo de colonias de la competencia de *Lactobacillus johnsonii* (Cepa Wildtype versus Cepa Inicial RR) en caja petri con MRS y MRS con rifampicina.

Cepa Wildtype vs Cepa Inicial RR			
Diluciones	Replicas	MRS	MRS+RIF
10⁻¹	R1	INC	INC
	R2	INC	INC
	R3	INC	INC
10⁻²	R1	INC	INC
	R2	INC	INC
	R3	INC	INC
10⁻³	R1	INC	INC
	R2	INC	INC
	R3	INC	INC
10⁻⁴	R1	462	226
	R2	496	238
	R3	477	254
10⁻⁵	R1	52	22
	R2	42	21
	R3	47	19

Tabla 8. UFC/ml y cambio logarítmico del conteo en placa petri *Lactobacillus johnsonii*, cepa wildtype y cepa inicial RR.

Competencia de Cepa Wildtype versus Cepa Inicial RR				
Diluciones	Cepa Wildtype		Cepa Inicial RR	
	UFC/ml	Log (UFC/ml)	UFC/ml	Log (UFC/ml)
10⁻⁴	23600000	7,37	22600000	7,35
	25800000	7,41	23800000	7,37
	22300000	7,34	25400000	7,40
10⁻⁵	30000000	7,47	22000000	7,34
	21000000	7,32	21000000	7,32
	28000000	7,44	19000000	7,27

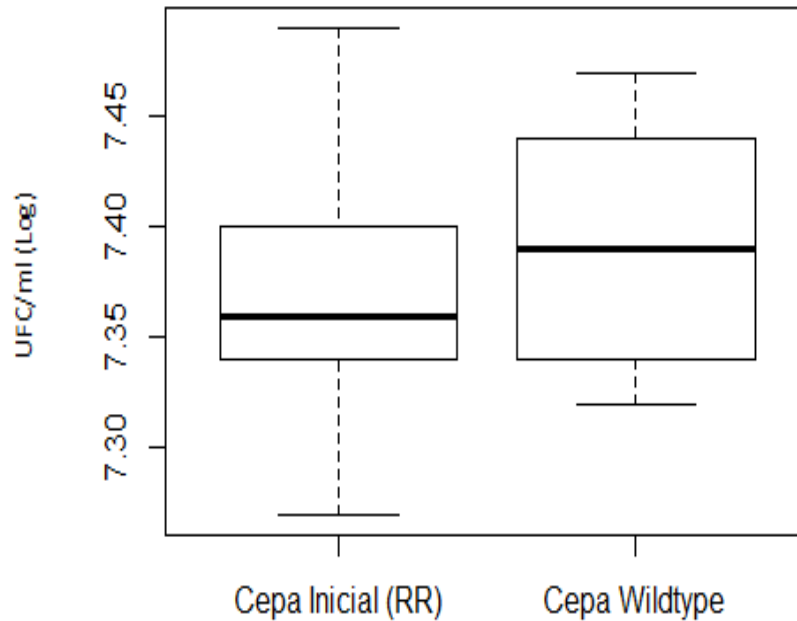


Figura 10. Box plot de crecimiento logarítmico (ufc/ml) de Ceba Wildtype versus Ceba Inicial RR.

7.12. Ensayo de Competencia de Ceba wildtype versus Ceba Final RR.

Al analizar los datos obtenidos de la competencia en medio MRS de la cepa wildtype versus la cepa final RR, se observó crecimiento en tanto la caja petri con antibiótico y la caja petri sin antibiótico.

Al realizar el respectivo conteo de UFC de cada caja y considerando la diferencia de colonias que crecen en los distintos medios, se procedió a evaluar los datos en el programa estadístico Rstudio.

En la prueba de Levene (varianzas homogéneas), se obtuvo un valor P de 1, valor mayor a 0,05; lo cual no rechaza la hipótesis nula que indica que las varianzas son homogéneas (Anexo 12). Una vez analizada la prueba de Levene, se realizó la prueba T-student, para analizar las medias del crecimiento de *Lactobacillus johnsonii*. Al analizar los resultados de la prueba T-student, se obtuvo un valor P de 8.94e-05, el cual sirve como indicador para rechazar la hipótesis nula, que indica que las medias son iguales; considerando una significancia de 0,05(Anexo13). Es decir, que en el presente caso la cepa wildtype crece a una tasa diferente a la cepa final RR. La figura 13, muestra la diferencia de crecimiento de las dos cepas y se

observa una diferencia considerable, pues el cuartil final de la cepa wildtype no se aproxima ni solapa al cuartil inicial de la cepa final RR.

Tabla 9. Conteo de colonias de la competencia de *Lactobacillus johnsonii* (Cepa Wildtype versus Cepa Final RR) en caja petri con MRS y MRS con rifampicina.

Cepa Wildtype vs Cepa Final RR			
Diluciones	Replicas	MRS	MRS+RIF
10⁻¹	R1	INC	INC
	R2	INC	INC
	R3	INC	INC
10⁻²	R1	INC	INC
	R2	INC	INC
	R3	INC	INC
10⁻³	R1	INC	INC
	R2	INC	INC
	R3	INC	INC
10⁻⁴	R1	542	315
	R2	487	283
	R3	473	289
10⁻⁵	R1	55	33
	R2	62	38
	R3	53	30

Tabla 10. UFC/ml y cambio logarítmico del conteo en placa petri *Lactobacillus johnsonii*, cepa wildtype y cepa final RR.

Competencia de Cepa Wildtype versus Cepa final RR				
Diluciones	Cepa Wildtype		Cepa final RR	
	UFC/ml	Log (UFC/ml)	UFC/ml	Log (UFC/ml)
10⁻⁴	22700000	7,35	31500000	7,49
	20400000	7,30	28300000	7,45
	18400000	7,26	28900000	7,46
10⁻⁵	22000000	7,34	33000000	7,51
	24000000	7,38	38000000	7,57
	23000000	7,36	30000000	7,47

