

Guió de Treball de Recerca

Com funcionen els mètodes de conservació naturals?

Introducció

Molt abans que se sabés que existien els microorganismes o que la biotecnologia fos una disciplina científica, moltes societats del món ja havien desenvolupat mètodes per a preservar els aliments, de manera tradicional, sense saber la ciència que s'hi amagava. Amb la tecnologia actual podem estudiar les bases biotecnològiques de la conservació dels aliments tradicionals, entendre el paper dels microorganismes en la conservació dels aliments i desenvolupar nous sistemes de conservació més eficients.

La recerca és com un joc de proves, una gimcana d'enigmes. En aquest treball aplicaràs el mètode científic i descobriràs la biotecnologia que s'amaga darrere de la melmelada, el fuet, el salmó fumat i el formatge. Per a fer-ho t'anirem guiant durant el protocol, proporcionant-te pistes, per a què treguis el científic/a que portes a dins i siguis tu qui dissenyi els experiments. Estàs preparat/da?

Objectius

- 1) Aplicar i desenvolupar el mètode científic per a destapar la biotecnologia que hi ha rere la conservació dels aliments.
- 2) Explicar en l'àmbit microbiològic què els hi passa als aliments quan es fan malbé, i per què alguns aliments es fan malbé abans que d'altres.
- 3) Manipular a escala molecular els aliments per a protegir-los contra l'atac dels microorganismes.
- 4) Aprendre a cultivar bacteris a casa i al laboratori, observar-los i identificar-los.
- 5) Aplicar els coneixements apresos per a fabricar un formatge artesanal únic.

Experiment: Anàlisi de la flora bacteriana de diversos aliments frescos i conservats, abans i després de ser incubats a 37 °C durant 7 dies.

Incògnita: Són les preguntes a respondre amb l'experiment. Quina és la incògnita del teu experiment?

R: Per què els aliments frescos es fan malbé abans que els conservats? Quin és el paper dels microorganismes en la conservació dels aliments? Tots els microorganismes creixen a la mateixa velocitat? De què depèn la velocitat de creixement?

Hipòtesi: La hipòtesi és la part més imaginativa del mètode científic. Una hipòtesi és una idea que explica el perquè d'una incògnita. Quina és la teva hipòtesi sobre la conservació dels aliments i el paper dels microorganismes?

R: Els aliments frescos es fan malbé abans perquè els microorganismes creixen en ells més ràpidament.

Disseny experimental:

El disseny experimental o protocol és la part més creativa de la ciència, i és la que et permetrà demostrar o rebutjar la teva hipòtesi. Per a dissenyar correctament un experiment, et recomanem que primer responguis les següents preguntes:

Com es pot mesurar d'una manera científica si un aliment es conserva bé o no? *Mesurant la velocitat amb la qual el colonitzen els microorganismes.*

Com pots saber si els bacteris creixen més ràpidament en un aliment que en un altre? *Incubar una petita mostra de cada aliment en paral·lel i observar la velocitat de formació de colònies a la placa de petri.*

Quines son les variables de l'experiment? Variable dependent? *Velocitat de formació de colònies*

Variable independent? *Aliment*

Com les mesuraràs? *La dependent es mesura mitjançant fotos de la placa de petri que mostrin el grau d'expansió de les colònies. La independent no es mesura, és arbitrària i és el tipus d'aliment.*

Necessites un control negatiu?, per què? *Per establir un valor inicial, per a validar que els microorganismes que creixen son conseqüència del nostre experiment i no una contaminació exterior.*

En el teu experiment, quin podria ser? (hi ha més d'una opció vàlida). *Una placa de petri on s'incuba aigua d'una xeringa, sense col·locar-hi cap aliment. S'espera que no creixi res.*

Abans de començar a dissenyar l'experiment hem de tenir ben clara quina és la nostra pregunta de recerca (incògnita) i la nostra hipòtesi:

La pregunta a la que vull respondre és...

La meva hipòtesi és...

Després de respondre les preguntes anteriors, volem que siguis tu el científic/científica que dissenyi l'experiment. Tenint en compte el que vols demostrar o refutar, les variables de l'experiment i les mostres que et proposem, com creus que hauria de ser l'experiment? Per a què et sigui més fàcil, t'indiquem els materials que probablement necessitaràs:

Materials:

Parelles de mostres	Equipament	Reactius i aliments
Salmó fresc / salmó fumat	Plaques de petri (IBEC).	Medi de cultiu bacterià.
Carn fresca / fuet	10 Xeringues de 15 ml	(CESIRE-CDEC)
Llet fresca /iogurt natural (no pasteuritzat)	1 espelma.	Aigua mineral
Llet fresca /llet UHT	Encenedor	Alcohol 96
Fruita/melmelada de la mateixa fruita.	logurtera	Blau de metilè/ Tinció de Gram.
Llet fresca /formatge	Microscopi	Llet fresca
	Rollo de paper de cuina.	Salmó fresc
	Ruixador per esprai.	Fruita fresca
	Càmera de fotos.	Melmelada
	Retolador permanent	Formatge
	Pinces	logurt
	Ganivet	
	Tubs FALCON	
	Portaobjectes	
	Cubreobjectes	
	Pipeta pasteur	

Una bona manera de dissenyar l'experiment és mitjançant un esquema o "workflow", amb dibuixos i anotacions per a què ràpidament puguis veure què faràs. Fes un workflow de com hauria de ser el teu experiment.

