

**AYUDAS DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA PARA  
LA INNOVACIÓN DOCENTE  
2010**

**MEMORIA DE RESULTADOS**

**Título del Proyecto**

Diseño de prácticas de laboratorio para el aprendizaje de los métodos de aislamiento e identificación de levaduras

**Referencia** ID 10/53

**Profesor coordinador**

Carmen Tejedor Gil

**Otros participantes**

E.Velázquez Pérez, N. Vizcaíno Santiso, R. Hermosa Prieto, E.Martínez  
Molina, P.F.Mateos González, E. Monte Vázquez, R. Rivas González,  
L.R. Fernández Lago, M.E. Trujillo Toledo,

# Memoria de resultados

## Resumen del Proyecto

El objetivo general del proyecto ha consistido en el diseño y evaluación de nuevas prácticas de laboratorio real que se han incorporado el presente curso a asignaturas del área de conocimiento de Microbiología.

1. Se han diseñado prácticas de aislamiento e identificación de levaduras a partir de muestras de orina y de muestras ambientales (suelo) que se han implementado en las clases prácticas de laboratorio de las asignaturas Microbiología I y II del Grado en Farmacia y Métodos Biológicos de Análisis y Corrección y Biotecnología Ambiental de la Licenciatura en Ciencias Agrarias y Ambientales (aplicables a las futuras enseñanzas prácticas del Grado en Ciencias Agrarias y Ambientales)

2. Se ha elaborado un tutorial en lenguaje html que incluye los protocolos básicos de aislamiento observación microscópica e identificación fenotípica de levaduras tanto clínicas como ambientales, vídeos demostrativos de las distintas técnicas empleadas y una galería de imágenes de resultados posibles para su visualización "pre-laboratorio", antes de la realización de la práctica. El tutorial se ha puesto a disposición de los estudiantes *on-line* y en formato digital.

3. La práctica se ha programado en 2 ó 4 sesiones, dependiendo del tipo de asignatura. En las asignaturas básicas de microbiología se han utilizado únicamente los módulos de la práctica dedicados al aislamiento y observación microscópica de levaduras mientras que en las asignaturas de contenidos más específicos se ha llevado a cabo la práctica completa. Al finalizar la última sesión se distribuyó entre los estudiantes una encuesta de percepciones y un cuestionario de evaluación de conocimientos sobre la experiencia práctica a los que contestaron de forma anónima.

## **Introducción**

Para conocer y comprender la enorme diversidad del mundo microbiano es fundamental poder manejar, reconocer, identificar, es decir, enfrentarse a todo tipo de microorganismos ya sean bacterias, hongos levaduriformes o filamentosos, virus, protozoos o algas unicelulares y ésto en la realidad de nuestras enseñanzas prácticas resulta casi imposible. La mayoría de las prácticas de laboratorio se realizan con bacterias (organismos procariotas) por su sencillez estructural, su facilidad de manejo y rapidez de crecimiento además de, por su versatilidad y diversidad.

Con este proyecto hemos pretendido enfrentar a nuestros estudiantes a otro tipo de microorganismos, las levaduras de gemación, de gran interés biotecnológico y ambiental así como sanitario por la capacidad patógena de algunas de las especies.

## **Resultados**

### ***Tutorial***

La conexión a Internet por sistema *wi-fi*, la disponibilidad de un ordenador destinado a usos docentes en el laboratorio de clases prácticas y de un cañón de proyección nos han permitido poner a disposición de los estudiantes y docentes el tutorial elaborado vía Internet evitando la obligatoriedad del soporte CD-DVD

El tutorial, implementado en un portalweb en lenguaje html, se ha proyectado de forma "pre-laboratorio" en el laboratorio de clases prácticas.

Con anterioridad a la realización de las sesiones prácticas, el tutorial estaba accesible *on-lien*, en el siguiente *url* para facilitar la labor de aprendizaje de las técnicas que luego se realizaban en el laboratorio:

[http://coli.usal.es/web/abydl/practicas\\_lev/index.html](http://coli.usal.es/web/abydl/practicas_lev/index.html)

Home   M. Orina   M. Ambientales   Galería   Vídeos



## Aislamiento e Identificación de levaduras

Departamento de Microbiología y Génética. Universidad de Salamanca

### Análisis Muestras de Orina

El propósito del análisis microbiológico de una muestra de orina es en primer lugar determinar si existe una infección y, si existe, identificar el microorganismo que la produce. Para determinar si existe infección debemos hacer un recuento del número de microorganismos que hay por mL de orina.