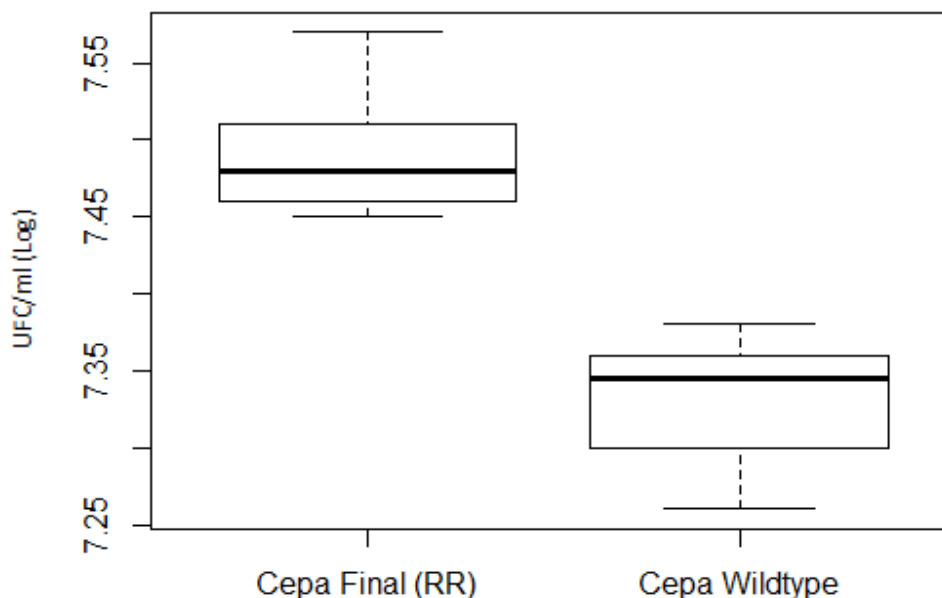


Figura 11 Box plot de crecimiento logarítmico (ufc/ml) de Cepa Wildtype versus Cepa Final RR.

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento e Identificación de *Lactobacillus* sp.

Se consideró utilizar cepas de *Lactobacillus* sp. Intestinales de ratón CD-1, para identificar la capacidad de adaptación de dichas bacterias a medios artificiales. Con la finalidad de obtener las cepas iniciales de trabajo en el presente estudio, se propuso utilizar un ratón de laboratorio, CD-1. Esta cepa de ratón, al ser pequeña, es de sencilla manipulación y disección, por lo cual se procedió a utilizar este tipo de modelo de animal para la extracción de una porción intestinal y por ende las cepas necesarias para el estudio.

Al obtener los resultados principales del aislamiento se verificó que fue eficiente obtener cepas puras de *Lactobacillus* sp. al realizar el hisopado directo del intestino, a diferencia del hisopado del caldo donde se colocó al trozo de intestino del ratón CD-1. Se identificó más colonias con características similares a las de *Lactobacillus* sp. en el medio a partir de hisopado intestinal y con estas cepas aisladas se logró trabajar durante todo el proyecto de titulación.

Es importante mencionar que las pruebas bioquímicas en este paso fueron de gran utilidad para descartar cualquier cepa no congruente a *Lactobacillus* sp. y que genere disconformidades

a lo largo del proyecto. Las pruebas bioquímicas realizadas solo fueron catalasa y oxidasa debido a que son pruebas confirmatorias y las principales para identificar un género bacteriano, además de la tinción Gram en la cual se verifica la morfología bacteriana y se puede realizar una clasificación por medio de microbiología clásica (Holzapfel y Wood, 2014).

8.2. Obtención de cepas mutantes de *Lactobacillus* sp. resistentes a Rifampicina

La obtención de cepas mutantes fue un proceso de selección, que contribuyó y facilitó el desarrollo del estudio. El seleccionar bacterias resistentes a un antibiótico sirve como marcador para identificar a lo largo del estudio su viabilidad de crecimiento. En cuanto a los resultados obtenidos se comprobó que fue suficiente utilizar la concentración de 100 ug/ml de rifampicina para seleccionar mutantes y a su vez para utilizar esta concentración como base para todo el desarrollo del proyecto. Se obtuvo resultados satisfactorios al utilizar esta concentración de rifampicina antes mencionada; sin embargo, hubo casos en los que no se observó resultados de colonias bacterianas al estar presente el antibiótico en el medio, lo cual indica que este es un factor de selección ambiental para las bacterias (Sorriano, 2017).

8.3. Ensayo de competencia

Así mismo, al seleccionar las cepas resistentes a rifampicina, a partir de las cepas aisladas previamente del intestino del ratón CD-1, con la finalidad de verificar que la viabilidad tanto de la cepa mutante como la cepa wildtype se procedió a colocarlas en medio artificial (caldo MRS) en una misma concentración, basada en un Mc Farland de 0.5 y se pudo observar mediante los resultados una relación de crecimiento 1:1. Esto demostró que ambas cepas bacterianas crecieron en una misma proporción y que a pesar de que una de las cepas poseía resistencia al antibiótico rifampicina no perdió ninguna habilidad de crecimiento y se mantenía viable en el tiempo como la cepa madre de la cuál fue aislada; es decir la cepa wildtype del intestino del ratón CD-1.

8.4. Antibiógramas

Al realizar los antibiógramas para corroborar la resistencia de las cepas del estudio se utilizó Muller Hinton, sin embargo, este medio después de 24 horas no tuvo crecimiento alguno en ningún lugar de toda la caja petri, por lo cual se propuso realizar un antibiógrama en un medio Agar Sangre. A las 24 horas no se observó ningún crecimiento en la caja petri con Agar sangre.

Esto fue un caso bastante singular, ya que generalmente las bacterias crecen con facilidad en estos medios enriquecidos; sin embargo, las cepas aisladas no crecieron en estos medios, por lo que se propuso realizar los antibiogramas en medios de Agar MRS. A las 24 horas de cultivo del antibiograma en el medio Agar MRS se observaron resultados satisfactorios, pues las cepas aisladas y sembradas en dichas cajas no presentaron sensibilidad al disco de rifampicina al contrario crecieron en toda la caja y sin ningún tipo de contaminación.

Este caso particular, se debe en general a los nutrientes y el pH al que los *Lactobacillus* sp. crecen. El agar Müller-Hinton para utilizarlo en antibiogramas de *Lactobacillus* sp. debe poseer un enriquecimiento extra y su pH debe ser ácido. Así mismo, no se obtuvo resultados al utilizar agar sangre, pues este no se encontraba en un pH óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus* sp. y a su vez requería una concentración de sangre de 5% (Jiménez et al, 2017). Considerando estos aspectos antes mencionados de los medios utilizados para los antibiogramas, es factible realizar antibiogramas de *Lactobacillus* sp. en medio MRS, pues los resultados son visibles a las 24 horas y este género bacteriano crece con mayor facilidad gracias a las características del Agar MRS.

8.5. Siembra de *Lactobacillus* sp. en medio artificial MRS.

Las cepas de *Lactobacillus* sp. resistentes a rifampicina fueron utilizadas para durante el transcurso de 150 días, ser cultivados diariamente en medio estéril (pases diarios) con la finalidad de mantener a la cepa en una fase exponencial y de esta manera evidenciar cambios en cuanto a su adaptación. Este es uno de los pasos más relevantes del estudio pues durante este tiempo se controló que los medios para cada pase sean totalmente estériles y no exista contaminación. Así mismo, se comprobó que las cepas crezcan con facilidad cada 24 horas y a su vez que estas mantengan su resistencia al antibiótico (Rifampicina), sin estar en un medio que contenga el mismo.

