

CAZADORES DE MITOS

Desarrollado por **FECYT**

La regla de los 5''

Luis Amigó CuBIOsity

Colegio Luis Amigó

**LUIS AMIGÓ
CURIOSITY**





Reto: La regla de los cinco segundos

¡Si se te ha caído al suelo y han pasado menos de 5 segundos, no te preocupes, puedes comértelo!

Objetivos:

- Cuestionar en base al conocimiento científico una creencia popular muy aceptada por la sociedad.
- Identificar los factores que determinan la presencia de microorganismos en alimentos que hayan sufrido una caída.
- Crear una serie de pruebas (experimentación) que permitan obtener resultados que confirmen o refuten la hipótesis de partida.
- Reflexionar sobre los riesgos sobre la salud que supone la aceptación de esta creencia.

Existe la creencia popular de que un alimento que se nos cae, si permanece en el suelo menos de 5 segundos, puede consumirse sin problemas, puesto que no ha permanecido el tiempo suficiente en contacto con la superficie en la que ha caído para sufrir contaminación por bacterias u otros microorganismos.

Pero ¿es esta creencia cierta? ¿Tienen los microorganismos un tiempo límite para adherirse a los alimentos? ¿Influirá de alguna manera el tipo de superficie sobre la que se caiga? ¿Y el tipo de alimento?

Vuestro objetivo será diseñar una investigación que permita desentrañar el reto y dar respuesta a estas preguntas.

1. ¿Tienen los microorganismos un tiempo límite para adherirse a los alimentos?

No tiene tiempo límite, pero contra más tiempo éste en la superficie más microorganismos se adhieren al alimento. Sin embargo, la superficie y el alimento pueden influir en qué microorganismos se adhieran al alimento.

2. ¿Influirá de alguna manera el tipo de superficie sobre la que se caiga?

La superficie sí que influye, ya que contra más porosa sea, hay más posibilidades de transmisión de microorganismos. Porque los microorganismos se mueven con más facilidad.

3. ¿Y el tipo de alimento?

Los alimentos sí que influyen. Pueden influir de dos maneras: de manera que se contamine con más facilidad (contra más agua tenga el alimento más fácil es que se adhieran microorganismos a él), y de manera que sea más difícil que se contamine (si presenta sustancias antimicrobianas o si está almacenado en condiciones que impidan que crezcan los microorganismos).

4. Tipos de microorganismos que se adhieren a la comida.

Hay tres principales microorganismos que se adhieren a la comida: los mohos, son hongos que se pueden ver a simple vista (ejemplos: *Aspergillus*); las enterobacterias (ejemplo: *E. Coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*...); y los virus, son menos frecuentes, contaminan el alimento y generan biotoxinas que se acumulan.

5. Estrategias que tienen los microorganismos para adherirse a la comida. Estructura celular.

Formando biopelículas (biofilms): matrices biológicamente activas formadas por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida (minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales).

1. Adherencia de células a la superficie:
 - a. Activa: la superficie de la célula bacteriana facilita el proceso (cilios).
 - b. Pasiva: gravedad, difusión y dinámica del fluido.
2. Producción de azúcares (exopolisacáridos) que consolidan la adhesión. 2 estados:
 - a. Reversible: implica fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas.

- b. Irreversible: por flagelos, pili y fimbrias.
3. Las células se dividen y las células hijas cubren el exterior e interior del punto de adhesión hasta formar un grupo.

6. ¿Existe algún material/alimento que sea estéril de forma natural?

Hay varios alimentos que son estériles de forma natural. Pero nosotros hemos destacado: la canela, los frutos secos y el ajo.

7. Tratamientos para esterilizar superficies/materiales. Eficacia.

- Métodos físicos (calor seco y calor húmedo).
- Métodos químicos (peróxido de hidrogeno, esterilización con glutaraldehído y óxido de etileno).
- Tindalización.
- Agua ozonizada.
- Rayos ultravioletas.

8. Enuncia vuestra hipótesis.

¿Crecen las bacterias sobre los alimentos con antibióticos naturales cuando caen al suelo y permanecen en él diferentes tiempos?

9. ¿Cuáles son las variables dependientes e independientes?

