

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

MEMORIA DE RESULTADOS

Título del Proyecto

**Elaboración de videotutoriales para la enseñanza/aprendizaje de la
identificación de bacterias acéticas presentes en productos probióticos
mediante el análisis de ácidos nucleicos y proteínas**

Referencia

ID2017/143

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, Lorena Celador
Lera, José Manuel González Buitrago, Fernando Sánchez Juanes**

Introducción

En las Ciencias experimentales la adquisición de conocimientos por parte de los alumnos va necesariamente ligada a la de destrezas manuales por lo que la realización de prácticas de laboratorio es imprescindible en el proceso de enseñanza-aprendizaje de estas Ciencias.

Actualmente, existen un gran número de técnicas experimentales cuya realización es muy compleja y que contienen fases que no se pueden llevar a cabo en el laboratorio de prácticas. Este es el caso, por ejemplo, del MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry) y de la secuenciación de ácidos nucleicos, dos técnicas complementarias para la identificación de microorganismos.

El MALDI-TOF MS y la secuenciación de ácidos nucleicos son técnicas que permiten la identificación de microorganismos, pero precisan de unas instalaciones y un equipamiento actualmente imposibles de implementar en un laboratorio de prácticas debido a su costo y, además, han de ser manejados por personal especializado.

En ambos casos hay partes del proceso que pueden ser llevadas a cabo en laboratorios de prácticas, como son la extracción de proteínas y la extracción y purificación de ácidos nucleicos, pero el resto del proceso ha de ser llevado a cabo en servicios especializados.

Por lo tanto, para que los alumnos puedan adquirir, tanto las destrezas manuales correspondientes a la parte de ambas técnicas que ellos pueden llevar a cabo en el laboratorio, como los conocimientos globales sobre el proceso completo de identificación, es necesario disponer de herramientas que faciliten la enseñanza-aprendizaje de este proceso.

Una de las herramientas fundamentales para esta finalidad son los tutoriales en los que se graba en vídeo la práctica para ser visualizada antes de su realización en el laboratorio, y que se pueden subir a plataformas que permiten a los alumnos acceder a ellos tantas veces como deseen sin necesidad de estar en el laboratorio.

Estos video-tutoriales son muy útiles en las prácticas de las asignaturas que requieren el manejo de microorganismos, como es el caso de la Biotecnología Farmacéutica, ya que permiten a los alumnos observar la forma correcta de manipularlos y aprender diferentes técnicas básicas para su identificación.

En este proyecto hemos planteado la enseñanza-aprendizaje de dos técnicas complementarias de identificación porque, aunque el MALDI-TOF MS permite la identificación de cualquier bacteria, algunos grupos de bacterias están escasamente representados en su base de datos Biotyper, y hay que completar la identificación con la secuenciación del gen ribosómico 16S, accesible en bases de datos públicas para todas las especies de bacterias.

Uno de los grupos escasamente representados en la base Biotyper es el de las bacterias acéticas, que están presentes en alimentos funcionales como el kefir. Por lo tanto, nos planteamos incluir en la enseñanza de la asignatura de Biotecnología Farmacéutica del Grado en Farmacia una práctica de identificación de las bacterias acéticas aisladas a partir de kefir comercial utilizando MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S.

Parte de esta práctica, concretamente el aislamiento de las bacterias a partir de kefir, se implementó como práctica de laboratorio y el resto del proceso de identificación se

grabó en forma de video-tutorial que se mostró a los alumnos en el laboratorio de clases prácticas. Los resultados de la identificación de las bacterias acéticas aisladas a partir de kefir se explicaron a los alumnos en el laboratorio después de la visualización del video-tutorial del proceso completo. En el caso del MALDI-TOF MS su propio sistema muestra las especies más próximas y unos valores de similitud que nos indican la fiabilidad de la identificación, y en el caso de la secuenciación del gen ribosómico 16S el usuario recibe una secuencia que ha de ser analizada en bases de datos externas.

Una vez que los alumnos habían visualizado el proceso de identificación completo y el modo en que se analizaban los resultados de ambas técnicas en el video-tutorial, se diseñó un seminario virtual sobre el contenido del mismo a través de la plataforma Studium, junto con una serie de esquemas y vídeos del proceso completo de identificación y unas preguntas que los alumnos debían contestar sobre cada parte de dicho proceso.

