

**DISEÑO DE UN LABORATORIO VIRTUAL DE MICROBIOLOGÍA PARA UNA
FUTURA IMPLEMENTACIÓN EN ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE
ÁREAS AFINES**

**ANABEL MEJÍA DE CASTRO
LUISA MOLINA MOLINA**

ZAMIRA SOTO VARELA

VIII SEMESTRE

19 DE NOVIEMBRE 2021

RESUMEN

Los laboratorios virtuales representan un recurso eficiente y didáctico para la adquisición de conocimiento de manera remota; debido a la crisis mundial generada por el virus SARS-CoV-2, este recurso ha sido la alternativa más viable para complementar la enseñanza virtual de los estudiantes del área de ciencias. Sin embargo, los recursos que existen para esta finalidad son de las áreas de la Física y la Química, dejando en desventaja a la Biología y mucho más a la Microbiología. Este trabajo tiene como objetivo principal dar las pautas para el diseño de un laboratorio virtual de Microbiología para una futura implementación en estudiantes universitarios de áreas afines; para esto, se realizó la selección y revisión de los métodos y prácticas impartidas en la Universidad Simón Bolívar considerados los más relevantes, la comparación y modificación de los mismos con métodos actualizados y normalizados; y finalmente, la elaboración de los diagramas guía de cada práctica desde una perspectiva microbiológica y de la arquitectura del software de forma general. Se espera, que, a través de la realización de este proyecto, a largo plazo, se genere un impacto positivo en la educación universitaria, al facilitar y aumentar la dinámica de la enseñanza de los temas por parte de los profesores hacia los alumnos implicados.

PALABRAS CLAVES

Laboratorio virtual, Diseño, Protocolos, Microbiología

ABSTRACT

Virtual laboratories represent an efficient and didactic resource for the acquisition of knowledge remotely; Due to the global crisis generated by the SARS-CoV-2 virus, this resource has been the most viable alternative to complement the virtual teaching of science students. However, the resources that exist for this purpose are based on Physics and Chemistry, leaving Biology at a disadvantage and Microbiology much more. The main objective of this work is the design of a virtual microbiology laboratory for a future implementation in university students from related areas; For this, based on the review of the protocols used for face-to-face learning, a software will be designed with a virtual laboratory program that will be accessed by students and teachers from the community, which will contain the most relevant practices of this science. It is expected that through the realization of this project, in the long term, a positive impact will be generated in university education, by facilitating and increasing the dynamics of teaching the subjects by the professors towards the students involved.

KEYWORDS

Virtual laboratory, Design, Protocols, Microbiology.

INTRODUCCIÓN

Uno de los componentes más importantes en la enseñanza de las ciencias son las prácticas de laboratorio, ya que estas le permiten al aprendiz ganar la destreza y agilidad necesarias para la vida profesional y su ejercicio en el campo laboral. Es por esto, que las prácticas constituyen un espacio donde se aplica lo aprendido en la teoría y se obtiene habilidad en las técnicas estudiadas por medio de “ensayo error” (Quezada, 2019); a través de estas, las personas afianzan sus conocimientos, lo que les hace adquirir seguridad y mayor capacidad de enfrentarse ante cualquier circunstancia que se le pueda presentar en el campo laboral. Acorde a lo anterior, cuando se hace referencia a las prácticas de laboratorio como una forma de comprender la enseñanza de las ciencias, se hace alusión a que el estudiante puede construir saberes, apropiarse de formas de trabajo científico y desarrollar actitudes, habilidades y aptitudes propias del trabajo experimental (Álvarez & Gómez, 2017). En este proceso, la figura del profesor será la clave principal, pues actuará como guía al brindar las herramientas necesarias y corregir los posibles errores, facilitando así el aprendizaje; para que esto funcione de la manera correcta, los estudiantes deben tener un conocimiento previo de lo que se va a realizar, con la finalidad de afianzar la metodología descrita por el tutor (López Rua & Tamayo Alzate, 2012).

Por otro lado, la crisis en la que el mundo se encuentra desde el año pasado (2020), como resultado de la pandemia originada por la enfermedad causada por el virus SARS-CoV2, obligó desde sus inicios a toda la población a cambiar drásticamente y de forma muy repentina su rutina y “normalidad” (Núñez-Cortés, 2020). Una de las áreas más afectadas ha sido la educación, ya que durante todo este tiempo se suspendió por completo la asistencia presencial a las instituciones escolares y universitarias. Esto resulta desfavorable, especialmente para los estudiantes universitarios de ciencias, debido a que su asistencia de forma presencial es vital para el desarrollo de las diversas competencias que solo son adquiridas en la práctica.

Debido a las distintas medidas de bioseguridad recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y a que el distanciamiento social es necesario para la contención de la enfermedad; se ha hecho muy difícil e incluso, se ha vuelto riesgoso el retorno de los estudiantes a los laboratorios del campus universitario, retrasando así su proceso de formación. Por lo mencionado anteriormente, se hace

necesario el diseño y creación de nuevas estrategias de aprendizaje, donde a través de la tecnología y basándose en las metodologías convencionales, se mejora y se mitiga el impacto de la pandemia en el proceso educativo (Núñez-Cortés, Reussi, García Dieguez, & Falasco, 2020).

Por consiguiente, una de las alternativas viables actualmente, es el uso de laboratorios virtuales para el aprendizaje remoto; esta herramienta resulta útil para impartir el conocimiento, puesto que los estudiantes pueden repetir las prácticas las veces que sean necesarias para comprender la técnica e ir adquiriendo destreza a tal punto de llevarla a la realidad con grandes habilidades (Pardo, Martínez Vázquez, Luis, 2005); lo que resulta beneficioso, debido a que las personas tienen diferentes ritmos al momento de aprender (García & Morcillo, 2014). De la misma forma, esto permite que los alumnos lleguen a conocer las técnicas más avanzadas en las que se trabaja con equipos y materiales a los que, debido a su costo y mantenimiento no se tiene acceso en las instalaciones y laboratorios de la mayoría de las Universidades y centros de educación superior (Rivadulla Lorenzo, Martha, 2013).

No obstante, aunque hoy en día se pueden encontrar numerosos sitios web y aplicaciones con laboratorios, estos son principalmente en ciencias como la Física y la Química; pero la oferta disminuye en relación a la Biología y mucho más en el área de Microbiología; por lo tanto, son muy escasas las opciones con las que cuentan los estudiantes de pregrado de la facultad de microbiología, para poder adelantar y reforzar el contenido práctico, debido a que la mayoría de plataformas contienen prácticas muy básicas, generales y se enfocan más que todo en la parte clínica. Cabe resaltar, que existen programas dirigidos a la enseñanza de esta disciplina, pero están orientados principalmente a la educación primaria y secundaria, y la interacción es limitada; es decir, el estudiante solo puede ver el proceso sin participar activamente en él (García & Morcillo, 2014). Además, estas herramientas de ayuda se encuentran en su mayoría diseñadas en el idioma inglés, lo que dificulta su uso en la población estudiantil que no maneja el idioma y está empezando a aprender las bases de este.

Este trabajo tuvo como objetivo dar las pautas desde la microbiología para el diseño de un software de laboratorio virtual de microbiología para una futura implementación en estudiantes universitarios, a través de la selección y revisión de los protocolos y prácticas impartidas en la Universidad Simón Bolívar considerados los más relevantes en esta área, su posterior comparación y modificación con métodos actualizados y normalizados; y finalmente, la elaboración de los diagramas guía de cada práctica y de la organización y arquitectura del software a nivel general.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las prácticas y protocolos relevantes en Microbiología

Para la identificación de las prácticas más relevantes en Microbiología que serán incluidas en el laboratorio virtual, fue necesario realizar una serie de encuestas en la Universidad Simón Bolívar para recolectar la información, estas se aplicaron durante el mes de agosto del 2021 a egresados, estudiantes de últimos semestres en la carrera de Microbiología (octavo semestre y practicantes) y a profesores del área pertinente. Las encuestas se llevaron a cabo de forma virtual por medio del uso de la herramienta *Formularios de Google*, las preguntas fueron abiertas, donde los encuestados colocaron las prácticas, técnicas o protocolos que consideran más importantes para un futuro profesional en microbiología. Luego, al tener los resultados de las encuestas estos fueron analizados y tabulados utilizando la herramienta *Microsoft office Excel 2013*, para así hallar las prácticas, técnicas y métodos con mayor frecuencia, de estos, se tomaron las primeras nueve (9), para la elaboración y revisión de los protocolos de las prácticas a incluir en el laboratorio virtual.

