

**AYUDAS DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA PARA
LA INNOVACIÓN DOCENTE
año 2009**

MEMORIA DE RESULTADOS

Título del Proyecto

Diseño de prácticas de laboratorio para el aprendizaje y la evaluación de procesos microbiológicos de fermentación para obtención de probióticos

Referencia ID 09/56

Profesores responsables

Carmen Tejedor Gil
Encarnación Velázquez Pérez

Otros participantes

Eustaquio Martínez Molina, Nieves Vizcaíno Santiso, M^a Jesús Peña Egado y
Paula García Fraile

Memoria de resultados

Resumen del Proyecto

1. Hemos diseñado una práctica consistente en un proceso de fermentación a escala de laboratorio para llevar a cabo la producción de probióticos a partir de productos lácteos inoculados con bacterias lácticas. La práctica se ha incluido en la programación docente de una asignatura que se impartía por primera vez este curso, la asignatura optativa Biotecnología Farmacéutica perteneciente al Grado en Farmacia. El próximo curso se incluirá también en la programación docente de la asignatura optativa Sanidad Alimentaria.
2. Hemos elaborado un tutorial en vídeo sobre el proceso de control y producción de prebióticos por fermentación. En el laboratorio de prácticas se ha instalado un cañón de vídeo digital para hacer posible la visualización del tutorial. Una copia del tutorial en formato CD se ha entregado a los estudiantes que lo han solicitado.
3. La posibilidad de proyectar vídeos en el laboratorio de prácticas nos ha permitido utilizar esta tecnología en las prácticas de la asignatura Microbiología II, asignatura troncal del Grado en Farmacia que han cursado este año 207 alumnos. Se han utilizado pequeños vídeos de los que ya disponíamos para presentar cada una de las técnicas de manipulación de microorganismos que se realizan en el laboratorio de microbiología.

Introducción

La utilización de recursos multimedia en el proceso de la enseñanza-aprendizaje de las ciencias experimentales tiene enormes posibilidades en la adquisición de destrezas manuales, objetivo de las prácticas de laboratorio. Concretamente, la elaboración de tutoriales en vídeo para proyectar a los estudiantes en el mismo laboratorio donde realizan las prácticas, que les permitan observar la forma correcta de manipular microorganismos y llevar a cabo técnicas microbiológicas especializadas se perfila como el mejor recurso didáctico para este fin.

La visualización de experimentos grabados en vídeo tiene además la ventaja de facilitar la adquisición de la destreza mental necesaria para la comprensión de fenómeno de que se trate. Los tiempos de espera en la práctica microbiológica son muy prolongados (días, en ocasiones) y puede ocurrir que el estudiante haya olvidado los

objetivos cuando finaliza la práctica. El vídeo elimina estos tiempos de espera y permite observar los resultados de cada fase de forma inmediata.

Resultados

1. Preparación del tutorial en vídeo

Hemos diseñado una práctica de laboratorio y elaborado un videotutorial donde se lleva cabo su realización que incluye los distintos apartados:

- Control de productos probióticos en distintos alimentos mediante técnicas de recuento.
- Aislamiento de bacterias probióticas a partir de una muestra de alimento probiótico.
- Realización de las pruebas bioquímicas para identificación del aislado utilizando un kit de identificación de bacterias lácticas.
- Identificación del aislado mediante el programa informático del mencionado kit.
- Fabricación de un producto probiótico mediante inoculación de una muestra de leche con la bacteria aislada e incubación en las condiciones adecuadas.

El vídeo fue grabado con una cámara Sony Digital 8 DCR-TRV510E PAL. La edición se realizó con el programa iMovie HD 6.0.3. en un Mac OS X Power PC G5 a 1.9 GHz. Una vez editado el video fue preparado para su exportación y posterior grabación en formato CD.

2. Implementación en prácticas

Los estudiantes realizaban la práctica en el laboratorio en 7 sesiones de laboratorio a lo largo de dos semanas (permitiendo los tiempos de crecimiento bacteriano que en ocasiones eran de 72 horas)

La visualización del vídeo se programó para el final de las prácticas con el objetivo de revisar los objetivos propuestos, la metodología utilizada y los resultados obtenidos.