Metodología aplicada

Se grabó en video el proceso completo de identificación mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S de las bacterias aisladas a partir de kefir comercial. Estas bacterias se aislaron en un medio comúnmente utilizado para el aislamiento de bacterias acéticas.

Para llevar a cabo MALDI-TOF MS las colonias aisladas se resuspendieron 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. 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.

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 6 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 gen ribosómico 16S en todas las bacterias y una mezcla comercial que contiene la DNA polimerasa (Taq) y los nucleótidos. Una vez finalizada la PCR, que se llevó a cabo utilizando los ciclos adecuados para amplificar el gen ribosómico 16S, 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. Para ello se utiliza este DNA molde y

una serie de primers universales para la secuenciación de este gen y se lleva a cabo otra PCR utilizando nucleótidos marcados con fluorocromos de diferentes colores lo que permite la lectura automática por una cámara CDC incorporada en el secuenciador automático.

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 elaborado un tutorial en video digital sobre la identificación de bacterias acéticas aisladas a partir de un alimento probiótico, el kefir, utilizando MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S que incluye:

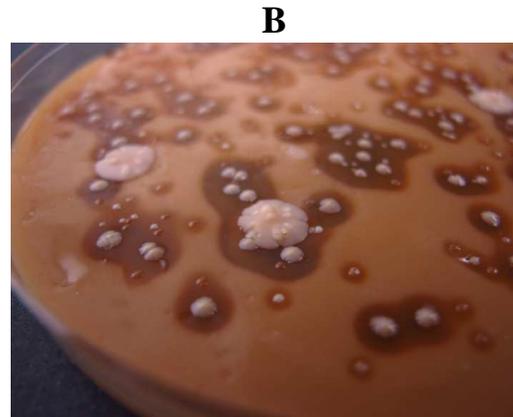
- El aislamiento de los microorganismos en medio adecuado para bacterias acéticas y la preparación de las muestras para cada uno de los dos análisis.
- El análisis mediante MALDI-TOF MS, que nos permitió la identificación de algunas de las cepas aisladas.
- La amplificación, secuenciación y análisis del gen ribosómico 16S, que nos permitió completar la identificación de todas las cepas aisladas.

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

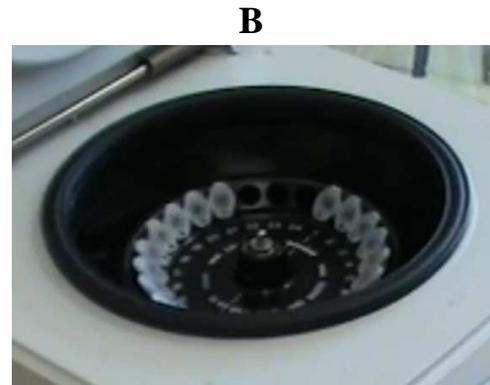
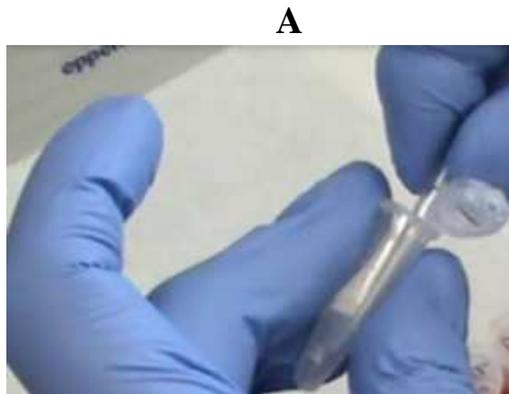
- En las prácticas en laboratorio real se ha llevado a cabo la primera fase del proceso que consiste en el aislamiento de las colonias de las bacterias acéticas a partir del kefir después de ser visualizados otros video-tutoriales, que se han realizado en el transcurso de varios proyectos de innovación docente previos, en los que los alumnos aprenden a realizar diluciones decimales seriadas y el aislamiento de bacterias presentes en alimentos probióticos.
- Posteriormente, a los alumnos se les ha mostrado el video-tutorial completo, que se grabó utilizando las colonias aisladas por ellos en el laboratorio y finalmente les ha mostrado el video-tutorial completo explicándoles los resultados obtenidos utilizando MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S.
- Finalmente, se ha diseñado un seminario virtual sobre la identificación de bacterias acéticas utilizando las dos metodologías a través de la plataforma Studium, incluyendo una serie de esquemas y vídeos junto con preguntas que los alumnos debían contestar sobre cada parte del proceso de identificación.