Al tener los protocolos previamente seleccionados para el desarrollo de las prácticas en el laboratorio virtual, se solicitaron a los docentes las guías que normalmente se utilizan para llevar a cabo las prácticas tanto básicas como las más avanzadas, identificadas como las más relevantes en las encuestas previamente realizadas.

Revisión, modificación de protocolos seleccionados

Luego de tener las guías de las prácticas suministradas por los docentes, se realizó una revisión de cada una y se compararon con los métodos estándar establecidos y actualizados como los métodos contenidos en el *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), la norma ISO 111 11133-1 (*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*) y el estándar método de la *American Public Health Association* (APHA), con el objetivo de afinar y detallar los protocolos que serán incluidos en el programa. Además, se combinaron técnicas en una sola práctica con el fin de optimizar su aprendizaje por parte de los estudiantes.

Las guías de las prácticas seleccionadas fueron evaluadas a partir de una serie de criterios (Objetivos definidos, materiales y equipos necesarios, medios de cultivo

recomendados y etapas del protocolo completas), los cuales fueron establecidos teniendo en cuenta los puntos clave o factores que influyen en una buena aplicación del protocolo descrito y un correcto aprendizaje por parte de los estudiantes; se buscaba determinar si la práctica evaluada cumplía (total/parcialmente) o incumplía cada criterio.

Elaboración del diseño general del software

Con los protocolos definidos para cada práctica, se realizaron los diagramas correspondientes en los cuales se especificó la arquitectura general, la ruta a seguir y las acciones a realizar por los usuarios en el software. Se elaboró el diagrama de casos de uso, el diagrama de distribución y un diagrama de estados para cada práctica, en los cuales se plasmaron los actores, escenarios, casos de uso o acciones realizadas por el usuario y la correcta función del software, con la finalidad de ejemplificar y crear documentos que sirvieran de guía para proceder con la programación e implementación del software. Se utilizó la herramienta online *Lucidchart* para realizar dichos esquemas, en los cuales se recrearon las acciones, los movimientos ejecutados por el usuario dentro del programa y los pasos a seguir en cada práctica.

RESULTADOS

Selección de las prácticas y protocolos relevantes en Microbiología

Se revisaron y analizaron los resultados obtenidos de las encuestas realizadas en la población estudiada ($n=30$), de las cuales 44% corresponden a estudiantes (37% estudiantes de octavo y 7% estudiantes en prácticas profesionales), 33% egresados y 23% a profesores de la facultad de Microbiología de la Universidad Simón Bolívar (Figura 1. a).

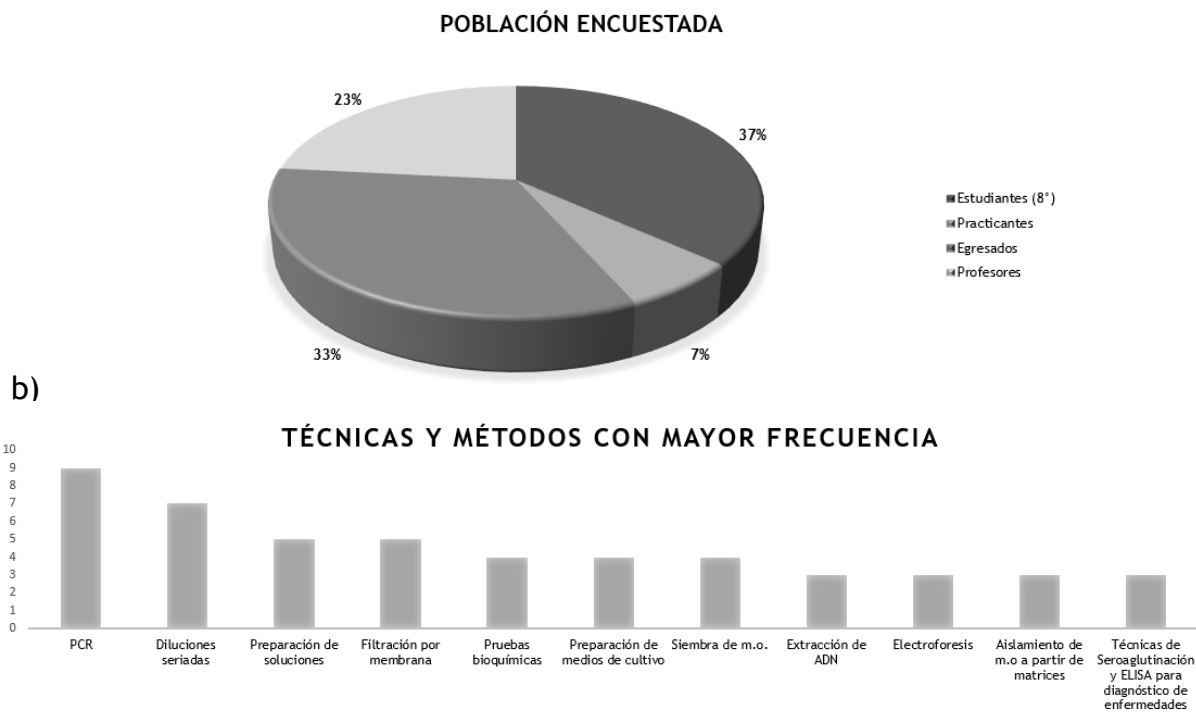


Figura 1. a) Gráfico con el tipo de población encuestada. b) Gráfico con las técnicas y métodos con mayor frecuencia de votación (m.o: microorganismos).

Los resultados de las encuestas mostraron que la técnica de PCR (9), las diluciones seriadas (7), la preparación de soluciones (5), la técnica de filtración por membrana (5), las pruebas bioquímicas (4), la preparación de medio de cultivo (4), la siembra de microorganismos (4), la extracción de ADN (3), la electroforesis (3), el aislamiento de microorganismos a partir de matrices (3) y las técnicas de Seroaglutinación y ELISA para diagnóstico de enfermedades (3), fueron los métodos, prácticas o técnicas que, según la población encuestada, resultan los más importantes para la formación de las bases necesarias en los estudiantes, que serán aplicadas en su futuro como microbiólogos (Fig. 1 b); el listado completo de votaciones se encuentra en el material suplementario.

Revisión y modificación de protocolos seleccionados

Al evaluar las prácticas a partir de los criterios establecidos, se encontró que la mayoría de las guías los cumplían a cabalidad. Sin embargo, se encontró que algunas prácticas cumplían medianamente ciertos criterios: en la práctica de

recuento en placa se observó que hacían falta materiales para su realización, el diluyente utilizado no era el recomendado por el *Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count* de la FDA y se agregó una etapa de control pipetas; también, en la práctica de filtración por membrana se evidenció que se utilizaban medios de cultivo que no eran los sugeridos por el *Bacteriological Analytical Manual Chapter 4 Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria* de la FDA (Tabla 1).

Práctica evaluada	Criterios evaluados				Método de referencia
	Objetivos definidos	Materiales y equipos necesarios	Medios de cultivo recomendados	Etapas del protocolo completas	
Recuento en placa	✓	✱	✓	✱	FDA, (2001). <i>Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count</i> .
Filtración por membrana	✓	✓	✱	✓	FDA, (2002). <i>Bacteriological Analytical Manual Chapter 4 Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria</i> .
Preparación de soluciones	-	-	-	-	-
Preparación y siembra de medios de cultivo	✓	✓	✓	✓	ISO/TS 11133-1:2009 (2009). <i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory</i> .
Detección por PCR de <i>Salmonella</i> sp. en agua	✓	✓	✓	✓	APHA/AWWA/WPCF, <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i> , 22th Edition. American public health
Pruebas bioquímicas	✓	✓	✓	✓	Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R. (1957). <i>Bergey's manual of determinative bacteriology</i> . Seventh Edition.

Tabla 1. Criterios evaluados en la revisión de las prácticas seleccionadas (✓): Cumple completamente; (✱): Cumple medianamente; (-): No aplica.

En base a los resultados obtenidos a partir de la comparación realizada con los protocolos estandarizados, se modificaron aquellas falencias detectadas (MS 2.). Por otro lado, al ser prácticas que serán incluidas en el software de un laboratorio virtual, se realizó la modificación en los objetivos de cada práctica (MS 2.),

especificando los conocimientos que el estudiante adquiere al ejecutarla, con la finalidad de que los objetivos aparezcan a manera de introducción en el programa.