- Variable independiente (la que nosotros manipulamos): los tipos de alimentos, ya que nosotros escogemos qué alimento comprobar. Por ejemplo, el ajo, la canela y los frutos secos, porque se supone que tienen antibióticos naturales y queremos comprobar si las bacterias se adhieren a estos alimentos. También el tiempo que el alimento permanece en el suelo. Hemos decidido dejar los alimentos 3, 5 y 7 segundos, escogimos 5'' porque es la regla de los 5'', 3'' para comprobar que antes de los cinco segundos no crecía nada y 7'' para comprobar que crecía.
- Variable dependiente (la que cambia en función a la independiente): es el crecimiento bacteriano, porque se puede manipular con el tiempo. Queremos comprobar que, en función al tiempo que esté en contacto el alimento con el suelo, ver si hay más crecimiento de microorganismos.

10. ¿Cuáles son vuestras muestras/grupos experimentales y de control?

El control positivo ha consistido en poner en contacto con el suelo un trozo de naranja natural. Porque la naranja no tiene antibióticos naturales, por eso debe haber crecimiento bacteriano. Además, la naranja es un alimento con mucha agua y, cuanto más agua, más facilidad para que crezcan bacterias.

El control negativo ha consistido en limpiar el suelo con lejía y comprobar que no hay crecimiento bacteriano. Hacemos esto para comprobar que se puede esterilizar la superficie.

Las muestras son:

- Naranja en contacto 3'', 5'' y 7''. Control +.
- Canela en contacto 3'', 5'' y 7''.
- Ajo en contacto 3'', 5'' y 7''.
- Anacardos en contacto 3'', 5'' y 7''.
- Superficie desinfectada con lejía. Control –.

11. ¿Qué posibles errores o sesgos de medición habéis identificado?

La temperatura, puede afectar el crecimiento de bacterias. Cuanta más temperatura más rápido crecen, pero si hay demasiado calor también se mueren, y el frío ralentiza su crecimiento. A nosotros, no nos crecía nada, y al ser enero, pensamos que era por el frío que hacía en el laboratorio, así que pusimos las placas cerca de un radiador y entonces sí se produjo crecimiento.

Contaminación, es muy fácil que con el ambiente se contamine, ya sea una corriente de aire, nuestra propia respiración... Por ejemplo, nosotros tuvimos una contaminación por hongos. Para evitar más contaminaciones hemos trabajado lo más cerca posible de una llama de mechero y hemos cerrado lo más rápido posible las tapas de las placas de Petri para evitar que entrara aire.

12. Describid el protocolo experimental.

MATERIAL

Reactivos	mg	mL
Agar		200
Pastilla de caldo de pollo		
Agua destilada		1000
Azul de metileno		30

Cristal violeta		30
Yodo de Gram		30
Alcohol 96º		150
Safranina O		30
Lejía		500

Utensilios	Cantidad
Placas de Petri	1 x muestra
Hisopos de algodón	1 x muestra
Mechero de alcohol	1
Pinzas de madera	1
Cristalizador para los lavados	1
Portaobjetos	1 x muestra
Cubreobjetos	1 x muestra
Guantes	1
Bata	1
Mascarilla	1
Gafas de seguridad	1

MÉTODO

PROCESO: Preparar las placas de Petri para crecimiento bacteriano.	Realizado
Esterilizar las placas de Petri y los hisopos de algodón que se van a utilizar.	
Calentar el agar en el microondas unos segundos. Dejar enfriar varios minutos.	
Separar la placa y, con mucho cuidado, verter el agar sobre la mitad inferior de las dos placas, lo suficiente para formar una capa por encima del fondo de la placa. Colocar rápidamente la parte superior de la placa de Petri para evitar que las bacterias transmitidas por el aire contaminen el experimento. Dejar enfriar de 30 minutos a 2 horas. Si no vamos a usar las placas inmediatamente, refrigerarlas boca abajo (hasta 2 meses). Recordar sacarlas unas horas antes cuando se vayan a utilizar para que el agar alcance la temperatura ambiente. Se realizará junto a mechero para mantener al máximo la esterilidad.	
PROCESO: Toma de muestras.	
Decidir el lugar exacto para tomar las muestras.	
Dar la vuelta a las placas de Petri y anotar en la parte inferior todos los datos importantes del experimento. Ser descriptivo. <ul style="list-style-type: none"> - Lugar de muestreo: - Día y hora: - En nuestro caso, alimento de muestreo y tiempo que ha estado en el suelo. Una vez que se ha anotado todo, volver a colocar las placas con la parte superior hacia arriba.	
Abrir con cuidado el extremo correcto del paquete del hisopo de algodón, lo justo para agarrar el extremo de madera. No permitir que el extremo con la punta de algodón entre en contacto con ninguna superficie que no se vaya a muestrear. Si no vamos a	