*Prácticas Microbiología II y Biotecnología Ambiental*

<p style="margin: 0;"><b>M. ORINA</b></p> <p style="margin: 0; font-size: small;"><i>Recuento y aislamiento. Microscopía. Identificación</i></p>	<p style="margin: 0;"><b>M. AMBIENTALES</b></p> <p style="margin: 0; font-size: small;"><i>Recuento y aislamiento. Microscopía. Identificación</i></p>
--	--

**Figura 1.** Página de inicio

Desde la página de inicio puede accederse al Análisis microbiológico de muestras de orina y al Análisis de muestras ambientales. La barra de menú horizontal permite acceder igualmente a la Galería de imágenes y a los Vídeos. Imágenes de las pantallas de los distintos apartados se presentan en el Anexo I:

- Análisis microbiológico de muestras de orinas. Siembra por extensión en superficie (Figura 2)
- Recuento y aislamiento (Figura 3)
- Aislamiento e identificación de levaduras en muestras de suelo. Preparación de la muestra y diluciones decimales (Figura 4)
- Observación al microscopio. Tipos de tinciones (Figura 5)
- Identificación fenotípica (Figura 6)
- Lectura e interpretación de resultados (Figura 7)
- Galería de imágenes (Figura 8)
- Vídeos (Figura 9)

### ***Implementación de la práctica***

Las prácticas de aislamiento e identificación de levaduras a partir de muestras de orina y de muestras ambientales (suelo) se han implementado en las clases prácticas de laboratorio de las asignaturas Microbiología I y II del Grado en Farmacia y Métodos Biológicos de Análisis y Corrección y Biotecnología Ambiental de la Licenciatura en Ciencias Agrarias y Ambientales (aplicables a las futuras enseñanzas prácticas del Grado en Ciencias Agrarias y Ambientales).

La práctica se ha programado en 2 ó 4 sesiones, dependiendo del tipo de asignatura. En las asignaturas básicas de microbiología se han utilizado únicamente los módulos de la práctica dedicados al aislamiento y observación microscópica de levaduras mientras que en las asignaturas de contenidos más específicos se ha llevado a cabo la práctica completa. Al finalizar la última sesión se distribuyó entre los estudiantes una encuesta de percepciones y un cuestionario de evaluación de conocimientos sobre la experiencia práctica a los que contestaron de forma anónima.

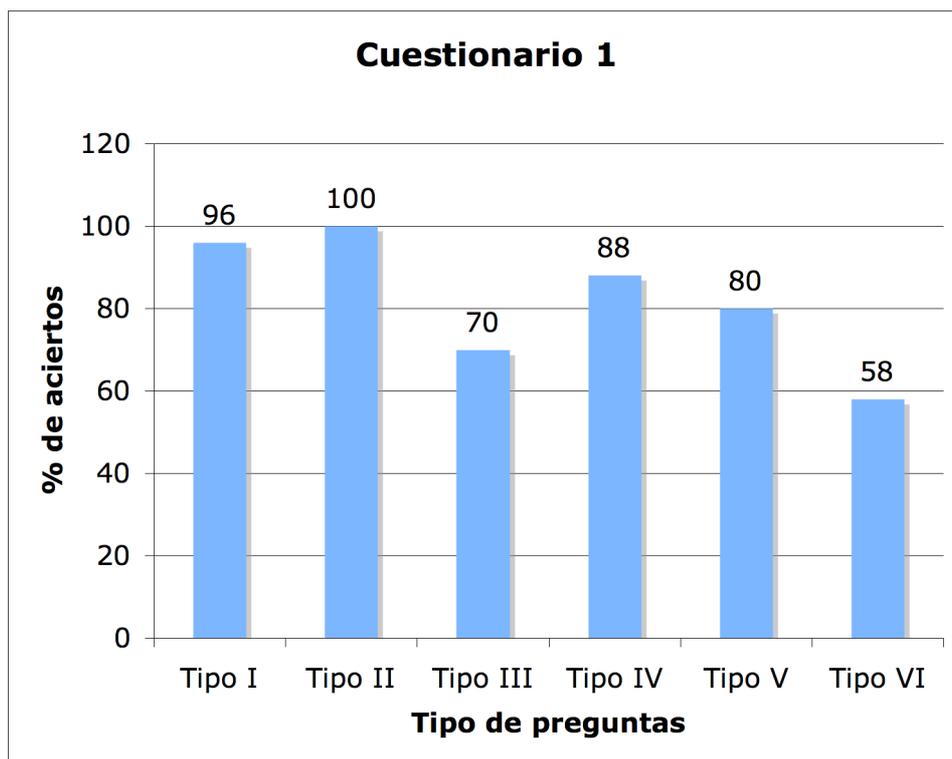
### ***Evaluación de la adquisición de conocimientos***

