

# Introducció al disseny experimental:

## Pràctiques de laboratori i de camp per a biòlegs

Universitat de Girona. 2010

### Autors:

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

**Sílvia Barrabés**  
**Marta Pérez-Garay**  
Bioquímica i Biologia Molecular

**Olga Serra**  
**Marc Yeste**  
Biologia Cel·lular

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES AMBIENTALS

**Marta Doncel**  
**Noemí Sánchez**  
Botànica

**Xavier Quintana**  
Ecologia

**Introducció al disseny experimental: Pràctiques de laboratori i de camp per a biòlegs**

Autors: Sílvia Barrabés, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Xavier Quintana, Noemí Sánchez, Olga Serra i Marc Yeste

**2010**

[www.udg.edu](http://www.udg.edu)

ISBN: 978-84-8458-338-7

Disenyy: Antonio Secilla

|                    |  |           |
|--------------------|--|-----------|
| <b>CAPÍTOL I</b>   | <b>MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL</b>                                       | <b>5</b>  |
|                    | Autor: Marc Yeste  |           |
|                    | 1. Ciència i filosofia de la ciència   | 5         |
|                    | 2. El mètode científic   | 9         |
|                    | 3. El disseny experimental (I): marc conceptual                                      | 15        |
|                    | 4. El disseny experimental (II): aspectes pràctics                                   | 17        |
|                    | 5. El disseny experimental (III): dissenys observacionals i dissenys manipulatius    | 21        |
|                    | 6. Bibliografia  | 26        |
| <b>CAPÍTOL II</b>  | <b>ESTUDI MANIPULATIU</b>  | <b>27</b> |
|                    | Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés, Marta Pérez-Garay                               |           |
|                    | 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià                            | 27        |
|                    | 1.a. Sessió introductòria  | 27        |
|                    | 1.a.1. Definició de la problemàtica  | 28        |
|                    | 1.a.2. Definició de la hipòtesi inicial i disseny experimental                       | 31        |
|                    | 1.a.3. El disseny experimental   | 32        |
|                    | 1.a.4. Els protocols de laboratori   | 33        |
|                    | 1.b. Sessions experimentals  | 34        |
|                    | 1.b.1. Contingut d'antocians a les patates de la varietat Àgata i Vitelotte          | 36        |
|                    | 1.b.2. Infecció amb <i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i>                | 42        |
|                    | a. Procediments previs   | 43        |
|                    | b. Inòcul puntual  | 47        |
|                    | c. Supervivència cel·lular   | 54        |
|                    | 1.b.3. Observació al microscopi òptic de la morfologia del tubercle de patata        | 62        |
|                    | 1.b.4. Activitat polifenoloxidasa (PPO) en patates de la varietat Àgata i Vitelotte  | 66        |
|                    | 2. Annexos   | 75        |
|                    | 2.a. Esquemes dels protocols   | 75        |
|                    | 2.b. Preparació del brou nutritiu  | 78        |
|                    | 2.c. Espectroscòpia d'absorció   | 79        |
|                    | 2.d. Seguiment d'una reacció enzimàtica  | 82        |
|                    | 2.e. Microscòpia òptica  | 84        |
|                    | 3. Bibliografia  | 86        |
| <b>CAPÍTOL III</b> | <b>ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU</b>  | <b>88</b> |
|                    | Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Xavier Quintana              |           |
|                    | 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora                              | 88        |
|                    | 1.a. Sessió introductòria  | 88        |
|                    | 1.a.1. Definició de la problemàtica  | 89        |
|                    | 1.a.2. Anàlisi de diferents dissenys experimentals a partir de dades bibliogràfiques | 92        |
|                    | 1.a.3. Proposta d'un disseny   | 96        |

|   |     |
|---|-----|
| 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la | 99  |
| 2.a. Sessió introductòria   | 99  |
| 2.a.1. Definició de la problemàtica i elecció del lloc de mostreig  | 99  |
| 2.a.2. Disseny experimental   | 101 |
| 2.b. Sessions experimentals   | 103 |
| 2.b.1. Els protocols  | 105 |
| 2.b.2. Sortida de camp  | 106 |
| a. Caracterització de l'àrea estudiada  | 109 |
| b. Mostreig en medi terrestre   | 111 |
| c. Mostreig en medi aquàtic   | 112 |
| 2.b.3. Anàlisi de clorofil·la   | 115 |
| a. Anàlisi de clorofil·la en productors primaris d'origen terrestre   | 118 |
| b. Anàlisi de clorofil·la en productors primaris d'origen aquàtic   | 124 |
| 2.b.4. Anàlisi de les dades   | 133 |
| 3. Bibliografia   | 136 |

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 1. Ciència i Filosofia de la Ciència

### 1.1. El problema del coneixement

La pedra angular de la filosofia de la ciència és, sobretot i per sobre de tot, el problema del coneixement.

Què és la realitat? Com coneixem la realitat que ens envolta? És objectiu el coneixement que tenim sobre un objecte o sobre un fenomen particular? O, al contrari, és simplement un acte subjectiu i, per tant, allò que coneixem ho coneixem de manera particular com a subjectes cognoscents i pensants que som?

En primer lloc hem de dir que el coneixement de qualsevol cosa és, sempre, una relació entre dos termes. El subjecte que és cognoscent (coneixedor) i l'objecte (la cosa) que és conegut. L'epistemologia estudia la relació entre el subjecte i l'objecte i tots els problemes que aquesta relació planteja. Es planteja preguntes com:

- Existeix la relació objecte–subjecte?
- Quin és l'origen d'aquesta relació?
- Té límits aquesta relació?

Com que la resposta a aquestes preguntes no és una resposta aïllada per a cada cas, sinó que és, i ha de ser, una resposta integrada i de conjunt, la relació d'un coneixement determinat no es pot estudiar deixant de banda el subjecte i/o l'objecte. De fet, el coneixement pot ser entès de diverses maneres: com una contemplació, com una assimilació o com una creació. És una contemplació perquè conèixer és veure; una assimilació perquè és nodrir-se, i una creació perquè és engendrar. Per al món grec és una contemplació (Plató), per al món medieval és una assimilació (sant Tomàs) i per al món modern és una creació (Hegel).

També durant la història del pensament occidental, l'origen, el valor i l'objecte del coneixement han estat entesos i compresos de diverses maneres. Per als racionalistes (Descartes, Leibniz), l'origen

del coneixement està en l'esperit humà (o «ànima» de l'home); per als empiristes (Bacon, Locke, Berkeley, Hume) i per als positivistes (Comte, Stuart Mill), en l'experiència, i per als crítics (clàssics com Kant, o racionalistes crítics com Popper), conjuntament en la raó i l'experiència. Per als escèptics, en canvi, el coneixement depèn de les circumstàncies o de l'individu (subjecte), la qual cosa condueix a l'absència de coneixement objectiu o, com deien els clàssics grecs, de veritat.

### 1.2. Què és la ciència?

La ciència és un tipus de coneixement fenomènic, ordenat, metòdic, parcial i objectiu, que analitza l'objecte a partir de les seves causes. El coneixement científic no aspira a comprendre les coses superficialment, sinó que pretén entendre'n les causes perquè d'aquesta manera s'explicaran millor els seus efectes. Per conèixer les coses amb profunditat necessitem emprar la raó, observar de manera detinguda les coses. Això requereix, i exigeix, molt temps de dedicació, constància, ordre i mètode. Aquestes característiques són les que, de fet, diferencien el coneixement científic de la resta de coneixements o sabers.

Tanmateix, com sabem, actualment el coneixement de les disciplines més diverses es defineix ell mateix com a científic. La biologia, la física, la química, la geologia, la medicina..., però també la sociologia, la psicologia, la politicologia..., es defineixen elles mateixes com a ciències, perseguint així la constatació que el coneixement que proporcionen és, per damunt de qualsevol cosa, objectiu i universalment vàlid. Perquè, de fet, la ciència és descriptiva, explicativa, definidora; investiga què són les coses, com són, o com es relacionen. Les ciències pretenen establir lleis, basades en conceptes generals, en les característiques en comú que tenen les coses i en el que es repeteix en els fenòmens.

A partir d'aquí podem establir la diferència bàsica entre el saber filosòfic i el saber científic. Fins al segle XV, ambdós eren la mateixa cosa. Però a partir d'aleshores, se separen i, si bé la filosofia busca

## 1. Ciència i Filosofia de la Ciència

conèixer els principis més profunds de les coses, les ciències particulars en cerquen les causes més pròximes.

### 1.3. Quin és el valor de la ciència?

Hi ha diferents punts de vista sobre el valor de la ciència. En alguns casos aquests punts de vista poden arribar a ser oposats entre ells. Així, per a alguns, la funció de la ciència és proporcionar una explicació possible i versemblant dels fets i dels esdeveniments. Per a altres autors, la ciència ha de ser capaç d'oferir un sistema únic que desxifri la realitat, que també és única. Atès que no hi ha dues realitats, no hi pot haver dues explicacions vàlides sobre la realitat. La ciència és una perquè la realitat és una. Per a aquestes persones la funció de la ciència és cognoscitiva, aspira a conèixer la realitat.

Uns altres autors proposen que la ciència no és sinó una creació de l'home (idealisme). Veuen el principal valor de la ciència en el descobriment de les harmonies del pensament, que poden coincidir o no amb l'harmonia de la realitat.

Molts matemàtics han concebut la seva ciència com si fos un joc d'escacs, en el qual el propi pensament és qui dicta les lleis científiques a les quals ell mateix se sotmet. En aquest cas la funció de la ciència seria, sobretot, estètica (tal com el mateix Kant defineix l'estètica transcendental a la Crítica de la Raó Pura).

Finalment, alguns epistemòlegs consideren que la funció de la ciència és, bàsicament, pràctica, de manera que la ciència és un instrument per dominar la realitat.

### 1.4. Les característiques del coneixement científic

El coneixement científic és un saber crític (fonamentat), metòdic, verificable, sistemàtic, unificat, ordenat, universal, objectiu, comunicable (per mitjà del llenguatge científic), racional, provisional i que explica i prediu fets per mitjà de lleis (científiques).

El coneixement científic és crític perquè tracta de distingir el que és veritat del que no ho és. Es distingeix de la resta perquè justifica el que coneix, dóna proves, i demostra que allò que enuncia és cert.

Es fonamenta en els mètodes d'investigació. El científic segueix procediments i desenvolupa la seva tasca basant-se en un pla previ. La investigació científica no és erràtica ni arbitrària, sinó planejada.

La seva verificació és possible mitjançant l'experiència. Si bé també és cert que les tècniques de verificació evolucionen i han evolucionat al llarg del temps.

És sistemàtic perquè és una unitat ordenada. Així, els nous coneixements s'integren en el sistema i es relacionen amb els que ja existien. És ordenat perquè no és un simple sumatori o agregat d'informacions aïllades, sinó un sistema d'idees connectades entre elles.

És un saber unificat perquè no busca un coneixement d'allò que és singular i concret, sinó un coneixement d'allò que és general; és a dir, que persegueix conèixer el component d'identitat i permanència que tenen les coses.

És universal perquè és vàlid per a totes i cadascuna de les persones, sense que hi hagi ni fronteres ni discriminacions ni determinacions de cap tipus. El coneixement científic no varia entre les diferents cultures.

És objectiu perquè és vàlid per a tots els individus i no sols per a un individu determinat. És de valor general i no de valor singular o individual. Pretén conèixer la realitat tal com és; la garantia d'aquesta objectivitat són les seves tècniques i els seus mètodes d'investigació i demostració.

És comunicable mitjançant el llenguatge científic, que és precís i unívoc, comprensible per a qualsevol subjecte capacitat, el qual podrà obtenir els elements necessaris per comprovar la validesa de les

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 1. Ciència i Filosofia de la Ciència

teories en els seus aspectes lògics i verificables.

És racional perquè la ciència coneix les coses mitjançant l'ús de la intel·ligència, de la raó.

El coneixement científic és provisional perquè la tasca de la ciència no s'atura, sinó que prossegueix sempre les seves investigacions per tal de comprendre millor la realitat. La recerca de la veritat científica és, per tant, una tasca oberta i dinàmica.

La ciència explica la realitat mitjançant lleis; aquestes són les relacions constants i necessàries dels fets entre ells. Són proposicions universals que estableixen en quines condicions es produeix un fet determinat. A partir de les lleis, es poden comprendre uns fets particulars i, alhora, predir-ne d'altres. En qualsevol cas, les explicacions dels fets que la ciència elabora són sempre racionals i s'obtenen mitjançant l'observació i l'experimentació.

L'argentí Mario Bunge defineix la ciència de manera més concreta així: «La ciència busca explicar la realitat mitjançant lleis, les quals possibiliten, a més de prediccions, aplicacions pràctiques (la tecnologia). El coneixement científic és un coneixement objectiu que s'estructura en sistemes verificables, obtinguts metòdicament i comunicats mitjançant un llenguatge construït amb regles precises i explícites en el qual s'evita l'ambigüitat de les expressions».

### 1.5. L'objectivitat del coneixement científic

Qualsevol coneixement que s'autodenomina ell mateix científic té la pretensió d'oferir una explicació objectiva dels fets. Això vol dir que per explicar com és la realitat no hi ha d'intervenir res d'individual (subjectiu), ni preferències ni tendències ni aspiracions ni opinions...

Malgrat aquesta declaració de principis que acabem de fer, s'ha de dir que la ciència també és veure la realitat a través d'una manera de pensar. És a dir, malgrat la pretensió d'objectivitat que té, i que el coneixement científic és el més objectiu dels

possibles, la ciència també és un producte humà i, per tant, les coses no són el que són en elles mateixes (i aquí podem recuperar de nou Kant), sinó que són allò que nosaltres percebem que són. Aquesta és, òbviament, una limitació de l'objectivitat pretesa, atès que introdueix un clar component subjectiu, que s'accepta, i que es persegueix reduir a la mínima i, alhora, inevitable expressió.

La ciència, per tant, intenta eliminar qualsevol subjectivitat possible. Això no significa l'eliminació del subjecte, sinó que n'implica la intervenció activa a través de la intel·ligència. L'eliminació de la subjectivitat significa, de fet, l'eliminació dels elements afectius i voluntaristes. Aquests elements, doncs, no s'han d'incorporar al sistema de relacions que constitueixen la base de la ciència, ni han de modificar-ne la finalitat, que és conèixer la realitat. Per tot plegat, podem concloure que la ciència és objectiva però, alhora, és un coneixement humà.

### 1.6. Característiques que expliquen l'objectivitat de la ciència

L'objectivitat de la ciència té les característiques pròpies següents:

1) **El conjunt d'objectes estudiat, que està format per fets exteriors al subjecte**, i són independents de qui els formula. Per tant, són fets o esdeveniments que no impliquen la subjectivitat de l'investigador.