usarlo todavía, dejar el extremo con algodón dentro del paquete. Cuando vayamos a muestrear, humedecer el extremo de algodón con agua destilada.	
Depositar en el suelo el alimento que queremos muestrear el tiempo necesario, evitar tocarlo con las manos, utilizar unas pinzas o algo similar.	
Proceder a la toma de la muestra tocando la parte del alimento que ha estado en contacto con el suelo con el extremo de algodón de hisopo.	
Levantar la tapa de la placa de Petri e insertar el extremo de algodón del hisopo sobre el agar y frotarlo suavemente hacia la izquierda y derecha a lo largo de la superficie del agar.	
Retirar el hisopo y volver a colocar la tapa de la placa de Petri. Sellar la placa con cinta. Voltar la placa de Petri y colocarla en el lugar donde queremos que crezcan las bacterias (preferiblemente en un lugar oscuro y cálido). Analizar el crecimiento cada día.	
Desechar el hisopo en agua con lejía (50:50) y lavarse muy bien las manos con agua y jabón. Desinfectar el área de trabajo y volverse a limpiar las manos con agua y jabón.	
PROCESO: Comprobación del crecimiento.	
Durante una semana, todos los días fotografiar el crecimiento de bacteriano en las placas.	
PROCESO: Preparación de muestras para tinción (repetirlo en tantos portaobjetos como muestras se quieran preparar).	
Observar lo que ha crecido en la placa, siempre a través de la tapa, nunca abriendo la placa.	
Coger un portaobjetos y lávalo bien con agua y jabón. Asegurarse de limpiar todo el jabón de la superficie del portaobjetos. Secarlo bien y recordar manipularlo solo agarrando del borde.	
Colocar una gota de agua destilada en el centro del portaobjetos.	
Recoger una pequeña muestra de la placa con un hisopo. Levantar la tapa lo suficiente para insertar el hisopo con el extremo de algodón en un área que tenga crecimiento bacteriano. No es necesaria mucha cantidad, incluso la muestra más pequeña tiene millones de bacterias. Al sacar el hisopo, cerrar la placa de nuevo.	
Colocar el extremo con algodón del hisopo sobre la gota de agua y extender mezclando sobre el centro del portaobjetos. Desechar el hisopo en un vaso de agua con lejía (50:50).	
Sujetar el portaobjetos con unas pinzas de madera y pasarlo por un mechero sin dejarlo directamente sobre la llama. Pasarlo y dejarlo enfriar unos segundos. Repetirlo hasta que se evapore el agua por completo y las bacterias queden fijadas, no "cocinadas".	
PROCESO: Tinción simple de las muestras	
Colocar el portaobjetos sobre papel de filtro.	
Añadir unas gotas de azul de metileno en el centro del portaobjetos hasta cubrir las bacterias fijadas anteriormente. Dejar reaccionar durante 60 segundos.	
Inclinar el portaobjetos sobre el cristalizador para eliminar el exceso de colorante.	