La evaluación de adquisición de competencias y conocimientos y el análisis de las percepciones de los estudiantes se realizó al finalizar las sesiones prácticas mediante un cuestionario al que los estudiantes respondieron de forma anónima.

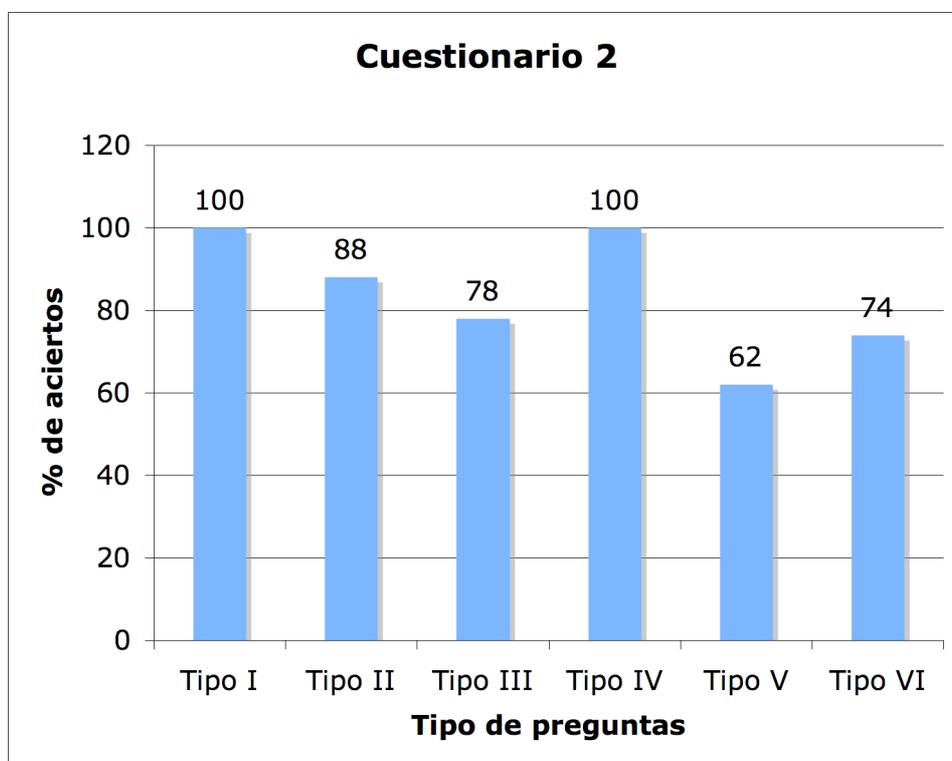
La primera parte del cuestionario constaba de 12 preguntas de respuesta múltiple de 6 tipos diferentes:

- Preguntas Tipo I sobre interpretación de imágenes de microscopio de levaduras
- Preguntas Tipo II sobre condiciones de cultivo de levaduras
- Preguntas Tipo III sobre cálculos de recuentos microbianos
- Preguntas Tipo IV sobre toma de decisiones acerca de la técnica de identificación
- Preguntas Tipo V sobre fundamentos teóricos de la técnica de identificación
- Preguntas Tipo VI sobre toma de decisiones acerca de la técnica microscópica

La nota media obtenida por los estudiantes de Microbiología II que realizaron la práctica de aislamiento e identificación de levaduras de muestras de orina obtuvieron una nota media de 7,8. Los estudiantes de Biotecnología Ambiental obtuvieron una nota media de Como se presenta en las figuras 10 y 11 el porcentaje de respuestas acertadas es alto. Las preguntas de los tipos I, II y IV sobre cuestiones prácticas son las que aciertan el mayor número de estudiantes. Las preguntas que conllevaban realización de cálculos y comprensión de fundamentos teóricos se fallaron más que el resto.