Cada semana fue necesario realizar tinción Gram y pruebas bioquímicas confirmatorias para identificar que no exista contaminación y que las cepas sean las mismas cada semana. Así mismo, se congeló en -80°C como respaldo en caso de pérdida de cepas o contaminación. Sin embargo, fue necesario describir cambios fenotípicos que eran observables en cuanto al medio (caldo MRS), pues las cepas en un determinado número de pases (día 72) generaban mayor turbidez. Esta turbidez está relacionada estrictamente con el crecimiento bacteriano (Escobar et al, 2010), por lo cual se podía inferir que estas bacterias que llevaban 72 crecían exitosamente

en este medio y estaban más adaptadas que en un inicio durante los primeros pases, donde la turbidez del medio era mínima en comparación a la obtenida a partir del pase 50.

Estos resultados de adaptabilidad se produjeron debido al tiempo que estas cepas estaban en continua fase exponencial y en el mismo medio artificial. Así mismo, se debe considerar que estas bacterias no poseían competencia de ningún tipo al estar en un medio con suficientes nutrientes, bajo condiciones óptimas y sin otros microorganismos (Escobar et al, 2010). Es por esto, que los pases *in vitro* realizados permitieron un alto crecimiento y desarrollo de las cepas en un determinado tiempo.

8.6. Extracción de ADN con DNazol.

Al finalizar los pases se realizó la extracción de ADN de las cepas mediante un protocolo para el uso de DNazol, el cual incluía como diluyente final del ADN, el compuesto NaOH. Sin embargo, este compuesto muchas ocasiones puede ser reemplazado con agua de PCR, ya que al realizar un ensayo de PCR con NaOH, no se obtuvieron bandas en el gel de agarosa. Esto puede deberse a la concentración del compuesto o a su vez la cantidad utilizada (Osmundson et al, 2013). Al utilizar agua de PCR en lugar del otro compuesto, hubo la presencia de bandas en el gel de agarosa después de haber realizado una correcta PCR y electroforesis. Sin embargo, fue necesario establecer en el protocolo que para una mejor extracción de ADN de las cepas se requiere que las mismas estén en una fase logarítmica por lo cual se estableció como factor de importancia dentro del protocolo para que los resultados reflejen la banda de interés.

8.7. Identificación molecular de cepas de *Lactobacillus* sp.

Para identificar que las cepas sean del mismo género y especie se realizó un análisis de una región específica del gen 16S rRNA, utilizando los primers EubB (27F) y 1492R. Al secuenciar los amplicones obtenidos del PCR realizado, se identificó el género y especie de cada cepa del estudio y al observar los resultados se descartó el uso de la cepa A y C, pues estas presentaban diferentes especies bacterianas entre sí.

Es decir, en el caso de la cepa A se observó que la cepa wildtype fue *L. johnsonii*; mientras que las cepas aisladas de esta misma, que deben seguir manteniéndose como *L. johnsonii*, al alinear sus secuencias se obtuvo que eran *L. murinus*. Así mismo, en el caso de la cepa C, la

cepa wildtype que se pensaba desde un inicio era *Lactobacillus*, al analizar los alineamientos de la región del gen 16 S rRNA se demostró que se trataba de *B. cereus*. Al analizar estos resultados, se descartó el uso de estas cepas para la continuación del proyecto pues al no coincidir entre ellas no se podía evidenciar cambios evolutivos, pues las cepas debían ser clonales. Estos resultados no satisfactorios, se debieron a una mala manipulación de las cepas durante los pases, una posible contaminación durante los pases y por último haber seleccionado al azar una colonia que no se encontraba totalmente aislada y en la cual había presencia de dos especies diferentes de *Lactobacillus* sp., que después fueron adaptándose hasta que una de ellas dominó el medio de cultivo. Estas son las posibles causas de los resultados con respecto a las cepas A y C.

En este punto del estudio, se trabajó solo con la cepa B correspondiente a *Lactobacillus johnsonii* tanto la cepa wildtype, como las cepas resistentes a rifampicina iniciales y finales, ya que era la candidata más apta para cumplir con el objetivo del estudio y verificar evolución y adaptabilidad bacteriana en tiempo real.

8.8. Genotipificación del gen LJ0648

Con la finalidad de identificar la clonalidad de las cepas del estudio, en este caso *L. johnsonii*, se procedió a analizar el gen más variable de esta especie en particular, basado en el MLST de este microorganismo; sin embargo, no existe disponible ningún MLST de la presente cepa, por lo cual se realizó una búsqueda bibliográfica de otros estudios relacionados. Según la literatura encontrada de Buhnik-Rosenblau, K y colaboradores el gen LJ0648 es uno de los más variables en la especie de *Lactobacillus johnsonii*. Al identificar este gen, se procedió a sintetizar primers específicos para este gen e identificar mediante PCR, electroforesis y secuenciamiento si este gen era homogéneo en todas las cepas de *Lactobacillus johnsonii*. Al analizar las secuencias se evidenció homología en cuanto a las secuencias de las tres cepas (wildtype, inicial RR y final RR), por lo cual se piensa estas son la misma cepa y por lo tanto se evaluó su tasa de crecimiento y como esta ha cambiado en el tiempo y cambiando su nicho intestinal a un nicho en un medio artificial.

8.9. Análisis de crecimiento

Al analizar el crecimiento bacteriano de *Lactobacillus johnsonii*, se identificó diferencias

entre las tres generaciones obtenidas (wildtype, inicial RR y final RR), pues estas cepas no estaban bajo las mismas condiciones ambientales. La diferencia fue contable y gracias a los valores obtenidos del conteo de UFC/ml de cada una de las generaciones se demostró que al someter a los *Lactobacillus johnsonii* a crecimiento en un medio artificial, a lo largo del tiempo (150 días), la cepa final RR, obtuvo una capacidad de crecimiento mucho más eficiente a diferencia de las otras dos cepas que son aisladas de intestino de ratón, sin pasar por todo el proceso de pases en medios artificiales, lo cual la limita a dichas condiciones de novo. Esta cepa que se mantuvo durante 150 pases diarios en medio artificial y se adaptó en este tiempo para crecer con mayor agilidad y eficiencia gracias a las propiedades en la cual se encontraba. Estos resultados obtenidos demuestran que las bacterias tienen un corto tiempo para adaptarse a un nuevo ambiente, un nuevo nicho, dependiendo de las características ambientales a las cuales estén sometidas.