Lavar con agua destilada desde una botella de lavado aplicando el agua en flujo suave desde el extremo superior. No lavar directamente sobre las bacterias fijadas ni durante mucho tiempo.	
Secar el portaobjetos con cuidado de no eliminar las bacterias fijadas. Se puede repetir el proceso del mechero de unos pasos atrás.	
Colocar el portaobjetos en el microscopio y ver a 4X, 10X y 40X. Anotar, dibujar, fotografiar lo que se ve.	
Si se va a poner el objetivo de 100X, una vez enfocado con el de 40X, poner sobre la muestra el espacio entre ambos objetivos y colocar una gota sobre la muestra en la posición donde pasa el haz de luz. NO VOLVER SOBRE EL OBJETIVO DE 40X. Poner el objetivo de 100X y enfocar con el micrométrico. Una vez usado, volver directamente al objetivo de 4X y limpiar el objetivo de 100X suavemente hasta no dejar rastro de aceite.	
PROCESO: Tinción de Gram	
Colocar el portaobjetos sobre papel de filtro.	
Añadir unas gotas de cristal violeta en el centro del portaobjetos hasta cubrir las bacterias fijadas anteriormente. Dejar reaccionar durante 60 segundos.	
Inclinar el portaobjetos sobre el cristalizador para eliminar el exceso de colorante.	
Lavar con agua destilada desde una botella de lavado aplicando el agua en flujo suave desde el extremo superior. No lavar directamente sobre las bacterias fijadas ni durante mucho tiempo.	
Secar el portaobjetos con cuidado de no eliminar las bacterias fijadas. Se puede repetir el proceso del mechero de unos pasos atrás.	
Añadir unas gotas de colorante yodo de Gram hasta cubrir completamente las bacterias. Dejar reaccionar durante 60 segundos.	
Inclinar el portaobjetos sobre el cristalizador para eliminar el exceso de colorante.	
Lavar con alcohol 96º aplicándolo en flujo suave desde el extremo superior del portaobjetos. Agregar alcohol hasta que salga claro después de pasar sobre las bacterias teñidas.	
Lavar con agua destilada desde una botella de lavado aplicando el agua en flujo suave desde el extremo superior. No lavar directamente sobre las bacterias fijadas ni durante mucho tiempo.	
Secar el portaobjetos con cuidado de no eliminar las bacterias fijadas. Se puede repetir el proceso del mechero de unos pasos atrás.	
Añadir unas gotas de colorante safranina O hasta cubrir completamente las bacterias. Dejar reaccionar durante 60 segundos.	
Inclinar el portaobjetos sobre el cristalizador para eliminar el exceso de colorante.	
Lavar con agua destilada desde una botella de lavado aplicando el agua en flujo suave desde el extremo superior. No lavar directamente sobre las bacterias fijadas ni durante mucho tiempo.	
Secar el portaobjetos con cuidado de no eliminar las bacterias fijadas. Se puede repetir el proceso del mechero de unos pasos atrás.	

Colocar el portaobjetos en el microscopio y ver a 4X, 10X y 40X. Anotar, dibujar, fotografiar lo que se ve. Las células Gram+ aparecerán violeta/violeta oscuro y las Gram- aparecerán en rosa/rojo claro.	
Si se va a poner el objetivo de 100X, una vez enfocado con el de 40X, poner sobre la muestra el espacio entre ambos objetivos y colocar una gota sobre la muestra en la posición donde pasa el haz de luz. NO VOLVER SOBRE EL OBJETIVO DE 40X. Poner el objetivo de 100X y enfocar con el micrométrico. Una vez usado, volver directamente al objetivo de 4X y limpiar el objetivo de 100X suavemente hasta no dejar rastro de aceite.	
PROCESO: Desechar las placas.	
Tomar las medidas adecuadas: mascarilla, guantes, gafas de seguridad, bata de laboratorio.	
Preparar un cristalizador de agua con lejía (50:50).	
Abrir cada placa de Petri y sumergir ambas partes en el cristalizador con agua y lejía alrededor de un minuto. Esto destruirá las bacterias. Evitar que la lejía entre en contacto con la piel ya que se podrían producir quemaduras.	
Colocar la placa de Petri desinfectada en una bolsa de plástico con cierre hermético y tirar la bolsa a la basura.	
PROCESO: Limpiar los portaobjetos	
Tomar las medidas adecuadas: mascarilla, guantes, gafas de seguridad, bata de laboratorio.	
En el mismo cristalizador con lejía introducir los portaobjetos y déjalos unos minutos.	
Lavar los portaobjetos con agua y jabón. Dejar secar. Desechar la lejía. Lavarse bien las manos con agua y jabón.	

OBSERVACIONES/INCIDENCIAS

Anotar observaciones del aspecto de las reacciones como posibles incidencias durante el proceso.

