

**PROYECTOS DE INNOVACIÓN Y MEJORA DOCENTE
2019-2020**

MEMORIA DE RESULTADOS

Título del Proyecto

**Elaboración de materiales didácticos para la enseñanza/aprendizaje
del proceso de identificación mediante MALDI-TOF MS y
secuenciación de ácidos nucleicos de hongos filamentosos aislados a
partir de queso**

Referencia

ID2019/157

Profesor responsable

M^a Encarnación Velázquez Pérez

Otros participantes

**Pedro F. Mateos González, Belén Rubio Pérez, Eustoquio Martínez Molina,
Carmen Tejedor Gil, José David Flores Félix, Fernando Sánchez Juanes,
Rocío Vicentefranqueira Rodríguez**

Introducción

En la enseñanza-aprendizaje de las Ciencias experimentales, la adquisición de conocimientos por parte de los alumnos incluye el aprendizaje de destrezas manuales que han de adquirirse mediante la realización de clases prácticas en el laboratorio. En el caso de la Microbiología, el aprendizaje del aislamiento y observación al microscopio de los microorganismos, de su propagación mediante diferentes técnicas de cultivo, de su identificación, de la detección de los metabolitos que producen y de su control, es imprescindible para adquirir todas las competencias necesarias para el manejo de los microorganismos. Estas clases prácticas deben ser impartidas en el laboratorio presencial, pero pueden ser complementadas con prácticas de laboratorio virtual, que las nuevas tecnologías permiten implementar de modo relativamente sencillo utilizando herramientas y plataformas digitales (Sancho et al. 2006).

En el Grado en Farmacia, los alumnos cursan varias asignaturas relacionadas con la Microbiología. La asignatura optativa Biotecnología Farmacéutica se imparte actualmente en cuarto curso de dicho Grado y el número de alumnos que la cursan anualmente está en torno a los 60. En el programa de clases prácticas de esta asignatura en laboratorio presencial se incluye el aprendizaje de técnicas de identificación de microorganismos de interés biotecnológico para la producción de alimentos funcionales. Así mismo, se incluyen algunas prácticas de laboratorio virtual que se han implementado en el curso de diferentes proyectos de mejora e innovación docente financiados por la USAL.

También se han elaborado diferentes documentos audiovisuales pre-laboratorio en los que se enseña, por ejemplo, la realización práctica del aislamiento, recuento e identificación de microorganismos que intervienen en la producción de diferentes alimentos funcionales como el yogur o el kéfir (Flores-Félix et al. 2016). Las técnicas de identificación que se muestran en estos documentos audiovisuales abarcan desde las más clásicas basadas en pruebas fenotípicas, incluyendo sistemas miniaturizados y automatizados, hasta las más modernas técnicas moleculares basadas en análisis de ácidos nucleicos y proteínas.

El proceso de identificación microbiana mediante técnicas basadas en pruebas fenotípicas puede ser llevado a cabo íntegramente en los laboratorios de prácticas docentes actuales, sin embargo hay otras técnicas de identificación que sólo pueden llevarse a cabo parcialmente en laboratorio presencial. Esto ocurre tanto con la secuenciación de ácidos nucleicos como con el análisis de proteínas ribosomales mediante MALDI-TOF MS, que precisan de unas instalaciones y un equipamiento actualmente imposibles de implementar en un laboratorio de prácticas debido a su costo y a su manejo por personal especializado.

En estos dos casos, los alumnos pueden llevar a cabo en el laboratorio de prácticas la parte inicial del proceso de identificación que incluye el aislamiento, la observación al microscopio y el cultivo de los microorganismos que luego van a ser identificados por ambas técnicas. No obstante, los alumnos precisan adquirir conocimientos sobre los procesos completos de identificación y no sólo las destrezas manuales de las partes que hayan llevado a cabo en el laboratorio presencial, para lo cual es necesario disponer de herramientas que faciliten la enseñanza-aprendizaje de dichos procesos.