2) **El llenguatge emprat**. S'utilitza un llenguatge format per termes unívocs, que evita la confusió dels significats i no dona lloc a l'ambigüitat.

3) **El mètode rigorós**. El mètode que se segueix és la clau de volta del coneixement científic. El mètode científic és rigorós i requereix coherència i lògica en la seva part teòrica, i l'adequació als fets en la seva part pràctica. Per mitjà d'un mètode establert i seguint un conjunt de passos ben definits s'arriba als resultats buscats. Aquest mètode no pot ser aleatori ni eludible, sinó que ha de ser establert com a premissa i s'ha de seguir escrupolosament.

## 1. Ciència i Filosofia de la Ciència

**4) Els subjectes que formulen teories i lleis científiques.** Els membres de la comunitat científica són els qui formulen i controlen les teories científiques. La societat científica és disciplinada, i les teories que es creen són sotmeses a una crítica per part de la resta de membres de la comunitat, que poden aprovar-ne o rebutjar-ne la utilitat. Això garanteix l'objectivitat i la versemblança d'aquestes teories.

Respecte a aquest darrer punt cal fer, però, un comentari addicional. I és que, de vegades, coexisteixen teories que són contràries entre elles. Això implica que en alguns casos és difícil establir la validesa o invalidesa d'una teoria o llei. Per tal d'explicar aquesta situació, s'al·lega que és possible la manca d'acord respecte a l'objecte estudiat entre la comunitat científica. En aquest cas, no hi sol haver ningú completament equànime que pugui decidir entre teories rivals aquella que tingui un major component d'autenticitat.

Una de les crítiques més destacables que es fa al coneixement científic fa referència al rigor del mètode. Es critica que el mètode és un mitjà, però que no és possible arribar a tots els objectes cognoscibles a través del mateix mitjà. A més, com que el mètode sorgeix del subjecte, no pot atorgar objectivitat per ell mateix al coneixement que es persegueix.

### 1.7. Classificació de les ciències

La divisió més acceptada és la de **ciències fàctiques** i **ciències formals**.

Les ciències fàctiques treballen amb objectes reals. La paraula fàctica ve del llatí factum, que significa 'fet', és a dir, que treballa amb fets. Se subdivideixen en naturals i socials; les primeres es preocupen per la natura i l'entorn en general, i les segones per l'àmbit humà.

Les ciències naturals són la biologia, la física, la química, etc. I les socials són la sociologia, l'economia, la psicologia, etc. La veritat d'ambdós tipus de ciències és fàctica perquè depèn de fets i és provisional perquè les noves investigacions poden presentar elements per a la seva refutació.

Les formals treballen amb formes, és a dir, amb conceptes ideals, que són creats per l'home, que es troben a la seva ment i que són obtinguts per abstracció. Són ciències formals la lògica i la matemàtica. Els interessen les formes i no els continguts, no els interessa tant el que es diu sinó el com es diu.

Així, mentre les ciències formals demostren o proven, les ciències fàctiques verifiquen (confirmen o refuten) hipòtesis que majoritàriament són provisionals. La demostració és completa i final; la verificació (podríem parlar també de contrastació) és incompleta, temporal i provisional (tal com afirma Karl R. Popper).



# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 2. Què és el mètode científic?

### 2.1. Conceptes generals

El mètode científic comprèn els passos lògics que integren el desenvolupament racional del coneixement. Un famós historiador de la ciència, J. B. Conant, es burlava de qui creia que existeix alguna cosa semblant al mètode científic.

Entre els mètodes que utilitza el científic hi ha mètodes definidors, mètodes classificatoris, mètodes estadístics, mètodes hipoteticodeductius, procediments de mesura i moltes altres variants. Per tant, parlar de mètode científic és referir-se a moltes tàctiques utilitzades per tal de construir el coneixement. De fet, els mètodes i la mateixa noció de ciència es van modificant al llarg de la seva història, encara que entre tantes diferències hi trobem estratègies fonamentals.

Actualment, el mètode científic hipoteticodeductiu és la base del desenvolupament i investigació en les anomenades ciències «dures» (és a dir, la física, la química, la biologia, la geologia...) i les anomenades ciències «toves» (com, per exemple, la psicologia, la sociologia...). En ambdós casos, el mètode científic que s'utilitza actualment es basa en els passos següents: observació, experimentació, hipòtesi i teoria.

### 2.2. Per què parlem de mètode?

Es defineix com a mètode el procediment ordenat que pretén assolir un objectiu concret. El mètode determina les regles de la investigació dels fets, i la demostració de les veritats científiques. Engloba l'estudi dels medis pels quals s'estén el coneixement humà i ordena els seus coneixements.

Cadascuna de les ciències té un mètode específic, propi de l'objecte formal del seu estudi. Tanmateix, hi ha un conjunt de característiques generals que es compleixen en totes les ciències. Aquestes característiques estan relacionades amb les dues activitats fonamentals de la ciència:

1) L'establiment dels principis parteix de l'experiència (o d'hipòtesis o postulats).

2) A partir dels principis establerts, s'utilitza la demostració a fi d'obtenir les conclusions que formen el coneixement científic.

Podríem dir, doncs, que la ciència és el coneixement d'unes conclusions, obtingudes per demostració a partir d'uns principis. Un saber científic és, així, un ordre de proposicions, relacionades entre elles mitjançant nexes demostratius. Per tot plegat, els elements més importants del mètode científic són:

- L'establiment dels principis
- La investigació experimental
- Els procediments de la demostració.

Dins d'aquest conjunt de regles que són els mètodes, hi distingim el mètode d'investigació (o descobriment), en el qual intervenen l'experiència, la raó, les hipòtesis del treball i gairebé tots els elements lògics de la ciència.

La investigació comprèn diversos passos:

- Selecció i determinació dels problemes més importants.
- Estudi de les possibles solucions, comparant diferents posicions històriques o d'altres autors.
- Formulació de les conclusions segures, diferenciant-les de les hipotètiques.
- Crítica de les posicions adverses.
- L'anàlisi, que va de les qüestions generals a les seves parts, i la síntesi que reconstitueix el tot partint dels resultats de l'anàlisi.

### 2.3. Història del mètode científic

#### 2.3.1. Context històric

El naixement de la filosofia a l'antiga Grècia com a contraposició a l'ús dels mites per respondre les preguntes que les persones d'aquell temps es plan-

## 2. Què és el mètode científic?

tejavent, representa un pas de gegant pel que fa al que els filòsofs antics denominaven «l'edifici del coneixement».

Per als filòsofs grecs, la ciència s'entenia d'una manera diferent de com l'entendem avui, lligada sobretot a la filosofia. Així, Aristòtil (al seu llibre Física) va definir la ciència com un coneixement cert a partir de les causes de les coses. Per a ell, la ciència és un hàbit intel·lectual especulatiu des del punt de vista subjectiu; i un conjunt de coneixements des del punt de vista objectiu. L'objectiu de la ciència és que coneguem el món, a nosaltres mateixos i Déu. L'home es dedica a la ciència mogut pel seu afany de saber o per satisfer les seves necessitats.

Actualment, un bon nombre d'historiadors de la ciència consideren que l'iraquí Al-Hasan (965-1039) és el precursor del mètode científic modern. Al-Hasan va desenvolupar la seva activitat investigadora mitjançant l'aplicació de mètodes experimentals rigorosos per tal de verificar i contrastar hipòtesis teòriques.

El concepte de ciència que tenim actualment és una evolució de la noció que es tenia en els segles XV-XVI. Així, la ciència, com a coneixement derivat de l'aplicació del mètode científic, inicia el seu camí a partir del Renaixement (segle XV) i sobretot a partir de l'obra del pisà Galileo Galilei (1564-1642).

El paper que l'epistemologia (genèricament denominada «filosofia de la ciència») ha tingut en la formulació del mètode científic discorre, de fet, paral·lela a la mateixa evolució de la ciència a partir del segle XVI. Podríem dir, doncs, que la història del mètode científic està relacionada molt estretament amb la història de la ciència, i que, de fet, la història del mètode científic és una part de la història de la ciència en general.

El desenvolupament i explicació de les regles a favor del raonament científic ha estat un tema de debat intens en els darrers 500 anys. Així, els filò-

sòfs naturals i els científics han defensat, en cada cas, la preponderància d'una aproximació concreta respecte al mètode que s'ha d'utilitzar quan es pretén obtenir un coneixement rigorós dels fets (el que es denomina «coneixement científic»).

Malgrat els desacords pel que fa a l'enfocament que s'ha d'aplicar, sempre hi ha hagut tendències força clares i unitàries que han determinat el desenvolupament del mètode científic fins a l'estructura amb la qual l'utilitzem actualment.

Un dels debats més importants en la història del mètode científic ha estat la contraposició del mètode inductiu (fins al segle XIX) (empiristes anglesos) i el mètode hipoteticodeductiu (K. R. Popper, entre d'altres). A partir del segle XX, la discussió entre els metodòlegs de la ciència ha consistit en la contraposició entre un mètode científic clarament definit i estructurat, i l'aparició dels denominats paradigmes i revolucions científiques (T. Kuhn i I. Lakatos).

### 2.3.2. Les principals aportacions històriques al mètode

Com ja hem indicat, l'epistemologia és una branca de la filosofia que s'encarrega dels problemes filosòfics que envolten la teoria del coneixement. Els seus principals problemes són: la possibilitat del coneixement, el seu origen o fonament, la seva essència o transcendència i el criteri de veritat.

Respecte al coneixement científic, hi ha i hi ha hagut diferents punts de vista durant la història del pensament occidental, de manera que les maneres de pensar i de concebre la ciència han canviat al llarg del temps. De fet, l'evolució del mètode ha estat paral·lela a l'aparició de nous descobriments que descarten coneixements previs.

#### El mètode segons René Descartes

Per a Descartes, el mètode, que és deductiu, són «regles certes i fàcils, gràcies a les quals qui les observi exactament no prendrà mai el fals per verdader; i

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 2. Què és el mètode científic?

arribarà, sense gastar inútilment cap esforç del seu esperit, sinó augmentant sempre, gradualment, la seva ciència, al verdader coneixement de tot allò de què sigui capaç». Per a Descartes, el criteri que permet no confondre el fals amb el verdader és l'evidència. En el seu *Discurs del Mètode* defineix com a constituents d'aquest les quatre regles següents:

- No acceptar com a vertader el que amb tota evidència no es reconegui com a tal.
- Dividir cada una de les dificultats en tantes parts com sigui necessari per resoldre-les (anàlisi).
- Ordenar els coneixements des dels més senzills fins als més complexos
- Fer enumeracions completes i generals que assegurin que no s'ha omès res de fonamental

### El mètode segons Galileu

Galileu afirmava que la lògica deductiva ens permet reconèixer la versemblança dels raonaments, però no ens permet dur a terme nous descobriments. Per tant, per a ell el mètode consisteix en la demostració rigorosa, prenent com a model la matemàtica, aplicada a enunciats certs i verificats per mitjà de l'experiència. Galileu estava convençut que un cop feta la demostració empírica és impossible que hi hagi errors i és impossible que hi hagi termes mitjans entre la certesa i la falsedat. Galileu sostenia que el mètode d'Aristòtil era el seu: limitar-se als sentits, a l'observació, a les experiències, i després buscar els mitjans per demostrar això i no una altra cosa.

### El mètode segons Francis Bacon

Francis Bacon pensava que no ens hem de limitar a la simple experiència subministrada pels sentits (empirisme) ni a la simple raó (racionalisme). És a dir, no hem de ser ni empírics ni dogmàtics.

A la seva obra *Novum Organum*, Bacon assenyala els prejudicis que impedeixen el progrés científic

(que va batejar com a «fantasmes»: tribu, caverna, fòrum i teatre). Oposa el seu mètode al de la inducció completa, que consisteix a obtenir d'un conjunt de casos una afirmació general que val per a tots els casos. També contraposa el seu mètode a la deducció pura perquè, segons ell, no permet avançar en el coneixement. Per tant, per a Bacon el coneixement ha de venir d'utilitzar un altre mètode. No consisteix només a fer una experiència, sinó que cal variar-la, transferir-la, prolongar-la, invertir-la, i comparar-la. Les experiències han de ser registrades i són: de presència, d'absència i de comparació.

### Els mètodes de John Stuart Mill

Per a Stuart Mill els mètodes són quatre: el de concordança, el de diferència, el de variacions concomitants i el de residus.

– Mètode de concordança. Si dos o més casos tenen una circumstància comuna, aquesta és la causa (o efecte) del fenomen. Es tracta d'estudiar casos diferents per veure en què concorden.

– Mètode de diferència. Si un cas on es presenta el fenomen i un altre on no es presenta tenen totes les circumstàncies comunes menys una, aquesta és la causa (o part de la causa) del fenomen. Es tracta de buscar casos que s'assemblin en totes les seves circumstàncies i difereixen en alguna d'elles.

– Mètode conjunt de concordança i diferència. Es tracta de la utilització conjunta dels altres dos mètodes: una concordança i una diferència.

– Mètode de variacions concomitants. Es tracta d'establir relacions de causa i efecte entre dos fenòmens. Els fenòmens estudiats podrien ser ambdós efectes d'una mateixa causa.

– Mètode de residus. Es tracta d'esbrinar les causes la presència de les quals no pot ser eliminada per experimentació.

## 2. Què és el mètode científic?

### 2.3.3. Principals teòrics del coneixement i el mètode

- **Plató** d'Atenes (428 aC - 347 aC), filòsof grec, un dels pensadors més originals i influents en tota la història de la filosofia occidental.
- **Aristòtil** d'Estagira (384 aC - 322 aC), filòsof i científic grec, considerat, al costat de Plató i Sòcrates, un dels pensadors més destacats de l'antiga filosofia grega i probablement el més influent en el conjunt de tota la filosofia occidental.
- **Francis Bacon** (1561-1626), filòsof i estadista anglès, un dels pioners del pensament científic modern.
- **Galileu** (1564-1642), físic i astrònom italià que, juntament amb l'astrònom alemany Johannes Kepler, va començar la revolució científica que va culminar amb l'obra del físic anglès Isaac Newton.
- **René Descartes** (1596-1650), filòsof francès, científic i matemàtic, considerat el fundador de la filosofia moderna.
- **Immanuel Kant** (1724-1804), filòsof alemany, considerat un dels pensadors més influents del pensament occidental. Creador de l'idealisme transcendent, vol superar l'escepticisme de Hume i el racionalisme de Descartes.
- **Georg Wilhelm Friedrich Hegel** (1770-1831), filòsof alemany, màxim representant de l'idealisme i un dels teòrics més influents en el pensament universal del segle XIX. Elabora el mètode dialèctic.
- **August Comte** (1798-1857), filòsof francès, considerat el fundador del positivisme i de la sociologia, contribueix al mètode científic des de l'àmbit de les ciències socials.
- **John Stuart Mill** (1806-1873), filòsof i economista britànic que va causar un gran impacte en el pensament britànic del segle XIX.