13. Describid los resultados.

- Día 1: sábado 23 de enero (15:30 horas) todavía no ha crecido nada.
- Día 2: domingo 24 de enero (17:30 horas) y no hay ningún cambio.
- Día 3: lunes 25 de enero (11:00 horas) y sigue sin crecer nada, creemos que es porque el ambiente es muy frío y vamos a poner las placas de Petri debajo de un radiador para ver si hay cambios.
- Día 4: martes 26 de enero (11:00 horas). El lunes pusimos las placas debajo de los radiadores y han crecido bacterias en el control + y en la naranja de 5''. Como el suelo estaba demasiado frío lo que hemos hecho es subirlas a otra aula y ponerlas encima de una mesa junto a un radiador.
- Día 5: miércoles 27 de enero (11:00 horas). El control + tiene dos colonias y han crecido hongos. También han salido colonias en la naranja de 3'' y 5'' y en la canela de 3''. El agar tiene variación en el color y eso puede influir en el crecimiento. Mantenemos las placas en la mesa junto al radiador.
- Día 6: jueves 28 de enero (11:00 horas). En el control + hay presencia de bacterias y hongos. También hay en las placas de la canela de 3'' y 5'' y en la naranja de 3'' y 5''. Mantenemos las placas en la mesa junto al radiador.
- Día 7: viernes 29 de enero (15:30 horas). Creemos que ha habido contaminación, porque ha crecido lo mismo en el ajo y la canela. En el control + sigue creciendo y en el control – sigue sin haber presencia de crecimiento. En la canela de 5'' ha crecido una colonia roja y creemos que hay crecimiento de hongos en la canela de 7''. Hay crecimiento de bacterias en la naranja de 3'', 5'' y 7'', también en la canela de 3'' y 5'', en el ajo de 5'' y en el de 7'' y en el fruto seco de 5''.

Ver tabla y fotografías en el anexo I.

14. Conclusiones.

Mediante los experimentos que hemos llevado a cabo hemos llegado a la conclusión de que los alimentos no tienen antibióticos naturales o que no reaccionan contra las bacterias en crecimiento, ya que han crecido colonias de microorganismos en muchas de las placas. No importa el tiempo que esté en contacto el alimento con la superficie contaminada, a la semana observamos crecimiento en casi todas las placas y, en las que no encontramos crecimiento, creemos que fue porque, al no tener una temperatura constante, el frío pudo ralentizar el crecimiento.

15. Bibliografía:

- Ábalos, C. (2005). Adhesión bacteriana a biomateriales. Recuperado el 18 de diciembre de 2020, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852005000100003.
- Aldon Corporation. (2011). Introduction to Microbiology: Bacterial Growth and Staining. IS 3014 Student Guide. Recuperado el 15 de enero de 2021, de <https://www.amazon.com/Innovating-Science-Introduction-Microbiology-Bacterial/dp/B00BUV76NM>.
- Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. (s.f.). Frutas y verduras siempre seguras. Recuperado el 18 de diciembre de 2020, de <https://www.mscbs.gob.es/consumo/pec/recomendacion/frutasVerduras.htm>.
- Navia, D. *et al.* (2010). Las biopelículas en la industria de alimentos. Recuperado el 18 de diciembre de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n2/v8n2a15.pdf>.
- OMS. (s.f.). Peligros biológicos. Inocuidad de alimentos. Control Sanitario. Recuperado el 18 de diciembre de 2020, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es.
- wikiHow. (s.f.). Cómo cultivar bacterias en una placa de Petri. Recuperado el 15 de enero de 2021, de <https://es.wikihow.com/cultivar-bacterias-en-una-placa-de-Petri>.