Nombre de la práctica	Modificación realizada	Método de referencia
Recuento en placa	-Se cambió el diluyente utilizado. -Se agregaron más materiales y equipos recomendados. -Se incluyó en el procedimiento un paso para control de pipetas.	FDA, (2001). Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count.
Determinación de coliformes en agua por técnica de filtración por membrana	-Se cambiaron los medios de cultivo por los sugeridos.	FDA, (2002). Bacteriological Analytical Manual Chapter 4 Enumeration of <i>Escherichia coli</i> and the Coliform Bacteria.
Identificación de microorganismos por pruebas bioquímicas	-Se combinaron las técnicas de pruebas bioquímicas, preparación de medios de cultivo y siembra de microorganismos.	Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology. Seveth Edition. ISO/TS 11133-1:2009 (2009). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
Determinación de microorganismos por PCR a partir de agua y muestras de alimentos	-Se agregó una etapa de preparación de soluciones. -Se combinaron las prácticas “Detección por PCR de <i>Salmonella</i> sp. en agua” y “Determinación de <i>V. cholerae</i> por PCR a partir de muestras de alimentos”.	APHA/AWWA/WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition. American public health. FDA, (2020). Bacteriological Analytical Manual Chapter 9 Vibrio. FDA, (2020). Bacteriological Analytical Manual Chapter 28 Detection of Enterotoxigenic <i>Vibrio cholerae</i> in Foods by the Polymerase Chain Reaction.

Tabla 2. Modificaciones realizadas en los protocolos y prácticas seleccionadas para el contenido del laboratorio virtual.

Además, ya que uno de los objetivos que se pretende lograr con la futura implementación del software como herramienta educativa es optimizar el tiempo de aprendizaje por parte de los estudiantes, se elaboraron dos métodos combinando prácticas que se complementan entre sí (Tabla 2). Por un lado, el

método de identificación de microorganismos por pruebas bioquímicas incluye las prácticas de preparación y siembra de medios de cultivo y pruebas bioquímicas; mientras que a la práctica llamada “Detección por PCR de *Salmonella sp.* en agua”, se le agregó una fase con los ejercicios de preparación de soluciones y el protocolo de “Determinación de *V. cholerae* por PCR a partir de muestras de alimentos” para crear un solo método llamado “Determinación de microorganismos por PCR a partir de agua y muestras de alimentos”, el cual servirá para que el alumno consiga aprender el procedimiento de las técnicas de PCR y electroforesis a partir de dos matrices diferentes.

Elaboración del diseño general del software

En el diagrama de casos de uso se ilustraron las acciones específicas que cada usuario, denominado actor, puede realizar en el software VIMILAB (Virtual Microbiology Laboratory). Para poder acceder al programa primero se debe verificar que el usuario y contraseña se encuentren dentro del servidor de la Universidad Simón Bolívar (USB).

Si el usuario corresponde a un profesor, este logrará realizar acciones como: matricular a los alumnos de su clase, ver las prácticas contenidas en el software y habilitarlas o deshabilitarlas en formato entrenamiento o evaluación para los estudiantes matriculados; en el caso del formato evaluativo, podrá ajustar el tiempo correspondiente para la práctica y el número de intentos permitidos, además, verificará las puntuaciones obtenidas y tendrá acceso las estadísticas globales de las calificaciones del curso.

Por otra parte, si se trata de un estudiante, luego de ingresar al software, este podrá acceder a las prácticas habilitadas en modo entrenamiento y evaluativo; en el primero, el alumno realizará el paso a paso de cada una de estas cuantas veces sea necesario y en tiempo libre; mientras que, en formato evaluativo, dispondrá de un tiempo limitado para la ejecución de la práctica y al terminar podrá ver la puntuación obtenida (Fig. 2).

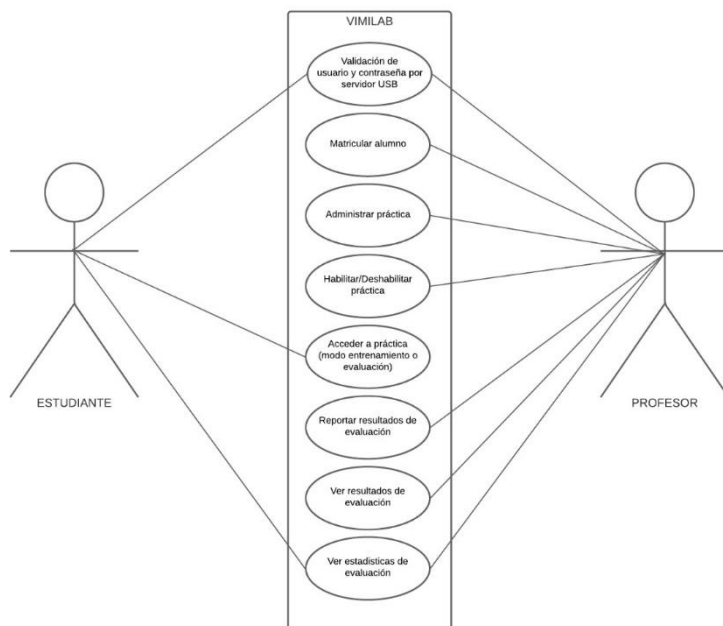


Figura 2. Diagrama de casos de uso del software.

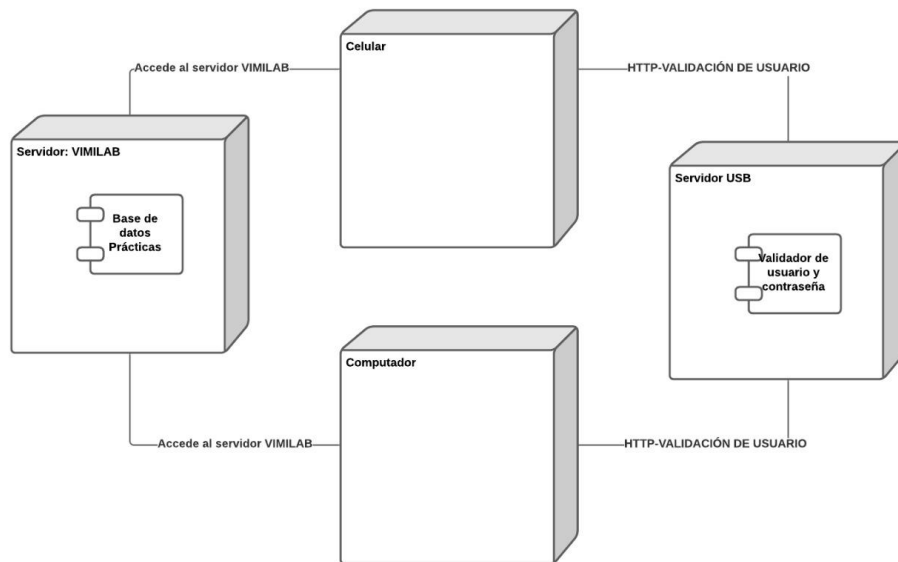


Figura 3. Diagrama de distribución del software.

En el diagrama de distribución se ilustró la arquitectura del sistema, es decir, la organización general de los componentes que lo conforman. Se especificaron los

nodos necesarios para la ejecución del programa, los cuales corresponden a dos servidores: VIMILAB, que contiene las prácticas y USB, en el que se encuentran los datos de usuario requeridos para el ingreso al programa; y dos dispositivos con los que se podrá tener acceso a los servidores, para el funcionamiento del sistema (Fig. 3).

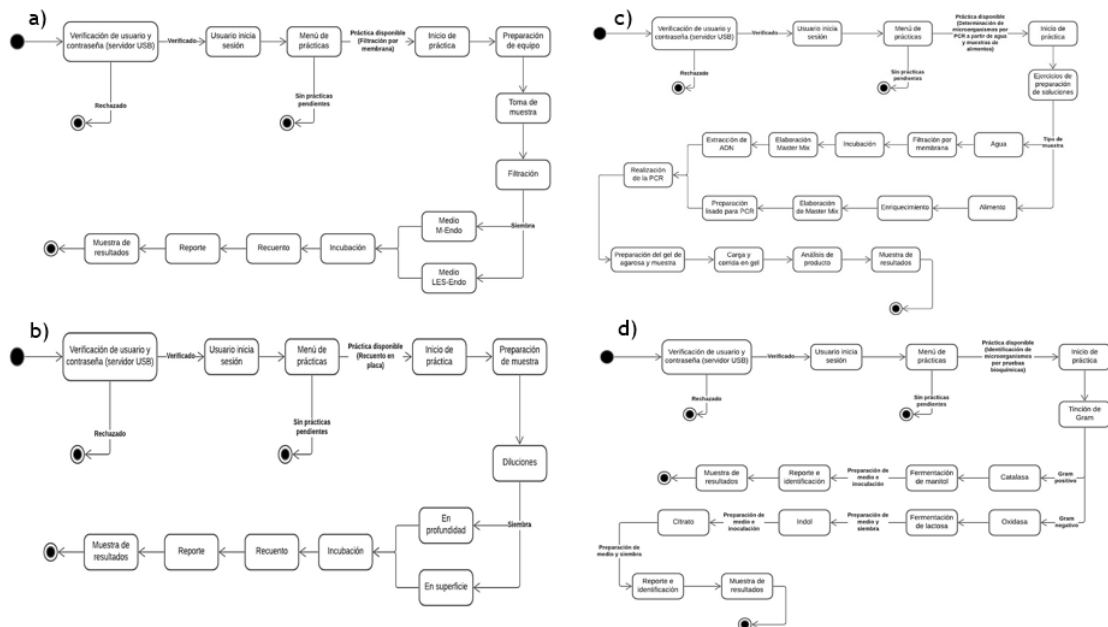


Figura 4. Diagramas de estado de las prácticas a incluir en el software. a) Filtración por membrana, b) Recuento en placa, c) Determinación de microorganismos por PCR a partir de agua y muestras de alimentos y d) Identificación de microorganismos por pruebas bioquímicas. Siendo ● el estado inicial y ⊙ el estado final.