- **Albert Einstein** (1879-1955), físic alemany nacionalitzat nord-americà, premiat amb un Nobel, famós per ser l'autor de les teories general i restringida de la relativitat, i per les seves hipòtesis sobre la naturalesa corpuscular de la llum. És probablement el científic més conegut del segle XX.

- **Karl R. Popper** (1902-1994), filòsof i teòric de la ciència, contribueix de manera decisiva al mètode hipoteticodeductiu, a partir del reforç de la lògica del raonament deductiu. Positivista crític, reacciona al neopositivisme del Cercle de Viena.

### 2.4. Marc conceptual i tipus de mètodes d'investigació

Hi ha regles fàcils i precises que permeten dur a terme una investigació científica? L'investigador ha de disposar, si no de quelcom de definitiu i infal·lible, almenys d'algunes normes elementals que li estalviïn el malbaratament d'esforços i temps. El mètode d'investigació s'entén com la «brúixola en la qual no es produeix automàticament el coneixement, però que ens evita perdre'ns en el caos aparent dels fenòmens, encara que només sigui perquè ens indica com no hem de plantejar els problemes i que no hem de caure en els nostres prejudicis predilectes» (Bunge, 1972).

L'objectiu del mètode científic, amb independència de l'objecte al qual s'aplica, és la resolució de problemes.

### Quines classes de mètodes de recerca hi ha?

Podem establir dues grans classes de mètodes d'investigació: els mètodes lògics i els empírics. Els primers són tots aquells que es basen en la utilització del pensament en les seves funcions de deducció, anàlisi i síntesi (ciències formals), mentre que els mètodes empírics (ciències fàctiques) s'aproximen al coneixement de l'objecte mitjançant el seu coneixement directe i l'ús de l'experiència. Entre ells trobem l'observació i l'experimentació.

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 2. Què és el mètode científic?

### 2.4.1. Mètode lògic-deductiu

Consisteix en l'aplicació dels principis generals a casos particulars. El paper de la deducció en la investigació és doble:

- En primer lloc, consisteix a trobar principis desconeguts a partir dels coneguts. Una llei o principi pot donar lloc a una altra de més general que la inclogui. Si un cos cau diem que pesa perquè és un cas particular de la gravitació.
- En segon lloc, també ens permet descobrir conseqüències desconegudes a partir de principis coneguts. Si sabem que la fórmula de la velocitat és  $v = s/t$ , podrem calcular la velocitat d'un avió.

La matemàtica és la ciència deductiva per excel·lència, atès que parteix d'axiomes i definicions. Dins del mètode lògic-deductiu, hi distingim:

- La deducció directa. A partir d'una premissa, s'arriba a una conclusió directa.
- La deducció indirecta. Necessita sil·logismes lògics. S'entén per sil·logisme l'argument que consta de tres proposicions, en el qual la relació entre dues premisses és mitjançada per un tercer terme. La premissa major conté la proposició universal, la premissa menor conté la proposició particular, i de la seva comparació se n'extreu la conclusió. Exemple: «A és B», «B és C», per tant «A és C».

### 2.4.2. Mètode hipotètic-deductiu

Un investigador proposa una hipòtesi com a conseqüència de les seves inferències del conjunt de dades empíriques o de principis i lleis més generals. En el primer cas, la hipòtesi es formula mitjançant un raonament inductiu, en el segon cas s'aplica la lògica deductiva. Ho veurem més en detall a l'apartat 2.5.

### 2.4.3. Mètode lògic-inductiu

Partint de casos particulars s'eleva a coneixements generals. Aquest mètode permet la formulació

d'una hipòtesi, la investigació de lleis científiques, i les demostracions. La inducció pot ser completa o incompleta. D. Hume, B. Russell, o K. R. Popper, entre molts altres, expressen reserves molt importants a la lògica del raonament inductiu.

### 2.4.4. Mètode analògic

Consisteix a inferir de la semblança d'algunes característiques entre dos objectes la probabilitat que les característiques restants siguin també semblants. Els raonaments analògics no són sempre vàlids.

### 2.4.5. Mètode dialèctic

La característica essencial del mètode dialèctic és que considera els fenòmens històrics i socials en moviment continu (G. W. F. Hegel). És l'origen del materialisme històric (K. Marx), que explica quines són les lleis que regeixen les estructures econòmiques i socials, les seves superestructures corresponents i el desenvolupament històric de la humanitat. Aplicat a la investigació, afirma que tots els fenòmens es regeixen per les lleis de la dialèctica, és a dir, que la realitat és dinàmica i està subjecta a contradiccions i a una evolució i desenvolupament perpetus. Per tant, el materialisme dialèctic i la dialèctica hegeliana proposen que tots els fenòmens han de ser estudiats en les relacions que aquests estableixen amb altres fenòmens i en el seu estat de canvi continu, perquè res no existeix com a objecte aïllat.

Aquest mètode descriu la història del que ens envolta, de la societat i del pensament, a través d'una concepció de lluita de contraris i no purament contemplativa, més aviat de transformació. Aquestes concepcions, pel seu caràcter dinàmic, exposen no sols els canvis quantitius, sinó els radicals o qualitius.

Tanmateix, les ciències experimentals dures mai no han utilitzat el mètode dialèctic; i el seu ús a les toves (com la sociologia i l'economia) no ha estat mai exempt de polèmica (funcionalistes vs. marxistes).

## 2. Què és el mètode científic?

Uns altres mètodes que no analitzarem en detall són:

- Mètode sintètic
- Mètode analític
- Mètode històric
- Mètode genètic
- Mètode de la concreció
- Mètode del modelatge
- Mètode sistèmic

### 2.5. El mètode hipotètic-deductiu

Com ja hem apuntat, les ciències fàctiques o empíriques són aquelles que estudien els fenòmens observables a l'entorn. Se'ls diu experimentals perquè parteixen de l'experiència i utilitzen com a criteri per acceptar les seves tesis la verificació experimental, i la seva comprovació en l'experiència.

L'experiència es defineix, per tant, com tot objecte, fet o fenomen susceptible de ser observat o experimentat a través de la percepció sensible. Tradicionalment, se les ha anomenat ciències inductives, ja que partint de l'experiència, de l'observació, pretenen assolir tesis o lleis que es puguin aplicar universalment. És problema de la inducció com a partir de les dades observades es pot fer una generalització universal. El mètode inductiu avui dia l'anomenem mètode hipoteticodeductiu. El seu creador va ser Galileu (1564-1642), i també William Whewell (1794-1866), amb grans aportacions i crítiques de lògics i teòrics de la ciència de l'actualitat.

Aquest mètode té les fases següents:

1. **Observació d'un fenomen** o problema, que constituirà l'objecte formal del nostre estudi.
2. **Formulació d'una hipòtesi** o conjunt d'hipòtesis que permeti resoldre el problema que hem plantejat.
3. **Disseny d'un experiment** o conjunt d'experiments que permeti contrastar la nostra hipòtesi i permeti determinar si és vertadera o falsa.
4. Segons els resultats del nostre experiment, determinarem si hem d'**acceptar** la nostra **hipòtesi** plantejada en el segon pas com a vertadera, o bé si l'hem de **refutar** i per tant formular una nova hipòtesi i, consegüentment, un nou experiment a fi de verificar-la o refutar-la.
5. **Formulació i expressió matemàtica de la llei** (generalització).

El conjunt de lleis forma una teoria que s'aplica de manera deductiva com els axiomes en les matemàtiques.

Per tal de comprovar la hipòtesi (pas 3), necessitem dissenyar un experiment o conjunt d'experiments dins d'un marc teòric que s'inclou en el mateix concepte del mètode hipoteticodeductiu. Precisament, dedicarem el pròxim apartat al disseny experimental.

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 3. El disseny experimental (I): marc conceptual

En l'execució del mètode científic, la verificació empírica de les hipòtesis hi té un paper fonamental. A fi de verificar empíricament els nostres enuncisats hem de dissenyar un experiment o conjunt d'experiments, que no són sinó els elements que definiran:

- Quins fenòmens observem.
- Com estudiem aquests fenòmens i com recollim les dades, per tal d'obtenir la màxima quantitat d'informació.

Tant si duem a terme un treball de camp com si fem un experiment al laboratori, el disseny de què fem i com ho fem és fonamental.

Quan parlem de dissenyar experiments, el concepte de rèplica, és a dir, el fet de repetir un experiment diverses vegades, cal tenir-lo ben present. De fet, necessitem un coneixement bàsic sobre estadística i teoria de la probabilitat per entendre ben bé què és i com es fa un disseny experimental correcte.

### 3.1. Què és un disseny experimental?

Una vegada definit l'objecte d'estudi que es vol estudiar i establertes les hipòtesis d'investigació, el científic ha de concebre la manera pràctica i concreta de respondre les preguntes plantejades. Això implica desenvolupar un disseny experimental per tal d'aplicar-lo al context particular del seu estudi. S'entén per disseny l'estratègia concebuda per respondre les preguntes d'investigació. El disseny assenyala a l'investigador el que ha de fer per assolir els seus objectius d'estudi, contestar les preguntes que s'ha plantejat i analitzar la certesa de les hipòtesis formulades en un context concret.

Si el disseny està correctament elaborat, la probabilitat que les conclusions de l'estudi siguin certes i, per tant, vàlides, serà més gran.

### 3.2. Què és un experiment?

El terme *experiment* té dues accepcions, una de general i una de particular. La regla general es refe-

reix a «dur a terme una acció concreta» i després observar-ne les conseqüències.

L'accepció particular (científica) del terme *experiment* seria la manipulació intencionada d'una acció per tal d'analitzar-ne i valorar-ne els possibles efectes. Seria «un estudi en el qual es manipulen deliberadament una o més variables independents dins d'una situació de control per part de l'observador/investigador» (Díez-Calzada i Moulines, 1999).

### 3.3. Quin és el primer requisit d'un experiment?

El primer requisit és la manipulació intencionada d'una o més variables independents. La variable independent és considerada com a «causa» en una relació entre variables; és la condició antecedent. La variable dependent (o conseqüent) serà «l'efecte» provocat per la causa (variable independent).

Per tal d'obtenir resposta sobre l'existència d'aquesta presumpta relació de causa-efecte, l'investigador manipula la variable independent i observa si la dependent varia o no. Manipular és donar diferents valors a la variable independent. Posteriorment, la variable dependent no es manipula, sinó que es mesura, per veure l'efecte que li ha provocat la manipulació de la variable independent.

#### Graus de manipulació d'una variable independent

La manipulació d'una variable independent pot fer-se en dos o més graus. Els nivells mínims de manipulació són dos: presència-absència de la variable independent. Cada nivell o grau de manipulació implica un grup experimental més.

#### a) Nivell de presència-absència (dos graus)

Un grup presenta la variable independent (grup experimental o problema) i l'altre, no (grup control). Després, es comparen els dos grups per veure si el grup que s'exposa a la variable independent difereix del grup que no s'hi exposa. La pre-

## 3. El disseny experimental (I): marc conceptual

sència de la variable independent se l'anomena «tractament experimental».

### b) Més de dos graus

La variable independent es manipula en diversos nivells, la qual cosa presenta l'avantatge que no sols podem determinar l'efecte de la presència-absència del tractament experimental, sinó també si diferents nivells de la variable independent produeixen efectes diferents. És a dir, si la magnitud de l'efecte ( $Y$ ) depèn de la intensitat de l'estímul ( $X_1, X_2, X_3...$ ).

Hi ha d'haver almenys dos nivells de variació i ambdós hauran de diferir entre ells. A mesura que hi hagi més graus de variació, l'experiment s'anirà complicant, però, alhora, s'obtindrà més informació sobre la relació causal de les variables. Com ja hem apuntat, un grau més implica un grup experimental més.

### Com es manipula la variable independent?

Per tal de determinar com manipulem la variable independent podem seguir diverses estratègies:

1. Consultar experiments precedents per esbrinar com es va manipular la variable. És imprescindible analitzar si la manipulació d'aquests experiments és extrapolable al nostre experiment.

2. Avaluar la manipulació abans de començar l'experiment. Abans de manipular una variable hauríem de tenir la resposta a algunes qüestions com ara:

– Les variables experimentals representen la variable conceptual?

– La manipulació de la variable independent farà que els subjectes es comportin de manera diferent? Si la manipulació és errònia pot ser que l'experiment no serveixi per a res, que ens equivoquem, o que tinguem resultats que no ens interessin.

3. Verificar la manipulació.

### 3.4. Quin és el segon requisit d'un experiment?

El segon requisit és mesurar l'efecte que la variable independent té sobre la variable dependent. La mesura ha de ser vàlida; si no podem assegurar que la mesura és adequada, els resultats no servirán. El nombre de variables dependents i independents dependrà del plantejament del problema i de les limitacions que hi hagi.

### 3.5. Quin és el tercer requisit d'un experiment?

El tercer requisit que un experiment «vertader» ha de complir és el control o validesa interna de la situació experimental. El terme *control* té diverses connotacions. Tanmateix, la seva acceptió més comuna és que, si a l'experiment s'observa que una o més variables independents fan variar les dependents, la variació d'aquestes últimes es deu a la manipulació i no a altres factors o causes. És a dir, *control* significa saber què està succeint realment amb la relació entre les variables independents i dependents.

Quan hi ha control podem conèixer la relació causal. En l'estratègia de la investigació experimental, «l'investigador no manipula una variable només per comprovar el que ocorre a l'altra, sinó que en efectuar un experiment és necessari fer una observació controlada» (Chalmers, 1997).

Controlar un experiment és evitar la influència d'altres variables estranyes, diferents de les independents, sobre les variables dependents.

### 3.6. Què és la validesa externa?

Un experiment ha de buscar abans de res validesa interna; és a dir, confiança en els resultats. A banda d'això, és molt desitjable que l'experiment tingui validesa externa. La validesa externa es refereix al fet que els resultats d'un experiment són tan generalitzables a situacions no experimentals com a altres subjectes o poblacions.



## 4. El disseny experimental (II): aspectes pràctics

### 4.1. Passos que hem de seguir

Ja hem indicat que el propòsit d'un disseny d'investigació és eliminar l'error experimental i assegurar que els resultats que s'obtenen són conseqüència dels factors que s'estan examinant. L'experiment, basat en una hipòtesi verificable que s'infereix de la investigació que duem a terme, ha de ser repetible i el seu disseny ha de seguir un conjunt de passos que detallem a continuació.