Una herramienta fundamental son los ya mencionados videotutoriales, que pueden ser visualizados en modo pre-laboratorio para facilitar al alumno el aprendizaje de las técnicas antes de su realización en las prácticas de laboratorio presencial, y también a través de plataformas digitales que permiten a los alumnos la visualización de los procesos completos de identificación tantas veces como deseen, así como la realización

de ejercicios de laboratorio virtual. Este tipo de ejercicios permite a los alumnos aprender a interpretar los resultados obtenidos para las muestras manejadas por ellos en el laboratorio presencial, y además aquellos obtenidos a partir de otras muestras, permitiendo a su vez a los profesores la evaluación del aprendizaje de los alumnos.

Hasta el momento, en la asignatura Biotecnología Farmacéutica se han implementado prácticas que permiten el aprendizaje del aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos que intervienen en la producción de yogur y kéfir, dos alimentos funcionales que contienen bacterias y en el caso del kéfir, además, levaduras. Otro de los alimentos incluido dentro de este grupo de alimentos funcionales es el queso que, además de bacterias y levaduras, puede contener algunos hongos filamentosos, cuya identificación no se había abordado antes en las prácticas de la asignatura Biotecnología Farmacéutica.

Por lo tanto, en el presente proyecto nos propusimos implementar una nueva práctica que permitiera a los alumnos abordar el aprendizaje del aislamiento, observación al microscopio, cultivo e identificación de los hongos filamentosos que están presentes en quesos de amplio consumo, como son los quesos azules y los quesos de pasta blanda que se maduran recubriéndolos con hongos filamentosos (mohos). El aislamiento de los hongos a partir de estos dos tipos de queso, su observación al microscopio y su posterior cultivo en medios que contienen agentes inhibidores del crecimiento bacteriano se llevó a cabo por los alumnos en el laboratorio de prácticas presencial.

Posteriormente, los hongos aislados se analizaron mediante MALDI-TOF MS, una técnica que permite la identificación tanto de bacterias como de hongos (Welke et al. 2019), pero que presenta un inconveniente para la identificación de los hongos filamentosos, ya que en su base de datos no están incluidas todas las especies utilizadas en la fabricación de quesos. Esta circunstancia no es, sin embargo, un inconveniente para el aprendizaje de los alumnos, que deben conocer las limitaciones de las diferentes técnicas aplicables a la identificación de microorganismos, para que sean capaces de completar el proceso de identificación utilizando técnicas alternativas en el caso de que una de ellas no sea capaz de identificar algunos de los microorganismos aislados.

En el caso de los hongos, la identificación de los aislados para los que no se obtiene una buena identificación mediante MALDI-TOF MS, hay que completarla mediante la secuenciación del fragmento intergénico 5.8S-ITS, cuyas secuencias son accesibles en bases de datos públicas para todas las especies de estos microorganismos. En el caso del MALDI-TOF MS los resultados hay que interpretarlos de acuerdo a unos rangos numéricos proporcionados por la propia casa comercial (Sánchez-Juanes et al. 2020) y en el caso de la secuenciación del fragmento 5.8S-ITS el usuario recibe una secuencia de nucleótidos que ha de ser analizada en bases de secuencias de genes accesibles a través de internet, y los valores de similitud obtenidos se interpretan de acuerdo con criterios generales aplicados a la identificación de hongos (Raja et al. 2017).

Dado que ambos procesos completos de identificación no se pueden abordar en las prácticas en el laboratorio presencial, es necesario diseñar actividades docentes complementarias en forma de ejercicios de laboratorio virtual que permitan integrar en un mismo esquema accesible para los alumnos (en nuestro caso a través de la plataforma Studium) los videotutoriales elaborados sobre los procesos de identificación mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del fragmento 5.8S-ITS y una serie de preguntas que permitan incrementar el conocimiento de los alumnos sobre ambos procesos facilitando la evaluación de los conocimientos adquiridos por parte del profesor.

Objetivos

El **objetivo general** de este proyecto es la enseñanza/aprendizaje del proceso de identificación mediante MALDI-TOF MS y secuenciación de ácidos nucleicos de hongos filamentosos aislados a partir de muestras de queso.