Workflow:

Preparació i condicionament del material:

Nota:

Quan es treballa amb microorganismes és molt important treballar en condicions d'esterilitat per a garantir la validesa dels resultats. Si no es treballa en condicions d'esterilitat, les mostres es poden contaminar amb microorganismes provinents de l'ambient, ja que a l'aire hi trobem espores de fongs i bacteris en suspensió que poden aterrar a l'interior de les plaques de petri i contaminar l'experiment. Per aquest motiu és important esterilitzar tota la zona de treball amb una solució d'etanol 70% i mantenir les plaques de petri tapades en tot moment. Per a poder inocular bacteris a l'interior de les plaques, s'han d'obrir a menys de 20 cm d'una flama, ja que la combustió de la flama genera un flux d'aire vertical que allunya els microorganismes ambientals i per tant preveu possibles contaminacions.

A continuació mira el següent vídeo explicatiu de com treballar en condicions d'esterilitat. En el vídeo veuràs que utilitzen una nansa de sembra per a la inoculació, nosaltres adaptarem el protocol i utilitzarem les xeringues i bastonets de les orelles. T'ho expliquem tot seguit:

Vídeo explicatiu:

Aseptic technique (BioRadLifeScience)

<https://www.youtube.com/watch?v=bRadilXkqoU>

Disseny experimental: Preparació

- 1) Primer de tot, amb el retolador permanent, escriu tota la informació necessària per a identificar la mostra. Ha de constar: quina serà la mostra que hi col·locaràs, la data, etc. També marca 1 tub FALCON per a cada mostra. Per què creus que cal retolar cada placa? *Per a poder identificar més tard cada mostra.*
- 2) En una olla petita posa a bullir 250 ml d'aigua destil·lada. Quan arrenqui a bullir, apaga el foc, aparta l'olla del foc i tapa-la. Deixa que l'aigua es refredi amb la tapa posada. Per què fem bullir l'aigua? *Per esterilitzar-la i evitar contaminacions.*
- 3) Mentre s'escalfa l'aigua, prepara l'àrea de treball. El més semblant a un laboratori a casa és la cuina, de manera que et recomanem que facis els experiments allà. Busca una superfície ample i llisa (la taula de la cuina és perfecte) i buida-la per tenir una bona zona de treball.
- 4) Prepara una solució d'etanol 70%: Mesura 700ml d'alcohol 96 (alcohol de farmàcia) i barreja'ls amb 300 ml d'aigua destil·lada. Introdueix la solució preparada dins del ruixador. Atenció, l'alcohol és altament inflamable, treballa sempre amb compte i allunyat de la flama! Per què s'utilitza etanol 70? Busca informació sobre que els passa als microorganismes amb aquesta solució. *Utilitzem alcohol 70 perquè a aquesta concentració és altament tòxica per molts organismes, ja que provoca que seu DNA i proteïnes precipitin*

Disseny experimental: Protocol

- 1) Ruixa la superfície de treball amb l'etanol 70 i neteja-la tota amb paper de cuina impregnat d'etanol 70. Ruixa't també les mans, així com el ganivet i unes pinces. Aparta el ruixador d'alcohol de la zona de treball i col·loca una espelma sobre la superfície esterilitzada. Encén-la i col·loca les plaques de petri al costat de l'espelma. Les espelmes enceses generen, per convecció, un flux d'aire que redueix el risc que partícules en suspensió (espores de fongs i bacteris) s'apropin a l'espelma i per tant a la placa. D'aquesta manera, es pot treballar en condicions d'esterilitat a uns 20 cm de radi de l'espelma encesa.