Se elaboró un diagrama de estado para cada práctica, que define las acciones que llevará a cabo el usuario al desarrollarlas, para esto y con el objetivo de añadir aspectos relevantes de las técnicas microbiológicas descritas en las guías, se incluyeron los pasos más importantes en cuanto a la realización de cada protocolo, describiendo las etapas principales de cada uno de estos. En el diagrama de estado de filtración por membrana se determinó que, posterior al inicio de práctica, se da la preparación y montaje del equipo de filtración, luego se toma la muestra, se filtra y siembra en el medio suministrado (M-Endo o LES-Endo); el usuario incuba las placas y después de esto, realiza el recuento arrojado e informa sus resultados. Con respecto a la práctica de recuento en placa, al iniciarla, el estudiante se dispone a preparar la muestra, para luego realizar las diluciones correspondientes; de cada una de estas, realizará el tipo de siembra adecuado (a profundidad o en

superficie) y luego de la incubación, procede al paso de recuento de colonias para finalmente dar el reporte de este.

Por otra parte, previo al inicio de los pasos contenidos en el protocolo de la práctica de detección de microorganismos por PCR a partir de agua o muestras de alimentos, el usuario deberá realizar una serie de ejercicios de preparación de soluciones; al culminar estos, podrá elegir el tipo de matriz con el que trabajará (agua o alimento) para luego continuar con los pasos relacionados con la obtención de la muestra requerida para la realización de la PCR y la electroforesis tales como elaboración de la master mix, enriquecimiento o filtración por membrana, preparación de gel de agarosa, entre otros. Finalmente, el estudiante analizará el producto amplificado e informará los resultados obtenidos.

Por último, con relación al diagrama de la práctica de identificación de microorganismos por pruebas bioquímicas, el estudiante realizará una tinción de Gram a la muestra suministrada, a partir del resultado (Gram positivo o Gram negativo) podrá realizar la identificación de los microorganismos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) aplicando diversas pruebas bioquímicas como la prueba de oxidasa, fermentación de carbohidratos, citrato e indol; además, para las pruebas en las que aplique, el usuario deberá preparar correctamente el medio de cultivo requerido efectuar la prueba bioquímica correspondiente.

En los diagramas realizados, se estableció el estado inicial; es decir, el punto de partida de ingreso del usuario al software y los posibles estados finales que pueden surgir en su paso por el programa: cuando el estudiante culmina la práctica asignada, no tiene prácticas pendientes por realizar o que el usuario y/o contraseña introducida sea incorrecta o no se encuentre en la base de datos de la universidad.

DISCUSIÓN

Los laboratorios virtuales representan una alternativa viable para complementar la enseñanza de los estudiantes del área de ciencias, es por ello que resulta importante, empezar a diseñar las bases a partir de los conocimientos adquiridos en microbiología para el desarrollo e implementación futura de un software que contenga las prácticas más relevantes de esta ciencia y que funcione como herramienta complementaria para la enseñanza universitaria (Infante Jiménez, Cherlys, 2014).

Según los resultados de las encuestas, se identificó que una parte de la población presentó dificultades para distinguir las diferencias entre una técnica y un método

analítico; pues se obtuvieron respuestas que no correspondían a la pregunta realizada ya que mencionaron técnicas e incluso nombres de asignaturas en general, cuando se les pedía mencionar métodos relevantes en la microbiología. Es importante aclarar que una técnica es el procedimiento básico que se lleva a cabo para encontrar la solución o respuestas que ofrezcan información sobre la muestra u objeto inicial evaluado; mientras que un método hace referencia a la implementación de la técnica para determinar el estado, propiedades y el análisis de una muestra contenida en una matriz determinada (Introducción a las técnicas instrumentales en el análisis industrial, 2008).

En este mismo sentido, se observó que las prácticas mayormente mencionadas por los encuestados correspondían a los métodos y técnicas básicas del área de microbiología tales como diluciones seriadas, preparación de soluciones y medio de cultivo, entre otras. Esto confirma la importancia de reforzar y practicar esto conocimientos, ya que son la base para el entendimiento y posterior aplicación de técnicas y métodos con un mayor grado de complejidad (Vargas Straube, Gutiérrez Escobar, Soto Quiroz, & Isla Paillamilla, 2021). Por otro lado, se encontró que la técnica más mencionada por los encuestados fue la técnica molecular Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual demuestra el interés en el conocimiento y aplicación de las técnicas o métodos moleculares para la detección microbiológica por la mayoría de la población encuestada. Esto puede deberse a que actualmente este tipo de técnicas están siendo ampliamente utilizadas porque presentan una serie de ventajas tales como alta sensibilidad, precisión y especificidad al realizarlas, mayor rapidez en la obtención de resultados y capacidad de procesar muchas muestras; además, es posible la identificación de microorganismos cuyo estudio resulta difícil a partir del cultivo y los métodos tradicionales de detección (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

Al comparar cada una de las practicas con los métodos estándar y revisar el cumplimiento de los criterios en cada una, se pudo evidenciar que la mayoría los cumplían a cabalidad, lo cual es un aspecto positivo ya que en la Universidad Simón Bolívar los docentes tienen en cuenta los métodos estándar para el desarrollo de las prácticas en el ejercicio de su enseñanza, esto es de gran importancia ya que en el ámbito científico es necesario que cada resultado obtenido tenga el debido respaldo y confiabilidad, es decir, tener resultados que sean comparables independientemente del lugar donde sean realizados, por lo tanto la forma de llegar a esto, es por medio del seguimiento de métodos de referencia además es importante que los estudiantes afiancen los métodos que necesitan para su vida laboral (Camaró-Sala et al.).

En la guía utilizada para recuento en placa se modificó la solución utilizada para realizar las diluciones seriadas (agua pepetona 0,1%) por el Agua de dilución tamponada con fosfato de Butterfield, recomendado por el Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count; esto se corrobora a partir de un estudio realizado donde se compararon distintos tipos de diluyentes utilizados para la aplicación de las técnicas de conteo bacteriano, el Agua de dilución tamponada con fosfato de Butterfield fue una de las soluciones probadas con el mayor número de resultados contantes. Cabe resaltar que la solución diluyente representa un factor muy importante al momento de realizar el recuento de bacterias a partir de una muestra, ya que si no se escoge correctamente, puede influir negativamente en los resultados debido a la presencia de sustancias o partículas que reducen la densidad bacteriana o que llegan a confundirse fácilmente con colonias, causando el reporte de un resultado erróneo y no representativo de la muestra (Butterfield CT, 1932). Así mismo, se encontró que esta práctica no presentaba de forma completa las etapas del proceso, ya que no se realizaban los debidos controles en las pipetas utilizadas, por esto se incluyó este paso, el cual se realiza antes de iniciar la práctica. Este tipo de controles realizados en el material es de gran relevancia, ya que servirá poder evaluar la eficacia del ensayo que se desarrollara y además por medio de este, es posible llegar a prevenir en mayor medida que se lleguen a dar informes erróneos al obtener los resultados (Gebhart C, 2014).