3. Análisis de percepciones

Se elaboró una encuesta para recoger las percepciones de los estudiantes acerca de la consecución de los objetivos del proyecto,

dividida en dos partes. La primera parte de la encuesta incluía preguntas acerca del modo y tiempo más adecuado para llevar a cabo la visualización del videotutorial en las sesiones prácticas, la segunda parte contenía preguntas acerca de la utilidad del videotutorial en la comprensión y el aprendizaje de la práctica realizada.

Encuesta. Primera parte

- 1 Considero muy aprovechable ver el vídeo después de haber realizado el ejercicio práctico de laboratorio
- 2 Hubiera preferido ver el vídeo antes de realizar la práctica
- 3 Sería preferible separar el vídeo en distintos apartados y verlos de forma independiente antes de realizar cada parte de la práctica
- 4 Las explicaciones verbales son imprescindibles para seguir el vídeo
- 5 Me hubiera gustado disponer de un guión escrito que resumiera el ejercicio filmado
- 6 Dada la prolongación de la práctica en el tiempo pienso que lo más útil sería ver el vídeo tanto antes de comenzar como al finalizar la práctica de laboratorio

La encuesta fue contestada de forma anónima por el 100% de los estudiantes.

En la Tabla I se presentan los Resultados obtenidos en la encuesta en las preguntas relativas a aspectos relacionados con la forma y el momento más propicio para la proyección del vídeo. En la Tabla se incluye la valoración de la misma según el modelo de Likert, asignando un valor de 5 a 1 a las distintas opciones presentadas. Los valores por encima de 3 indican una mayoría de encuestados de acuerdo con el aserto.

Tabla I. Porcentaje de estudiantes que contestan cada una de las opciones de las preguntas 1 a 6

Número de pregunta	1	2	3	4	5	6
Totalmente de acuerdo (5)	0%	60%	0%	30%	0%	60%
De acuerdo (4)	40%	40%	0%	50%	30%	40%
Dudoso (3)	20%	0%	80%	20%	60%	0%
En desacuerdo (2)	40%	0%	20%	0%	10%	0%
Totalmente en desacuerdo (1)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Valoración (Modelo de Likert)	3	4,6	2,8	4,1	3,3	4,6

Encuesta. Segunda parte.

- 7 Ver el ejercicio práctico de forma completa en el vídeo me ha ayudado a comprender mejor el objetivo de la práctica
- 8 Considero que únicamente siguiendo el vídeo sería capaz de llevar a cabo la práctica
- 9 El vídeo me ayuda a comprender la técnica de recuento de microorganismos
- 10 El vídeo me ayuda a comprender cómo funciona el kit de identificación de bacterias lácticas
- 11 El vídeo me ayuda a reforzar los conocimientos sobre las características de crecimiento de las bacterias lácticas
- 12 Prefiero llevar a cabo la manipulación de microorganismos después de haber visto un vídeo de la técnica

En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos en la encuesta de percepciones acerca de la utilidad del vídeo en la comprensión y el aprendizaje de la práctica realizada

Tabla II. Porcentaje de estudiantes que contestan cada una de las opciones de las preguntas 7 a 12

Número de pregunta	7	8	9	10	11	12
Totalmente de acuerdo (5)	20%	30%	10%	30%	30%	40%
De acuerdo (4)	70%	40%	80%	70%	70%	60%
Dudoso (3)	10%	30%	10%	0%	0%	0%
En desacuerdo (2)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Totalmente en desacuerdo (1)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Valoración (Modelo de Likert)	4,1	4	4	4,3	4,3	4,4

Conclusiones

Del análisis de las percepciones de los estudiantes, reflejadas en la primera parte de la encuesta, podemos concluir que:

Es interesante que programemos la visualización del vídeo tanto al comienzo como después de la realización de la práctica. Los estudiantes consideran, además, fundamentales las explicaciones verbales del tutorial mientras que, sin embargo, no consideran necesario separar el vídeo en distintos apartados para verlos de

forma independiente antes de realizar cada parte de la práctica si bien hubieran preferido disponer de un guión escrito de la misma

Los estudiantes valoran positivamente la proyección del tutorial que piensan les ha servido para comprender mejor el objetivo de la práctica y las técnicas en que se fundamenta.

Es de destacar que la proyección de pequeños vídeos sobre técnicas microbiológicas en las clases prácticas de la asignatura Microbiología II ha sido positivamente valorada por el conjunto de profesores que han impartido dichas prácticas. Los profesores han destacado, además, la buena acogida por parte de los estudiantes que ven con más detalle los detalles prácticos de cada una de las destrezas manuales que se les exige adquirir.