Los **objetivos concretos** son los siguientes:

1. Implementar una nueva práctica en laboratorio presencial con la finalidad de aislar los hongos filamentosos presentes en muestras de diferentes quesos elaborados con leche cruda, que son considerados probióticos, para, posteriormente, llevar a cabo su identificación mediante MALDI-TOF MS y secuenciación de ácidos nucleicos.
2. Elaborar un videotutorial sobre el aislamiento, observación al microscopio e identificación mediante MALDI-TOF MS y secuenciación de ácidos nucleicos de los hongos filamentosos aislados en el objetivo 1. Este videotutorial se mostrará a los alumnos previamente a la realización de la práctica en laboratorio real y se pondrá a su disposición a través de Studium.
3. Diseño de ejercicios de laboratorio virtual utilizando materiales didácticos interactivos que serán volcados a la plataforma Studium donde los alumnos podrán observar los resultados obtenidos para hongos aislados a partir de diferentes muestras de queso y contestar a una serie de preguntas para la evaluación de los conocimientos adquiridos.

Metodología aplicada

En primer lugar para aislar los hongos se tomaron muestras directas de 2 quesos comerciales, un queso de pasta blanda madurado con un hongo filamentosos y un queso azul, que se depositaron en el centro de sendas placas conteniendo un medio selectivo para hongos, Sabouraud cloranfenicol (BD Difco, Detroit, USA). Las placas se incubaron a 25°C durante 24h.

Para llevar a cabo MALDI-TOF MS se tomó una muestra del micelio del hongo, se resuspendió en 300 µl de agua MilliQ estéril y se añadieron 900 µl de etanol, centrifugándose a 15.500 g durante 2 min. El precipitado se secó al aire durante 1 h y se le añadieron 50 µl de ácido fórmico (70% v/v), mezclándose cuidadosamente antes de añadir 50 µl de acetonitrilo. Se centrifugó de nuevo a 15.500 g durante 2 min y 1 µl del sobrenadante se colocó sobre la placa de acero dejándose secar a temperatura ambiente antes de proceder al análisis mediante MALDI-TOF MS que se llevó a cabo en el IBSAL. Los resultados de la identificación se basan en una escala de valores que proporciona la casa comercial (Bruker en este caso). Valores entre 2.3 y 3.0 indican buena identificación a nivel de especie; valores entre 2.0 y 2.299 indican buena identificación a nivel de género y una posible buena identificación a nivel de especie, valores entre 1.7 y 1.999 indican buena identificación a nivel de género, pero no de especie y valores menores de 1.7 indican no identificación (Sánchez-Juanes et al. 2020).

Para llevar a cabo la secuenciación de ácidos nucleicos se partió de colonias en cultivo puro que se suspendieron en 100 µl de una solución sarkosyl al 0,1% y se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 100 µl de NaOH 0,05M utilizando vortex y se mantuvo a 96°C durante 5 min para lisar las

células. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 4 minutos y se separó el sobrenadante que se diluyó diez veces con agua milliQ estéril. Con el DNA extraído se llevó a cabo la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los primers universales que permiten la amplificación del fragmento intergénico 5.8S-ITS en todos los hongos y una mezcla comercial que contiene la DNA polimerasa (Taq), los nucleótidos y un tampón adecuado para su funcionamiento siguiendo la metodología previamente descrita (García-Fraile et al. 2013). Los productos se sometieron a electroforesis en un gel horizontal de agarosa al 1% durante 2h a 6v/cm que se tiñó en una solución de bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a dicho gen se cortaron del gel y se purificaron utilizando unas columnas que contienen un filtro que retiene la agarosa y permite filtrar el DNA que queda listo para la secuenciación (Millipore Co., Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio Nucleus de la USAL en un secuenciador ABI377 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) usando un “BigDye terminator v3.0 cycle sequencing kit” siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en Genbank utilizando el programa Blastn (Altschul et al. 1997).

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

Resultados

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

1. Se ha implementado una nueva práctica en la asignatura de Biotecnología Farmacéutica de cuarto curso del Grado de Farmacia para la enseñanza-aprendizaje del proceso de identificación de hongos filamentosos.

- En las prácticas en laboratorio se ha llevado a cabo el aislamiento de hongos filamentosos a partir de un queso de pasta blanda madurado con un hongo filamentosos y de un queso azul, su observación al microscopio y su cultivo para el posterior análisis mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del fragmento intergénico 5.8S-ITS.