Finalmente cabe destacar que las prácticas de laboratorio representan la forma por medio de la cual los estudiantes plasman los saberes previamente aprendidos, y representan una actividad fundamental para desarrollar y fortalecer las habilidades, generando inquietudes en torno a su objeto de estudio (Marín et al., 2019). Es así como se elaboraron los métodos “Identificación de microorganismos por pruebas bioquímicas” y “Determinación de microorganismos por PCR a partir de agua y muestras de alimentos” por medio de la combinación de técnicas relacionadas y la organización estratégica de los protocolos; esto con el fin de optimizar su aprendizaje por parte de los estudiantes logrando que técnicas que normalmente se llevan a cabo en varias sesiones de laboratorio presencial y en grupos de estudiantes, puedan realizarse en una sola sesión y de manera individual facilitando que el estudiante correlacione los conocimientos previamente adquiridos de forma integral.

Desde el punto de vista de la ingeniería de desarrollo de software, resulta fundamental la elaboración de los diagramas de casos de uso, de distribución y de estados, pues estos contienen los detalles necesarios y son el punto de partida para el desarrollo e implementación del software.

Es así como, con el presente trabajo se demostró la importancia de reconocer que la interdisciplinariedad permite enriquecer y producir conocimientos, al integrar las técnicas, instrumentos y métodos de diversas ciencias para darle solución a problemas que se van presentando en la sociedad (Elichiry, N.,1987); es por eso, que en este proyecto se combinaron los conocimientos desde el área de la microbiología con ciertas bases de la ingeniería de sistemas para crear las pautas iniciales desde el punto de vista de la ciencia que servirán para el desarrollo informático del software que contendrá el laboratorio virtual.

CONCLUSIONES

El anterior trabajo representa una base para el futuro diseño o desarrollo de un software en microbiología, en el cual se parte de la selección de los métodos más importantes que deben ser practicados por los futuros microbiólogos para su desempeño profesional; es así como se observó que los métodos elegidos por los encuestados con mayor frecuencia correspondían a métodos y técnicas básicas, lo cual afirma su importancia en relación al desarrollo de competencias para su aplicación en el ámbito profesional; además, al ser la PCR la técnica con mayor número de repeticiones, se manifiesta el interés general de incluir y conocer técnicas moleculares por sus diversas ventajas frente a las tradicionales. Por otro lado, ya que la mayoría de las guías suministradas cumplían totalmente con los criterios evaluados, se observó que en la Universidad Simón Bolívar los docentes consideran importante incluir métodos normalizados para la elaboración de las prácticas empleadas en la enseñanza; así como las modificaciones realizadas en las prácticas, representan un aporte a la mejora continua de la educación universitaria. A partir de lo anterior, se establecieron y organizaron los protocolos en diagramas de estado para establecer las pautas para el diseño del software; es así como, algunas prácticas estas se complementaron agregando pasos, materiales y reactivos recomendados para la correcta ejecución de la misma. Adicionalmente, y algunas técnicas fueron combinadas en un solo método, para lograr el aprendizaje por parte del estudiante en una sola sesión. Con todo lo anterior, se estaría generando a largo plazo un impacto positivo en la educación universitaria en el área de microbiología, al facilitar y aumentar la dinámica de la enseñanza de los temas por parte de los profesores hacia los alumnos implicados.

REFERENCIAS

- Álvarez, D. P. Z., & Gómez, J. S. Á. (2017). Actividades prácticas que propician el aprendizaje del concepto de microbiología en el aula. *Bio-grafía*, 957

- APHA/AWWA/WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition. American public health
- Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology. Seveth Edition. Puede consultarse en la siguiente página web:
<https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848#page/7/mode/1up>
- Butterfield CT (1932). La selección de un agua de dilución para exámenes bacteriológicos. Revista de bacteriología, 23 (5), 355-368.
<https://doi.org/10.1128/jb.23.5.355-368.1932>
- Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 33(7), e31-e36.
- Elichiry, N. (1987). Importancia de la articulación interdisciplinaria para el desarrollo de metodologías transdisciplinarias. El niño y la escuela. Reflexiones sobre lo obvio. Editorial Nueva Visión, Bs. As.
- FDA, (2001). Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count. Puede consultarse en la siguiente página web:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
- FDA, (2002). Bacteriological Analytical Manual Chapter 4 Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Puede consultarse en la siguiente página web:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#conventional>
- FDA, (2020). Bacteriological Analytical Manual Chapter 28 Detection of Enterotoxigenic Vibrio cholerae in Foods by the Polymerase Chain Reaction. Puede consultarse en la siguiente página web:
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-28-detection-enterotoxigenic-vibrio-cholerae>
- FDA, (2020). Bacteriological Analytical Manual Chapter 9 Vibrio. Puede consultarse en la siguiente página web:
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-9-vibrio>
- García, M., & Morcillo, J. (2014, May 20). Las TIC en la enseñanza de la Biología en la educación secundaria: los laboratorios virtuales. ResearchGate. https://www.researchgate.net/profile/Marta-Lopez-Garcia/publication/28184291_Las_TIC_en_la_ensenanza_de_la_Biologia_en_la_educacion_secundaria_los_laboratorios_virtuales/links/0a85e537b37a57cea000000/Las-TIC-en-la-ensenanza-de-la-Biologia-en-la-educacion-secundaria-los-laboratorios-virtuales.pdf

- Gebhart, C. (2014). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*.
- Infante Jiménez, Cherlys. (2014). Propuesta pedagógica para el uso de laboratorios virtuales como actividad complementaria en las asignaturas teórico-prácticas. *Revista Mexicana de Investigación Educativa*, 19(62), 917-937. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-66662014000300013
- ISO/TS 11133-1:2009 (2009). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*. Puede consultarse en la siguiente página web: <https://www.iso.org/standard/46118.html>
- López Rua, A. M., & Tamayo Alzate, Ó. E. (2012). LAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN LA ENSEÑANZA DE LAS CIENCIAS NATURALES. *Revista Latinoamericana de Estudios Educativos*, 8(1), 145-166. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1341/134129256008.pdf>
- Lorenzo-Rivadulla, M. (2013). El uso de laboratorios virtuales para la enseñanza-aprendizaje de ciencias de la naturaleza en 2º de la ESO (Master's thesis).
- Marín, L. A., Restrepo, G. del S. G., & Cardona-Arias, J. A. (2019). Impacto de las prácticas profesionales sobre las competencias de investigación formativa en estudiantes de Microbiología de la Universidad de Antioquia-Colombia. *Revista Virtual Universidad Católica Del Norte*, 0(56), 2-15. <https://revistavirtual.ucn.edu.co/index.php/RevistaUCN/article/view/1034/1477>
- Núñez-Cortés, J. M. (2020). Educación médica durante la crisis por Covid-19. *Educación Médica*, 21(3), 157. <https://doi.org/10.1016/j.edumed.2020.05.001>
- Núñez-Cortés, J. M., Reussi, R., García Dieguez, M., & Falasco, S. (2020). COVID-19 y la educación médica, una mirada hacia el futuro. *Foro Iberoamericano de Educación Médica (FIAEM) | Educación Médica*. Obtenido de www.elsevier.es: <https://www.elsevier.es/es-revista-educacion-medica-71-avance-resumen-covid-19-educacion-medica-una-mirada-S1575181320300760>
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 31, 535-546. Obtenido de <https://www.scielo.org/article/rpmesp/2014.v31n3/535-546/>
- Pardo, A. S., & Vázquez, J. L. M. (2005). El uso de los laboratorios virtuales en la asignatura Bioquímica como alternativa para la aplicación de las

tecnologías de la información y la comunicación. Tecnología Química, 25(1), 5-17.

- Quezada, G. (2019). ¿Qué importancia tienen los laboratorios en la educación? Dialoguemos. <https://dialoguemos.ec/2019/04/que-importancia-tienen-los-laboratorios-en-la-educacion/>
- Vargas Straube, M. J., Gutiérrez Escobar, J. C., Soto Quiroz, J. F., & Isla Paillamilla, E. (2021). Aprendizaje de microbiología experimental en un formato virtual en contexto de pandemia: una experiencia de implementación de actividades con la utilización de un set portátil en la formación de profesores de Biología y Ciencias Naturales. Revista Iberoamericana de Educación, 87(1), 49-71. <https://doi.org/10.35362/rie8714594>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario 1. Encuestas realizadas a estudiantes, profesores y egresados

Encuesta Estudiantes

Esta encuesta pertenece al desarrollo de un trabajo de grado de estudiantes del programa de Microbiología, que tiene como objetivo la selección de las prácticas y métodos relevantes en la Microbiología.

Muchas gracias por tomarse el tiempo de completar encuesta.