#### *Primer pas: Què volem esbrinar?*

Escriurem què pretenem estudiar. Hem d'intentar ser tan precisos com sigui possible. Habitualment, els investigadors fan un repàs de la literatura científica (State-of-the-art) per tal de veure què han cercat i què han trobat altres investigadors que han abordat la mateixa temàtica. El problema que es planteja es formularà mitjançant una pregunta com ara: «Quins són els efectes de X sobre Y?» o, més concretament: «Quins són els efectes d'una central tèrmica (X) en la vegetació (Y) del seu voltant?».

#### *Segon pas: Definició de conceptes, variables i factors*

S'han de definir les variables, les constants i els grups.

**Variable independent (o variable manipulada).** És la variable que es canvia expressament per a l'experiment. Una variable independent pot tenir diversos nivells, per exemple, diverses concentracions d'un fàrmac diferent si volem assajar com afecta un medicament determinat un conjunt de pacients.

**Variable dependent (o variable resposta).** És la variable que respon a les condicions experimentals proporcionades pels diferents nivells de les variables independents.

**Constants (o factors controlats).** Són tots els factors que no canviaran en el transcurs de l'experiment. El control d'aquest tipus de factors (o constants) és molt important per tal d'assegurar que els resultats que es produeixin en la variable depen-

dent seran exclusivament deguts als canvis de la variable independent. Per tant, tots els factors i/o condicions del model experimental, exceptuant-ne la variable o variables (si n'hi ha més d'una) independents, han de ser controlats i constants, a fi de proporcionar uns resultats acurats.

**Grup control.** Pràcticament sempre és necessari definir un grup control, és a dir, una categoria que permeti la comparació amb els resultats que s'obtenen en el grup experimental. En el grup control tots els factors, fins i tot les variables dependents, s'han de mantenir constants.

**Grup experimental.** En el grup o grups experimentals, la variable independent pren un valor diferent respecte al grup control. La resta de factors s'han de mantenir constants.

**Rèpliques.** Es defineix com a rèplica el nombre de vegades que repetim l'experiment. A partir del nombre de rèpliques podem calcular una mitjana (aritmètica o geomètrica), així com una mesura de la dispersió de les nostres dades (la variància, la desviació típica, l'error típic de la mitjana, el coeficient de variació...). El motiu pel qual repetim l'experiment diverses vegades és per evitar errors en la presa de dades/resultats. Com més vegades repetim l'experiment, més robustesa tindran els nostres resultats i més sòlida serà la hipòtesi que n'hàgim inferit.

#### *Tercer pas: Formulació d'una hipòtesi de treball*

La formulació de les hipòtesis és, com ja hem vist, un pas molt important del mètode científic (que ja hem dit que tenia un caràcter hipoteticodeductiu). Es defineix com a hipòtesi l'enunciat contrastable que és o bé deduït d'una teoria o d'una llei científica existent o bé inferit a partir de coneixements i/o observacions prèvies. Quan definim la hipòtesi de treball expressem la nostra intuïció respecte com la variable dependent respondrà a la variable independent. La hipòtesi s'ha de redactar de manera impersonal, per exemple: «Quan subministrem una concentració igual o superior d'un agent quimioterapèutic X, un percentatge Y de cèl·lules canceroses

## 4. El disseny experimental (II): aspectes pràctics

morirà». Mai no utilitzarem la primera persona del singular a l'hora de formular una hipòtesi («Jo veuré que Y cèl·lules canceroses moriran quan subministri una concentració igual o superior de X agent quimioterapèutic.»).

### Quart pas: Disseny del procediment experimental

Com ja hem dit, haurem d'aconseguir que la nostra variable independent (X; a l'exemple que hem posat seria la concentració d'agent quimioterapèutic) prengui valors diferents, si volem veure quin és l'efecte de X sobre Y. Això és el que ens permetrà contrastar la nostra hipòtesi de treball.

Per a cada grup experimental, el valor de la variable independent X serà diferent. Per al grup control el valor de X serà o bé zero o bé aquell valor que genera efectes coneguts sobre Y.

El procediment experimental que s'adopti ha d'explicitar:

- Com aconseguirem que la variable independent (X) prengui valors diferents.
- Com mesurarem la variable dependent (Y).
- Quantes rèpliques d'urem a terme.

El procediment experimental ha d'estar prou desenvolupat perquè un altre investigador pugui repetir exactament el mateix procediment i pugui comprovar, així, que els resultats obtinguts es repeteixen i que, per tant, no depenen de l'observador (això fa referència a l'objectivitat del coneixement científic, tal com ja hem explicat).

### Cinquè pas: Obtenció i anàlisi dels resultats/dades

Les dades que obtenim poden ser qualitatives o quantitatives. Mentre que les dades qualitatives solen ser una descripció dels resultats de l'experiment (per exemple, més gran, més petit...), les dades quantitatives són resultats numèrics (per exemple, 45%, 2,8 mM, 25 min...).

Els resultats per a cada rèplica i experiment es registren i posteriorment es calculen mitjanes i mesures de la dispersió per a cada rèplica (anàlisi exploratori). Els resultats obtinguts per a cada grup experimental es comparen entre ells, i es comparen els resultats dels grups experimentals entre ells, i amb el grup control (anàlisi explicativa, contrast d'hipòtesis).

### Sisè pas. Conclusió

La conclusió de l'estudi resumirà què s'ha fet, què s'ha trobat i com contribueix aquesta troballa a l'àmbit de coneixement en el qual s'està treballant.

## 4.2. Elements que defineixen un bon disseny experimental

El disseny d'un experiment es pot fer d'una manera més o menys correcta. Tanmateix, un disseny adequat dona una solidesa superior a les conclusions del nostre estudi que un disseny derivat d'un plantejament erroni. Els elements que caracteritzen un bon disseny experimental són:

### 1) Discriminació

L'experiment ha de ser capaç de diferenciar clarament entre dues hipòtesis (habitualment denominades *nul·la* i *alternativa*).

### 2) Repetibilitat i generalització

Els experiments han de ser repetits diverses vegades per tal de poder aplicar els mètodes estadístics. D'altra banda, hi ha diferències importants entre les unitats d'anàlisi, que cal tenir en compte a l'hora d'incloure una generalització. Per tant, en aquest punt, l'existència de rèpliques no és només una condició necessària, sinó imprescindible.

### 3) Controls

Els controls ens serveixen per eliminar la possibilitat que altres factors produeixin efectes no desitjats sobre la variable independent, la qual cosa distorsionaria les conclusions del nostre estudi.

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 4. El disseny experimental (II): aspectes pràctics

Els denominats *controls de qualitat* són els que demostren que l'experiment és repetible tant en l'espai (diferents laboratoris) com en el temps (diferents dies).

### 4) Ceguesa del disseny

És molt recomanable que els dissenys experimentals que es proposin siguin cecs, és a dir, que els investigadors, en principi, han de desconèixer els possibles resultats que s'obtindran. Altrament, el subconscient dels mateixos investigadors els podria conduir a adoptar unes conclusions que responen més a prejudicis i a idees preconcebudes que als mateixos resultats. Per bé que aquesta és una condició ideal dels dissenys experimentals que de vegades és difícil posar en pràctica, és molt important que l'investigador tingui la predisposició d'anar a cegues.

### 5) Avaluació del disseny

Un bon disseny ha de ser autèntic i precís. Quan diem que ha de ser autèntic volem dir que ha de ser una representació fidedigna de la realitat, a més de donar un significat vertader. Quan diem que ha de ser precís volem dir que ha de ser reproduïble i que el seu coeficient de variació ha de ser baix.

### 6) Anàlisi estadística

Quan dissenyem un experiment, no sols hem de tenir en compte què volem fer i com ho volem mesurar, sinó que també cal haver considerat el maneig i l'anàlisi de les dades que obtindrem. El test estadístic que s'apliqui ha de ser adequat al tipus d'experiment i de dades que s'han obtingut, per tal que les conclusions del nostre estudi siguin correctes i no es deguin a errors de tipus estadístic.

### 4.3. El disseny experimental en un cas pràctic

Des del Departament de Química de la UdG, ens demanen que avaluem si unes molècules sintètiques tenen o no activitat citocinina. Les citocinines són un grup d'hormones vegetals, derivades de les

purines, que en plantes promouen la divisió cel·lular i inhibeixen l'envelliment dels teixits.

#### 1) Discriminació

Adoptarem com a hipòtesi de partida contrastable que aquestes molècules tenen activitat citocinina. L'altra possibilitat (hipòtesi alternativa) és que aquestes molècules no tinguin activitat citocinina, sinó que siguin altres hormones vegetals.

#### 2) Capacitat de replicació

L'experiment es durà a terme en potets de vidre de 750 ml. Es mesurarà el ritme de creixement de les plantes, i es mantindran constants el temps i el foto-període.

#### 3) Controls

Hi haurà tres controls diferents:

a) Control sense hormones (negatiu). El medi de creixement de les plantes només contindrà sals, per tant les plantes creixeran en absència d'hormones exògenes.

b) Control amb citocinina (control positiu 1). El medi de creixement conté una hormona amb activitat citocinina.

c) Control amb citocinina (control positiu 2). El medi de creixement conté una hormona amb una activitat diferent de l'activitat citocinina (per exemple, l'auxina).

Aquests controls, a més de proporcionar-nos uns valors de referència, també ens permetran fer una observació ràpida del nostre experiment.

#### 4) Ceguesa del disseny

No sabem realment si les hormones sintètiques que ens han demanat que analitzéssim tenen o no activitat citocinina. Per tant, encara que creguem que probablement presenten aquesta característica, no tenim la certesa al 100%.

## 4. El disseny experimental (II): aspectes pràctics

### 5) Avaluació

Mesurarem el creixement de les plantes abans, durant i després de dur a terme l'experiment. Mesurarem el creixement mitjançant les variables dependents següents:

- Longitud i nombre de tiges
- Longitud i nombre de rels
- Amplada i nombre de fulles
- % clorosi
- % necrosi
- Pes fresc
- Pes sec
- Quantitat de proteïna total
- Quantitat de pigments fotosintètics
- Metilació del DNA

### 6) Anàlisi estadística

Durem a terme una anàlisi de variància (ANOVA) d'un factor (que tindrà diferents nivells, els diferents tractaments) per a cadascuna de les variables, i el test *post hoc* que s'adeqüi millor al tipus de dades obtingudes. Aquest test permetrà determinar, a partir de la comparació amb els tres controls que hem esmentat, si l'hormona sintètica en qüestió presenta o no activitat citocinina.

#### 4.4. Les preguntes més importants a l'hora de dissenyar un experiment

El més important que hem de tenir en compte quan volem dissenyar un experiment són els punts següents:

- 1) Definir els objectius.
- 2) Escriure què es farà de manera clara i precisa.
- 3) Desenvolupar l'estratègia respecte com es durà a terme l'estudi.
- 4) Escriure de manera precisa els resultats que s'han trobat.
- 5) Quants tractaments s'han dut a terme?
- 6) Quina és la mida mostral que s'ha d'analitzar?
- 7) Com s'han d'analitzar els resultats que s'obtinguin?

A part d'això, també hi ha altres qüestions que, sense estar directament relacionades amb el procediment, sí que hi influeixen de manera determinant:

- ✓ Aspectes pràctics del disseny que també cal tenir en compte.
- ✓ Quin finançament hi ha per fer l'estudi?
- ✓ Com es posa en pràctica l'experiment? Quina logística es necessita?
- ✓ En quin ordre s'han de fer els passos?
- ✓ Es pot fer l'experiment en un sol dia? Durarà gaires hores? Hi haurà temps per menjar?
- ✓ Es requerirà el suport d'alguna altra persona?

## 5. El disseny experimental (III): dissenys observacionals i dissenys manipulatius

### 5.1. Disseny d'investigació observacional o «no manipulatiu»

En un disseny d'investigació de tipus observacional (també podem parlar de mostreig o d'experiment *mesurable*) no manipulem les variables que volem estudiar, sinó que simplement les observem i en registrem els valors. Observem, doncs, la natura tal com és sense manipular-la. Aquest tipus de mètode d'estudi, molt emprat en treballs de camp (ecologia), segueix, òbviament, el rigor del mètode científic sense necessitat de manipular una variable independent (o més d'una) per tal de veure'n l'efecte sobre una altra de dependent. De fet, la variabilitat natural ens serveix, ella mateixa, a l'hora de contrastar les nostres hipòtesis de treball.

Si, per exemple, la nostra hipòtesi sobre el dimorfisme sexual és que ha evolucionat per selecció sexual deguda a la preferència de les femelles, podem predir que els mascles més vistosos, per exemple, aconseguiran atreure més femelles al seu territori.

El principal problema d'un disseny d'investigació observacional és que, sovint, és difícil excloure l'efecte d'altres variables que no intervenen pròpiament en l'estudi (és a dir, que no són ni variables dependents ni variables independents). En aquest sentit, hi ha models matemàtics que intenten controlar l'efecte d'aquestes altres variables (que reben el nom de *confounding factors*). Seguint l'exemple que hem utilitzat, es podria donar el cas que els individus més vistosos tinguin millors territoris, i que sigui això, i no la vistositat, el que atregui les femelles (si aconseguíssim dissociar la vistositat de la qualitat del territori, els mascles més vistosos deixarien de tenir més èxit).

### 5.2. Disseny d'investigació manipulatiu

En el disseny d'investigació *manipulatiu* també denominat *experimental en sentit estricte*, l'investigador manipula directament la variable independent, a fi de valorar l'efecte que té sobre la dependent.

Tornant a l'exemple anterior, podríem manipular la longitud de la cua d'alguns mascles per tal de veure

com això afecta el seu èxit de cria, mesurat com a nombre de femelles que nidifiquen als seus territoris. Si, en efecte, l'èxit dels mascles amb la cua allargada és superior al dels mascles control (no manipulats) i al dels mascles amb la cua escurçada, es conclourà que les cues més llargues són les preferides per les femelles.

Aquests resultats no poden atribuir-se a diferències prèvies entre els grups de mascles (per exemple, en la qualitat del territori), ja que aquest factor no ha estat modificat en l'experiment (era, doncs, un factor controlat de l'experiment i no pas una variable independent manipulada), ni tampoc a terceres variables (*confounding factors*) relacionades amb el maneig dels ocells, tal com posen de manifest els grups control.

### 5.3. Avantatges i inconvenients dels dissenys observacionals i manipulatius

Respecte als dos tipus de dissenys que hem esmentat, cal que fem un parell d'aclariments:

- Cap mètode no és millor que un altre; en realitat, són complementaris. El mètode observacional és l'adequat per descriure patrons, sintetitzar informació i estudiar associacions entre variables. La seva validesa externa és gran (els resultats són generalitzables), però la seva validesa interna (que, recordem-ho, és la certesa amb la qual es pot establir una relació causal) és menor que en el cas del mètode experimental.

