

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

MEMORIA DE RESULTADOS

Título del Proyecto

Implementación de sistemas miniaturizados para la identificación de bacterias lácticas

Referencia

ID2013/257

Profesores responsables

M^a Encarnación Velázquez Pérez

Otros participantes

Pedro F. Mateos González, Belén Rubio Pérez, Eustoquio Martínez
Molina, Raúl Rivas González, Carmen Tejedor Gil, José David
Flores Félix, Lorena Celador Lera

Introducción

La utilización de recursos multimedia en el proceso de la enseñanza-aprendizaje de las ciencias experimentales facilita la adquisición de destrezas tanto mentales como manuales que son el objetivo de las prácticas de laboratorio.

En el caso de las prácticas que requieren el manejo de microorganismos, la elaboración de tutoriales en video permite al alumno observar la forma correcta de manipularlos y aprender técnicas microbiológicas, con la ventaja de que se pueden recoger en unos pocos minutos resultados, que en la práctica microbiológica, tardan días en obtenerse.

La utilización de este tipo de tutoriales ha demostrado una gran eficacia en las prácticas de laboratorio real, ya que evita errores en la manipulación de los microorganismos por parte del alumno y los riesgos que eso puede conllevar en algunos casos.

Actualmente, además, se pueden subir estos videos a plataformas que permiten la distribución on-line que permitirá a los alumnos acceder al vídeo sin estar ligados a un ámbito espacio-temporal concreto, por lo que podrán verlo tantas veces como deseen y sin necesidad de estar en el laboratorio.

Metodología aplicada

Se ha grabado el proceso completo de identificación mediante sistemas miniaturizados de los dos microorganismos que normalmente se utilizan en la fabricación del yogur, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, y que pueden ser aislados en medios de cultivo convencionales y en condiciones aerobias.

La cepa de *Lactobacillus* se ha aislado en medio TJA (agar jugo de tomate) y la de *Streptococcus* en agar sangre y los sistemas miniaturizados que se han utilizado son rutinariamente aplicados a la identificación de estos microorganismos tanto en alimentos como en clínica. En el primer caso se ha utilizado el sistema API 50 CH y en el segundo caso el sistema API 20STREP, ambos comercializados por la casa BioMerieux (Francia).

Los resultados obtenidos se han analizado utilizando la base de datos de estos grupos de microorganismos accesible on-line a la que está suscrito nuestro Departamento (Apiweb).

La grabación del video se realizó utilizando una cámara Sony HandyCam DCR-SR77E. A continuación, se utilizó el programa informático Windows Live Movie Maker 14.0.8091.0730 en un ordenador HP a6641es con procesador Intel Core 2 Quad Q8200 a 2,33GHz. Tras la edición y maquetado del archivo de video, se procedió a realizar la grabación en formato CD haciendo uso del programa informático CyberLink PowerStarter 7.0.2216

Resultados

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

1. Se ha elaborado un tutorial en video digital sobre la identificación de microorganismos aislados a partir de yogur utilizando sistemas miniaturizados que

incluye:

- La inoculación de cepas aisladas a partir de yogur en medios líquidos específicos para los sistemas API 50CH diseñado para la identificación de *Lactobacillus* y API STREP diseñado para la identificación de *Streptococcus*.
- La inoculación de las galerías de microtubos de cada uno de los sistemas utilizados.
- La lectura de los resultados después de la incubación de las galerías y la comparación de los mismos con bases de datos de acceso on-line que nos permiten la identificación de los microorganismos.

2. Se ha implementado esta práctica en la asignatura de Biotecnología Farmacéutica de cuarto curso del Grado de Farmacia.