***Obligatorio**

1. ¿En qué semestre se encuentra actualmente? *

2. Mencione tres (3) prácticas o métodos microbiológicos vistos a lo largo de su carrera universitaria que considera le servirán para su quehacer profesional como Microbiólogo *

Encuesta Profesores

Esta encuesta pertenece al desarrollo de un trabajo de grado de estudiantes del programa de Microbiología, que tiene como objetivo la selección de las prácticas y métodos relevantes en la Microbiología.

Muchas gracias por tomarse el tiempo de completar encuesta.

***Obligatorio**

1. Nombre *

2. ¿En qué área imparte docencia? *

3. Mencione tres (3) prácticas o métodos microbiológicos que considera le servirán a sus estudiantes en su futuro quehacer profesional como Microbiólogos *

Encuesta Egresados

Esta encuesta pertenece al desarrollo de un trabajo de grado de estudiantes del programa de Microbiología, que tiene como objetivo la selección de las prácticas y métodos relevantes en la Microbiología.

Muchas gracias por tomarse el tiempo de completar encuesta.

***Obligatorio**

1. Nombre *

2. ¿En qué área se desempeña actualmente? *

3. Mencione tres (3) prácticas o métodos microbiológicos vistos a lo largo de su carrera universitaria que considera le sirvieron para su quehacer profesional como Microbiólogo *

Material suplementario 2. Protocolos seleccionados, revisados y modificados

RECuento EN PLACA

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:

Aprender la técnica de recuento en placa, realizando las diferentes siembras (en profundidad y en superficie) a partir de diluciones seriadas de muestra de alimentos (leche) y finalmente contar las UFC aplicando las reglas de recuento previamente vistas.

MATERIALES Y EQUIPOS

Medios de cultivo	Muestra	Materiales
Agua de dilución tamponada con fosfato de Butterfield (Diluyente)	Alimento	Pipetas de 1,5 y 10 mL
Agar Plate Count 124 Standard método		Balanza
		Termómetros
		Incubadora
		Tubos de ensayo
		Cajas de petri
		Baño de agua circulante para templar agar
		Frasco Schott
		Refrigerador
		Contador de colonias Quebec
		Varilla de vidrio

PROCEDIMIENTO

Siembra en profundidad

1. Desinfectar con alcohol al 70% toda el área de trabajo.

2. Marcar las cajas de petri y tubos estériles con la fecha, número de grupo, muestra y dilución correspondiente.
3. Desinfectar con alcohol al 70% el empaque que contiene el alimento.
4. Pipetear con agua para un control de pipetas
5. Agitar 25 veces la muestra para lograr una buena homogenización.
6. Tomar 10mL de la muestra mezclada y agregarlos al frasco que contiene 90mL del diluyente, agitar hasta homogenizar la mezcla y así se obtiene la dilución 10^{-1} .
7. Tomar 1mL de la dilución 10^{-1} y adicionarlos al tubo que contiene 9 mL del diluyente marcado con la dilución 10^{-2} . Mezclar unas diez veces aspirando con la pipeta. Esta es la dilución 10^{-2} . Realizar las sucesivas diluciones de la misma manera.
8. Tomar las cajas de petri marcadas y agregar 1 mL correspondiente a cada dilución luego de agitar los tubos.
9. Adicionar 15 mL del agar fundido a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a cada una de las cajas. Realizar un control de agar, adicionando diluyente.
10. Mezclar cuidadosamente el inóculo de manera uniforme mediante rotación alterna y movimientos hacia adelante y hacia atrás de las placas sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal.
11. Invertir las placas e incubar las cajas durante 48 ± 2 horas a 35°C .

Siembra en superficie

1. Preparar la muestra y realizar diferentes diluciones.
2. Marcar las cajas de petri que contienen el agar con el nombre de alimento, fecha, dilución.
3. Marcar dos cajas de petri del mismo medio, una como control del diluyente y otra como control de medio.
4. Adicionar 0,1 mL de cada una de las diluciones y del control de diluyente en las cajas marcadas respectivamente que contienen el medio de cultivo.
5. Extender con una varilla de vidrio la muestra sobre la superficie, hasta que la superficie quede seca.
6. Incubar las cajas durante 48 ± 2 horas a 35°C

Informe de resultados

1. Utilizar el contador de colonias y reportar el número de UFC/ml presente

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- FDA, (2001). Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count. Puede consultarse en la siguiente página web:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES EN AGUA POR LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:

Dar a conocer los pasos para que el usuario pueda aprender las bases de la técnica de filtración por membrana para la determinación de coliformes a partir de agua potable.

MATERIALES Y EQUIPOS

Medios de cultivo	Materiales
Medio M-Endo	Equipo de filtración por membrana
Medio LES endo Agar	Filtros de membrana (0,45μ)
	Bomba de vacío
	Pinzas de punta lisa
	Incubadora capaz de mantener una temperatura de 35°C
	Frascos muestreadores, de vidrio resistente o cristal refractario.
	Material común de laboratorio

PROCEDIMIENTO

1. Armar y conectar el equipo de filtración (Utilizando pinzas estériles ubicar el filtro de membrana sobre el receptáculo del equipo de filtración. Cuidadosamente ubicar el vaso de filtración sobre el receptáculo y ajustarlo. Filtrar la muestra bajo un vacío parcial).
2. Realizar una purga del equipo de filtración con aproximadamente 50 mL de agua estéril.
3. Tomar 100 ml de la muestra de prueba y transferir al equipo de filtración
4. Filtrar

5. Retire el filtro de membrana con pinzas estériles y transferir al medio M-Endo o LES Endo Agar
6. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 22 a 24 horas
7. Cuente como positivas las colonias que son color rosa a rojo oscuro con un brillo superficial verde metálico

REPORTE Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para el cálculo de la densidad bacteriana tanto de coliformes totales, coliformes fecales; compute el recuento el medio de cultivo utilizado, utilizando para el reporte del resultado filtros que tengan entre 20 y 80 colonias de coliformes totales y/o fecales y no más de 200 colonias de todos los tipos utilizando la siguiente ecuación.

UFC/100 mL = Colonias contadas x 100 / mL de muestra filtrados.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- FDA, (2002). Bacteriological Analytical Manual Chapter 4 Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Puede consultarse en la siguiente página web:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#conventional>

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:

Aprender el desarrollo de técnicas básicas en microbiología como la tinción de Gram, la preparación y siembra en diversos medios de cultivo (sólidos y líquidos), así como la correcta identificación de microorganismos a través de algunas pruebas bioquímicas.

MATERIALES

Medios de cultivo/Cepas/Reactivos	Materiales
1 frasco de 500g de medio MacConkey liofilizado	6 tubos largos tapa rosca
Agua destilada	6 tubos pequeños tapa rosca fondo plano

Cepas (Escherichia coli, Staphylococcus aureus)	Probeta de 500mL
Cristal violeta	Espátula
Lugol	Estufa
Alcohol acetona	Autoclave
Safranina	Tampones de algodón
1 frasco de 500g Caldo de cultivo Tryptofano liofilizado	Guantes de cuero
1 frasco de 500g Medio de movilidad manitol nitrato (agar) liofilizado	3 Erlenmeyer de 250mL
1 frasco de 500g de Agar citrato liofilizado	Balanza analítica
Agua oxigenada al 30%	Papel Kraft
Reactivo de Kovacs	12 cajas de Petri estériles
	Asas bacteriológicas (En punta y en aro)
	Cinta indicadora
	Portaobjetos
	Microscopio
	Asa en aro y en punta

PROCEDIMIENTO

TINCIÓN DE GRAM

- Esterilizar el asa en aro
- Levantar la caja de petri que contiene el microorganismo desconocido y acercarla al mechero
- Con el asa en aro, tomar una porción de una colonia del microorganismo desconocido
- Hacer el frotis en una lámina portaobjeto
- Fijar la lámina con calor al mechero.
- Agregar cristal violeta a toda la lámina durante 1 minuto.
- Lavar.
- Agregar Lugol a toda la lámina durante 1 minuto.
- Lavar.
- Agregar alcohol-cetona durante 25 a 30 segundos.
- Lavar.

- Agregar Safranina o Fucsina durante 30 segundos.
- Lavar.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Observar los resultados en el microscopio

NOTA: dependiendo del resultado (Gram positivo o Gram negativo) se continúa con el procedimiento de identificación correspondiente del microorganismo por pruebas bioquímicas.

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE GRAM POSITIVOS (*Staphylococcus aureus*) POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBA CATALASA

1. En un portaobjeto depositar de 1 a 2 gotas de agua oxigenada al 30%
2. Con el asa en aro tomar una porción de la colonia del microorganismo (Gram +)
3. Depositar el asa con el microorganismo sobre la gota de agua oxigenada, y observar la reacción

NOTA: la formación inmediata de una efervescencia (formación de burbujas) se toma como resultado positivo y se continúa con el proceso de identificación.