- La distinció entre un i altre tipus de disseny no té res a veure amb els instruments de mesura ni amb el lloc de la presa de dades (treball de camp o de laboratori), sinó només amb el fet que es manipuli o no les variables independents. De tota manera, els dissenys observacionals són més nombrosos al camp que al laboratori.

### 5.4. Els dissenys observacionals i els mètodes de mostreig

En les ciències experimentals (com la biologia), la majoria de les investigacions són quantitatives. És a

## 5. El disseny experimental (III): dissenys observacionals i dissenys manipulatius

dir, un cop dutes a terme les observacions/experiments obtenim uns nombres com a resultats. Ja hem parlat de la diferència entre investigacions no manipulatives (observacions) i manipulatives (és a dir, experiments).

El principal problema de les **observacions** és que els resultats que s'obtenen poden ser deguts a l'efecte de terceres variables desconegudes. Per això, és important dur a terme estimacions dels paràmetres de la població que es pretengui estudiar tenint en compte:

1. La variable independent (paràmetre) que es vol analitzar.
2. La població que s'està mostrejant.
3. El mètode de mostreig.

Els paràmetres d'una població són variables que ens expliquen com es resumeix la informació dels ítems d'aquesta població. La població és la col·lecció de tots els ítems que són d'interès.

Hi ha poblacions finites, com els alumnes que estan matriculats a TCI-III (cada alumne és un ítem), i poblacions infinites, com el resultat que es pot obtenir quan es tira una moneda a l'aire (sempre la podrem tirar una altra vegada, de manera que cada tirada és un ítem). En aquest últim exemple, per conèixer la freqüència amb què cau cada costat de la moneda no es pot tenir accés a la població sencera. De manera similar, en el cas de poblacions finites, no sempre és possible tenir accés a tota la població (en termes de temps, feina o diners).

Els mètodes de mostreig ens permeten estimar paràmetres poblacionals a partir de l'estudi d'una fracció de la població (o mostra). Hi ha diferents mètodes de mostreig i la preferència per un o altre dependrà de l'objectiu de l'estudi, del paràmetre que es vulgui estimar i de la població (distribució espacial, temporal, mobilitat...). Això vol dir que el mètode que s'esculli dependrà de la pregunta que es vulgui respondre.

### 5.4.1. Mostreig a l'atzar simple

Un mostreig a l'atzar simple és aquell en el qual tots els ítems de la població tenen la mateixa probabilitat de ser mostrejats. Si els ítems (individus, unitats mostrals...) d'una població de mida  $N$  es poden enumerar des d'1 fins a  $N$ , una manera de dur a terme un mostreig aleatori simple consisteix a seleccionar  $n$  unitats de manera aleatòria (per exemple, utilitzant una taula de nombres a l'atzar). Si es treballa amb mostreigs espacials (la unitat mostral no és un individu sinó un espai) es pot dividir l'àrea en graelles i seleccionar, aleatòriament, les caselles que es mostrejaran.

### 5.4.2. Mostreig estratificat

Consisteix a subdividir *a priori* la població en subunitats o estrats i després fer un mostreig aleatori dins de cada estrat. La subdivisió respon a un coneixement *a priori* de l'existència d'aquests estrats i assumeix que el paràmetre que es mesurarà està influït per ells. La no estratificació portaria al fet que dades de dues poblacions diferents es prenguessin com si fossin d'una única població. Això condueix a un augment de la variància i a un biaix en l'estimació del paràmetre. Si es pensa en el pes dels elefants marins (els mascles són molt més grans i pesats que les femelles) es poden definir *a priori* dos estrats (mascles i femelles) i fer un mostreig d'individus a l'atzar dins de cada estrat. Altrament, no estratificar portaria a estimar un pes de mitjana intermèdia que només alguns individus presenten, i una variància molt gran. En separar entre sexes, s'estimen dues mitjanes de pesos que són representatives de les distribucions de pes de cada sexe.

L'estratificació pot ser tant espacial com temporal. En algunes llacunes, per exemple, es poden trobar espècies d'aus que s'hi estan tot l'any i altres que són migratòries i només hi són a l'estiu. Si es vol estudiar la diversitat d'aus en una llacuna concreta serà necessari estratificar en estacions de l'any i després prendre mostres aleatòriament dins de cada estació.

# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 5. El disseny experimental (III): dissenys observacionals i dissenys manipulatius

### 5.4.3. Mostreig sistemàtic

Quan una població pot ser numerada en ordre o cobreix una àrea espacial ben definida, es pot mostrejar de manera sistemàtica a intervals regulars (prenent els individus parells de la població o mostreiant cada certa distància). Perquè aquest tipus de mostreig permeti calcular errors de mostreig o fer comparacions entre poblacions, s'ha de complir el supòsit/premissa que els ítems estan distribuïts a l'atzar. Aquest tipus de mostreig és generalment més fàcil de dur a terme que els mostreigs aleatoris. Com es pot veure pel que hem explicat fins aquí, les mostres poden ser individus, àrees espacials, fraccions de temps..., tot depèn de la pregunta que es vulgui respondre i del sistema on es treballi. Hi ha situacions en què són necessaris aproximacions o dissenys mostrals que són de gran utilitat, però que són, alhora, menys intuïtius. El mètode dels transsectes és un d'aquests i presenta molts avantatges pràctics en certs casos. Si es volgués conèixer la densitat d'aus en camps conreats amb dues espècies de cereals diferents, definir àrees mostrals quadrades o rectangulars perquè després es puguin comptar els individus que hi ha dins d'aquestes àrees delimitades pot ser poc pràctic. Una alternativa és caminar un nombre de metres definit prèviament i comptar els individus que es detecten al llarg d'aquest transsecte. És necessari definir una distància lateral fins on es considera que és possible detectar els individus.

El transsecte és, doncs, una àrea mostral rectangular. Quan hi ha un gradient ambiental molt marcat (com per exemple des de la línia de marea baixa fins a la de marea alta), es pot fer un transsecte al llarg del gradient i prendre mostres a intervals regulars dins de cada transsecte. És important tenir en compte que en aquests casos la unitat mostral és el transsecte (des del punt de vista estadístic correspon a una única observació).

El mètode de marca/recaptura o captura/recaptura, que ha estat desenvolupat per estimar el nombre d'individus en poblacions d'animals mòbils, es basa en simples regles de proporcions i probabilitats. Si

es volgués calcular el nombre total de peixos d'una llacuna, es podria passar una xarxa i capturar un nombre  $n_1$  d'individus. Aquests individus es poden marcar d'alguna manera i alliberar-los novament. Després d'un període de temps (de dies o setmanes, per a l'exemple) es pot passar la xarxa una altra vegada, i en aquest cas capturar  $n_2$  individus. Dins d'aquests, hi haurà un nombre  $m$  d'individus que ja havien estat marcats prèviament.

La proporció de peixos marcats en tota la llacuna hauria de ser igual a la de peixos marcats a la segona mostra. Així que la quantitat de peixos de tota la llacuna ( $N$ ) serà:

$$N = n_1 * n_2 / m$$

Els supòsits d'aquest mètode són bastant intuïtius:

- 1) La població és tancada, no hi ha emigració ni immigració d'individus cap a altres àrees ni des d'altres àrees.
- 2) Tots els animals tenen la mateixa probabilitat de caure a la primera mostra i la segona mostra. És una mostra a l'atzar de la població.
- 3) La marca no afecta la possibilitat de ser capturat o la supervivència, ni s'esborra o es perd.

### 5.4.4. El mètode de Hayne

Una alternativa a l'estimació de la mida poblacional per captura i recaptura és el mètode de Hayne o de Leslie i Davis, que es pot aplicar quan no es poden complir els supòsits del mètode anterior o quan no és possible capturar individus vius. El mètode de Hayne consisteix en captures successives de membres de la població. Si la població és tancada, a mesura que capturem i traiem individus, aquesta anirà disminuint i davant d'un mateix esforç de captura s'atraparan menys individus cada vegada.

Si moltes mostres a l'atzar de mida  $n$  són preses independentment i la mitjana és calculada per cada mostra, probablement tindran diferents valors. Si el

## 5. El disseny experimental (III): dissenys observacionals i dissenys manipulatius

nivell de variació és petit, aleshores mostres diferents ens donaran més o menys el mateix resultat. Si la variació és gran, els diferents mostres ens donaran com a resultat valors molt diferents.

### 5.5. La importància de les rèpliques

Per fer inferències estadístiques a partir de mostres (estimació de paràmetres poblacionals o comparació de situacions diferents), el grau de confiança augmentarà a mesura que augmenti el nombre de rèpliques. Això és especialment cert pel que fa a estimadors no esbiaixats (la llei dels grans nombres diu que quan el nombre de mostres tendeix a l'infinit, el valor estimat tendeix al valor del paràmetre real pel qual disminueix la variància). De manera similar, el poder estadístic (que es defineix com 1 menys la probabilitat d'acceptar una hipòtesi nul·la quan aquesta és realment falsa) dels tests augmenta. Això genera un compromís entre la precisió amb què volem dur a terme les inferències i la feina i/o cost que porta cada mostra.

Hi ha mètodes per calcular la mida mostral necessària per assolir un determinat grau de precisió o poder estadístic que depenen del paràmetre que s'estimi o del test que es faci. Aquests mètodes són fàcilment accessibles als manuals d'estadística.

Quan s'utilitzen àrees mostrals és important tenir en compte la mida dels organismes, així com una noció de la seva densitat i de la seva distribució espacial. Una manera pràctica és augmentar la mida de l'àrea mostral progressivament i representar gràficament la variància respecte de la mida de la mostra. A mides petites la variància serà molt gran, de manera que petits canvis en la mida tindran grans efectes en la dispersió. Tanmateix, a partir de certa mida, la disminució que es produeixi en la variància quan l'àrea augmenti serà molt petita. Això serà especialment evident quan la corba comenci a arribar a un punt de saturació o plateau.

El mateix s'aplica a la distribució espacial dels individus. Si estan agrupats i si l'àrea de mostreig escollida és similar o més petita que els agrupaments, lla-

vors s'obtidran dades de densitats nul·les i altes, atès que les mostres poden caure dins d'un agrupament o fora. Si la distribució espacial es presenta a la mateixa escala que les unitats de mostreig, és possible detectar-la. Amb mides d'unitats de mostreig a escales més grans que el patró de distribució es tindrà una bona estimació de la densitat, però no es podrà detectar aquest patró.

Quan es treballa amb la riquesa (diversitat) d'espècies d'una comunitat concreta, el nombre d'espècies que s'hi detecta augmenta a mesura que augmenta la mida de la mostra. Tanmateix, un cop la mostra té una mida prou gran per representar correctament aquesta comunitat, el nombre d'espècies es mantindrà constant. Un mètode comú per determinar la mida òptima és augmentar progressivament la mida de mostreig i representar gràficament el nombre d'espècies respecte de la mida de mostreig, a fi de determinar visualment la mida a partir de la qual la variació en el nombre d'espècies és molt petita.

### 5.6. El problema de les pseudorèpliques

Tant quan es treballa amb dissenys observacionals com amb dissenys experimentals, és molt important tenir ben clar què s'entén per mostra, perquè serà a partir d'aquí que es duran a terme les inferències estadístiques. Aquestes inferències seran correctes o no en funció de la definició del que s'entén per *unitat mostral*. Una premissa bàsica per dur a terme inferències és que les unitats de mostreig han de ser totalment independents entre elles. És a dir, el valor d'una dada no ha de ser influït pel valor d'una altra ni hi ha d'influir. Tanmateix, aquest supòsit sovint és deixat de banda. Per exemple, si volem determinar la quantitat d'insectes que hi ha en una fulla d'una espècie vegetal i es compta la quantitat d'insectes que hi ha a tres fulles d'una planta, cinc d'una altra i set d'una altra, serà un error pensar que tenim quinze dades, perquè les fulles d'una mateixa planta tenen coses en comú entre elles, i per tant no són unitats mostrals independents. Si una d'aquestes plantes ha estat infectada o colonitzada per algun paràsit és molt probable que



# CAPÍTOL I. MÈTODE CIENTÍFIC I DISSENY EXPERIMENTAL

Autor: Marc Yeste

## 5. El disseny experimental (III): dissenys observacionals i dissenys manipulatius

presenti densitats elevades d'insectes en totes i cadascuna de les fulles. Davant d'aquesta situació, parlem de pseudorèpliques, perquè les tres fulles de la primera planta que hem esmentat no són del tot independents entre elles i, per tant, no són rèpliques en sentit estricte. Així doncs, seguint l'exemple que hem posat, les rèpliques són les diferents plantes (en aquest cas, tres) i no pas les quinze fulles (que són pseudorèpliques).

Per tant, en aquest cas, el que hem de fer és calcular una mitjana per planta (obtinguda a partir de la consideració de les diferents fulles en les quals

hàgim valorat la densitat d'insectes) i després treballar amb aquestes mitjanes com a unitats mostrals (rèpliques). De manera similar, quan duem a terme dissenys experimentals manipulatius, les dades independents provindran de cadascuna de les unitats experimentals. Si prenem mostres de sang d'un mateix pacient per valorar l'efecte d'un medicament concret en una població de pacients sans i una de pacients leucèmics, les mitjanes procedents de les diferents preses de sang d'un únic pacient seran les rèpliques o unitats mostrals (rèplica = pacient), mentre que les diferents preses de sang dins de cada pacient seran les pseudorèpliques.