**Figura 10.** Porcentajes de preguntas acertadas en el cuestionario por los alumnos de la Facultad de Farmacia (asignatura **Microbiología II**)

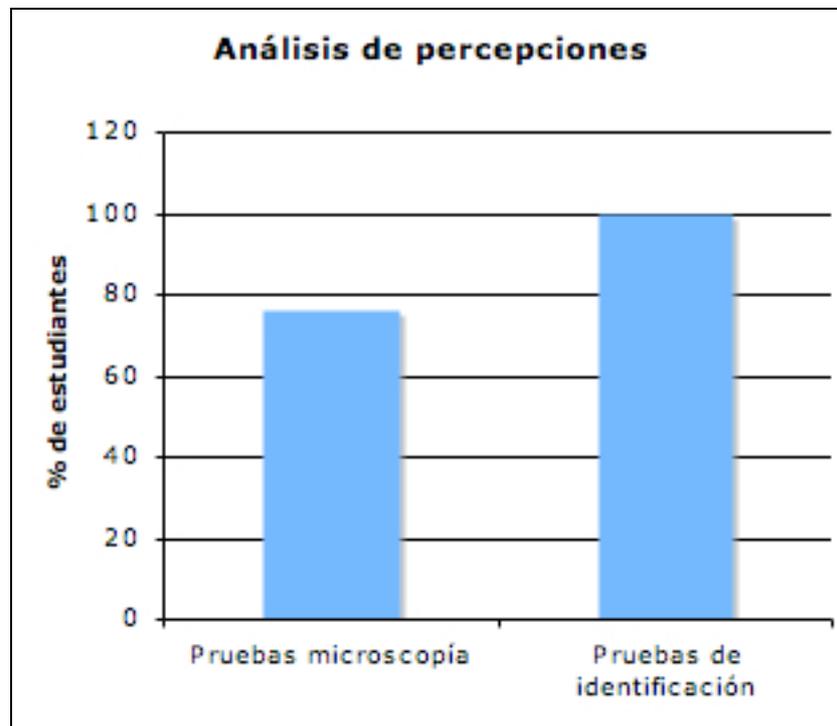


**Figura 11.** Porcentajes de preguntas acertadas en el cuestionario por los alumnos de la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales (asignatura **Biología Ambiental**)

## **Análisis de percepciones**

En la segunda parte del cuestionario se incluían 6 preguntas (del tipo SI, NO, No sabe/No contesta) para conocer las percepciones de los estudiantes acerca de su capacidad de interpretar los resultados de las técnicas utilizadas en la práctica realizada.

Como se observa en la figura 12, el 100% de los estudiantes encuestados se sienten capaces de interpretar las pruebas de identificación de levaduras y un porcentaje menor, el 76% de los estudiantes, se sienten capaces de interpretar imágenes de levaduras de gemación al microscopio aunque, como se observa en los resultados de los cuestionarios de evaluación, las preguntas de Tipo I en las que hay que interpretar imágenes de microscopio son contestadas correctamente por prácticamente el 100% del conjunto de estudiantes (96% y 100%)



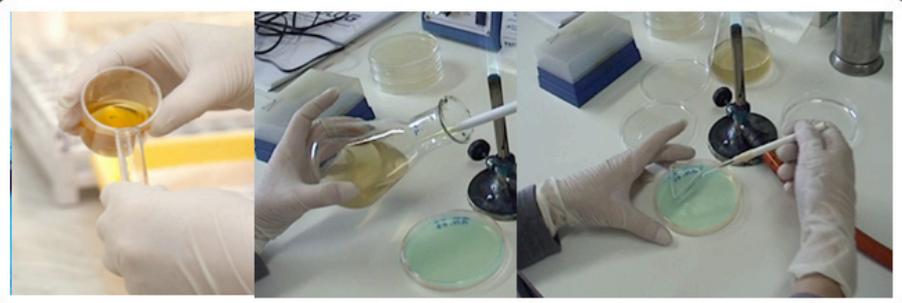
**Figura 12.** Porcentaje de estudiantes que consideran haber adquirido la capacidad de interpretar los resultados de las diferentes pruebas.