A continuación se exponen los puntos básicos del video-tutorial correspondientes a la identificación mediante MALDI-TOF mediante capturas de pantalla del mismo.

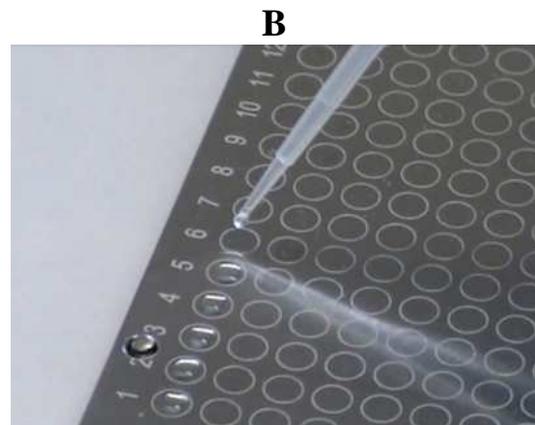
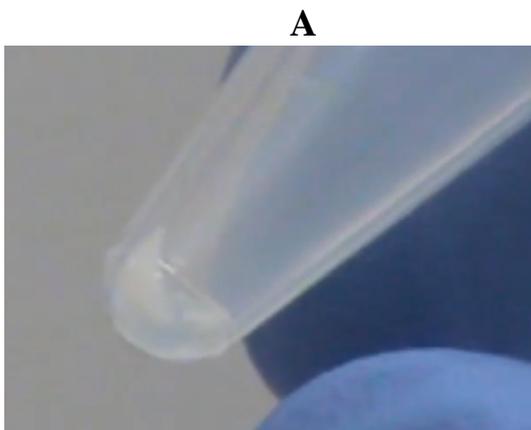
1. Para aislar las bacterias se utilizó un kefir comercial (A). Después de realizar diluciones decimales seriadas del kefir hasta 10^{-3} , a partir de cada una de las diluciones placas se inocularon las placas de un medio utilizado comúnmente para el aislamiento de bacterias acéticas y se aislaron colonias de diferente morfología macroscópica para llevar a cabo la identificación (B).



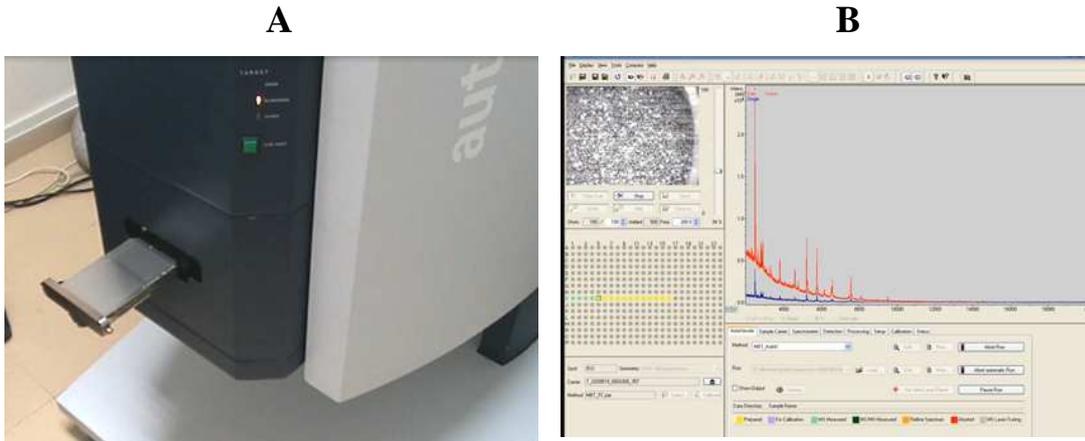
2. Las colonias se pasaron a tubos eppendorff, se resuspendieron en agua MiliQ estéril para proceder a la extracción de las proteínas (A) y se centrifugaron (B).



3. 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).