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DEL MANITOL

- **Preparar el medio de cultivo a utilizar**
 1. Rotule el frasco con la fecha de preparación, el nombre del medio, cantidad preparada y coloque una porción de cinta indicadora a un lado del frasco.
 2. Con la balanza analítica, pese la cantidad de medio liofilizado a preparar y agréguela al erlenmeyer seco.
 3. Añada poco a poco el agua destilada y agite en forma de 8 hasta homogeneizar la mezcla y no se vean grumos.
 4. Caliente el medio por alrededor de 15 minutos, agitando cada 5 minutos, hasta que hierva o se vea translúcido.
 5. Dispersar en tubos para obtener un medio con una profundidad de 6-7cm
 6. Realizar la esterilización del medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos
- **Inoculación del medio**

1. Esterilizar el asa en punta acercándola al mechero
2. Tomar una porción de colonia del microorganismo catalasa positiva
3. Inocular en el medio de manitol, introduciendo el asa en el centro del tubo hasta su base
4. Incubar a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas.
5. Observar resultados

NOTA: se considera positivo cuando el medio vire de rojo a amarillo por liberación de productos ácidos, y negativo cuando permanezca de color rojo.

- Al resultar positivas todas las pruebas realizadas, se concluye que la cepa estudiada corresponde a *Staphylococcus aureus*.

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE GRAM NEGATIVOS (*Escherichia coli*) POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBA OXIDASA

1. Tomar la tirilla correspondiente y dejar que alcance la temperatura ambiente
2. Esterilizar el asa
3. Con el asa en aro, escoger una colonia del microorganismo desconocido y extenderla por la zona reactiva de la tirilla
4. Esperar menos de 60 seg para observar resultados

NOTA: Solo se considerarán positivos los que viran a azul antes de los primeros 60 segundos. Transcurrido este tiempo todas las cepas, incluso las negativas, acaban virando a gris azulado.

- Al resultar negativa la prueba, se continúan realizando las siguientes pruebas correspondientes.

PRUEBA FERMENTACIÓN DE LACTOSA

- **Preparación del medio (Agar MacConkey)**
- 1. Rotule el frasco con la fecha de preparación, el nombre del medio, cantidad preparada y coloque una porción de cinta indicadora a un lado del frasco.

2. Con la balanza analítica, pese la cantidad de medio liofilizado a preparar y agréguela al erlenmeyer seco.
3. Añada poco a poco el agua destilada y agite en forma de 8 hasta homogeneizar la mezcla y no se vean grumos.
4. Caliente el medio por alrededor de 15 minutos, agitando cada 5 minutos, hasta que hierva o se vea translúcido.
5. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min
6. Enfriar a 47°C, mezclar bien y dispersar en las placas
7. Esperar que las placas se solidifiquen y colocarlas boca abajo para evitar la humedad excesiva en la superficie del medio
- **Siembra en superficie**
 1. Esterilizar el asa
 2. Con el asa en aro, tomar una porción de colonia del microorganismo oxidasa negativo
 6. Realice una siembra en agotamiento por estrías en el medio MacConkey.
 7. Incubar a 37°C por 24 horas en aerobiosis y observar resultados

NOTA: se tomará como positivo las colonias de color rojo o violeta y como negativo las colonias amarillas.

- Al resultar positiva la prueba, se continúan realizando las siguientes pruebas correspondientes.

PRUEBA DE INDOL

- **Preparar el medio de cultivo a utilizar**
 1. Rotule el frasco con la fecha de preparación, el nombre del medio, cantidad preparada y coloque una porción de cinta indicadora a un lado del frasco.
 2. Con la balanza analítica, pese la cantidad de medio liofilizado a preparar y agréguela al erlenmeyer seco.
 3. Añada poco a poco el agua destilada y agite en forma de 8 hasta homogeneizar la mezcla y no se vean grumos.
 4. Caliente el medio por alrededor de 15 minutos, agitando cada 5 minutos, hasta que hierva o se vea translúcido.
 5. Dispersar en tubos con 3 ml en cada uno.
 6. Realizar la esterilización del medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos

- **Inoculación del medio:**

1. Esterilizar el asa en aro
2. Tomar una porción de colonia del microorganismo lactosa positivo
3. Inocular en el medio, introduciendo el asa con el microorganismo y distribuirlo de manera homogénea en el caldo.
4. Incubar a 37 °C durante 24-48 horas.
5. Transcurrido el tiempo añadir el reactivo de Kovacs (4-5 gotas) resbalando por la pared del tubo sin agitar
6. Observar resultados

NOTA: se tomará como positivo la formación de un anillo de color rojo en la superficie del caldo, y la formación de un halo amarillo se tomará como negativo.

- Al resultar positiva la prueba, se continúan realizando las siguientes pruebas correspondientes.

PRUEBA DE CITRATO

- **Preparación del medio (Agar Citrato)**

1. Rotule el frasco con la fecha de preparación, el nombre del medio, cantidad preparada y coloque una porción de cinta indicadora a un lado del frasco.
2. Con la balanza analítica, pese la cantidad de medio liofilizado a preparar y agréguela al erlenmeyer seco.
3. Añada poco a poco el agua destilada y agite en forma de 8 hasta homogeneizar la mezcla y no se vean grumos.
4. Caliente el medio por alrededor de 15 minutos, agitando cada 5 minutos, hasta que hierva o se vea translúcido.
5. Dispersar en tubos para obtener un medio con una profundidad de 6-7cm
6. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min
7. Enfriar y solidificar en posición inclinada (pico de flauta).

- **Siembra**

1. Esterilizar asa en punta
2. Tomar una porción de colonia del microorganismo indol positivo
3. Inocular en el agar citrato con el asa, realizando una estría en la superficie del medio
4. Incubar a 35±2 °C durante 24-72 horas.
5. Observar resultados

NOTA: se tomará como positivo el cambio de color del medio a azul intenso, y como negativo los tubos que se mantengan de color verde.

- Al resultar negativa la prueba, se concluye que la cepa estudiada corresponde a *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- ISO/TS 11133-1:2009 (2009). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. Puede consultarse en la siguiente página web: <https://www.iso.org/standard/46118.html>
- Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology. Seveth Edition. Puede consultarse en la siguiente página web: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848#page/7/mode/1up>

a) DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS POR PCR A PARTIR DE AGUA Y MUESTRAS DE ALIMENTOS

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:

Dar a conocer los principios y pasos de las técnicas de PCR y electroforesis para la detección de microorganismos (*Salmonella sp* y *V. cholerae*) a partir de dos matrices diferentes (agua y muestras de alimentos).

DETECCIÓN POR PCR DE *Salmonella sp.* EN AGUA

MATERIALES REACTIVOS

Reactivos	Materiales y Euipos
Agua estéril.	Equipo de filtración: bomba de vacío, soportes y vasos.
Agua peptonada tamponada	Mechero.
Lisozima.	Centrifuga.
SDS.	Vortex
Buffer TE.	Baño serológico.

Cloruro de sodio.	Termociclador
Acetato de sodio.	Kit de extracción de ADN
Cloroformo/alcohol isoamílico	Puntas de micropipetas
Isopropanol al 100%.	Filtros Millipore de 0,45 µm.
Etanol al 70%.	Pinzas
Primers para <i>Salmonella</i> sp: 139 (5' GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGG CAA 3') y 141 (5' TCATCGCACCGTCAAAGGAACC 3')	Micropipetas.
Go Taq polimerasa	
dNTPs (10 mM)	
Agua libre de ADNasa y RNAsas.	
Agarosa	
Buffer TAE	
Marcador de 100 pb	
Agente intercalante	

PROCEDIMIENTO

Filtración de la muestra

1. Filtración de la muestra
2. Tener una muestra de aproximadamente 1 litro de agua de mar o potable.
3. Prepare el sistema de filtración (Manifold, porta embudo, empaque, embudo) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Ensamble las partes del equipo de filtración por membrana previamente esterilizadas: Embudos de filtración con sus tapas.
4. Enjuague el interior del embudo con aproximadamente 100 ml de agua destilada estéril y encender la bomba para purgar el sistema
5. Usando una pinza estéril por muestra, coloque el filtro de membrana con la cuadrícula hacia arriba sobre la frita del aparato, ensamblar el embudo y asegurarlo al equipo.
6. Filtrar la muestra agregando aproximadamente 250 ml cada vez hasta completar 1000 ml. Filtre la muestra encendiendo la bomba de vacío, una vez filtrada apagar la bomba y abrir la llave del manifold para eliminar el vacío generado por la filtración.
7. Enjuague el interior del embudo con aproximadamente 250 ml de agua destilada estéril y encender de nuevo la bomba para filtrar y repetir el

- procedimiento una vez filtrada el agua de enjuague apague la bomba y abra la llave del manifold para eliminar el vacío generado por la filtración
8. Flamear las pinzas y tomar el filtro evitando la rotura de este para agregarlo en frascos con 250 ml de agua peptonada al 100%.
 9. Dejar en incubación por 24 hr a 37° C.