## ANEXO 1

Home M. Orina M. Ambientales

### Análisis Microbiológico de orina

**1** Muestra. Siembra extensión en superficie



**PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**  
Hacer una dilución 1/50 de la muestra de orina.  
Para ello depositar 0,5 mL de orina en un matraz que contiene 24,5 mL de diluyente estéril.  
Sembrar 0,1 mL de la dilución 1/50 en Agar CLED y en Agar Sangre por la técnica de siembra en superficie.

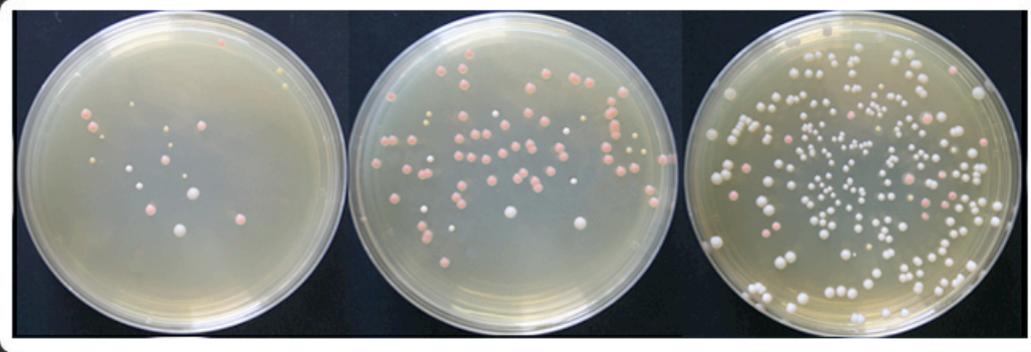
Agar CLED. Agar Cistina Lactosa Deficiente en Electrolitos. Este agar se utiliza porque permite el crecimiento de la mayoría de los patógenos urinarios y evita el crecimiento invasivo de *Proteus*.

Agar Sangre: Es un agar que permite el crecimiento de microorganismos difíciles (*Staphylococcus* y *Streptococcus*) que no son capaces de crecer en otros medios como el agar CLED).

**Figura 2.** Análisis microbiológico de muestras de orinas. Siembra por extensión en superficie

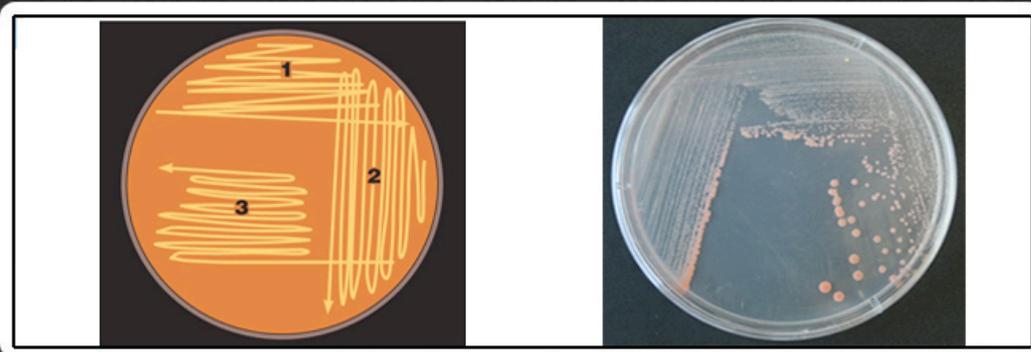
### 3

## Recuento y aislamiento



### RECuento

- Seleccionar las placas de la dilución donde hayan crecido entre 20 y 200 colonias por placa. Realizar el recuento de las colonias crecidas y calcular la media.
  - Calcular las unidades formadoras de colonia (ufc) en 1 gramo de la muestra de suelo original teniendo en cuenta la cantidad sembrada en cada placa y la dilución de la muestra sembrada.
- Cálculos: El número de ufc/g de muestra es igual a la media del número de colonias por el factor de dilución (Inverso de la dilución) y por 10.