## 6. Bibliografia

- ALTHUSSER, L. *Curso de filosofía para científicos. Filosofía y filosofía espontánea de los científicos*. Barcelona: Laia, 1975.
- BACHELARD, G. *La formación del espíritu científico*. México: Siglo XXI, 1978.
- BUNGE, M. *La ciencia, su método y su filosofía*. Buenos Aires: Siglo Veinte, 1972.
- CHALMERS, A. *¿Qué es esa cosa llamada ciencia?* Madrid: Siglo XXI, 1997.
- DANIEL, W. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud*. México: Limusa Wiley, 2002.
- DÍEZ CALZADA, J. A.; MOULINES, C. U. *Fundamentos de filosofía de la ciencia*. 2a ed. Barcelona: Ariel, 1999.
- ECHEVERRÍA, J. *Introducción a la metodología de la ciencia. La filosofía de la ciencia en el siglo XX*. Barcelona: Barcanova, 1989.
- GAUCH H. G. *Scientific method in practice*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- HEMPEL, C. *Filosofía de la ciencia natural*. Madrid: Alianza, 1998.
- HULBERT, S. H. «Pseudoreplication and the design of ecological field experiments». *Ecological Monographs* (1984), 54, 187-211.
- KLEE, R. *Introduction to the Philosophy of Science: cutting Nature at its seams*. New York: Oxford University Press, 1997.
- KUHN, T. *La estructura de las revoluciones científicas*. México: FCE, 1962.
- LAKATOS, I. *La metodología de los programas de investigación científica*. Madrid: Alianza, 1983.
- MOSTERÍN, J. *Conceptos y teorías en la ciencia*. 3a ed. Madrid: Alianza, 2000.
- POPPER, K. R. *La lógica de la investigación científica*. Madrid: Tecnos, 1962.
- QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3a ed. New York: W. H. Freeman and Co., 1995.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### 1.a. Sessió introductòria

Tal com ja s'ha exposat, el disseny d'investigació manipulatiu o experimental és aquell en què l'investigador altera (manipula) a consciència la variable independent a fi de valorar l'efecte que provoca sobre la dependent (paràmetre d'estudi). En aquest cas, serà molt important definir correctament quina serà la variable independent, i, per tant, la que es modificarà, i quines variables mantindrem constants (factors controlats). Estudis més complexos poden consistir a modificar més d'una variable per descriure la seva interacció i com aquesta afecta la variable dependent. Cal tenir en compte que el disseny experimental influirà posteriorment en l'anàlisi estadística de les dades resultants.

Per dissenyar un bon estudi manipulatiu caldrà fer-ho detingudament, procés que pot trigar tant o més temps que els mateixos experiments. Un disseny d'investigació, sigui del tipus que sigui, respon a la necessitat d'entendre un fenomen o comprendre les lleis que regeixen aquest fenomen. Per això, el primer pas essencial és definir la problemàtica d'estudi, allò de què realment volem obtenir una resposta o que pretenem entendre. Aquest pas implica la recollida d'informació ja existent sobre la problemàtica, cosa que ens permetrà formular la hipòtesi inicial de partida. Aquesta hipòtesi serà, de moment, una solució provisional que caldrà contrastar i verificar amb el mètode experimental.

Un cop definit l'objectiu d'estudi (la problemàtica) i la solució provisional (la hipòtesi inicial), es passa al disseny experimental. Això és establir els procediments pràctics que cal dur a terme per resoldre la problemàtica plantejada. En aquest disseny caldrà definir tota una sèrie de paràmetres a partir de la bibliografia anterior o el nostre coneixement previ. Aquests paràmetres són:

– la variable independent: factor que pot tenir algun tipus d'influència sobre el paràmetre d'estudi, i que manipulem.

– la variable dependent: factor que respon a les condicions experimentals, el paràmetre mesurat.

– les constants: variables independents que no manipulem, els factors que no canvien durant l'experiment.

– el grup control: grup en el qual el factor que estem estudiant és «zero», el que utilitzem per contrastar els resultats del grup experimental, el que ens serveix de referència.

– el grup experimental: grup problema (d'estudi), del qual modifiquem la variable independent i esperem que la variable dependent prengui un valor diferent.

– les rèpliques: nombre de vegades que repetim l'experiment, i que dóna robustesa als resultats.

En el disseny experimental també cal tenir en compte els mètodes de mesura que s'empraran (que han de ser adequats) i establir els controls necessaris (els controls dels experiments).

Un cop definit l'estudi, es pot procedir a l'execució dels experiments, obtenció de les dades i anàlisi dels resultats. Aquesta anàlisi ens ha de permetre validar o rebutjar la nostra hipòtesi inicial (és correcta la solució provisional?) o, el que és el mateix, arribar a unes conclusions. És a partir d'aquesta interpretació que es pot establir una nova problemàtica d'estudi o reajustar la hipòtesi inicial, dissenyar un nou estudi i avançar, així, en el coneixement.

Les activitats d'aprenentatge següents pretenen introduir l'estudiant en el disseny experimental. Aquest haurà de definir la problemàtica d'estudi i la hipòtesi inicial, fer el disseny experimental, executar els experiments proposats i analitzar els resultats per tal de validar o no la seva hipòtesi.

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

## 1.a.1. Definició de la problemàtica

**Objectius formatius:** Establir una problemàtica d'estudi que es resoldrà al laboratori. Lectura de textos i elaboració d'un projecte d'estudi.

**Mida dels grups:** individual

**Activitat 1:** De manera individual i prèviament a la sessió d'aula. Durada: 1 h

A continuació es mostren tres textos que s'han de treballar abans d'assistir a la sessió d'aula. Suposa que ets un investigador que coneixes una problemàtica real (en aquest cas, la que s'exposa en els textos), la qual voldries abordar per ampliar-ne el coneixement. Per dur a terme el teu estudi sobre aquest tema, hauries de trobar el finançament d'un organisme públic o privat. Així, a través d'un projecte escrit, hauries de **plantejar la problemàtica** i l'avenç que suposaria trobar-hi una solució, i a més a més, hauries de desenvolupar el **pla de treball** que duries a terme per abordar-la (com ho faries). A tall de guia, segueix aquests sis punts en l'ordre que apareixen per tal d'arribar a construir les idees bàsiques del teu projecte:

**Plantejar la problemàtica:**

1. Llegeix els tres textos i subratlla les idees/conceptes principals/importants de cada un.
2. Compara els tres textos i apunta les idees/conceptes que s'han repetit en tots tres.
3. Relaciona les idees del punt 2 i intenta descriure la problemàtica o característiques generals del tema que s'està tractant.

**Pla de treball:**

4. Explica molt breument quin interès científic es pot derivar del que acabes de llegir; és a dir, què creus que es podria estudiar? (Poden sorgir multitud d'estudis.)
5. Explica d'una manera general com duries a terme cada un dels estudis proposats en el punt 4.

**Text 1: L'interès per la patata**

La patata (*Solanum tuberosum*) és una de les principals plantes cultivades al món, on ocupa al voltant de 19 milions d'hectàrees i té una producció anual mitjana de prop de 300 milions de tones. A Catalunya, el 2007, es calculaven més de 2.000 hectàrees destinades al conreu de la patata, les quals produïen gairebé 53.000 tones, i Barcelona era la província amb més extensió de cultiu (gairebé 1.000 hectàrees) i producció (més de 20.000 tones).

Actualment, al mercat es poden trobar moltes varietats diferents de patata que presenten característiques molt variades. Exactament, es conreen més de 8.000 varietats a tot el món, i per exemple podem trobar varietats adaptades per ser cultivades en diferents tipus de sòl, clima i altitud. Tot i la versatilitat, molts laboratoris encara continuen buscant noves varietats que confereixin propietats interessants a les patates, ja sigui per incrementar-ne el rendiment, millorar-ne el valor nutritiu o obrir vies per a nous usos del midó de tipus no alimentari.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

Un exemple de varietats d'un interès creixent són les patates blaves/violeta (o acolorides). Aquestes patates blaves són riques en uns tipus de compostos fenòlics secundaris, els antocians, els quals mostren propietats antioxidants beneficioses per a la salut. En general, aquests tipus de compostos fenòlics són responsables de les coloracions vermelles, blaves, porpres o violetes que presenten algunes estructures/òrgans vegetals. La capacitat antioxidant dels antocians és donada per la seva capacitat per captar radicals lliures i de quelació d'alguns ions metàl·lics. És per aquest fet que certs aliments vegetals rics en antocians han suscitat un gran interès pels beneficis que poden reportar a la salut humana (prevenció de càncer i malalties cardiovasculars). A més, les varietats acolorides han despertat un interès creixent en l'àmbit gastronòmic, simplement pel seu color vistós. D'aquesta manera, la demanda creixent d'aquests nous usos està repercutint directament en el valor econòmic d'aquestes varietats.

#### Text 2: La infecció per *Erwinia* i mecanismes de resistència

*Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*) és un bacteri gramnegatiu anaeròbic facultatiu que actua en climes temperats. La infecció per *Eca* provoca la podridura tova del tubercle de patata. Al camp, si la infecció no es controla o bé es planten tubercles infectats per obtenir el conreu següent, *Eca* s'estén cap a la part aèria i podreix i panseix tota la planta, la qual cosa provoca el que s'anomena el *peu negre*.

*Eca* es classifica com a patogen vegetal, ja que pot sintetitzar els enzims necessaris per degradar les parets vegetals cel·lulòsiques, cosa que li permet penetrar dins el teixit. No obstant això, *Eca* no és capaç, igual com molts patògens vegetals, de degradar la paret cel·lular suberificada de les cèl·lules de la pell de la patata (periderma). El biopolímer responsable de l'engruiximent de les parets cel·lulars d'aquesta capa protectora s'anomena *suberina*, la qual està formada per compostos derivats d'àcids grassos i fenòlics. D'aquesta manera, la infecció per *Eca* és possible perquè el bacteri pot accedir a la part carnosa de la patata a través de les lenticel·les i ferides i no a través de la pell de la patata. Les ferides a la patata es produeixen bàsicament durant l'emmagatzematge, ja que és en aquest moment, acabades de collir del camp, quan la pell no ha adquirit encara les propietats fisicoquímiques necessàries per fer-se resistent a l'abrasió. Per tant, és en aquest procés quan les condicions d'infecció d'*Eca* seran les més propícies, ja que en molts casos alguns tubercles aparentment sans poden contenir bacteris a la superfície. A més, emmagatzemar els tubercles humits o en condicions d'humitat elevada i poca ventilació (condensació de l'aigua a sobre dels tubercles) proporcionarà una capa d'aigua sobre la superfície de la patata que facilitarà les condicions d'anaerobiosi necessàries per al creixement ràpid del bacteri i l'inici de la podridura. Tant és així que les pèrdues econòmiques més importants per l'efecte d'aquest patogen es produeixen durant l'emmagatzematge dels tubercles, i poden arribar a pèrdues de producció de fins al 100% i de milions d'euros.

Tenint en compte que l'entrada d'*Eca* al tubercle es produeix bàsicament a través de ferides, la capacitat i la rapidesa a l'hora de cicatritzar-les serà una característica important per incrementar la resistència a aquest patogen. La cicatrització de ferides és un procés en el qual també intervé la suberificació de les parets cel·lulars de les cèl·lules que hi participen, de manera que es crea una barrera que s'anomena *periderma cicatricial*. Així, l'obtenció ràpida dels precursors necessaris per sintetitzar la suberina, ja sigui a través d'una nova síntesi o de mobilitzar i redirigir-hi altres substàncies fenòliques (com per exemple antocians), és un procés clau i determinant d'aquesta regeneració.

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### Text 3: Les varietats de patates

Tot i que la patata que es cultiva internacionalment pertany a una única espècie botànica, *Solanum tuberosum*, hi ha milers de varietats molt diferents en grandària, forma, color, textura, contingut i gust. És per aquestes característiques i propietats diferencials que se'n cultiven múltiples varietats, i cadascuna és apreciada per a un ús o altre. Per exemple, hi ha varietats cultivades de les quals només s'extreu midó i d'altres pensades per al consum humà. Dins aquestes últimes, hi ha un seguit de varietats amb propietats específiques que les fan idònies per a determinades manipulacions culinàries.

Una de les varietats més cultivada i més consumida és la varietat Àgata. Aquesta varietat, d'origen holandès, té un tubercle de pell groguenca i carn ferma, recomanada principalment per bullir i poc apta per fregir. Tot i ser una varietat molt productiva, té una resistència mitjana a una gran varietat de patògens.

La varietat Vitelotte és una varietat originària de Bolívia i el Perú, de pell fosca i carn morada. Actualment, aquesta varietat està prenent molt interès gràcies al seu aspecte curiós. La cuina moderna està adoptant aquesta varietat per donar una imatge renovada als seus plats. A més, aquesta varietat és interessant pel seu contingut elevat en antocians, uns compostos fenòlics que a més de ser responsables de la seva coloració li confereixen capacitat antioxidant (propietat beneficiosa per a la salut).

Les patates Vitelotte són, en comparació amb altres varietats més habituals, poc productives, fet que provoca que s'hagin cultivat poc fins al moment. Un exemple es mostra a França l'any 2008, on mentre el cultiu de patata Àgata era de 490 hectàrees, el de la varietat Vitelotte es limitava a 10 hectàrees. A més, la baixa producció d'aquesta varietat blava també s'explica per la manca d'informació sobre la seva sensibilitat a diferents agents patògens típics de la patata. Aquest fet atura alguns productors a decidir-se pel seu cultiu, tot i el seu innegable interès mèdic i gastronòmic.

**Activitat 2:** De manera individual i a la sessió d'aula. Durada: 30 min

Poseu en comú les idees dels punts 1-5 de l'activitat anterior amb la guia del professor.



**Àgata.** Varietat holandesa molt popular, de les millors per bullir i en amanides. Autor: O. Serra.



**Vitelotte.** Especialitat francesa apreciada per la pell blau fosca i la polpa violeta. Autor: O. Serra.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### 1.a.2. Definició de la hipòtesi inicial i disseny experimental

**Objectius formatius:** Definir la hipòtesi inicial que dóna resposta a la problemàtica d'estudi i descriure els diferents paràmetres importants en un disseny experimental.

**Mida dels grups:** individual / 3-4 alumnes

**Activitat 3:** Durada: 30 min

Primer de manera individual (10 min) i després en grups de tres (5 min), contesteu les preguntes que es formulen a continuació. Finalment, discutiu-ho amb tota la classe (10 min).

1. Definiu la hipòtesi global del treball, la qual verificarem empíricament a les sessions de laboratori.

o Individual:

o Grup:

2. Definiu els paràmetres importants en el disseny experimental.

o Individual:

—

—

—

—

—

—

o Grup:

—

—

—

—

—

—

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### 1.a.3. El disseny experimental

**Objectius formatius:** Treballar els diferents punts importants del disseny experimental.

**Mida dels grups:** 3-4 alumnes

**Activitat 4:** Durada: 1 h - 1 h 10 min

El disseny experimental té en compte com s'obté la mostra, el lloc d'on prové, el nombre de rèpliques i els diferents assajos que s'hauran de fer. Aquest exercici es treballa amb una activitat tipus puzzle:

1. Situeu-vos en grups de tres. Cada component del grup ha de llegir un text que us passarà el professor i contestar les preguntes assignades al seu text (10 min).
2. Reunió d'experts: Agrupeu-vos amb companys d'altres grups que hagin llegit el mateix text que vosaltres (5-6 persones). Compareu i discutiu les respostes a les preguntes corresponents al vostre text. Finalment, consensueu les respostes més adequades (20 min).
3. Recupereu el vostre grup inicial. Seguint l'ordre dels textos, expliqueu als companys del grup què plantejava el vostre text i les respostes a les preguntes (20 min). Cada cop que un company expliqui el seu text, un dels altres companys ha de controlar el temps i el tercer (i quart) membre del grup ha de fer totes les preguntes necessàries perquè aquest tema quedi clar. Aquestes funcions són rotatives.
4. Discussió general amb la classe (15 min). Es trien tres alumnes a l'atzar que sortiran davant la classe i exposaran breument les conclusions a les quals ha arribat el seu grup amb referència a un dels textos. L'alumne seleccionat no podrà exposar el text que tenia assignat a l'inici de l'exercici.