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



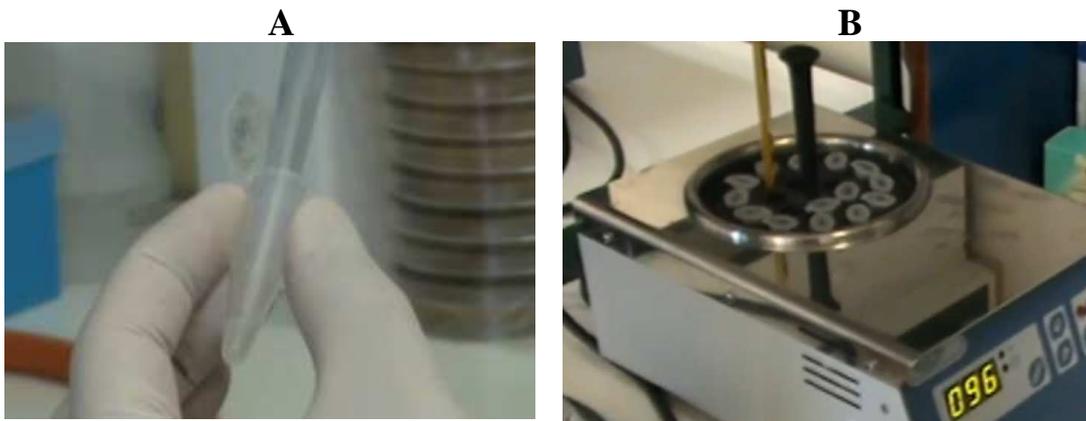
5. Después de comparar los espectros de cada cepa con los depositados en la base de datos Biotyper, se ofrecen los resultados marcados en verde para valores superiores a 2.0.

Identificador	Etiqueta	Identificación	Valor 1	Identificación	Valor 2
B20 (-)(C)	KA 10	identificación poco fiable	1.418	identificación poco fiable	1.366
B21 (++)(A)	KA 11	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.388	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.359
B22 (++)(A)	KA 11	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.398	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.35
B23 (-)(C)	KA 12	identificación poco fiable	1.27	identificación poco fiable	1.257
B24 (-)(C)	KA 12	identificación poco fiable	1.266	identificación poco fiable	1.261
B3 (-)(C)	KA 2	identificación poco fiable	1.268	identificación poco fiable	1.239
B4 (-)(C)	KA 2	identificación poco fiable	1.233	identificación poco fiable	1.214
B5 ++)(A)	KA 3	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.148	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.147
B6 (++)(A)	KA 3	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.501	<i>Gluconobacter oxydans</i>	2.462
B7 (-)(C)	KA 4	identificación poco fiable	1.247	identificación poco fiable	1.185
B8 (-)(C)	KA 4	identificación poco fiable	1.255	identificación poco fiable	1.214
B9 (-)(C)	KA 5	identificación poco fiable	1.194	identificación poco fiable	1.189

Los resultados de la identificación mediante MALDI-TOF mostraron que en el kefir están presentes bacterias acéticas y que algunas de las cepas aisladas pertenecían a la especie *Gluconobacter oxydans*, pero otras no se pudieron identificar. Estas otras cepas fueron identificadas mediante el análisis del gen ribosómico 16S.

A continuación se exponen los puntos básicos del video-tutorial correspondientes a la identificación mediante secuenciación del gen ribosómico 16S mediante capturas de pantalla del mismo.

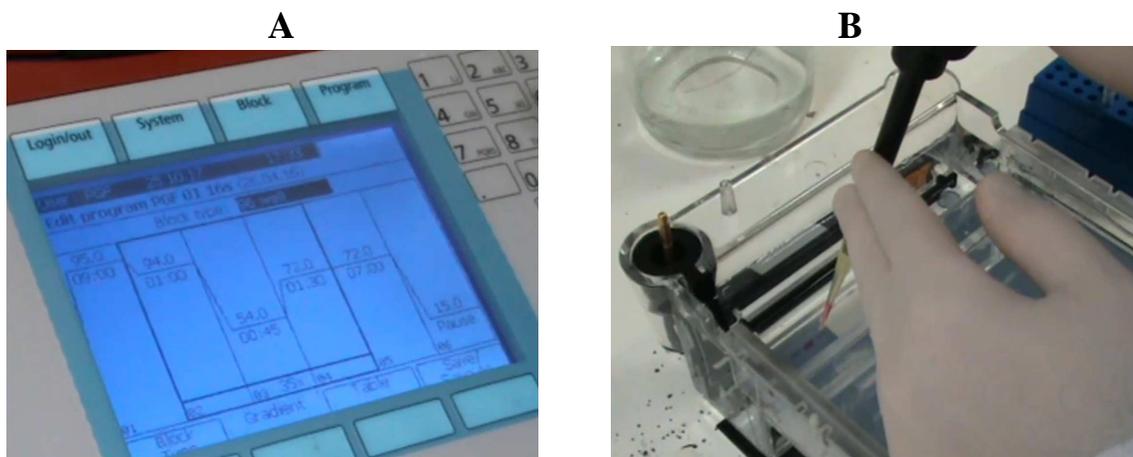
6. Para la extracción del DNA las células de las cepas se resuspendieron en 100 μ l de NaOH 0,05M (A) y la suspensión se mantuvieron 5 min en termoblock a 96°C (B).