### AIslAMIENTO

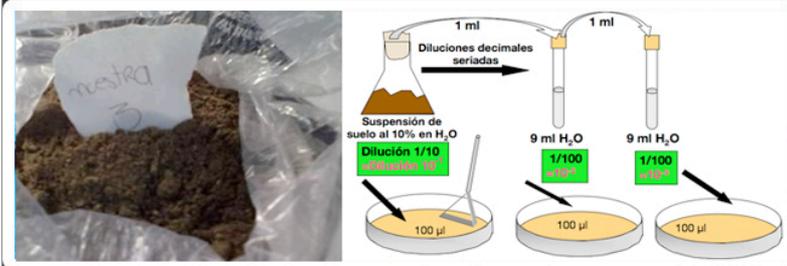
Una vez realizado el recuento de las colonias que crecen en Sabouraud Cloranfenicol realizamos el aislamiento en cultivo puro mediante la técnica de siembra por agotamiento en estría de diferentes colonias e Incubamos a 28°C durante 24-48 h.

**Figura 3.** Recuento y aislamiento

## Aislamiento e identificación de levaduras en una muestra de suelo

1

### Preparación de la muestra y diluciones decimales



#### PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES A PARTIR DE LA MUESTRA DE SUELO

- Dilución madre ( $10^{-1}$ ): Pesar en condiciones asepticas 10 g de suelo en bolsa de Stomacher y resuspender en 90 mL de agua de peptona estéril. Agitar durante 60 segundos a velocidad máxima.

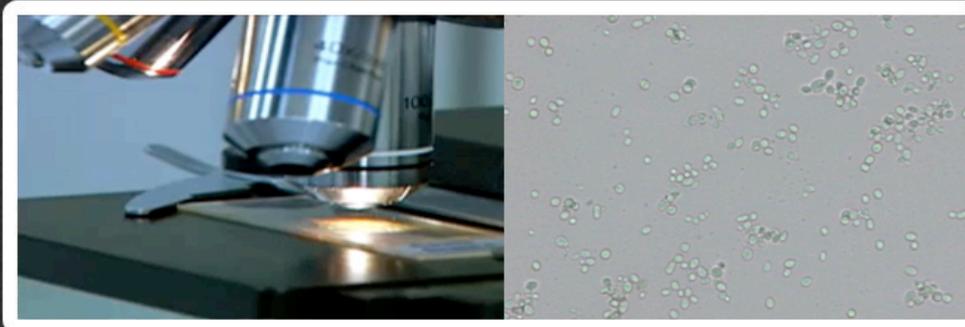
- Diluciones seriadas: Transferir 1 mL de la dilución madre a 9 mL de agua de peptona estéril ( $10^{-2}$ ) Agitar en Vortex 15 segundos.

Transferir 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  a 9 mL de agua de peptona estéril ( $10^{-3}$ ) Agitar en Vortex 15 segundos.

**Figura 4.** Aislamiento e identificación de levaduras en muestras de suelo. Preparación de la muestra y diluciones decimales

4

### Observación al microscopio



#### OBSERVACION EN FRESCO

Depositar una gota de agua estéril en un porta. Extender una colonia de levadura con asa de siembra y fijar a la llama. Cubrir la preparación con un cubre y observar al microscopio con el objetivo 40x

#### TINCIÓN SIMPLE

Depositar una gota de agua estéril en un porta. Extender una colonia de levadura con asa de siembra y fijar a la llama. Añadir una gota de azul de metileno y tñir durante 1 minuto. Lavar la preparación con alcohol de 96° y posteriormente con agua. Dejar secar y observar al microscopio con el objetivo 40x. Añadir aceite de Inmersión y observar con el objetivo 100x

#### TINCIÓN NEGATIVA

Depositar una gota de nigrosina en un porta. Extender una colonia de levadura con asa de siembra y fijar a la llama. Dejar secar y observar al microscopio con el objetivo 40x. Añadir aceite de inmersión y observar con el objetivo 100x