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### 1.a.4. Els protocols de laboratori

**Objectius formatius:** Reconèixer els punts clau d'un protocol i entendre'ls, i identificar el material i els aparells necessaris per reproduir-lo posteriorment al laboratori.

**Mida dels grups:** individual / 3-4 alumnes

**Activitat 5:** Durada: 25 min

Primer de manera individual (10 min) contesteu el qüestionari que us fa a mans el professor. Posteriorment poseu-lo en comú en grups de tres (5 min) i amb tota la classe (10 min).

**Activitat 6:** Durada: 35 min

De manera individual, llegiu els protocols Mesura del contingut d'antocians (apartat 1.b.1), Assaig de l'ínòcul puntual (apartat 1.b.2, secció b) i Activitat polifenoloxidasa (apartat 1.b.4) i subratlleu tots els termes que no s'entenguin o no es coneguin (10 min).

Poseu en comú amb la resta de la classe quins són els dubtes sobre els protocols (10 min).

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### 1.b. Sessions experimentals

##### Preàmbul

La sessió introductòria ens va servir per definir el disseny experimental que desenvoluparíem per conèixer la resistència/sensibilitat de la varietat de patata Vitelotte a un patogen comú, el bacteri *Pectobacterium carotovorum* (Pc, *Erwinia carotovora*).

Durant aquestes pràctiques, es desenvoluparà el disseny experimental anteriorment treballat a l'aula. S'incidirà en els conceptes estudiats prèviament, com la definició de la problemàtica, la hipòtesi, les variables, la rèplica i els controls. No obstant això, l'objectiu principal se centra a dur a terme els procediments experimentals encarats a la consecució i anàlisi dels resultats que ens permetran respondre a la problemàtica inicial plantejada, per tal de poder acceptar o rebutjar la nostra hipòtesi de treball.

Per abordar la nostra problemàtica, en aquestes sessions se seguiran diversos procediments detallats en aquest guió:

✓ Contingut d'antocians a les patates de la varietat Àgata i Vitelotte

✓ Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*

– Procediments previs

– Inòcul puntual

– Supervivència cel·lular

✓ Observació histològica del tubercle de patata

✓ Activitat polifenoloxidasa (PPO) en patates de la varietat Àgata i Vitelotte

Els procediments experimentals estan esquematitzats en l'annex 2.a.

A continuació es detalla la planificació temporal dels diversos experiments:

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

| <b>Activitat</b>  | <b>Dilluns</b>   | <b>Dimarts</b>   | <b>Dimecres</b>   | <b>Dijous</b>                                       | <b>Divendres</b>                                     |
|---|--|--|---|---|--|
| <b>Comprensió disseny experimental</b>                  | -Qüestionari   |  |   |   |  |
| <b>Contingut d'antocians</b>                            | -Quantificació d'antocians<br>-Obtenció resultats  |  |   |   |  |
| <b>Inòcul puntual</b>                                   | -Preparar cultiu d' <i>Eca</i> i aigua estèril<br>-Rentar les patates                              | -Preparar l'inòcul d' <i>Eca</i> i d'aigua estèril<br>-Punxar les patates amb l'inòcul |   |   | -Mesura extensió podridura<br>-Obtenció de resultats |
| <b>Supervivència cel·lular</b>                          | -Preparar cultiu d' <i>Eca</i> i aigua estèril<br>-Rentar les patates<br>-Autoclavar filtres paper | -Fer discos de patata<br>-Incubar disc patata / paper filtre inoculat                  | -Assaig tinció vital<br>-Obtenció de resultats          |   |  |
| <b>Observació histològica del tubercle de la patata</b> |  |  | Observació i descripció de les estructures del tubercle |   |  |
| <b>Activitat polifenol-oxidasa</b>                      |  |  |   | -Assaig polifenol-oxidasa<br>-Obtenció de resultats |  |

1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

1.b.1. Contingut d'antocians en les patates de la varietat Agata i Vitelotte

Introducció

Els **antocians** (o antocianines) són el grup més important de pigments **hidrosolubles** visibles per a l'ull humà. Es troben als vacúols de les cèl·lules vegetals i proporcionen color rosa, vermell, taronja, blau, morat, violeta i púrpura a diferents estructures vegetals de plantes superiors com flors, fulles, fruits, tiges i arrels. Els antocians no s'han de confondre amb els carotenoides (grocs i vermells), un grup de pigments vegetals **liposolubles** també visibles per a l'ull humà.

Les funcions dels antocians a les plantes són múltiples, des de la protecció de la radiació ultraviolada fins a l'atracció d'insectes pol·linitzadors. En els últims anys l'interès pels antocians s'ha intensificat perquè posseeixen importants propietats terapèutiques i farmacològiques beneficioses per als humans.

Químicament, els antocians pertanyen a la família dels polifenols i es defineixen com flavonoides fenòlics. Són antocianidines glicosilades, és a dir, estan constituïdes per una molècula d'antocianidina (l'aglicona) a la qual s'uneix un glúcid mitjançant un enllaç  $\beta$ -glucosídic. L'estructura química bàsica de l'aglicona (antocianidina) és el grup flavili, format per un anell benzopirè (A) unit a un anell fenílic (B) (figura 1).

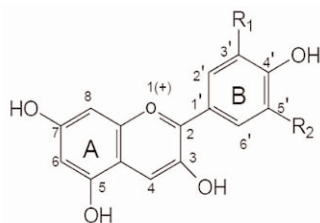


Figura 1. Estructura bàsica de les antocianidines. Extret i modificat de <http://www.cq.ufam.edu.br/Experimentos/acai/acai.html>

Aquesta estructura bàsica pot tenir diferents substituents (R1, R2), els més comuns dels quals són els

descrits a la taula 1. En funció d'aquests substituents, i d'altres factors com el pH, el pigment presentarà una coloració o una altra dins de l'ampli

| Nom de l'aglicona o antocianidina | SUBSTITUCIÓ R1 | SUBSTITUCIÓ R2 |
|-----------------------------------|----------------|----------------|
| Pelargonidina                     | H              | H              |
| Cianidina                         | OH             | H              |
| Delfinidina                       | OH             | OH             |
| Peonidina                         | OCH3           | H              |
| Petunidina                        | OCH3           | OH             |
| Malvidina                         | OCH3           | OCH3           |

Figura 2. Nom i estructura de les antocianidines més comunes.

ventall de tonalitats que van des del blau fins al vermell (blau, púrpura, violeta, lila, fúcsia, etc.).

La combinació de les antocianidines amb diferents glúcids (els més comuns són la D-glucosa, L-ramnosa, D-galactosa, D-xilosa o D-arabinosa) dona lloc a una gran varietat d'antocians.

En el nostre cas, la coloració blavosa de les patates és donada pel contingut en l'antocià malvidina-3-p-coumarilglucòsid. Així, per determinar el contingut total d'antocians de les patates ens basarem en la capacitat d'absorció d'aquest compost a la regió visible de l'espectre electromagnètic. Com que l'antocià malvidina-3-p-coumarilglucòsid presenta el seu màxim d'absorció a una longitud d'ona ( $\lambda$ ) de 545 nm, la seva quantificació es realitzarà a aquesta  $\lambda$ .

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### Disseny experimental

1. Definició del problema:

2. Definició de conceptes:

a. Variable Independent:

b. Variable Dependent:

c. Constants:

d. Grup control:

e. Grup experimental:

3. Formulació de la hipòtesi:

4. Disseny del procediment experimental

En parella (grup) s'analitzarà una sola patata. La meitat dels grups de la classe analitzaran patates Àgata, i l'altra meitat, patates Vitelotte. Cada grup farà l'experiment utilitzant tres rèpliques internes d'una mateixa patata, és a dir, de la mateixa unitat experimental.

Taula 1

| Grup | Nom i cognom dels estudiants del grup | Varietat d'estudi | Mostres per analitzar              |
|------|---------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 2    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 3    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 4    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 5    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 6    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 7    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 8    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 9    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

**Procediment**

L'assaig que fem servir per determinar el **contingut total d'antocians** es basa en el mètode descrit per Jansen i Flamme (2006) amb modificacions.

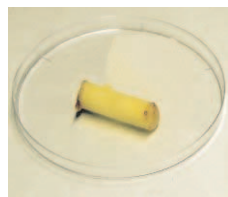
Abans de començar cal que tingueu clar el disseny experimental i el protocol que fareu servir. Per a més informació sobre l'espectrofotometria d'absorció podeu consultar l'annex 2.c. També cal que localitzeu el material i els aparells que necessitareu per a la pràctica.

**Material:**

- Una patata (v. Àgata o Vitellote)
- Foradataps d'1,2 cm de diàmetre
- Tallador
- Placa petri
- Pinces
- Bisturí
- Tubs de vidre
- Espàtula
- Guants
- Espectrofotòmetre
- Solució d'extracció (8,5 ml de etanol 90% + 1,5 ml de HCl 1M)
- Gel i caixa de porexpan
- Eppendorfs d'1,5 ml
- Pipetes i puntes
- Centrífuga eppendorffs
- Cubetes d'espectrofotometria
- Gradeta de cubetes
- Gradeta eppendorffs
- Vòrtex

**Protocol**

1. **Per cada una de les rèpliques internes** (consultar disseny del procediment experimental), extraieu un cilindre de patata amb el foradataps i dipositeu-lo en una placa de petri.



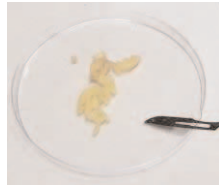
Aspecte d'un cilindre de patata. Autor: M. Pérez-Garay

2. Sobre la placa de Petri i de manera ràpida per evitar l'evaporació d'aigua, tal·leu 3 discos de patata amb el tallador. Comenceu per un dels extrems del cilindre i continueu cap a l'interior; de manera que un dels discos contingui la pell, el segon el còrtex i el tercer el parènquima de reserva (medulla externa). **Tingueu cura de no ferir-vos quan feu servir el tallador!**
3. Peseu ràpidament els discos de patata (els tres junts) i anoteu-ne el pes.
4. Trossegeu els discos en fraccions molt i molt petites amb el bisturí i transferiu-les a un tub de vidre amb l'ajuda d'una espàtula.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià



Aspecte d'un cilindre de patata trossejat. Autor: M. Pérez-Garay

5. Afegiu al tub 2 ml de la solució d'extracció, tapeu-lo amb parafilm, agiteu-lo amb el vòrtex i deixeu incubar en gel durant 1 h. Cada 15 min cal que agiteu amb el vòrtex.
6. Transferiu 1,2 ml del sobrenedant a un tub d'Eppendorf d'1,5 ml (amb micropipeta) procurant no emportar-vos sediment i centrifugueu 5 min a 13.000 rpm. Recordeu equilibrar la centrífuga
7. Recolliu 1 ml de sobrenedant a un nou tub d'Eppendorf d'1,5 ml sense emportar-vos sediment. **És molt important no emportar-vos sediment ja que s'obtidria una solució tèrbola que interferiria en la lectura de l'absorbància.**
8. Si la patata és de la varietat Vitelotte:
  - a. Prepareu el blanc d'espectrofotometria amb 1 ml de solució d'extracció.
  - b. Prepareu una dilució 1/40 de l'extracte de patata i afegiu 1 ml d'aquesta a la cubeta d'espectrofotometria.
  - c. Mesureu l'absorbància a  $\lambda = 545 \text{ nm}$
9. Si la patata és blanca:
  - a. Prepareu el blanc d'espectrofotometria amb 1 ml de solució d'extracció.
  - b. Afegiu 1 ml de l'extracte de patata a la cubeta d'espectrofotometria.
  - c. Mesureu l'absorbància a  $\lambda = 545 \text{ n}$

1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

1.a.2. Anàlisi de diferents dissenys experimentals a partir de dades bibliogràfiques  
**RESULTATS INDIVIDUALS**

Results individuals

1. Varietat i nombre de mostres analitzades i registre d'incidències:

2. Valors d'absorbància i pesos obtinguts:

Taula 2

|   | Varietat _____ |           |           |
|---|----------------|-----------|-----------|
|   | Rèplica 1      | Rèplica 2 | Rèplica 3 |
| Unitats d'absorbància<br>( $\lambda = 545 \text{ nm}$ ) |                |           |           |
| Pes fresc (g)   |                |           |           |

3. Per cada mostra, calculeu la quantitat d'antocians per kg de pes fresc de patata (mg antocians kg<sup>-1</sup> patata) a partir dels valors de la taula i dels que es mostren a continuació. Escriviu el vostre resultat a la taula.

- Coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) de la malvidina-3-p-coumaril-glucòsid =  
 $3,02 \times 10^4 \text{ UA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (consulteu l'annex 2.c.)
- Pes molecular (PM) de la malvidina-3-p-coumaril-glucòsid =  $718,5 \text{ g mol}^{-1}$
- Volum de tampó d'extracció =
- Dilució de l'extracte =

Taula 3

|  | Varietat _____ |           |           | Valors estadístics |                     |
|--|----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------------|
|  | Rèplica 1      | Rèplica 2 | Rèplica 3 | Mitjana            | Desviació estàndard |
| quantitat d'antocians<br>(mg antocians kg <sup>-1</sup><br>fresc patata) |                |           |           |                    |                     |



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### Resultats globals de l'experiment

I. Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 4

|           |           | Contingut d'antocians (mg antocians kg <sup>-1</sup> fresc patata) |                     |                  |                     |
|-----------|-----------|--|---------------------|------------------|---------------------|
|           |           | De cada patata   |                     | De cada varietat |                     |
| Núm. grup | Varietat  | Mitjana  | Desviació estàndard | Mitjana          | Desviació estàndard |
| 1         | Vitelotte |  |                     |                  |                     |
| 2         | Vitelotte |  |                     |                  |                     |
| 3         | Vitelotte |  |                     |                  |                     |
| 4         | Vitelotte |  |                     |                  |                     |
| 5         | Àgata     |  |                     |                  |                     |
| 6         | Àgata     |  |                     |                  |                     |
| 7         | Àgata     |  |                     |                  |                     |
| 8         | Àgata     |  |                     |                  |                     |
| 9         | Àgata     |  |                     |                  |                     |

2. Representació gràfica dels resultats de l'experiment:

#### Discussió i conclusions

- Les dades obtingudes responen al problema plantejat? Justifiqueu la resposta.
- S'ha confirmat la hipòtesi de partida? Justifiqueu la resposta.