Extracción de ADN

1. Adicionar 1500 µl del cultivo de preenquecimiento de caldo agua peptonada en tubos Eppendorf
2. Centrifugar los tubos a 12,000 rpm por 5 minutos y descartar el sobrenadante.
3. Kit de extracción
4. A partir del Pellet, se siguieron las instrucciones del fabricante del kit comercial Pure Link Genomic DNA mini kit de Invitrogen o el kit WIZARD GENOMIC DNA KIT (Promega)

Método Convencional

1. Adicionar 600 µl de buffer TE a la biomasa celular obtenida.
2. Adicionar 4 µL de control interno de extracción.
3. A cada tubo adicionar SDS (10%) y 12 µL de Lisozima (10 mg/mL) e incubar durante 1 hora y 30 minutos.
4. Adicionar 80 µl de acetato de sodio y 100 µl de cloruro de sodio a cada tubo y agitar fuertemente por 30 segundos.
5. Calentar los tubos a 65 °C por 10 minutos.
6. Dividir la cantidad de cada tubo y repartir en 2 tubos equitativamente.
7. Adicionar cloroformo y alcohol isoamílico hasta completar cada tubo a 1,5 ml.
8. Agitar fuertemente y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
9. Tomar el sobrenadante de cada uno de los tubos y colocar en un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril.
10. Adicionar isopropanol a cada tubo y mezclar por inmersión.
11. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos y descartar el sobrenadante de cada tubo.
12. Adicionar 500 µl de etanol al 75% y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
13. Descartar el sobrenadante de cada tubo y dejar evaporar completamente el alcohol.

14. Una vez evaporado el etanol, adicionar 20 µl de agua libre de ADNasa y ARNasa e incubar a 37°C en la incubadora durante 30 minutos, para resuspender el ADN. Leer en espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

PCR convencional

1. Antes de realizar la PCR, se diluye el ADN obtenido luego de la extracción para obtener una concentración aproximada de 10 ng/µl en cada replica.
2. Preparar la Master Mix, de acuerdo como se muestra en la siguiente tabla:

Reactivo	Concentración final	Volumen 1 RX
Buffer (5X)	1 X	5 µL
Cloruro de Magnesio (25 mM)	2 mM	2 µL
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5 µL
Primer 139	0,5 µM	1,25 µL
Primer 141	0,5 µM	1,25 µL
Taq polimerasa	0,75 U	0,15 µL
Agua Libre de RNasa/DNasa	---	9,85 µL
Volumen Final		20 µL

3. Adicionar 20 ul de la master mix a cada tubo por muestra de ADN. Colocar dos tubos adicionales por cada corrida, que corresponden al Control Positivo (ADN . spp) y Control Negativo (Agua).
4. Adicionar 5 ul de cada una de las muestras de ADN a cada tubo y 5 ul de control positivo en el tubo para control positivo y 5 uL de agua en el tubo para el control negativo.
5. Tapar los tubos con mucho cuidado y llevar al termociclador, programe el equipo y realice la amplificación siguiendo el siguiente protocolo:
 - I. 95°C por 2:00 min.
 - II. 95°C por 1:00 min.
 - III. 59,9°C por 1:00 min.
 - IV 72°C por 1:00 min.
 - V. Del paso IV pasa al segundo paso 30 veces.

Electroforesis

1. Preparar el gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X
2. Sembrar cada muestra en un pocillo del gel y a su vez sembrar en uno de los pocillos el marcador de peso molecular de 100 pb.
3. Los productos amplificados deben ser corridos a 50V durante una hora y media.

Interpretación de resultados

Los resultados deben interpretarse como positivo por la presencia de una banda de 284 pb, una vez sea validada la ausencia de banda en el control negativo (Blanco).

b) DETECCIÓN DE *Vibrio cholerae* POR PCR A PARTIR DE MUESTRAS DE ALIMENTOS

MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos	Materiales
Agua peptonada alcalina	Termociclador automático programable
Cebadores de PCR de la toxina 5'-TGAAATAAAGCAGTCAGGTG-3' , 5'- GGTATTCTGCACACAAATCAG-3'	Aparato de electroforesis en gel horizontal
TAQ polimerasa	Tubos de microcentrífuga (0,2 ml)
Desoxinucleótidos(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Micropipetas (0,5-20 µl y 20-200 µl)
Tampón de PCR compuesto por (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl 2 15 mM)	Punta de pipeta
Aceite mineral	Microcentrífuga
Agua desionizada esterilizada	Transiluminador UV
TBE (Buffer) (Trisborato 0,9 M, EDTA 0,02 M, pH 8,3)	Microondas
Agarosa	
Solución de bromuro de etidio (10 mg/ml)	
Buffer de carga de muestra	
Marcadores de peso molecular de ADN	

ENRIQUECIMIENTO

1. Pese 25 gr de muestra en un frasco
2. Agregue 225 ml de agua peptonada alcalina al frasco
3. Mezcle durante 2 minutos a alta velocidad
4. Incube la solución a $35^{\circ} \pm 2$ durante 6 a 8 horas

- Preparar la Master Mix de PCR (2,5 µl de tampón de PCR, 16 µl de agua peptonada alcalina, 1 µl de cada de cada desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) y 1 µl de cada cebador de la toxina) y almacenar las alícuotas congeladas, para su posterior uso. Esta se prepara mezclando todos los reactivos necesarios, excepto la TAQ polimerasa y el lisado molde. La reacción final contiene el TRIS

PROCEDIMIENTO

1. A partir de la solución incubada prepare un lisado crudo para PCR, centrifugando 1 ml de solución de enriquecimiento en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml durante 10 minutos, este lisado se utilizará inmediatamente para PCR
2. Agregar la TAQ polimerasa (0,5µl) y el lisado (1µl) a la Master Mix
3. Distribuirlo en tubos de microcentrífuga de 0,2 ml

Las condiciones para el termociclado que se deben usar son:

Thermocycler conditions:	time (min)	temperature (°C)
Initial denaturation	3	94
Denaturation	1	94
Primer annealing	1	55
Primer extension	1	72
Final extend	3	72
No. cycles: No more than 35		

Tabla tomada de Bacteriological Analytical Manual Chapter 28 Detection of Enterotoxigenic *Vibrio cholerae* in Foods by the Polymerase Chain Reaction.

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener el gel a una concentración entre 1,5-1,8 %
2. Añadir la agarosa al buffer (TBE) en un matraz
3. Calentar la mezcla en un horno microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido
4. Dejar enfriar hasta unos 50° C

5. Preparar el molde en el que se va hacer el gel sellando los bordes con cinta y colocar un peine en la posición indicada para crear los pocillos
6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que se solidifique durante mínimo 30 minutos

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Mezclar lisado (10-20 ul) y marcador con 0,2 µl de buffer de carga

CARGA DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA DE GEL

1. Colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis
2. Añadir buffer de electroforesis hasta que cubra el gel (3-5 mm)
3. Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos

ANÁLISIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS

1. Colocar las muestras preparadas en los pocillos del gel de agarosa sumergido en el TBE que contiene Bromuro de etidio
2. Conecte el equipo y esperar a que migre adecuadamente con un voltaje de 5 a 10 W por centímetro
3. Ilumine el gel de agarosa con un transiluminador UV y visualice las bandas relativas a la migración del marcador de peso molecular, el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado

CONTROLES

- Incluya un control de Master Mix que no contenga muestra y uno de control positivo para *Vibrio cholerae* en todos los análisis

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- APHA/AWWA/WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition. American public health
- FDA, (2020). Bacteriological Analytical Manual Chapter 9 *Vibrio*. Puede consultarse en la siguiente página web: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-9-vibrio>
- FDA, (2020). Bacteriological Analytical Manual Chapter 28 Detection of Enterotoxigenic *Vibrio cholerae* in Foods by the Polymerase Chain Reaction. Puede consultarse en la siguiente página web: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-28-detection-enterotoxigenic-vibrio-cholerae>

Material suplementario 3. Diagramas de estado