2. Se ha elaborado un videotutorial sobre la identificación de hongos filamentosos mediante las dos técnicas mencionadas que incluye:

- El aislamiento de los microorganismos en medio adecuado para hongos filamentosos y la preparación de las muestras para cada uno de los dos análisis.
- El análisis mediante MALDI-TOF MS, que nos permitió la identificación de algunas de las cepas aisladas.
- La amplificación, secuenciación y análisis del fragmento intergénico 5.8S-ITS, que nos permitió completar la identificación de las cepas aisladas.

A continuación se exponen los puntos básicos del videotutorial correspondientes a la identificación de los hongos aislados mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del fragmento intergénico 5.8S-ITS mediante capturas de pantalla seleccionadas a partir del videotutorial.

1. Para aislar los hongos se utilizaron un queso de pasta blanda madurado con un hongo filamentoso (A) y un queso azul (C). Después de sembrar directamente desde los quesos en medio Sabouraud cloranfenicol se observó el crecimiento de hongos con diferente morfología macroscópica, de los cuáles se muestra un ejemplo para cada uno de los dos tipos de queso (B y D).

A



B



C



D



2. Para la identificación mediante MALDI-TOF MS, se tomaron muestras del micelio de cada hongo, se pasaron a tubos eppendorff resuspendiéndolos en agua MiliQ estéril para proceder a la extracción de las proteínas (A) y posteriormente se centrifugaron (B).

A



B



3. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se sometió a un tratamiento con ácido fórmico y acetonitrilo (A). La muestra de cada cepa se colocó en la placa de acero, se dejó secar, y se cubrió con la matriz (B).

A



B

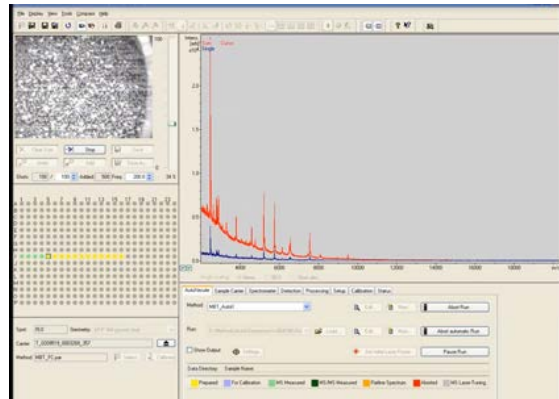


4. La placa se lee en el equipo de MALDI-TOF MS que está ubicado en el IBSAL (A) y obtiene los espectros de proteínas de cada una de las muestras (B).

A



B



5. Después de comparar los espectros de cada cepa con los depositados en la base de datos Biotyper 3.0, se ofrecen los resultados marcados en verde para valores superiores a 2.0.

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Organismo (mejor candidato)	Puntuación	Organismo (segundo mejor candidato)	Puntuación
I1 (++) (C)	JB	Geotrichum silvicola	2.223	Geotrichum silvicola	2.173
I2 (++) (C)	JB	Geotrichum silvicola	2.226	Geotrichum silvicola	2.173
I3 (+) (B)	JA	Penicillium camemberti	1.765	identificación poco fiable	1.391
I4 (+) (B)	JA	Penicillium camemberti	1.771	identificación poco fiable	1.631

Los resultados de la identificación mediante MALDI-TOF mostraron que la cepa JB aislada a partir de queso de pasta blanda madurado con un hongo filamentoso pertenece a la especie *Geotrichum silvicola*, ya que presenta valores superiores a 2.2 (la prueba se

hace normalmente por duplicado). La cepa JA aislada a partir del queso azul se identificó a nivel de género, *Penicillium*, puesto que se obtuvieron valores superiores a 1.7 y el sistema la marca en amarillo, pero no se pudo identificar a nivel de especie. Por lo tanto, la identificación de la cepa JA ha de completarse mediante la secuenciación del fragmento intergénico 5.8S-ITS.

6. Para la extracción del DNA, el micelio de la cepa JA se resuspendió en 100 μ l de NaOH 0,05M (A) y la suspensión se mantuvo 5 min en termoblock a 96°C (B).