7. Después de la lisis, el sobrenadante contiene el DNA total de las cepas (A) que se mezcla con la reacción de PCR (B)

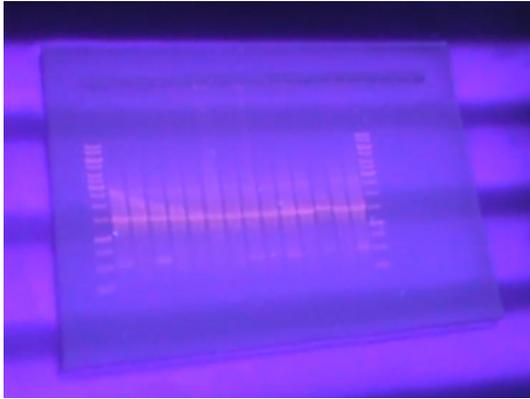


8. Después de llevar a cabo la PCR (A) se llevó a cabo la electroforesis de sus productos (B)



9. La banda correspondiente al gen ribosómico 16S (A) se cortó directamente del gel y se purificó antes de su secuenciación (B)

A



B

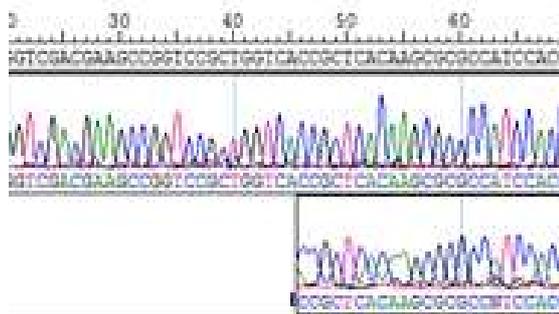


10. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático (A) cuyos resultados se obtienen como cromatogramas que se ensamblan utilizando programas informáticos (B).

A



B



Las secuencias de los genes correspondientes a las cepas que no se identificaron mediante MALDI-TOF MS se compararon frente a las depositadas en bases de datos públicas como el Genbank en cuya base de datos están almacenadas las secuencias de los genes ribosómicos 16S de todas las especies bacterianas, lo cuál convierte a la secuenciación de este gen a la herramienta más útil en la identificación de bacterias, pero no en la más rápida. En cuanto a la rapidez la aventaja el MALDI-TOF MS que, si bien para bacterias clínicas es la técnica hoy día más segura y rápida, tiene el inconveniente de que hay especies bacterianas que no están en su base de datos. Esto ocurre en el caso de las bacterias acéticas de las que sólo unas pocas especies están incluidas en la base Biotyper, mientras que las secuencias del gen ribosómico 16S están disponibles para todas las especies. En este caso, 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 una de las cepas que no se pudieron identificar por MALDI-TOF MS denominada KA 4, ya que la especie *Acetobacter orientalis* a la que pertenece esta cepa (similitud del 100%) no está incluida en la base de datos Biotyper utilizada para analizar los espectros obtenidos mediante MALDI-TOF MS.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acetobacter orientalis strain 21F-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2586	2586	100%	0.0	100%	NR_028825.1
Acetobacter orientalis strain NBRC_16606 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	98%	0.0	99%	NR_113852.1
Acetobacter cibinongensis strain NBRC_16605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2473	2473	98%	0.0	99%	NR_113851.1
Acetobacter cibinongensis strain 4H-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2468	2468	98%	0.0	99%	NR_024771.1
Acetobacter tropicalis strain Ni-6b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2459	2459	100%	0.0	98%	NR_112098.1
Acetobacter tropicalis strain Ni-6b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2457	2457	100%	0.0	98%	NR_036881.1
Acetobacter orleanensis strain NBRC_13752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2453	2453	100%	0.0	98%	NR_028614.1
Acetobacter indonesiensis strain 5H-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	100%	0.0	98%	NR_028616.1
Acetobacter cerevisiae strain JCM_17273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	98%	0.0	99%	NR_113552.1
Acetobacter cerevisiae strain LMG_1625 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	98%	0.0	99%	NR_026512.1
Acetobacter tropicalis strain NBRC_16470 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2440	2440	98%	0.0	99%	NR_113551.1