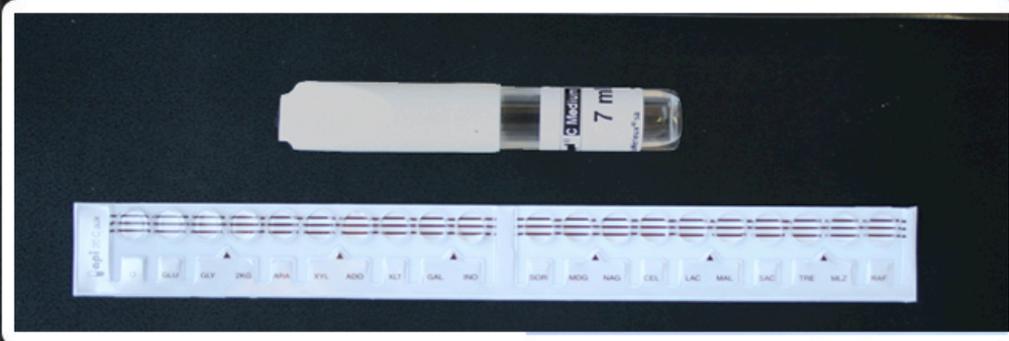
#### TINCIÓN DE GRAM

Depositar una gota de agua estéril en un porta. Extender una colonia de levadura con asa de siembra y fijar a la llama. Seguir el protocolo de la tinción de Gram con Cristal Violeta (2 minutos), Lugol (1 minuto), lavado con alcohol de 96° (1 minuto) y Safranina (1 minuto). Dejar secar y observar al microscopio con el objetivo 40x. Añadir aceite de inmersión y observar con el objetivo 100x

**Figura 5.** Observación al microscopio. Tipos de tinciones

## 4

### Identificación fenotípica con Galería API 20C AUX



#### **GALERÍA API 20 C AUX.**

A partir de una colonia crecida en agar Sabouraud. Inocular una galería API 20C AUX.

La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente.

Permite identificar un total de 34 especies diferentes.

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático

## 5

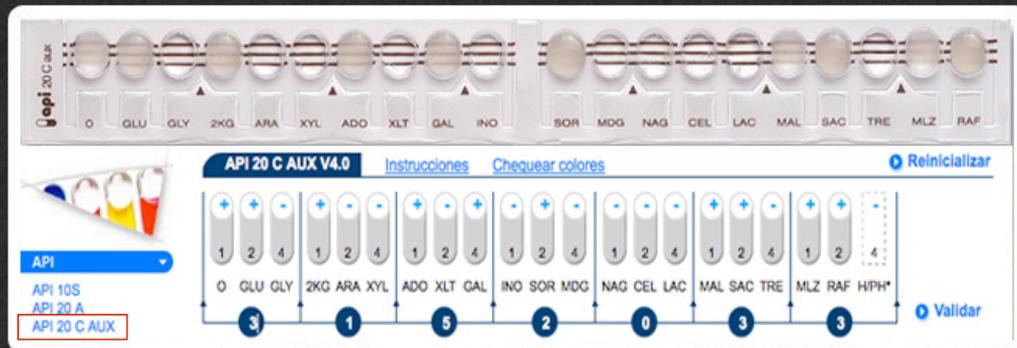
### Galería API 20C AUX. Procedimiento



**Figura 6.** Identificación fenotípica

### LECTURA E INTERPRETACIÓN.

Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados.



### INTERPRETACIÓN DE LOS TRIPLETES.

En la hoja de resultados, los diferentes nutrientes están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno, en caso de ser positivo, un valor diferente: 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar.