- 2) A prop de l'espelma, talla dos fragments petits (2 cm) del primer aliment, i amb les pinces col·loca un dels fragments a l'interior d'una xeringa. Per a fer-ho primer treu el protector de la xeringa i l'èmbol. Després de col·locar el primer fragment d'aliment a l'interior de la xeringa, torna a posar l'èmbol i amb compte agafa 2 ml de l'aigua esterilitzada a l'olla amb la xeringa carregada amb el fragment de l'aliment. L'objectiu és que a l'interior de la xeringa hi hagi un fragment d'aliment i 2 ml d'aigua. Col·loca el segon fragment de l'aliment a l'interior d'un tub FALCON, i deixa'l incubar a temperatura ambient, sense tancar el tub, durant 24 hores. Per què deixem una mostra 24 hores a la intempèrie abans d'analitzar-la? *Per a poder observar com de fràgil a nivell microbiològic és aquest aliment. Si un aliment és fungible, la seva càrrega bacteriana inicial augmentarà enormement en veure's exposat a l'exterior, davant d'un altre aliment més resistent al creixement bacterià.*
- 3) Sacseja durant 1 minut la xeringa per a què l'aigua renti l'aliment i arrossegui tots els possibles microorganismes de la seva superfície.
- 4) Per últim, a menys d'un pam de l'espelma, destapa la placa de petri i gota a gota reparteix els 2 ml de líquid de l'interior de la xeringa. Torna a tancar la placa. Per què utilitzem una xeringa i no una cullera? *Per què la xeringa és estèril al ser material quirúrgic correctament empaquetat.*
- 5) Destapa parcialment la tapa de cultiu, agafa un palet de les orelles pel centre i amb el cotonet reparteix el líquid per tota la superfície de la placa de petri. Torna a tancar la placa.
- 6) Deixa que el medi de cultiu absorbeixi les gotes d'aigua. (2 minuts) i a continuació col·loca les plaques boca baixa a l'interior de la incubadora. Programa-la a 37 graus. Per què 37 graus? *És la temperatura idònia per al creixement de molts microorganismes ja que és la temperatura on la majora d'enzims tenen el seu pic d'activitat.*
- 7) Incuba les plaques de petri a la iogurtera durant 7 dies.
- 8) Passades 24 hores fes una fotografia de cada placa per a monitoritzar el creixement bacterià. Anota totes les observacions que facis en una llibreta. Repeteix aquest procediment durant 1 setmana.
- 9) Passades les primeres 24 hores, repeteix el procediment d'inoculació de les plaques per a cada aliment, però aquest cop utilitzant el segon fragment d'aliment, el qual havies guardat a l'interior del tub FALCON sense tancar. **ATENCIÓ:** has de generar 1 nova placa per a cada mostra, d'aquesta manera tindràs 2 plaques per cada mostra (temps=0 h i temps=24 h). En total has de tenir 4 plaques per parella d'aliments: Placa 1: Aliment fresc X 0 h, Placa 2: Aliment fresc X 24 h, Placa 3: Aliment conservat X 0 h, Placa 4: Aliment conservat X 24 h.
- 10) Monitoritza el creixement bacterià fotografiant cada placa diàriament, durant 7 dies.
- 11) Després dels 7 dies, agafa un palet de les orelles, obre una placa (no són necessàries condicions d'esterilitat), frega una colònia de la superfície de la placa i passa el cotonet per sobre un porta objectes. Deixa passar 1 minut per a què la mostra s'assequi.
- 12) En aquest punt és molt important anar amb cura. No hem d'oblidar que estem tractant amb microorganismes i que aquests poden haver crescut molt durant aquest temps.
- 13) Amb una pipeta Pasteur col·loca unes quantes gotes d'etanol 96 sobre la preparació. Deixa'l evaporar.
- 14) Col·loca amb una altra pipeta Pasteur 1 gota de tinció (Blau de Metilè). Després renta la mostra sota l'aixeta amb aigua (baixa pressió). I deixa-la assecar i guarda-la.
- 15) Després de fer l'observació de les mostres és important posar la placa amb aigua i llegir durant uns minuts per tal d'assegurar-nos que no quedin microorganismes vius.

Resultats:

Fotografies amb anotacions de cada placa cada dia.

Fotografia de la visualització del camp del microscopi de cada mostra. Observacions.

Discussió:

En aquest apartat has de raonar els resultats que has obtingut. S'ajusten a la teva hipòtesi? Com els interpretaries? T'has endut alguna sorpresa? La discussió és la part més personal del mètode científic, és on pots exposar i raonar totes les teves idees, observacions i reflexions. Per a què una discussió estigui ben feta, és important contextualitzar els resultats en el tema que s'està investigant. Això significa que has de fer una recerca bibliogràfica dels conceptes més importants que estàs investigant i explicar com els teus resultats estan relacionats amb aquests conceptes.

T'ajudem a contextualitzar els resultats, busca informació sobre els següents conceptes: Pasteurització, activitat aquosa, fermentació làctica, aliments fumats, producció de fuet, mermelada i formatge i càrrega bacteriana. Com relacionaries aquests conceptes amb els teus resultats?

Conclusions:

En poques paraules (3 o 4 frases) has de dir si els teus resultats indiquen que la hipòtesi és certa o falsa i per què.