El video-tutorial completo se mostró a los alumnos en el laboratorio de prácticas y se subió a la plataforma Studium. Finalmente, se diseñó un seminario virtual utilizando la aplicación de Moodle para el diseño de seminarios autoevaluables con características interactivas y videos didácticos que se subió también a la plataforma Studium, desde donde los alumnos pueden realizar un test, que permitió la evaluación de los conocimientos adquiridos.

12. En la imagen se presenta la primera pantalla en la que se le indica al alumno cómo proceder para realizar el seminario virtual.

Identificación de bacterias acéticas presentes en productos probióticos mediante el análisis de ácidos nucleicos y proteínas

Personalizar | Editar | Informes | Calificar ensayos

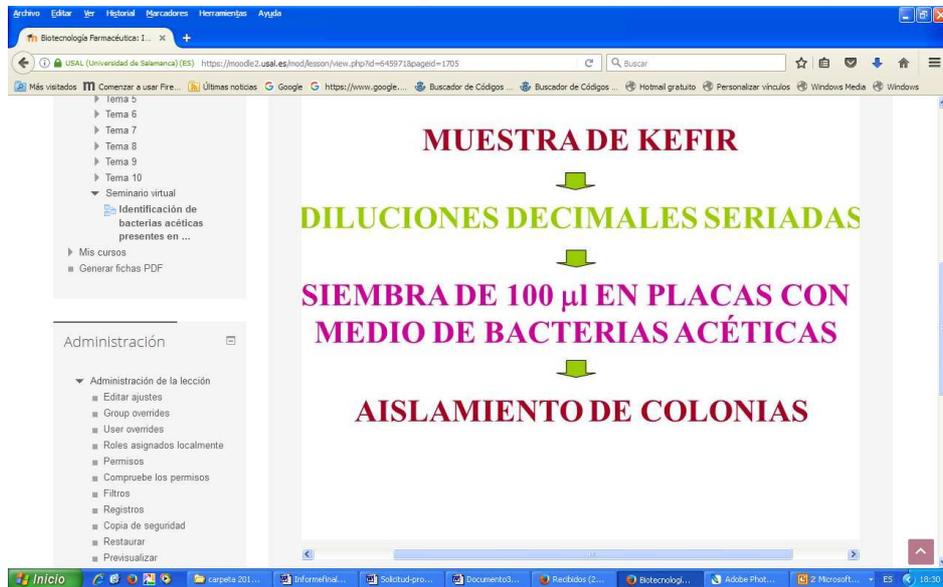
Contenido

Esquema 1

MUESTRA DE KEFIR

A partir de este momento se ofrecen al alumno 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 el alumno debe responder una serie de preguntas sobre cada paso del proceso de identificación siguiendo dichos esquemas, que se exponen a continuación:

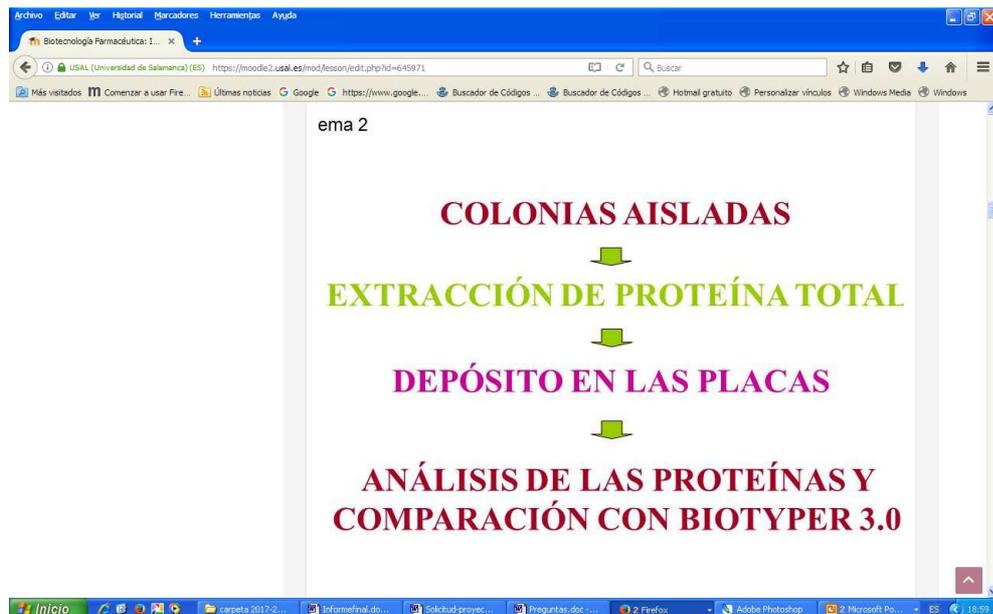
13. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 1