Por otro lado, el hecho de no tener competencia en el medio artificial y que estos microorganismos posean los nutrientes como también temperatura óptima y necesaria, agiliza su adaptación y hace de este un ambiente óptimo para su desarrollo. El nuevo ambiente al cuál la cepa final RR se adaptó presentaba características óptimas para el microorganismo como también al no tener competencia alguna ni dificultad de crecimiento por factores intrínsecos, se puede inferir que la bacteria pasó por varios cambios a nivel genómico para adaptarse a este nuevo ambiente. Sin embargo, las cepas que fueron directamente extraídas del intestino (wildtype) y las derivadas de esta sin haber sido sometidas a pases diarios (iniciales RR) si bien es cierto poseen una deficiente tasa de crecimiento en medio artificial en relación a la cepa final RR, éstas presentan habilidad de crecimiento en el intestino, de donde fueron aisladas. Se debe considerar que los microorganismos, como las bacterias ácido lácticas, que habitan en el intestino, un lugar hostil y de alta competitividad, invierten un alto costo energético en la adquisición de ADN extracromosómico (plásmidos), como también para la activación de genes necesarios que contribuyen a su supervivencia y viabilidad en dichos ambientes. Debido a esto, se puede inferir que uno de los posibles cambios que ocurrieron en los *Lactobacillus johnsonii* (cepa final RR), tiene que ver con el innecesario gasto energético que representa poseer plásmidos dentro de su citoplasma, por lo cual al no tener ninguna necesidad de seguir manteniendo este ADN extracromosómico, las bacterias optan por deshacerse de él y ahorrar energía para otros procesos metabólicos necesarios e incrementar su tasa de crecimiento. Así mismo, se presume que a al transcurrir un tiempo extenso de pases en medio artificial, existe la probabilidad de que ciertos genes de *Lactobacillus johnsonii* se inactiven o a su vez sean

innecesarios para la bacteria en un medio optimo por lo cual la bacteria los elimine de su genoma.

Al considerar los aspectos antes mencionados se puede asociar a las cepas wildtype de *Lactobacillus johnsonii*, como microorganismos generalistas, ya que estos gracias a la adquisición de plásmidos tienen la capacidad de sobrevivir en diversos ambientes y tolerar cambios intrínsecos extremos. Por otro lado, la cepa final RR de *Lactobacillus johnsonii*, se la puede considerar como microorganismos especialistas, pues estos solo pueden ser viables en condiciones óptimas y concretas. De esta manera se puede inferir que las bacterias al ocupar un nuevo nicho pasan a ser un nuevo ecotipo de bacteria y esto las hace hábiles en crecer en ciertos ambientes específicos pero débiles e ineficientes para crecer en otros donde existe mayor competencia y ambientes de mayor hostilidad.

9. CONCLUSIONES

- Se aisló 3 cepas de *Lactobacillus* sp. en medio MRS, a partir de un centímetro de intestino delgado de ratón CD-1.
- Se seleccionó mutantes a rifampicina de las tres cepas aisladas.
- Se mantuvo en fase logarítmica por 150 pases diarios a las tres cepas de *Lactobacillus* sp. mutantes iniciales resistentes a rifampicina.
- Se extrajo ADN genómico con DNAzol, donde se obtuvo concentraciones de 1,6 a 2 ng/μl, valores óptimos para posteriores análisis moleculares.
- Se amplificó la región del gen 16S rRNA, mediante primers específicos, se realizó PCR y se envió a secuenciar la región del gen 16S rRNA de los aislados para identificar las especies de las cepas aisladas de *Lactobacillus* sp.
- Se continuó el estudio con las cepas correspondientes a *Lactobacillus johnsonii* y se seleccionó el gen más variable de dicha cepa.
- Se verificó que la secuencia del gen LJ0648 (gen más variable) de la cepa wildtype, como de la cepa inicial RR y cepa final RR, correspondientes a *Lactobacillus johnsonii* son homologas entre sí, demostrando que son posibles clones
- La cepa wildtype de *Lactobacillus johnsonii* posee la misma tasa de crecimiento que la cepa inicial RR de *Lactobacillus johnsonii*, pues ambas no estuvieron por varios días

en medio artificial y estas poseen adaptación a nichos intestinales de donde fueron aisladas.

- La cepa final RR de *Lactobacillus johnsonii*, posee una alta tasa de crecimiento en relación a la cepa wildtype y a la cepa inicial RR de *Lactobacillus johnsonii*, a pesar de que su nicho inicial fue el intestino delgado del ratón CD-1, como las cepas mencionadas; la cepa final RR, después de estar en constantes pases durante 150 días presentó adaptación a un nuevo nicho (medio MRS artificial), dando lugar así a un nuevo ecotipo de *Lactobacillus johnsonii*.
- Se demostró que los microorganismos como *Lactobacillus johnsonii*, bacterias de la flora intestinal por excelencia, poseen la capacidad de adaptarse a nuevos nichos en un tiempo considerable y condiciones óptimas; aun siendo este un medio artificial.
- Se demostró la diferencia de viabilidad de las bacterias al enfrentarse a nuevos nichos a los cuales no están adaptadas y cómo influye la competencia y la hostilidad del ambiente en el que se encuentren.
- En conclusión, este proyecto, identificó los cambios evolutivos a nivel genotípico y fenotípico de *Lactobacillus johnsonii* en medio artificial, lo cual tiene relevancia a nivel de organismos probióticos, los cuales dicen tener la capacidad de colonizar nichos intestinales a los cuales no están adaptados después de ser cultivados en medios artificiales.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda seleccionar mayor número de cepas de *Lactobacillus* sp. para posteriores estudios.
- Se debería considerar incrementar número de pases, con la finalidad de investigar más cambios evolutivos a nivel genotípico y fenotípico.
- Se recomienda utilizar otro tipo de medio artificial para analizar el crecimiento de *Lactobacillus* sp.
- Se debería realizar un análisis del gen 16S rRNA, antes de empezar los pases, durante la mitad de los pases y al concluir los pases diarios con la finalidad de evitar posibles contaminaciones y mantener resultados viables en cuanto al número de cepas.

- Con la finalidad de corroborar que las cepas aisladas sean 100% la misma, es decir clones, se recomienda evaluar varios genes, de preferencia los más variables, mediante un MLST, para continuar con investigaciones *in vivo*.
- Se recomienda realizar posteriores ensayos *in vivo* en ratones CD-1 para corroborar la adaptación de *Lactobacillus* sp. a nuevos nichos (medios artificiales) y evaluar la capacidad de colonización intestinal de los mismos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adeyemo, S.; Onilude, A. (2014). Molecular identification of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermenting cereals. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*. Vol. 5(6): 56-67.
- Akey, J.; Sosnoski, D.; Parra, E.; Dios, S.; Hiester, K.; Su, B.; Bonilla, C.; Jin, L.; Shriver, M. (2001). Melting Curve Analysis of SNPs (McSNP): A Gel-Free and Inexpensive Approach for SNP Genotyping. *BioTechniques* 30: 358-367pp. Disponible en: <http://anth.la.psu.edu/documents/Akeyetal.2001aMcSNP.pdf>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410. PubMed
- Amund, O. (2016). Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Canadian Journal Of Microbiology*, 62(9), 715-725. doi:10.1139/cjm-2016-0186
- Barbu, A., Neamțu, M. B., Zăhan, M., & Mireșan, V. (2016). Novel uses of probiotics in human health. *Acta Medica Transilvanica*, 21(3), 26-30.
- Buhnik-Rosenblau, K., Matsko-Efimov, V., Jung, M., Shin, H., Danin-Poleg, Y. and Kashi Y. (2012). Indication for Co-evolution of *Lactobacillus johnsonii* with its hosts. *BMC Microbiology*. doi: 10.1186/1471-2180-12-149
- Campbell, N y Reece, J. (2007). *Biología*. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España.
- Canchaya, C.; Claesson, M.; Fitzgerald, G.; Sinderen, D.; Toole, P. (2006). Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*. 152: 3185-3196 pp. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/152/11/3185.pdf>
- Claesson, M.; Sinderen, D.; Toole, P. (2006). The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. Federation of European Microbiological Societies. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111pdf>
- Diancourt, L.; Passet, V. Chervaux, C.; Garault, P.; Smokvina, T.; Brisse, S. (2007). Multilocus Sequence Typing of *Lactobacillus casei* Reveals a Clonal Population Structure with