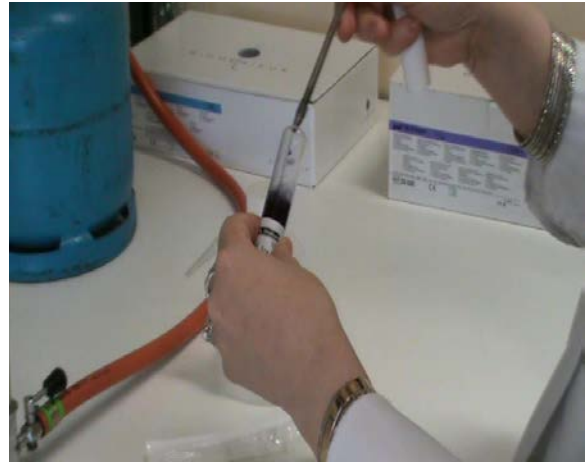
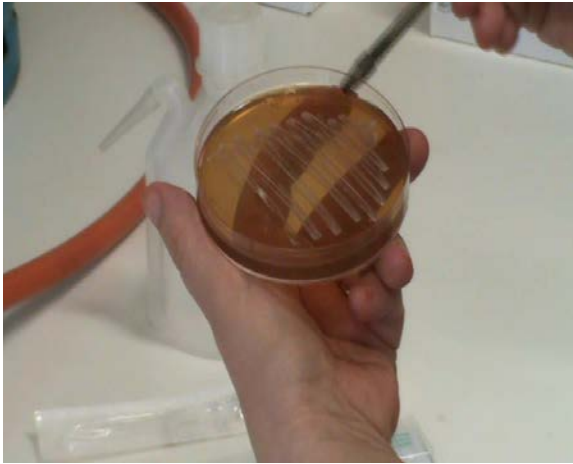
- Este video-tutorial ha sido diseñado para ser visualizado por los alumnos a continuación de otro video-tutorial en el que los alumnos aprenden los métodos de aislamiento de bacterias en el yogur y que se ha realizado en el transcurso de un proyecto de innovación docente previo.
- Este tipo de video-tutoriales han demostrado ser de una gran utilidad para la realización de prácticas de laboratorio en asignaturas relacionadas con la Microbiología y además de ser una excelente herramienta para el profesor, tienen una excelente acogida por parte de los alumnos.
- Las encuestas realizadas a los alumnos de cuarto y quinto curso del Grado de Farmacia que han cursado la asignatura de Biotecnología Farmacéutica han mostrado que el 100% de los alumnos consideran muy útil la visualización del video-tutorial previamente a la realización de la práctica en el laboratorio.

A continuación se exponen los puntos básicos del video-tutorial mediante capturas de pantallas del mismo.

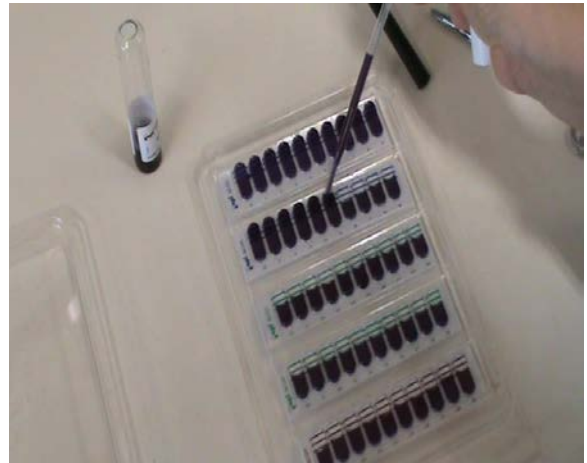
1. Para identificar la cepa de *Lactobacillus*, se utilizó el sistema API 50CH. Este sistema consta de galerías que contienen 50 microtubos con diferentes fuentes de carbono y ampollas con medio CHL para *Lactobacillus* que contienen un indicador de pH de color morado.



2. Partiendo de un cultivo en medio TJA (agar jugo de tomate), utilizado habitualmente para el aislamiento de *Lactobacillus*, se hace una suspensión del mismo en el medio CHL con la ayuda de un asa de cultivo estéril y se deja durante unos minutos en reposo para que se resuspendan las células adecuadamente.



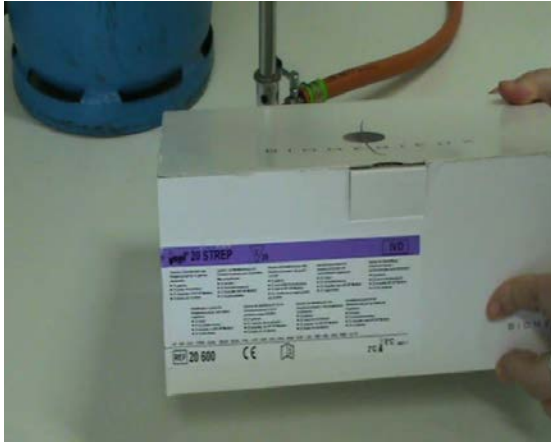
3. Una vez homogeneizada la suspensión con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril se rellenan los minitubos empezando por rellenar la parte inferior y posteriormente rellenando las cúpulas de los tubos.