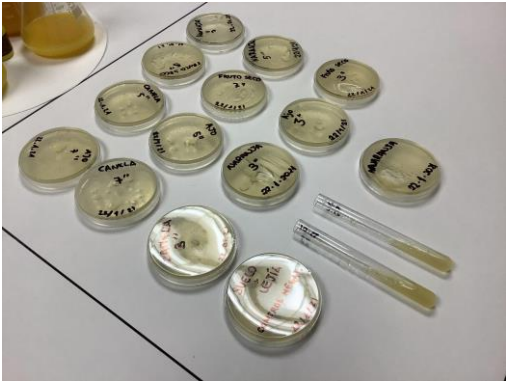
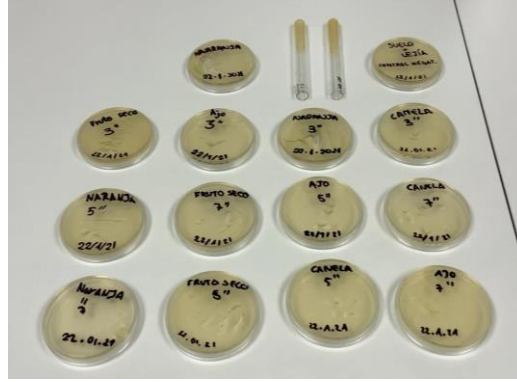
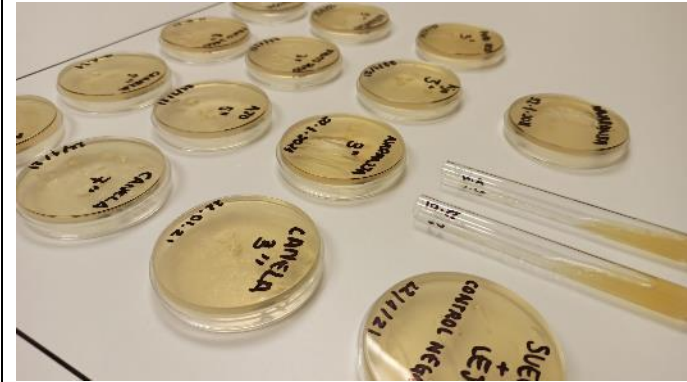
Tabla de resultados: crecimiento bacteriano por días y placas:

Placa/Día	Sábado (1 día)	Domingo (2 días)	Lunes (3 días)	Martes (4 días)	Miércoles (5 días)	Jueves (6 días)	Viernes (7 días)
Control +							
Control -							
Naranja 3''							
Naranja 5''							
Naranja 7''							
Ajo 3''							
Ajo 5''							
Ajo 7''							
Canela 3''							
Canela 5''							
Canela 7''							
Frutos Secos 3''							
Frutos Secos 5''							
Frutos Secos 7''							

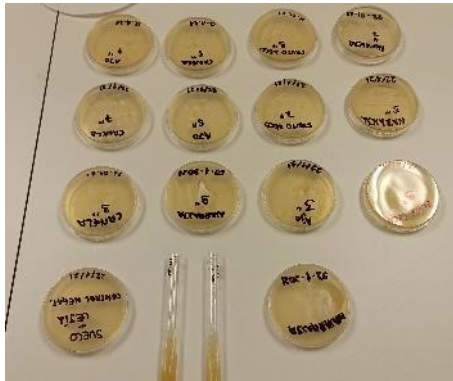
Leyenda:

	Sin crecimiento		Con crecimiento		Con crecimiento + contaminación
--	-----------------	--	-----------------	--	---------------------------------

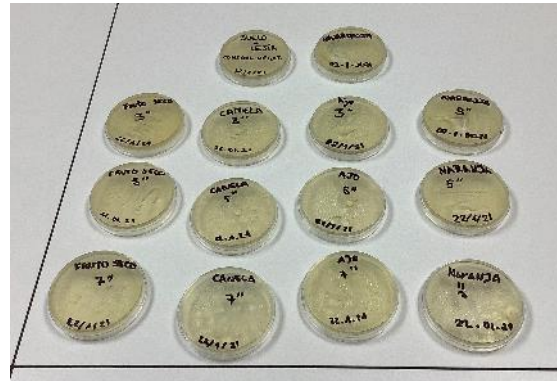
Registro fotográfico:

22 enero 2021 (siembra)	23 enero 2021 (1 día)	24 enero 2021 (2 días)
		

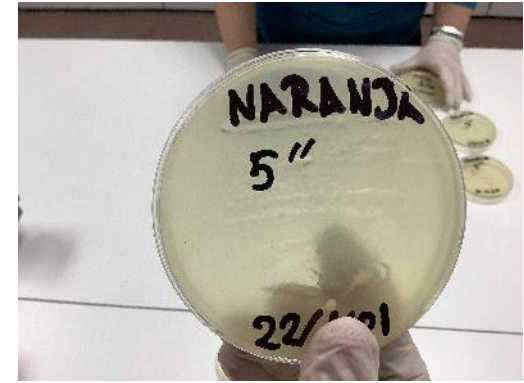
25 enero 2021 (3 días)