A



B



7. Después de la lisis, el sobrenadante contiene el DNA total sobre el que se lleva a cabo la PCR (A). La posterior electroforesis se lleva a cabo en geles horizontales de agarosa (B)

A



B

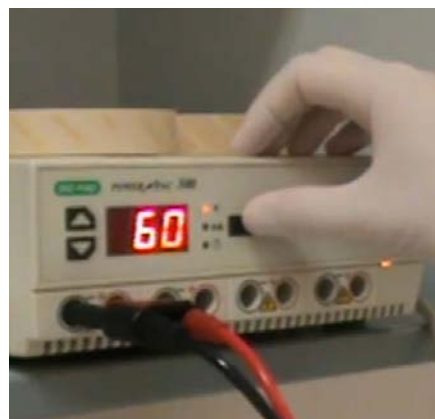


8. Los productos de la PCR se cargan en los pocillos del gel (A) y se lleva a cabo la electroforesis a 60 V para geles de 10 cm de longitud (B)

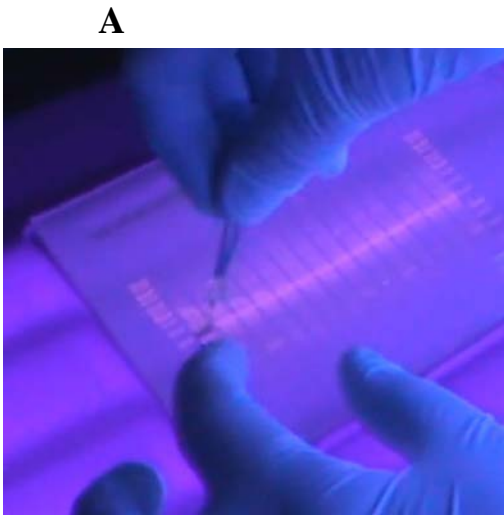
A



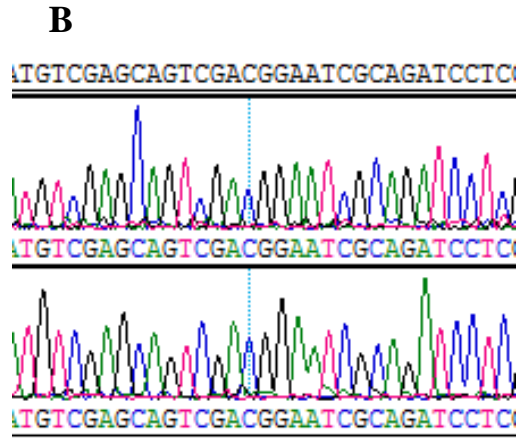
B



9. La banda correspondiente al fragmento intergénico 5.8S-ITS se cortó directamente del gel (A) y se purificó antes de su secuenciación (B)



10. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático del Servicio Nucleus de la USAL (A) cuyos resultados se obtienen como cromatogramas que se ensamblan utilizando programas informáticos (B).



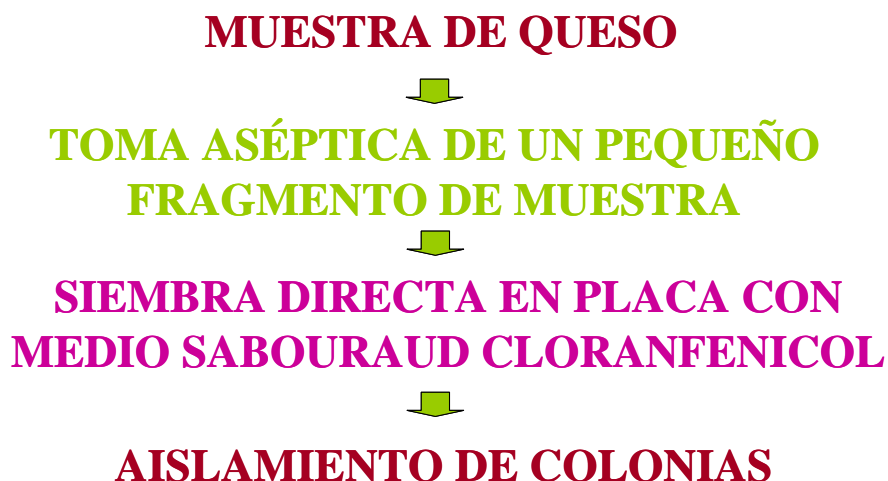
La secuencia del fragmento intergénico 5.8S-ITS de la cepa JA se comparó frente a las depositadas en la base de datos pública Genbank, que contiene las secuencias de estos fragmentos para todas las especies cultivadas de hongos filamentosos, lo que convierte a la secuenciación de este gen en la herramienta más útil para la identificación de estos microorganismos. El MALDI-TOF MS presenta la ventaja de ser más rápido, pero tiene la desventaja de que hay especies de hongos que no están en su base de datos. En el caso de la secuenciación, los resultados de la identificación se obtienen en forma de porcentajes de similitud entre las secuencias testadas y las de la base de datos, de modo que similitudes cercanas al 100% indican una buena identificación a nivel de especie.