Anexos

Anexo I. Contenido del videotutorial

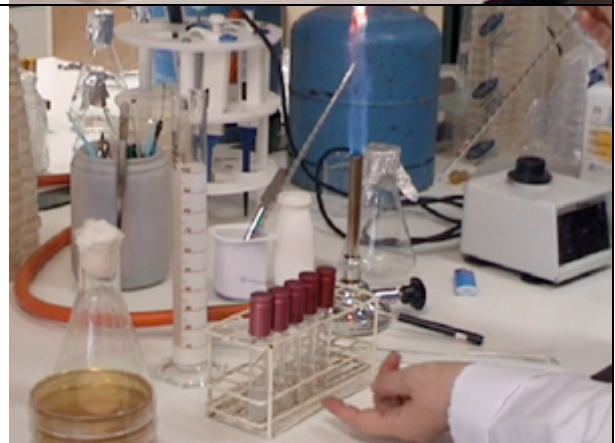
Anexo II Capturas de pantalla de la proyección de algunos vídeos de técnicas microbiológicas utilizadas en la docencia prácticas de la Microbiología en el Grado en Farmacia.

Anexo I Contenido del videotutorial

Descripción del procedimiento completo realizado en la práctica	
Parte I: Control de productos probióticos en distintos alimentos mediante técnicas de recuento. Recuento de microorganismos en dos tipos de yogurt en un medio específico para lactobacterias	
Preparación de la muestra	
Obtención de una dilución 1/10 de la muestra de yogurt líquido en condiciones asépticas	
Obtención de una dilución 1/10 de la muestra de yogurt sólido en condiciones asépticas	
Agitar el matraz con la suspensión del alimento en un agitador magnético, durante media hora	

Obtención de diluciones decimales seriadas. Realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6}

Inóculo: 500 microlitros de cada una de las diluciones anteriores en 4,5 mL de solución salina estéril.



Una vez realizadas todas las diluciones y contando con la dilución inicial tendremos las siguiente diluciones: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Siembra por extensión en superficie.

Sembrar, de cada dilución, 100 microlitros, empezando por la dilución 10^{-6} hasta llegar a la dilución 10^{-4}



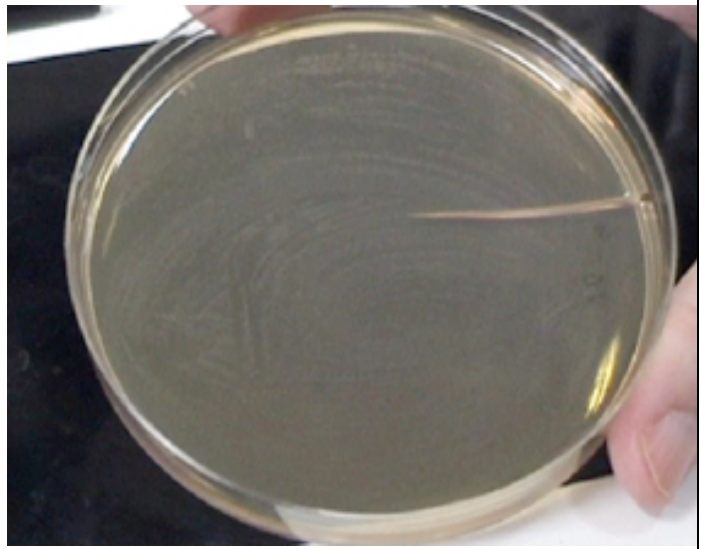
Extensión de los 100 microlitros de las diluciones por toda la placa, mediante asa de vidrio o de Drigalsky en condiciones estériles.



Incubar las placas a 28 °C durante 48-72 horas



Después del periodo de incubación se observa la existencia de colonias muy pequeñas, en el medio específico para *Lactobacillus*.