Low Levels of Homologous Recombination. *Appl Environ Microbiol.* Oct; 73(20): 6601–6611. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2075077/pdf/1095-07.pdf>

Elena, S. y Sanjuán, R. (2017). Climb Every Mountain? *Revista Science.* Vol 302. p 2074

Escobar, L.; Rojas, C.; Giraldo, G.; Padilla, L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche vacuno. Universidad de Quindío.

Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España

Hernández, A.; Coronel, A.; Monge, M.; Quintana, C. (2015). Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatría Integral.* Vol 19 (5): 337-354. España. Disponible en: http://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2015/xix05/05/n5-337-354_Anselmo%20Hdez.pdf

Holzappel, W.; Wood, B. (2014). *Lactic acid bacteria: Biodiversity and Taxonomy.* John Wiley & Sons Inc. United Kingdom.

Ilk, S., Canpolat, E., Ozgen, M., Saglam, N., & Sultana, N. (2016). Genotypic Identification And Characterisation Of Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria From Nigde Cheese. *Oxidation Communications*, 39(3-I), 2423-2432.

Jiménez, G., Pérez, M., Navarro, J. y Gutiérrez, J. (2017). Infección del tracto urinario por *Lactobacillus delbrueckii*, microorganismo usado como probiótico. Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario de Granada. *Rev Esp Quimioter*; 30(3): 229-230

Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular.* MCGRAW-HILL. México

Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., & Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 81-11. doi:10.1186/s13073-016-0300-5

Kwon, H.; Yang, E.; Yeon, S.; Kang, B.; Kim, T. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the

- region extending from 16S rRNA rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 239 (2004) 267–275.
- McNulty, N. P., Yatsunenkov, T., Hsiao, A., Faith, J. J., Muegge, B. D., Goodman, A. L., Gordon, J. I. (2011). The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Science Translational Medicine*, 3(106), 106ra106. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002701>
- Microbial systems. (2009). La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. Newsletter No. 3.
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2014). *Microbiología Médica*. Barcelona: Elsevier.
- Osmundson, T.; Eyre, C.; Hayden, K.; Dhillon, J.; Garbelotto, M. (2013). Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular Ecological Resources*. 13(1):66-74.
- Pot, B.; Felis, G.; Bruyne, K.; Tsakalidou, E.; Papadimitriou, K.; Leisner, J.; Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Pyar, H.; Peh, K. (2013). Characterization and Identification of *Lactobacillus Acidophilus* Using Biolog Rapid Identification System. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6 (1). Disponible en: <https://www.ijppsjournal.com/Vol6Issue1/7982.pdf>
- RStudio Team (2015). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA
- Rivas, B.; Marcobal, A.; Muñoz, R. (2006). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*. 152, 85-93pp.
- Salvetti, E.; Torriani, S.; Felis, G. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Vol. 4(4). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/257790939_The_Genus_Lactobacillus_A_Taxonomic_Update
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Kalavathy, R., Sieo, C. C., & Ho, Y. W. (2016). Safety Assessment of Two New *Lactobacillus* Strains as Probiotic for Human Using a Rat Model. *Plos ONE*, 11(7), 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0159851

- Soriano, F. (2001). Selección de bacterias resistentes a los antibióticos: factores microbiológicos y farmacológicos. Departamento de Microbiología Médica. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*
- Sunil, N.; Vora, J. (2016). Analysis of 16S rRNA rRNA Gene of Lactic Acid Bacteria Isolated from Curd and Raw Milk. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. Vol 5 (5): 1806-1808. Disponible en: <http://www.jaihindcollege.com/aided/science/senior-college/pdfs/ugc/NOV163850.pdf>
- Tong, D.; Wenjun L.; Yuqin, S.; Haiyan, X.; Bilige, M.; Heping, Z.; Zhihong, S. (2015). The evolution and population structure of *Lactobacillus fermentum* from different naturally fermented products as determined by multilocus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology*.
- Tong, D.; Wenjun L.; Zhihong, S.; Qiang, L.; Haiyan, X.; Yuqin, S.; Heping, Z. (2014). A novel multi-locus sequence typing (MLST) protocol for *Leuconostoc lactis* isolates from traditional dairy products in China and Mongolia. *BMC Microbiology*. 14:150
- Wang, B., Xu, H., Wei, H., Zeng, Z., & Xu, F. (2015). Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* for modulating microflora, acid and bile resistance, and physiological indices in mice. *Canadian Journal Of Microbiology*, 61(2), 155-163. doi:10.1139/cjm-2014-0694
- Whetten, R. (2013). Genotyping by sequencing and data analysis. North Carolina State University. Department of Forestry and Environmental Resources. Disponible en: http://www.nordicforestresearch.org/adapcar/files/2013/09/RossWhetten_P.pdf

12. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de Caldo MRS.

Agua destilada	1000ml
MRS Broth	55g

*Autoclavado a 121°C y 15 psi durante 20 min

Anexo 2. Preparación de Agar MRS.

Agua destilada	1000ml
MRS Agar	70 g

*Autoclavado a 121°C y 15 psi durante 20 min

Anexo 3. Tinción Gram

Reactivos	Tiempo
1.- Cristal violeta	1 minuto
2.- Lugol	1 minuto
3.- Alcohol cetona	10 segundos
4.- Safranina	30 segundos

*Tras la aplicación de cada reactivo, realizar un lavado indirecto de la placa con Agua destilada.

Anexo 4. Preparación de Solución Stock de Rifampicina.

- 1.- Disolver 0,1 g de Rifampicina en 2 ml de metanol y agitar en un vortex hasta disolver todo el contenido.
- 2.- Añadir 5 gotas de 10N NaOH con una pipeta Pasteur y agitar la mezcla.
- 3.- Añadir 2 ml de esta solución a un litro de agar o caldo. De esta manera se contiene una concentración final de rifampicina de 100 µg/ml.