11. En la imagen se muestran los resultados para la cepa JA mediante secuenciación del fragmento intergénico 5.8S-ITS. Esta cepa pertenece a la especie *Penicillium roqueforti*, que no está recogida en la base de datos del MALDI-TOF MS Biotyper 3.0 disponible en el IBSAL.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy		
Sequences producing significant alignments						
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		Download Manage Columns Show 100				
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium roqueforti strain CBS 221.30 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	1013	1013	100%	0.0	100.00%	MH855127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium roqueforti CBS 221.30 ITS region, from TYPE material	1013	1013	100%	0.0	100.00%	NR_103621.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium cameum strain CBS 112297 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	1002	1002	100%	0.0	99.64%	MH862891.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium roqueforti strain CBS 221.30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	1002	1002	98%	0.0	100.00%	KF465778.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium cameum CBS 112297 ITS region, from TYPE material	1002	1002	100%	0.0	99.64%	NR_111551.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium cameum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial sequence, strain CBS 112297	1002	1002	100%	0.0	99.64%	AB479310.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium roqueforti strain ATCC 10110 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	1000	1000	99%	0.0	99.82%	GQ458035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium psychrosexualis CBS 128137 ITS region, from TYPE material	979	979	100%	0.0	98.91%	NR_111552.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium paneum strain CBS 101032 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	946	946	100%	0.0	97.81%	MH862717.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium paneum CBS 101032 ITS region, from TYPE material	946	946	100%	0.0	97.81%	NR_103620.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium paneum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial sequence, strain CBS 101032	946	946	100%	0.0	97.81%	AB479312.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium concentricum strain CBS 477.75 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal R	935	935	100%	0.0	97.45%	MH860944.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium robsamsonii CBS 140573 ITS region, from TYPE material	935	935	100%	0.0	97.45%	NR_144866.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium robsamsonii strain CBS 140573 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	935	935	100%	0.0	97.45%	KJ904339.1
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium marinum ITS region, from TYPE material	935	935	100%	0.0	97.45%	
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium marinum strain CBS 109550 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	935	935	100%	0.0	97.45%	

A partir de los resultados de la identificación se diseñó un ejercicio virtual para ser llevado a cabo por los alumnos a través de Studium que consta de una serie de esquemas sobre el procedimiento global sobre el que versarán las preguntas del test junto con la parte del vídeo-tutorial de cada paso del proceso. A continuación se muestran las preguntas y los esquemas del ejercicio virtual.

12. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 1



Pregunta del esquema 1

El queso es un alimento que contiene: a) bacterias b) hongos filamentosos c) levaduras d) todas son correctas.

13. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 2

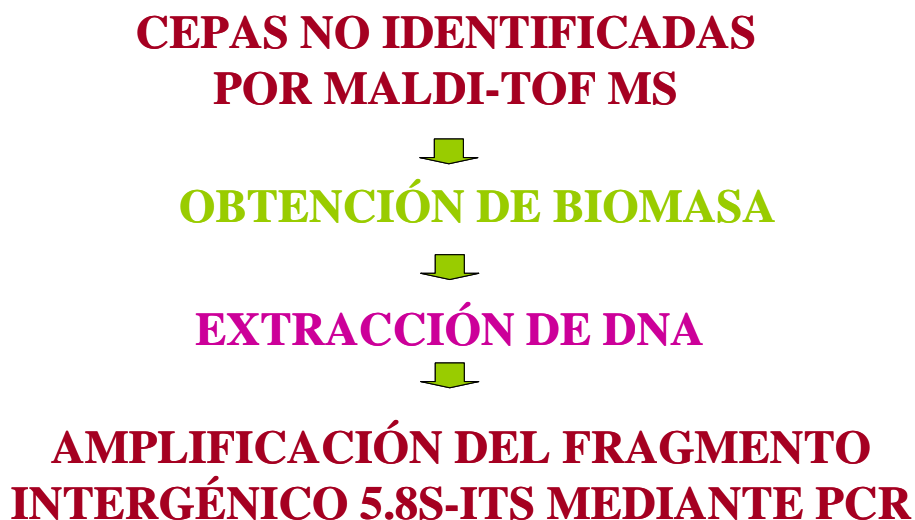


Preguntas del esquema 2

1. Los valores resultantes de la comparación de los espectros de proteínas obtenidos mediante MALDI-TOF MS frente a la base de datos indican: a) buena identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2.3 y 3 b) probable identificación a nivel de especie cuando oscilan entre 2 y 2.3 c) buena identificación a nivel de género cuando oscilan entre 2 y 2.3 d) probable identificación a nivel de género cuando oscilan entre 1.7 y 2

2. Utilizando MALDI-TOF MS se ha identificado en una de las muestras de queso analizadas al hongo: a) *Penicillium camemberti* b) *Geotrichum silvicola* c) *Penicillium roqueforti* d) *Geotrichum candidum*

14. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 3



Preguntas del esquema 3

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

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

15. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 4

ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICIONES EN GEL DE AGAROSA



PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS



PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN



COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS FRENTE A LAS DEPOSITADAS EN GENBANK

Preguntas del esquema 4

1. Los productos de la PCR: a) se separan mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa b) el fragmento intergénico 5.8S-ITS corresponde a una banda en el gel c) las bandas se cortan directamente a partir del gel con un bisturí y se purifican mediante centrifugación utilizando columnas de purificación d) todas son correctas

2. La secuencia obtenida tras la secuenciación del fragmento intergénico 5.8S-ITS de la segunda analizada corresponde a la especie: a) *Penicillium camemberti* b) *Geotrichum silvicola* c) *Penicillium roqueforti* d) *Geotrichum candidum*

Para poder responder a esta última pregunta se facilita a los alumnos la secuencia del fragmento intergénico 5.8S-ITS, así como las instrucciones para analizar esta secuencia en el Genbank.

Finalmente, los alumnos contestaron de forma anónima una serie de preguntas, que incluían las siguientes sobre la nueva práctica implementada y sobre su opinión acerca de la utilidad de la enseñanza basada en sistemas audiovisuales.

1. Después de la realización de la práctica me considero capaz de realizar un aislamiento de hongos filamentosos

A B C D E

2. La práctica permite familiarizarse con los pasos a seguir en un proceso de identificación de hongos a partir de una muestra alimentaria

A B C D E

3. Considero la enseñanza basada en sistemas audiovisuales un complemento imprescindible de la enseñanza práctica tradicional

A B C D E

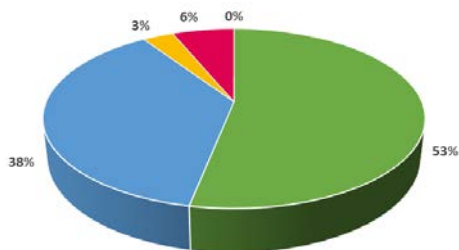
4. Considero que los vídeos pre-laboratorio son muy útiles para aprender el modo de realizar posteriormente las prácticas en el laboratorio

A B C D E

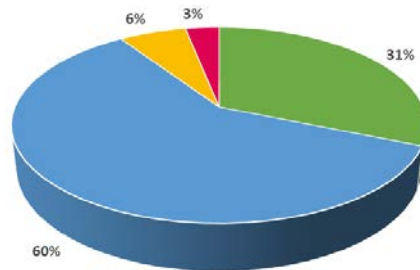
Las opciones de respuesta corresponden a las siguientes opiniones: A: Totalmente de acuerdo, B: De acuerdo, C: Dudoso, D: En desacuerdo, E: Totalmente en desacuerdo

Los resultados de las respuestas de 60 alumnos se recogen en la figura para las respuestas de las preguntas 1 (A), 2 (B), 3 (C) y 4 (D).