Pregunta del esquema 1

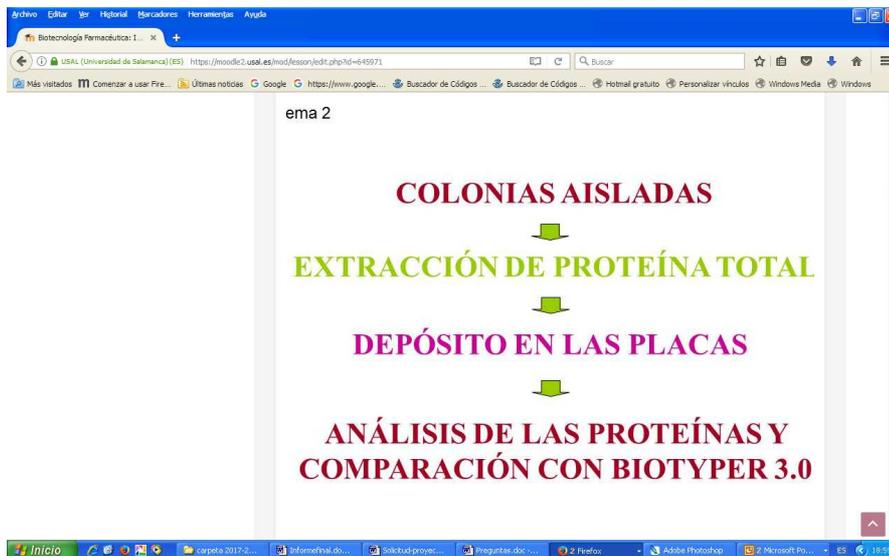
1. El kefir es un alimento que contiene: a) bacterias lácticas b) bacterias acéticas c) levaduras d) todas son correctas.

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



Preguntas del esquema 2

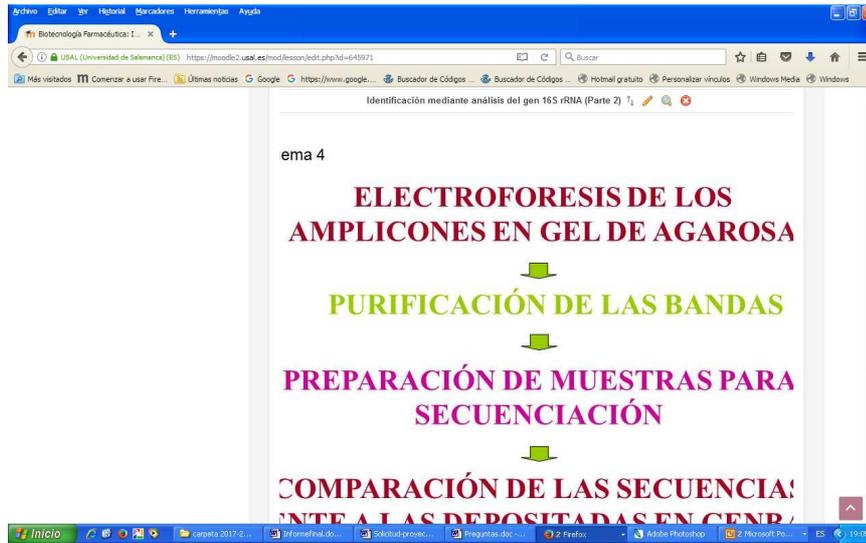
1. El MALDI-TOF MS se basa en: a) la obtención de bandas de proteínas en un gel b) la obtención de espectros de proteínas mediante espectrometría de masas c) la obtención de secuencias de proteínas d) la valoración cuantitativa de proteínas totales mediante espectrometría UV
2. La identificación utilizando MALDI-TOF MS se basa en: a) la comparación de secuencias de proteínas frente a una base de datos b) la comparación de los espectros de proteínas de una muestra problema frente a los espectros de una base de datos (Biotyper) c) el cálculo de similitudes que se traducen a una puntuación numérica d) la b y la c son correctas
3. Los valores de similitud 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
4. Utilizando MALDI-TOF MS se han identificado en la muestra de kefir analizada la especie de bacterias acéticas: a) *Acetobacter aceti* b) *Acetobacter oeni* c) *Guconobacter oxydans* d) *Acetobacter pasteurianus*
15. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 3