4. Una vez inoculada la cepa, las galerías se incuban a 37°C durante 48h y los resultados se leen observando el viraje del indicador a pH ácido (color amarillo) para los azúcares o básico (color morado intenso) para los ácidos orgánicos.



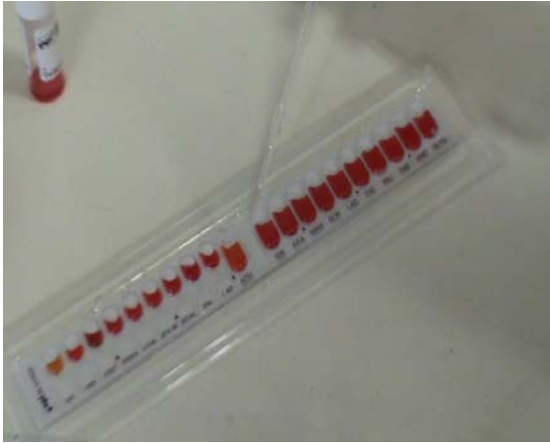
5. Para identificar la cepa de *Streptococcus*, se utilizó el sistema API 20STREP. Este sistema consta de galerías que contienen 20 minitubos con diferentes sustratos enzimáticos y fuentes de carbono, así como ampollas con medio específico para *Streptococcus* que contienen un indicador de pH de color rojo.



6. Partiendo de un cultivo en medio agar sangre, utilizado habitualmente para el aislamiento de *Streptococcus*, se hace una suspensión del mismo en el medio STREP con la ayuda de un asa de cultivo estéril y se deja durante unos minutos en reposo para que se resuspendan las células adecuadamente, al igual que en el caso anterior. A continuación se rellenan los primeros tubos que son muy cortos y contienen sustratos para detectar la producción de diversos enzimas por parte de la bacteria.



7. A continuación se rellena el resto de los tubos empezando como en el caso anterior por la parte de abajo del tubo y posteriormente rellenando las cúpulas desde la prueba 9 a la 20 ya que las 9 primeras pruebas necesitan ser reveladas con reactivos especiales y hay que dejar libres las cúpulas para añadirlos. Estos reactivos son de diferentes tipos y se añaden una vez incubadas las galerías API 20 STREP durante 24h a una temperatura comprendida entre 37°C y 45°C.



8. Una vez añadidos los reactivos se leen los resultados que en las las 9 primeras pruebas dan diferentes coloraciones y en el resto la utilización de diferentes azúcares, origina una bajada de pH, virando en este caso el indicador del color rojo al amarillo.



9. Una vez codificados los resultados, la identificación en ambos casos se lleva a cabo on-line frente a las bases de datos correspondientes a *Lactobacillus* y *Streptococcus* de la casa que comercializa ambos sistemas miniaturizados de identificación. Las especies identificadas en el caso de los yogures sólidos son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Departamento de Microbiología y Genética Universidad de Salamanca
apiweb

API 20 STREP V7.0

REFERENCIA: FECHA: 23/06/14
COMENTARIO:

BAJA DISCRIMINACION

Substrato	API 20 STREP V7.0		
Perfil	S S S S 4 4 0		
Baza	POSIBILIDAD DE <i>Lactobacillus</i> spp. ¡NO VALEDA ANTES 24H DE COLONIZACIÓN! ¡NO VALEDA ANTES 24H DE COLONIZACIÓN!		
Taxón significativo	% ID	I	Pruebas en contra
<i>Streptococcus salivarius</i>	85.8	8.88	
<i>Lactobacillus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	7.9	8.74	86% 18% 84%
<i>L. mesenteroides</i> spp.	5.9	8.87	
Taxón significativo	% ID	I	Pruebas en contra
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8.4	8.67	86% 1% 14% 25% 84%
Pruebas complementarias	18%	LEVURO	SALICILATO
<i>Lactobacillus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	++	III	-
<i>L. mesenteroides</i> spp.	-	+	+
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	+	+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	+

Departamento de Microbiología y Genética Universidad de Salamanca
apiweb

API 50 CHE V5.1

REFERENCIA: FECHA: 23/06/14
COMENTARIO:

BUENA IDENTIFICACION

Substrato	API 50 CHE V5.1		
Perfil		
Baza		
Taxón significativo	% ID	I	Pruebas en contra
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	99.7	1.8	
Taxón significativo	% ID	I	Pruebas en contra
<i>Streptococcus thermophilus</i>	8.2	9.8	18%