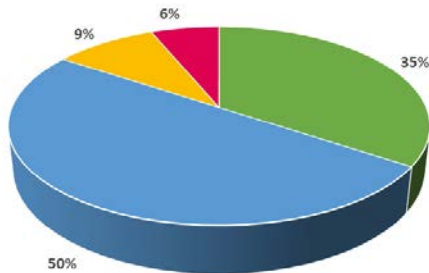
A



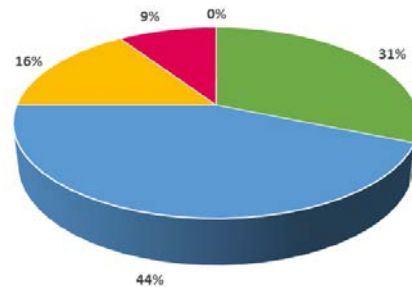
B



C



D



Como se puede observar en la figura, el 91% de los alumnos consideraron que eran capaces de aislar hongos filamentosos y que la práctica les permitió comprender el proceso de identificación de los mismos. Así mismo, la gran mayoría de los alumnos (85 y 75%) consideraron que la enseñanza basada en sistemas audiovisuales es un complemento imprescindible de la enseñanza práctica tradicional y que los vídeos pre-laboratorio son muy útiles para aprender el modo de realizar posteriormente las prácticas en el laboratorio.

Conclusiones

1. Se ha implementado una nueva práctica híbrida entre laboratorio presencial y virtual para la enseñanza-aprendizaje del aislamiento e identificación de hongos filamentosos.

2. Se han elaborado una serie de materiales didácticos que incluyen videotutoriales y ejercicios de laboratorio virtual que permiten comprender el proceso completo de identificación de hongos filamentosos a los alumnos y al profesor la evaluación del aprendizaje de los mismos.

3. La mayoría de los alumnos consideran que serían capaces de llevar a cabo dicho proceso, que los videotutoriales pre-laboratorio son muy útiles para la realización posterior de la práctica y que los materiales audiovisuales son un complemento imprescindible de la enseñanza práctica tradicional.

Referencias bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410

Flores Félix JD, Tejedor C, Celador L, Martínez Molina E, Rivas R. 2016. Aplicación de las TICS a la Enseñanza de la Biotecnología Microbiana: videotutoriales pre-laboratorio para el aprendizaje de la identificación de microorganismos. En: Renovación Pedagógica En Educación Superior. Rosario Isabel Herrada Valverde, M^a Trinidad Cutanda López y Ana Torres Soto (Editoras). Editum (Ediciones Universidad de Murcia). pp. 410 - 413. ISBN 978-84-608-8854-3 Vol. I

García-Fraile P, Silva LR, Sánchez-Márquez S, Velázquez E, Rivas R. 2013. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. *Food Chem* 139 (1-4):31-34

Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J Nat Prod* 80(3):756-770

Sánchez-Juanes F, Teixeira-Martín V, González-Buitrago JM, Velázquez R, Flores-Félix JD. 2020. Identification of Species and Subspecies of Lactic Acid Bacteria Present in Spanish Cheeses Type “Torta” by MALDI-TOF MS and pheS gene Analyses. *Microorganisms* 8(2):301

Sancho P, Corral R, Rivas T, González MJ, Chordi A, Tejedor C. 2006. A Blended Learning Experience for Teaching Microbiology. *Am J Pharm Educ* 70(5): 120

Welker M, Van Belkum A, Girard V, Charrier JP, Pincus D. 2019. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert Rev Proteomics* 16(8):695-710