<p>Expresión de Resultados. Recuento en yogurt líquido</p>	<p>La placa con la dilución 10^{-5} es la que ha permitido el recuento recordemos que las diluciones se hacen para obtener un numero contable de colonias, que debe estar entre 30 y 300 colonias.</p> <p>250 colonias en la palca correspondiente a la dilución 10^{-5} Por lo tanto el recuento final de ufc/mL en yogurt liquido sería de 250×10^6 o 25×10^7 ufc/mL en el yogur líquido</p>
<p>Expresión de Resultados. Recuento en yogurt sólido</p>	<p>En este caso la palca correspondiente a la dilución 10^{-2} permite contar 200 colonias.</p> <p>Por lo tanto el recuento final es de 200×10^3 o 20×10^4 ufc/mL en el yogurt sólido.</p>

Parte II: Aislamiento de bacterias probióticas a partir de una muestra de alimento probiótico.

Después del periodo de incubación se observa la existencia de colonias muy pequeñas. A continuación se procede a aislar una colonia en cultivo puro, para después hacer la identificación.

Tomar una colonia con asa de punta



Pasar esa colonia con el asa a una placa del mismo medio, extendiendo por la técnica de agotamiento en estría.



Incubar a 28 °C durante 48 horas

PARTE III: Realización de las pruebas bioquímicas para identificación del aislado utilizando un kit de identificación de bacterias lácticas.

El kit contiene una serie de pruebas de producción de ácido a partir de sustratos hidrocarbonados.



Las distintas pruebas llevan un indicador de pH para observar la producción de ácido como consecuencia del metabolismo de los azúcares utilizados como sustrato.



El indicador vira a amarillo cuando se produce ácido y permanece rojo o naranja, cuando no se ha producido ácido, aunque el microorganismo se haya reproducido.



Sembrar cada tubo con el cultivo obtenido a partir de la colonia que usamos anteriormente para aislar el microorganismo.



Inocular cada tubo con un asa de siembra

Esterilizar el asa siempre entre tubo y tubo.



Incubar 48h a 28 °C



Después de incubar los tubos, se procede a leer los resultados de todas las pruebas, para leer las pruebas hay que tener en cuenta si se ha producido un **cambio de color**.

Serán **positivas** (es decir hay producción de ácido) las pruebas donde se observe color **amarillo**



Serán **negativas** los **naranjas o rojos** (negativa la producción de ácido)



Identificación del aislado mediante el programa informático, diseñado en nuestro laboratorio, incluido kit.

Con la ayuda de un programa de ordenador que se facilita con el kit se procede a identificar el microorganismo.



El programa permite ir introduciendo los datos positivos y negativos, como codificación binaria, es decir un 1 si es positivo y un 0 si es negativo.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS QUE PRODUCEN ALTERACIONES EN ALIMENTOS

1. Cocos G positivos	9. Acido de Acetilglutámico	17. Acido de Melibiosico
2. En pares y cadenas	10. Acido de Asimbiosico	18. Acido de Melibiosico
3. En pares y tiradas	11. Acido de Fructosa	19. Acido de Rafinosa
4. Bacilos G positivos	12. Acido de Galactosa	20. Acido de Fibrosa
5. Bacilos G negativos	13. Acido de Glucosa	21. Acido de Salicina
6. Produccion de acetico	14. Acido de Lactosa	22. Acido de Sacarosa
7. Utilizacion de acetato	15. Acido de Maltosa	23. Acido de Trehalosa
8. Utilizacion de lactato	16. Acido de Manosa	24. Acido de Xilosa

Introducir los resultados de las pruebas en la columna de la derecha (0=negativo y 1=positivo). Después, hacer click sobre IDENTIFICAR o sobre ESPECIES PROXIMAS.

Identificar

Especies proximas

El programa realiza la comparación de los datos introducidos con los datos codificados de las especies de *Lactobacillus* conocidas hasta el momento en que se elaboró y ofrece una identificación de la especie problema o del conjunto de especies más próximas.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS QUE PRODUCEN ALTERACIONES EN ALIMENTOS

1. Cocos G positivos	9. Acido de Acetilglutámico	17. Acido de Melibiosico
2. En pares y cadenas	10. Acido de Asimbiosico	18. Acido de Melibiosico
3. En pares y tiradas	11. Acido de Fructosa	19. Acido de Rafinosa
4. Bacilos G positivos	12. Acido de Galactosa	20. Acido de Fibrosa
5. Bacilos G negativos	13. Acido de Glucosa	21. Acido de Salicina
6. Produccion de acetico	14. Acido de Lactosa	22. Acido de Sacarosa
7. Utilizacion de acetato	15. Acido de Maltosa	23. Acido de Trehalosa
8. Utilizacion de lactato	16. Acido de Manosa	24. Acido de Xilosa

Introducir los resultados de las pruebas en la columna de la derecha (0=negativo y 1=positivo). Después, hacer click sobre IDENTIFICAR o sobre ESPECIES PROXIMAS.