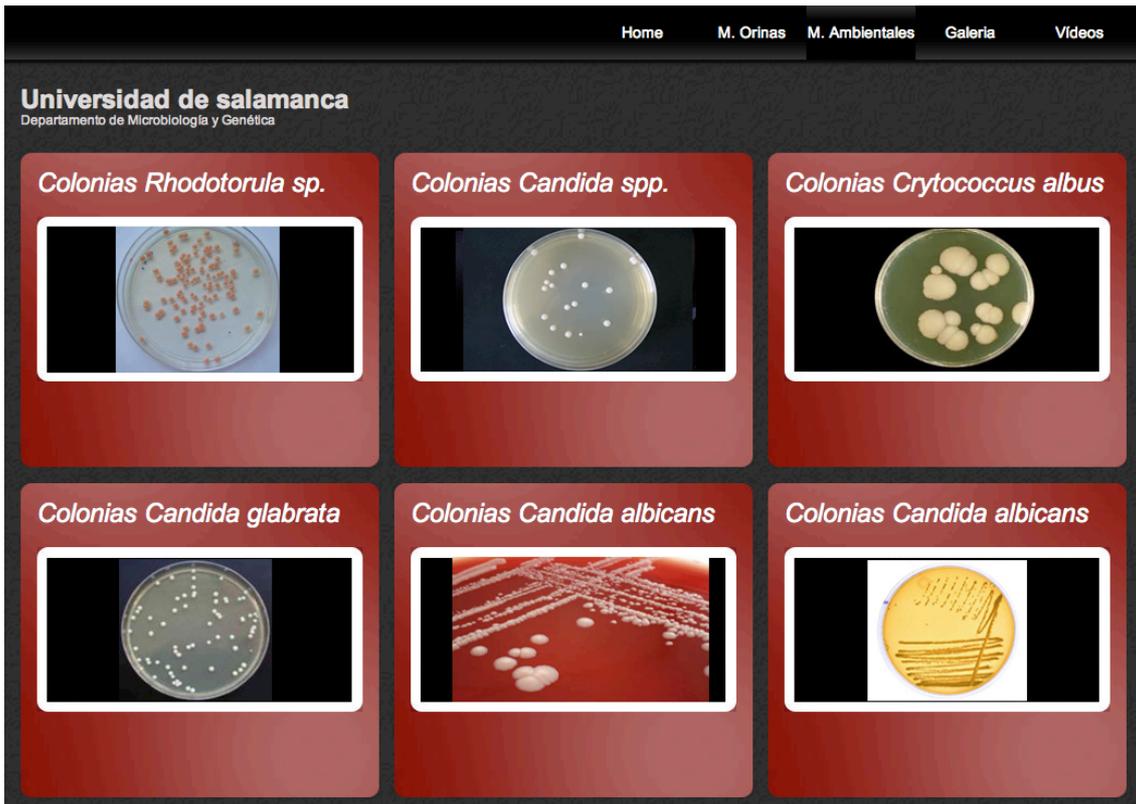
Sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico.

PERFIL DUDOSO			
Galería	API 20 C AUX V4.0		
Perfil	3 1 5 2 0 3 3		
Nota	Rhodotorula:PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA		
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Rhodotorula glutinis	99.9	0.3	0 0% ADO 8%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Rhodotorula mucilaginosa 2	0.1	0.0	0 0% 2KG 1% ARA 80% XYL 80% TRE 95%

### IDENTIFICACIÓN

La identificación debe hacerse mediante el Catálogo Analítico o el Programa Informático de Identificación suministrado por el fabricante.

**Figura 7.** Lectura e interpretación de resultados



**Figura 8.** Galería de imágenes

## Videos

### Siembra por extensión en superficie



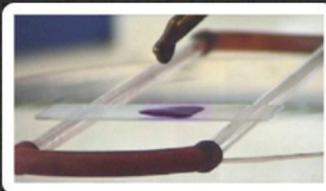
VER VIDEO. Depositar sobre la superficie de una placa con agar nutritivo una gota ó 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo de microorganismos problema y extenderlo con ayuda del asa de Drigalsky, previamente esterilizada, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco. Incubar la placa, en posición invertida, a la temperatura deseada (durante 24, 48 ó 72 horas) según el tipo de microorganismo. La posición invertida evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas.

### Siembra en estría



VER VIDEO. Con un asa de siembra, previamente esterilizada, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la placa con agar nutritivo, en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se esteriliza el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, esterilizando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Se lleva la placa a incubar, a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida.

### Tinción de Gram



VER VIDEO. Con el asa de siembra, previamente flameada, tomar un poco de muestra. En una lámina portaobjetos hacer el extendido en espiral. Dejar secar a temperatura ambiente. Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor. Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 min. Quitar el exceso de colorante. Todas las células gram positivas y gram negativas se tñen de color azul-púrpura. Agregar lugol y esperar entre 1 minuto. Agregar acetona y/o alcohol 96° y esperar unos segundos (parte crítica de la coloración). Enjuagar con agua. Tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica y esperar 1-2 min. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas. Enjuagar con agua y dejar secar. Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

### Procedimiento Galería API 20C AUX



VER VIDEO. A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland. Transferir 100 µl (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar evitando la formación de burbujas. Llenar las cúpulas con la suspensión anterior evitando la formación de burbujas y creando un nivel horizontal para generar resultados correctos. Incubar a 28-30 °C durante 48-72 h. Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados.

**Figura 9.** Vídeos demostrativos de las diferentes técnicas utilizadas.