Anexo 5 . Protocolo de Extracción con DNAzol

- 1.- Cultivar cada una de las cepas bacterianas en caldo nutritivo por 24 horas a 37°C.
- 2.- Tomar 1.5 ml en un microtubo eppendorff, las bacterias deben estar en fase logarítmica y centrifugar para eliminar el caldo nutritivo a 13200 rpm por 5 min.
- 3.-Eliminar el caldo de cultivo y conservar el pellet. Realizar dos lavado del pellet con 1000 µl de PBS 1x, centrifugar 14000 rpm por 5 minutos.
- 4.- Eliminar el PBS del segundo lavado y suspender el pellet en el volumen que queda en el microtubo eppendorf con la ayuda de un vortex.
- 5.- Adicionar 500 µl de DNAzol voltear muy despacio para lisar las células y liberar el ADN sin dañarlo (de una a dos veces).
- 6.- Adicionar un volumen de 500 µl de alcohol al 100% e invertir los tubos. Dejar reposar por 3 minutos. (es mejor si el alcohol está en la congeladora del área de extracción de ADN, los 3 min de reposo deben ser de preferencia en la congeladora, el frío permite una mejor precipitación del ADN).
- 7.- Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante (botar el sobrenadante en el frasco especial para eliminar guanidina).
- 8.-Realizar dos lavados, agitando lentamente, con 1000 µl etanol al 75% (Igual frío a 20°C).Tener cuidado de no romper el pellet de ADN. Centrifugar 10000 rpm por 5 minutos y descartar el sobrenadante.
- 9.- Dejar secar el pellet por 15 a 30 minutos en la incubadora a 37°C o a temperatura ambiente por una hora hasta que el pellet este totalmente seco (El etanol es inhibidor de PCR).
- 10.- Suspender en 300 µl de Agua PCR.

Anexo 6. Protocolo para PCR de 16S rRNA.

Reactivos	Volumen para 1X
Buffer	2µl
MgCl ₂	0,67µl
dNTPs(10mM)	0,6µl
Primer F(39.38nmol)	0,8µl

Primer R(41.32nmol)	0,8µl
Taq polimerasa	0,05µl
ADN	1µl
H2O	4,08µl
Volumen total	10µl

Anexo 7. Programa de PCR utilizado para la amplificación de región 16S rRNA en Bacterias.

Programa	T°	Tiempo	Ciclos
Denaturalización Inicial	94 °C	4 minutos	30
Denaturalización	94 °C	1 minuto	
Hibridación	57°C	30 segundos	
Polimerización	72 °C	2 minutos	
Extensión Final	72 °C	8 minutos	
Reposo	20 °C	∞	

Anexo 8. Secuencias en formato FASTA de la región del gen 16S rRNA de las cepas de *Lactobacillus* sp. aisladas.

Cepas		Secuencias	
Cepa A	Wildtype	Forward	<pre>>WA_27F GCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGCTTGCAC AAATGAAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA CACGTGGGTAACCTGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGA AACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCT AGAGTTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTGGATGGACCT GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTG</pre>

			GTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACCTGGCCTTTATTGAC GGTAATTACTTAGAAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTG GGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGTTCAATAAGTCTGATGTGA AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTG AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGC GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAG GCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCAT GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT AnACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTCCGCCTCTCAGT GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC
		Reverse	>WA_1492R TAAGTCTGATGTGAAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCA TCAGAAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA CTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG AGGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGG TTCCGCCTCTCAGTGTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTG AAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGC AAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGAC AGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTGTGCTATTAGTGGC ATCATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTA TGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGA GAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTTAAAGCCGTT CTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTG GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC GTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGT CTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTC AGCCG
	Initial RR	Forward	>RIA_27F TGCAAGTCGAACGAACTTCTTATCACCGAGTGCCTGCACT CACCGATAAAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACCGT GGGCAACCTGCCAAAAGAGGGGGATAACACTTGGAAAACAG GTGCTAATACCGCATAACCATAAGTTACCGCATGGTAACTATG TAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGGCG CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGA TGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT GAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGACAGATAGGGAA TCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGT GGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAGA GAAGAAAGTGCCTGAGAGTAACTGTTACGTTTCGACGGTA TCTAACCGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCG TAAAGGGAACGCAGGCGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGC CTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTT GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAAGCGGC TCTCTGGTCTGTAAC-TGACGCTGAGGTTGCAAAGC
		Reverse	>RIA_1492R GGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGAAAACCTGGGAGACTTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAAGCGGCTCT CTGGTCTGTAACGACGCTGAGGTTGAAAAGCGTGGGTAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT GAATGCTAAGTGTGGAGGTTTCCGCCCTCAGTGTGTCAG CTAACGCAATAAGCATTCCGCCCTGGGAGTACGACCGCAAG GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTAC CAGGTCTTGACATCTTTTGACAATCCTAGAGATAGGACTTTC CCTTCGGGGACAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCA GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAG CAAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT ACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGACCGCGAGGTTTAG CAAATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA GCATCCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCG CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGG GTAACCTTTGGAGCCAGC

	Final RR	Forward	<p>>RIA_27F ATGCAGTCGAACGAACTTCTTTATCACCGAGTGCTTGCAC TACCATAAAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT GGGCAACCTGCCAAAAGAGGGGATAAACACTTGGAAACAG GTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATG TAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGGCG CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGA TGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACT GAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA TCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGCT GGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAAACCTGTTGTTAGA GAAGAAAGTGGGTGAGAGTAAGTTCACGTTTCGACGGTA TCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCG TAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTAAAGTCTGATGTGAAAGC CTTCGGCTTAACCGAGTAGTGCATTGGAACTGGGAGACTT GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGGC TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCAAAGCGTGGGTA GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT_{An}ACGA TGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGGTCA GCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAA GGTTGAAACTCAAAG</p>
		Reverse	<p>>RFA_1492R AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATT GGAAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACT CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC CAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG GTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTT CCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCT GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAG CAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTTGACATCTTTTGACAAT CCTAGAGATAGGACTTTCCCTTCGGGGACAAAATGACAGGT GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCAGCA TTAAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGG AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTC GCAAGACCGCGAGGTTTAGCAAATCTCTTAAAGCCGTTCTCA GTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAAT CGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGA ACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACTTTGGAGCCAGC</p>
Cepa B	Wildtype	Forward	<p>>WB_27F GCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGTGCTTGCAC AAATGAACTAGATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA CACGTGGGTAACCTGCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGA AACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCT AGAGTTTGAAGATGGTTCTGCTACTCTTGGATGGACCT GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAAGGTAACGGCTTACCAAGG CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTGTTG GTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTGAC GGTAATTACTTAGAAAAGTACGGGTAACACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGA AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAACTGTTG AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGC GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAG GCGGCTCTTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCAT GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT _{An}ACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGGTTCCGCCTCTCAGT GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC</p>
		Reverse	<p>>WB_1492R TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCA TCAGAAACTGTTGAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA CTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGG TTTCCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG</p>