Identificar

Especies proximas

En este caso el resultado es una única especie *Lactobacillus casei* subespecie *casei*.


IDENTIFICACION DE BACTERIAS QUE PRODUCEN ALTERACIONES EN ALIMENTOS

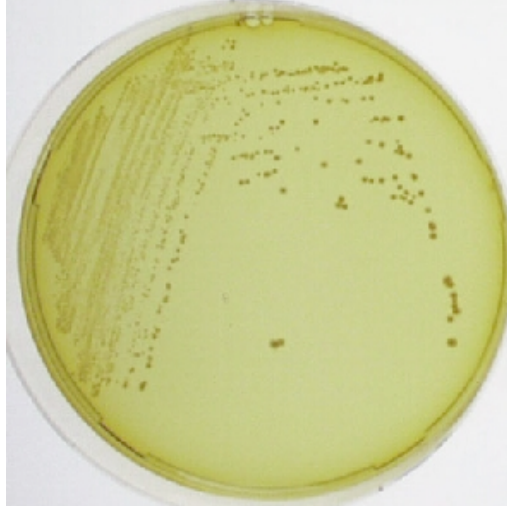
1. Coque O positivos	9. Acido de Amigdalina	17. Acido de Melitobona
2. En pesc y cadenas	10. Acido de Azelaico	18. Acido de Melibiosa
3. En pesc y Nitros	11. Acido de Fructosa	19. Acido de Palmitosa
4. Bacilos O positivos	12. Acido de Galactosa	20. Acido de Fribosa
5. Bacilos O negativos	13. Acido de Glucosa	21. Acido de Estreina
6. Produccion de acetico	14. Acido de Lactosa	22. Acido de Escorosa
7. Utilizacion de sorbita	15. Acido de Maltosa	23. Acido de Trehalosa
8. Utilizacion de lactato	16. Acido de Manosa	24. Acido de Xilosa

L. casei subsp. casei

PARTE IV: Fabricación de un producto probiótico mediante inoculación de una muestra de leche con la bacteria aislada e incubación en las condiciones adecuadas.

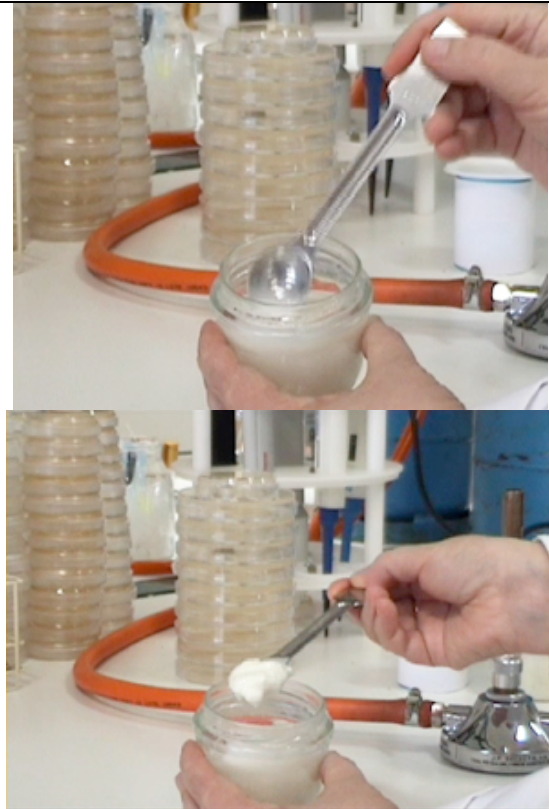
Inocular una muestra de leche con un inculo del microorganismo previamente aislado de un producto comercial.





Tapar e incubar a 37 °C durante 24 h.

A las 24 horas se observa la existencia de una capa serosa, líquido por encima; por debajo la consistencia es la del yogurt



Anexo II Capturas de pantalla de la proyección de algunos vídeos de técnicas microbiológicas utilizadas en la docencia práctica de la Microbiología en el Grado en Farmacia.