26 enero 2021 (4 días)

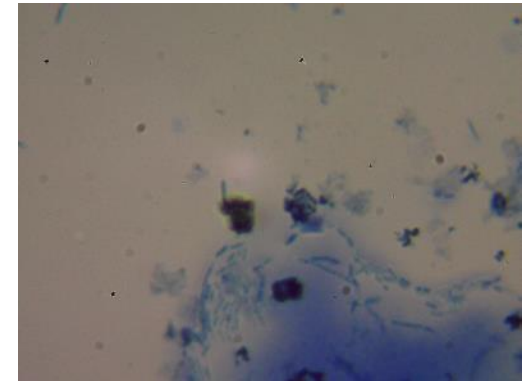
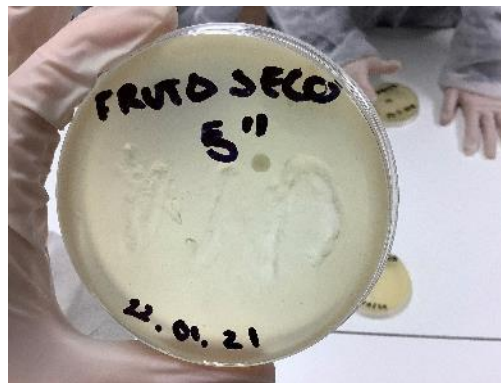
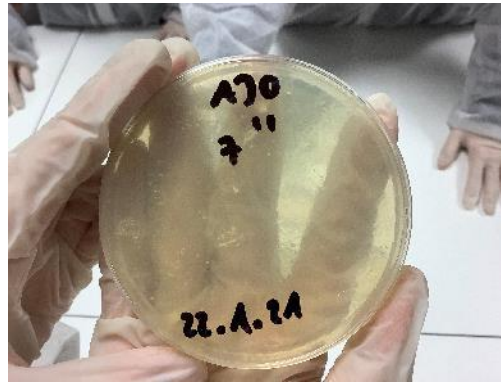
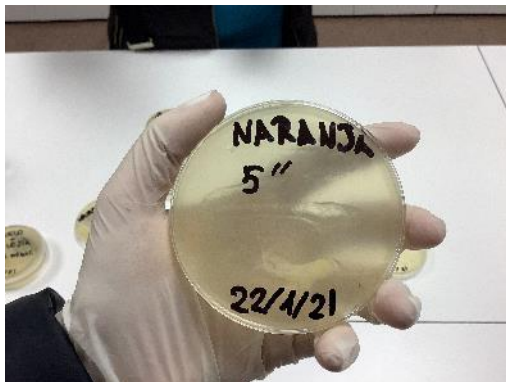


27 enero 2021 (5 días)

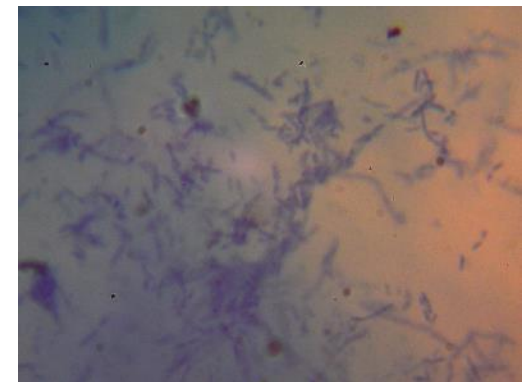


28 enero 2021 (6 días)

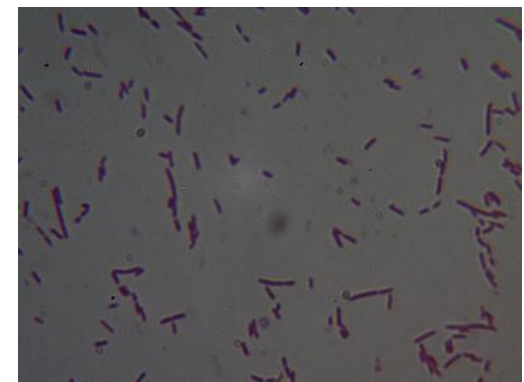
29 enero 2021 (7 días)



Canela 5'' – Azul de Metileno – 100X



Canela 3'' – Azul de Metileno - 100X



Ajo 7'' – GRAM – 100X