			<p>CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCG AAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGC AAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGAC AGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCC ATCATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGA GAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTAAAGCCGTT CTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTG GAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGT CTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTC AGCCG</p>
	Inicial RR	Forward	<p>>RIB_27F GCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGCTTGCACT AAATGAAACTAGATAACAAGCGAGCGGGACGGGTGAGTAA CACGTGGGTAACCTGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGA AACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCT AGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTGGATGGACCT GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTG GTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACCTGGCCTTTATTGAC GGTAATTACTTAGAAAAGTCACGGGTAACACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGTGCAAGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGA AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAAAAGTGTG AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGC GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGCAAG GCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCAT GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT AnACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTCCGCTCTCAGT GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC</p>
		Reverse	<p>>RIB_1492R TAAGTCTGATGTGAAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCA TCAGAAAAGTGTGAACTTGTAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA CTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTG AGGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGGAGG TTTCCGCTCTCAGTGTGCAAGCTAACGCATTAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCG AAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGC AAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGAC AGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCC ATCATTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGA GAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTAAAGCCGTT CTCAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTG GAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGAGAGT CTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTC AGCCG</p>
	Final RR	Forward	<p>>RFB_27F GCAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGATTTTAGTGCTTGCACT AAATGAAACTAGATAACAAGCGAGCGGGACGGGTGAGTAA CACGTGGGTAACCTGCCCAAGAGACTGGGATAACACCTGGA AACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCT AGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTGGATGGACCT GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG CAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATT GGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTG GTAGTGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACCTGGCCTTTATTGAC GGTAATTACTTAGAAAAGTCACGGGTAACACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG GGCGTAAAGCGAGTGCAAGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGA</p>

			AAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTG AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGC GGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAG GCGGCTCTTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCAT GGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT AnACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTCCGCCTCTCAGT GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA CCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGA
		Reverse	>RFB_1492R CCGGATTTATFGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATA AGTCTGATGTGAAAAGCNTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATC AGAACTGTTGAACTGNAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACT CCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC CAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAG GCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTT CCGCCTCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACG GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAG CAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAA CCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGT GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTGTGATTAGTTGCCATCA TTAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAACCGG AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGA CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAA GCGAACCTGCGAAGCAAGCGGATCTTTAAAGCCGTTCTC AGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGCTGGA ATCGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGTGAATACGTT CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTCTG TAACACCCAAAGCCGGTGGGAT
Cepa C	Wildtype	Forward	>WC_27F GCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTA GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAA GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAA CATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGC TGTCACCTATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTGTGGT AGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTT CGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAG TTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCC ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCCGAG GTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT GGAGGGTCATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG AAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAA CTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGT GTTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACGCATTA AGCACTCCGCC
		Reverse	>WC_1492R TAAGTCTGATGTGAAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC ATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGGA ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACACTG AGGCGGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGG TTTCCGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCG CCTGGGGAGTACGCCGCAAGGCTGAAAAGTCAAAGGAATTG ACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCG AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGA AAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGAC AGGTGGTGCATGTTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTGGC ATCATTAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTA TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGA GCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTT CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTG GAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC GTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTACACACGAGAGT TTGTAACACCCGAAGTCCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGC

Inicial RR	Forward	<p>>RIC_27F ACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGC ATGGTAACTATGTAAGGTTGGCTATGCTACCGCTTTTGGAT GGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTA CCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGC CACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGC AGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGA GCAACCGCGTGGGTGAAGAAGTCTTCGGATCGTAAAC CCTGTTGTAGAGAAGAAAGTGCCTGAGAGTAACTGTTTAC GTTTCGACGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG ATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTAAGTCT GATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAA ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAAGTCCAT GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGT GGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCG AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ACGCCGTATACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC CTTCAGTCTGCAGCTAACG</p>
	Reverse	<p>>RIC_1492R GAGTAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG GAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT ATGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGTTGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATT AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAAG TGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAAGTAAACGCAAT AAGCATTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGG--CCCGCACAAGCGGTGGA-GCATG- TGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTTTG ACATCTTTGACAATCCTAGAGATAGGACTTTCCTTCGGG ACAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATT GTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCC GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACG GTACAACGAGTGCAGAACCGCGAGGTTAGCAAATCTCTT AAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTAC ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCGCC GGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACAC CATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCGGTGGGGTAACTTTG GAGCCAGC</p>
Final RR	Forward	<p>>RFC_27F GCAGTCCAACGAAACTTCTTTATCACCGAGTGTGCACTCA CCGATAAAGAGTTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG GCAACCTGCCAAAAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGT GCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTA AAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCGCGCGCA TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATG CGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGA GACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCGCGTGG GTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTGTTGTTAGAGA AGAAAGTGCCTGAGAGTAACTGTTACGTTTCGACGGTATCT AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA AGGGAACGACGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTC GGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGAAACTGGGAGACTTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT CGGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGGCTCT CTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGC AAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG AATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTACGTGCTGCAGC TAACGCAATAAGCATTCCGCCTGG</p>
	Reverse	<p>>RFC_1492R GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTG GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAAGTCC CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAC AGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGT TCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCC GCCCTTACGTGCTGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGG GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCA ACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCTTTTACAATCC TAGAGATAGGACTTTCCTTCGGGGACAAAATGACAGGTGG</p>

			TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATT AAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT GGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCA AGACCGCGAGGTTAGCAAATCTCTTAAAGCCGTCTCAGTT CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGC TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACA CCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTGGAGCCAGCCG
--	--	--	---

Anexo 9. Protocolo para PCR de gen LJ0648.

Reactivos	Volumen para 1X
Buffer	5µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,5µl
dNTPs(0,2mM)	0,5µl
Primer F(0,4 µM)	1µl
Primer R(0,4 µM)	1µl
Taq polimerasa (0,02)	0,5µl
ADN	5µl
H ₂ O	15µl
Volumen total	25µl

Anexo 10. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen LJ0648 en *Lactobacillus johnsonii*.

Programa	T°	Tiempo	Ciclos
Denaturalización Inicial	95 °C	3 minutos	30
Denaturalización	95 °C	1 minutos	
Hibridación	50°C	30 segundos	

Polimerización	72 °C	90 segundos	
Extensión Final	72 °C	10 minutos	
Reposo	12 °C	∞	

Anexo 11. Secuencias en formato FASTA del gen LJ0648 de las cepas de *Lactobacillus johnsonii*.