Preguntas del esquema 3

1. El DNA se extrae habitualmente con soluciones: a) acuosas a pH ácido b) acuosas a pH neutro c) acuosas a pH básico d) orgánicas
2. La PCR permite: a) la amplificación de proteínas b) la amplificación de RNA c) la amplificación de DNA d) de todas ellas
3. La Taq polimerasa es una enzima que copia: a) DNA a DNA b) DNA a RNA c) RNA a DNA d) RNA a proteína.

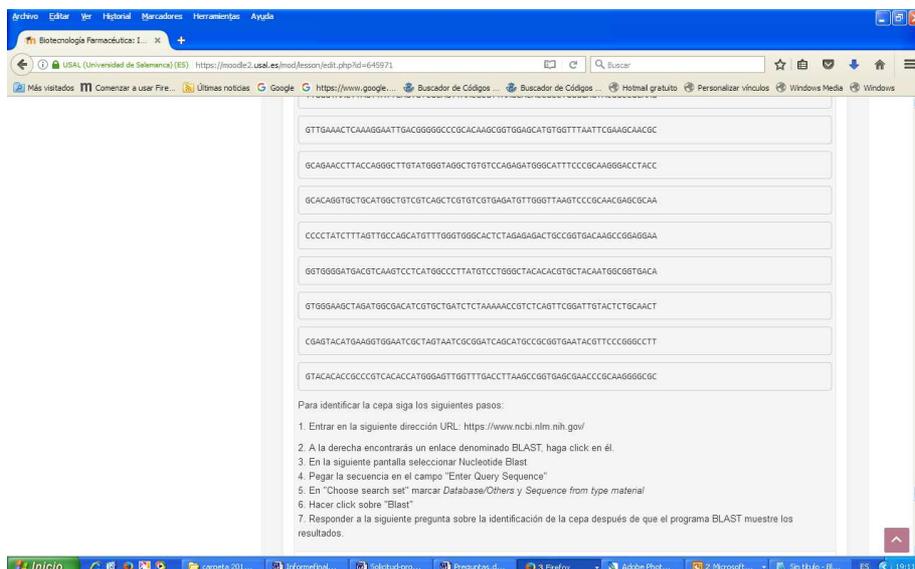
16. En la siguiente figura se muestra la pantalla en la que aparece el esquema 4



Preguntas del esquema 4

1. Los amplicones obtenidos tras la PCR: a) se separan mediante electroforesis horizontales b) se separan utilizando geles de agarosa c) se separan a voltajes de aproximadamente 6v/cm d) todas son correctas
2. Después de la electroforesis: a) el gen 16S rRNA corresponde a una banda en el gel b) las bandas se purifican mediante centrifugación utilizando columnas de purificación c) el producto purificado se utiliza para la secuenciación del gen d) todas son correctas
3. La secuencia obtenida tras la secuenciación del gen 16S de la cepa KA 4 corresponde a la especie: a) *Acetobacter pasteurianus* b) *Acetobacter orientalis* c) *Gluconobacter oxydans* d) *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Para poder responder a esta última pregunta se facilitó a los alumnos la secuencia del gen ribosómico 16S obtenido para la cepa KA 4 así como las instrucciones para analizar esta secuencia en el Genbank.



Una vez realizado el ejercicio de laboratorio virtual, las notas obtenidas por los alumnos se reflejan en la siguiente figura.

17. Porcentajes de notas situadas en diferentes rangos para los 59 alumnos que llevaron a cabo el seminario virtual



Como se puede observar en la figura, la mayor parte de los alumnos obtuvieron una nota entre 8 y 9 y fueron minoritarias las notas inferiores a 8. De acuerdo con estos resultados podemos concluir que el grado de comprensión del proceso de identificación mediante MALDI-TOF MS y secuenciación del gen ribosómico 16S fue muy elevado.