Cepas	Secuencias	
Wildtype	Forward	<p>>W_F TRIM QUALITY: 20</p> <p>-----</p> <p>CTCCTAGTTC AAGCACTACGACCTTCTTAGTCTGATTTC TTGTTAAAAACC AACGAAATCTCGTATTTACATCTTTCATCTGGAAAAGAAGTGAGCATTTAGCG GCATATGGAGTTC CATTGGTGAATTACAATCCTCGCATCTTGGAACTCAC CCTGGCCATTAACGTATCTTCTACTGTTGACAAATCAGAACGTGTACCGT GATTTAAACCACTAGAACACTGCATCATTGTCCAGTCACCAAAAAACATTA AAGATTTTTCTTGATCAAAGCCAGCTTTTTCAAAAAAATGGCCAAAAAGTA CTAGTAGCAATAAAAATAATTCTTTCCATTTAACAATCTTTTAATTGCTTCA TTGCTTACTTGGCTTATATTTCAACTGAATACTCATTAATTAGTTGACTCCA GAATTGCCATTTTCATCCCAAGAATCAAAATCTTT-</p>
	Reverse	<p>>W_R TRIM QUALITY: 20</p> <p>----</p> <p>AACTGCTCAACCAGTTTTACCATTGGATCAAGAAGCTGAGGACTAGTTGG ATCAACTCCTAGTTCAAGCACTACGACCTTCTTAGTCTGATTTCTTGTTAAA AACCAACGAAATCTCGTATTTACATCTTTCATCTGGAAAAGAAGTGAGCATT AGCGGCATATGGAGTTC CATTGGTGAATTACAATCCTCGCATCTTGGAAACC TCACCTGGCCATTAACGTATCTTCTACTGTTGACAAATCAGAACGTGTA CCGTGATTTAAACCACTAGAACACTGCATCATTGTCCAGTCACCAAAAAAC ATTAAGATTTTTCTTGATCAAAGCCAGCTTTTTCAAAAAAATGGCCAAA AGTACTAGTAGCAATAAAAATAATTCTTTCCATTTAACAATCTTTTAATTG CTTCATTGCTTACTTGGCTTATATTTCAACTGAATACTCATTAATTAGT- GACTCCA-----</p>
Inicial RR	Forward	<p>>IRR_F TRIM QUALITY: 20</p> <p>-----</p> <p>AGTTGGATCAACTCCTAGTTC AAGCACTACGACCTTCTTAGTCTGATTTCCT GTTAAAAACCAACGAAATCTCGTATTTACATCTTTCATCTGGAAAAGAAGTG AGCATTTAGCGGCATATGGAGTTC CATTGGTGAATTACAATCCTCGCATCT TGGAACCTCACCTGGCCATTAACGTATCTTCTACTGTTGACAAATCAGA ACGTGTACCGTGATTTAAACCACTAGAACACTGCATCATTGTCCAGTCACC AAAAACATTAAGATTTTTCTTGATCAAAGCCAGCTTTTTCAAAAAAATG GCCAAAAGTACTAGTAGCAATAAAAATAATTCTTTCCATTTAACAATCTTT TAATTGCTTCATTGCTTACTTGGCTTATATTTCAACTGAATACTCATTAATT AGTTGACTCCAGAATTGCCATTTTCATCCCAAGAATCAAAATCTTTA</p>
	Reverse	<p>>IRR_R TRIM QUALITY: 20</p> <p>-----</p> <p>TTTGAAGTCTCAACCAGTTTTACCATTGGATCAAGAAGCTGAGGACTAGT TGGATCAACTCCTAGTTCAAGCACTACGACCTTCTTAGTCTGATTTCTTGTT AAAAACCAACGAAATCTCGTATTTACATCTTTCATCTGGAAAAGAAGTGAGC ATTTAGCGGCATATGGAGTTC CATTGGTGAATTACAATCCTCGCATCTTGG AACCTCACCTGGCCATTAACGTATCTTCTACTGTTGACAAATCAGAACG TGTACCGTGATTTAAACCACTAGAACACTGCATCATTGTCCAGTCACCAAA AACATTAAGATTTTTCTTGATCAAAGCCAGCTTTTTCAAAAAAATGGCC AAAAGTACTAGTAGCAATAAAAATAATTCTTTCCATTTAACAATCTTTTAA TTGCTTACTTGGCTTATATTTCAACTGAATACTCATTAATTAGT- GACTCCA-----</p>
Final RR	Forward	<p>>FRR_F TRIM QUALITY: 20</p> <p>-----</p> <p>AGTTGGATCAACTCCTAGTTC AAGCACTACGACCTTCTTAGTCTGATTTCCT GTTAAAAACCAACGAAATCTCGTATTTACATCTTTCATCTGGAAAAGAAGTG AGCATTTAGCGGCATATGGAGTTC CATTGGTGAATTACAATCCTCGCATCT TGGAACCTCACCTGGCCATTAACGTATCTTCTACTGTTGACAAATCAGA ACGTGTACCGTGATTTAAACCACTAGAACACTGCATCATTGTCCAGTCACC AAAAACATTAAGATTTTTCTTGATCAAAGCCAGCTTTTTCAAAAAAATG GCCAAAAGTACTAGTAGCAATAAAAATAATTCTTTCCATTTAACAATCTTT TTGCTTACTTGGCTTATATTTCAACTGAATACTCATTAATTAGT- GACTCCA-----</p>

		TAATTGCTTCATTGCTTTACTTGGCTTATATTCAACTGAATACTCATTAAATT AGTTGACTCCAGAATTGCCATTTTTTCATCCCAAGAATCAAAAATCTT--
	Reverse	>FRR_R TRIM QUALITY: 20 TTTGAAC TGCTCAACCAGTTTACCATTGGATCAAGAAGCTGAGGACTAGT TGGATCAACTCCTAGTTCAAGCACTACGACCTTCTTAGTCTGATTTCTTGTT AAAAACCAACGAAATCTCGTATTACATCTTCATCTGGAAAGAAGTGAGC ATTTAGCGGCATATGGAGTTCATTGGTGAATTACAATCCTCGCATCTTGG AACCTCACCTGGCCATTAACGTATCTCTTCACTGTTGACAAATCAGAACG TGTACCGTGATTTAAACCACTAGAACAACACTGCATCATTGTCCAGTCACAAA AACATTAAGATTTTTCTTGATCAAAGCCAGCTTTTCAAAAAAATGGCC AAAAAGTACTAGTAGCAATAAAATAATTCTTTCCATTTAACAATCTTTTAA TTGCTTCATTGCTTTACTTGGCTTATATTCAACTGAATACTCATTAAATTAGT- GACTCCAGAA-----

Anexo 12. Resultados de parámetros de la prueba de Levene.

Levene Test			
Parámetros	Cepas		
	Wildtype vs. Inicial RR	Wildtype vs. Inicial RR	Inicial RR vs Final RR
Grados de Libertad	10	10	20
F	0.0055	0	1.9483
P	0.9426	1	0.1781

Anexo 13. Resultados de parámetros de la prueba T-student.

T-student			
Parámetros	Cepas		
	Wildtype vs. Inicial RR	Wildtype vs. Inicial RR	Inicial RR vs Final RR
Grados de Libertad	10	10	20
t	-0.5678	6.2973	6.7626
P	0.5827	8.94e-05	1.409e-06