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*) (*Pectobacterium atrosepticum*)

## Introducció

El sòl és un ecosistema que conté una gran quantitat de microorganismes com bacteris i fongs. Dins d'aquests microorganismes del sòl s'hi troben patògens de la patata, com els bacteris de l'espècie *Erwinia carotovora*. Les patates, com que són tubercles que han crescut dins el sòl, presenten a la seva superfície una gran quantitat d'aquests microorganismes.

*Erwinia carotovora* és un bacteri gramnegatiu anaeròbic facultatiu que actua en climes temperats. La infecció per aquest bacteri provoca la **podridura tova** del tubercle de patata. Al camp, si la infecció no es controla o bé es planten tubercles infectats per obtenir el conreu següent, *Erwinia carotovora* s'estén cap a la part aèria i podreix i panseix tota la planta, la qual cosa provoca el que s'anomena el **peu negre**.

*Erwinia carotovora* es classifica com a patògen vegetal ja que **secretava enzims** capaços de **degradar la paret cel·lular primària cel·lulòsica** de les cèl·lules vegetals, alliberar-ne el contingut i avançar dins el teixit. Aquest procés inicialment produeix la maceració del teixit, el qual acabarà podrint-se i donant lloc a la podridura tova de la patata. No obstant això, els enzims bacterians secretats no poden degradar les parets cel·lulars que s'han engruixit per deposició dels biopolímers lignina o suberina. Aquest és el cas de la pell suberosa de la patata, la qual actuarà de barrera protectora per a l'entrada de patògens. D'aquesta manera, *Erwinia carotovora*, per accedir a la part carnosa de la patata, principalment ho farà a través de les ferides de la pell, però també per les lenticel·les.\* Les ferides a la patata es produeixen bàsicament durant l'emmagatzematge, ja que és en aquest moment, acabades de collir del camp, quan la pell no ha adquirit encara les propietats fisicoquímiques necessàries per fer-se resistent a l'abradió. Aleshores, les condicions d'infecció per part d'*Erwinia carotovora* seran les més propícies, i

més quan l'emmagatzematge es doni en condicions d'humiditat elevada i poca ventilació, cosa que facilita les condicions d'anaerobiosi necessàries per al creixement ràpid del bacteri. Tant és així que les pèrdues econòmiques més importants per l'efecte d'aquest patògen es produeixen durant l'emmagatzematge dels tubercles, i poden arribar a pèrdues de producció de fins al 100% i de milions d'euros.

Per avaluar la resistència de les patates a la infecció per *Erwinia carotovora* utilitzarem la soca *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*), també coneguda com *Pectobacterium atrosepticum*. Tot i que hi ha diversos mètodes per estudiar la resistència de la patata a *Eca*, en el nostre cas tindrem en compte que *Eca* no pot travessar la pell i per això infectarem directament el teixit parenquimàtic de la patata (com si s'hi accedís a través d'una ferida). La nostra intenció serà infectar les patates amb una concentració d'inòcul d'*Eca* coneguda i constant. Per això, per evitar que els bacteris i fongs propis del sòl (especialment *Eca*) participin en aquesta infecció i ens emmascarin els resultats, caldrà desinfectar prèviament les patates. Els mètodes que utilitzarem seran:

- **inòcul puntual** per avaluar la capacitat de la patata per frenar l'extensió de la maceració del teixit (podridura).
- **assaig de supervivència cel·lular** per avaluar la resistència de les parets cel·lulars a ser degradades.

Cada un d'aquests assajos requereix uns procediments previs comuns que consten del rentat de les patates i de la preparació de l'inòcul, els quals estan explicats a l'apartat a (procediments previs). El desenvolupament específic de l'inòcul puntual i l'assaig de la supervivència cel·lular es presenten als apartats corresponents b i c (inòcul puntual i supervivència cel·lular, respectivament), cada un d'ells amb el seu disseny experimental propi.

\* lenticel·la: conducte de teixit suberós lax o no suberificat (depenent de l'espècie) pel qual és possible el bescanvi de gasos entre l'atmosfera i els teixits interns.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### a. Procediments previs

##### Procedimientos

El procediment utilitzat es basa en els mètodes descrits per Austin i col·laboradors (1988), Zimnoch-Guzowska i col·laboradors (2000) i Jansky i Rouse (2003) amb modificacions.

Abans de començar cal que tingueu clar el disseny experimental dels assajos associats a aquests procediments previs (inòcul puntual i supervivència cel·lular) i el protocol que fareu servir. També cal que localitzeu el material i els aparells que necessitareu per a la pràctica.

#### Rentat de les patates

##### Material:

- Patates (v. Àgata o v. Vitelotte)
- Sabó rentaplats
- Dues galledes
- Solució d'hipoclorit sòdic comercial al 0,5%
- Paper de cel·lulosa
- Vaporitzador amb alcohol 70%
- Guants

##### Protocol:

Aquest protocol es durà a terme conjuntament amb tota la classe. Cal rentar les patates necessàries per fer els assajos de l'inòcul puntual i de supervivència cel·lular. La nostra classe consta de \_\_\_\_\_ alumnes. El nombre de patates que rentem de la varietat Vitelotte és \_\_\_\_\_ i de la varietat Àgata és \_\_\_\_\_.

1. Utilitzant un recipient (galleda) suficientment gran per a cada varietat, feu els rentats de les patates següents:

- a) aigua de l'aixeta i sabó vigilant de **NO masegar-les**.
- b) aigua de l'aixeta per esbandir-les.
- c) solució d'hipoclorit sòdic comercial al 0,5% (el lleixiu comercial sol estar al voltant del 5%) durant 40 min.
- d) aigua de l'aixeta.

2. Poseu les patates sobre un paper de cel·lulosa i vaporitzeu-les amb una solució d'alcohol 70%.

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

3. Deixeu-les assecar abans d'utilitzar-les (es poden deixar tota la nit).

## Preparació de l'inòcul

## Material:

- Cultiu sòlid d'Eca
- 2 tubs de cultiu amb 10 ml de brou nutritiu
- Nansa de Kolle
- Incubadora a 26°C
- Bec de Bunsen
- Encenedor
- Tubs d'Eppendorf 2 ml estèrils
- Centrífuga d'Eppendorf
- Aigua de l'aixeta autoclavada (estèril)
- Espectrofotòmetre
- Cubetes d'espectrofotometria
- 2 tubs de Falcon de 50 ml
- Caixa de puntes blaves estèril
- Caixa de puntes grogues estèril
- Contenidor de residus biològics
- Joc de micropipetes
- Gradeta tubs d'Eppendorf
- Gradeta tubs de Falcon de 50 ml
- Gradeta de cubetes

## Protocol:

Aquest protocol el durà a terme cada parella d'alumnes (grup). S'han de mantenir les **condicions estèrils!** Tot el material que hagi estat en contacte amb el bacteri *Eca* s'ha d'abocar en recipients especials per a residus biològics.

1. Creixement d'Eca en brou nutritiu.

- a) Amb una nansa de Kolle, piqueu 2 colònies d'Eca prèviament crescudes en agar nutritiu i inoculeu-les en un tub de cultiu amb 10 ml de brou nutritiu prèviament preparat (annex 2.b.). Feu un control negatiu per assegurar que es treballa en condicions estèrils adequades.
- b) Incubeu a 26°C durant tota la nit (*overnight*).

2. Preparació de l'inòcul (**condicions estèrils**). Caldrà preparar els inòculs per dur a terme els assajos de l'inòcul puntual i la supervivència cel·lular, cadascun d'ells amb la concentració bacteriana adequada. No obstant això, per a ambdós assajos partirem d'un inòcul mare o stock que es prepara seguint l'esquema següent:

- a) Poseu 1,9 ml de cultiu líquid d'Eca en un tub d'Eppendorf de 2 ml estèril.
- b) Centrifugueu durant 1 min en una centrífuga de sobretaula a les màximes revolucions.
- c) Elimineu el sobrenedant per abocament.
- d) Repetiu el pas a, b i c dues vegades més.
- e) Resuspeneu el sediment amb 1,5 ml d'aigua de l'aixeta estèril.
- f) Centrifugueu durant 1 min en una centrífuga de sobretaula amb les màximes revolucions.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

- g) Elimineu el sobrenedant per abocament.
- h) Resuspeneu el sediment amb 1,9 ml d'aigua de l'aixeta estèril.
- i) Amb una punta estèril, prepareu 800 µl d'una dilució 1/4 a un tub d'Eppendorf.
- j) Pipetegeu els 800 µl en una cubeta de plàstic d'espectrofotometria. Prepareu també el blanc d'espectrofotometria.
- k) Mesureu la turbiditat a  $\lambda = 530$  nm.
- l) Prepareu els inòculs i els blancs per poder dur a terme l'inòcul puntual i l'assaig de la supervivència. Recordeu fer-ho en condicions estèrils.

**PROCEDIMENTS**  
1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (Eca)

1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (Eca)  
**RESULTATS INDIVIDUALS**

**Resultats individuals**

1. Valor d'absorbància obtingut ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ):

2. Utilitzant aquest valor d'absorbància i seguint la relació proporcional que se us mostra a continuació, mesureu la concentració cel·lular de l'inòcul mare o stock:

$$0,8 \text{ UA}_{\lambda=530\text{nm}} = 5 \times 10^8 \text{ cfu ml}^{-1}$$

3. Busqueu la informació dels inòculs que cal preparar en els diferents protocols i feu els càlculs necessaris per obtenir-los a la concentració adequada amb aigua de l'aixeta estèril. Una vegada calculat, prepareu els inòculs i els blancs.

**Taula 5**

|  | Experiments    |                         |
|--|----------------|-------------------------|
|  | Inòcul puntual | Supervivència cel·lular |
| Concentració adequada (concentració final) |                |                         |
| Volum necessari (volum final)              |                |                         |
| Volum d'inòcul mare (volum inicial)        |                |                         |

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### b. Inòcul puntual

##### Disseny experimental

1. Definició del problema:

2. Definició de conceptes:

a. Variable independent:

b. Variable dependent:

c. Constants:

d. Grup control:

e. Grup experimental:

f. Control negatiu de l'experiment:

3. Formulació de la hipòtesi:

4. Disseny del procediment experimental:

Cada alumne/a analitzarà una patata de tal manera que cada grup (parella d'alumnes) analitzarà una patata de la varietat Vitelotte i una de la varietat Àgata. Dins de cada unitat experimental es faran tres rèpliques internes, és a dir, dins de la mateixa patata, inoculades amb Eca, i tres rèpliques internes inoculades amb aigua (control negatiu).

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

Taula 6

| Grup | Nom i cognom dels estudiants del grup | Varietat d'estudi | Rèpliques analitzades                    |
|------|---------------------------------------|-------------------|--|
| 1    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 2    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 3    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 4    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 5    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 6    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 7    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 8    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
| 9    |                                       | Vitelotte         | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 6 (3 Eca + 3 aigua d'una mateixa patata) |



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### Procediment

El procediment utilitzat per a l'assaig de l'inòcul puntual es basa en els mètodes descrits per Elphinstone (1987), Austin i col·laboradors (1988), Zimnoch-Guzowska i col·laboradors (2000) i Jansky i Rouse (2003) amb modificacions.

Abans de començar cal que tingueu clar el disseny experimental i el protocol que fareu servir. Per a més informació sobre l'espectrofotometria d'absorció podeu consultar l'annex 2.c. També cal que localitzeu el material i els aparells que necessitareu per a la pràctica.

#### Material:

- Patates (v. Àgata o v. Vitelotte)
- Inòcul d'*Eca* a  $7 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>
- Inòcul control
- Bec de Bunsen
- Encenedor
- Caixes de puntes grogues estèrils
- Micropipeta per 10  $\mu$ l volum
- Gomets
- Paper de laboratori
- Caixes de plàstic amb tapa
- Peu de rei
- Placa de Petri reutilitzada
- Caixa de cartró gran
- Ganivet
- Llapis
- Cullera
- Contenidor de residus biològics
- Gradeta de tubs d'Eppendorf

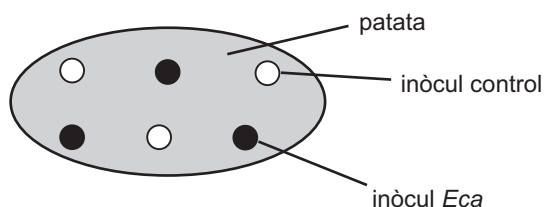
#### Protocol:

S'han de mantenir les condicions estèrils! Tot el material que hagi estat en contacte amb el bacteri *Eca* s'ha d'abocar en recipients especials per a residus biològics.

1. Disposeu de 100  $\mu$ l d'un inòcul d'*Eca* a  $1 \times 10^9$  cfu ml<sup>-1</sup> en aigua de l'aixeta estèril que heu de mantenir en condicions estèrils durant tot el procés (procediments previs).

2. Disposeu de patates prèviament desinfectades (procediments previs).

3. Infecteu les patates amb 3 inòculs d'*Eca* i 3 inòculs d'aigua de l'aixeta estèril (control) seguint dues franques i intentant intercalar els dos tipus d'inòcul tal com es mostra:



Esquema de la situació dels inòculs a la patata. Autor: O. Serra

a) Pipetegeu 10  $\mu$ l de l'inòcul prèviament agitat amb una punta groga estèril.

1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*)  
**PROCEDIMENT**

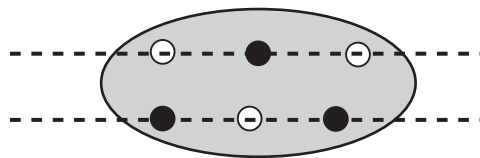
- b) Punxeu la patata enfonsant la punta uns 2-4 mm de fondària.
- c) Allibereu l'inòcul.
- d) Traieu la punta de dins la patata i llenceu-la al contenidor de residus adequat.
- e) Repetiu el pas amb les punxades que resten. Després de fer les punxades control enganxeu un gomet a sobre del foradet per discernir entre inòculs control i *Eca*. No retoleu el gomet!

4. Embolcal·leu les patates amb paper de laboratori completament humit tenint cura que els gomets no caiguin. Traieu l'excés d'aigua exprimint suaument l'embolcall.

5. Poseu les patates embolcallades a dins una caixa de plàstic amb paper humit al fons. Per identificar les patates de cada grup, retoleu un trosset de paper amb llapis i situeu-lo a sobre/sota dels embolcalls. Tanqueu la caixa i incubeu-ho durant 72 h a temperatura ambient i en la foscor (dins una caixa de cartró per exemple).

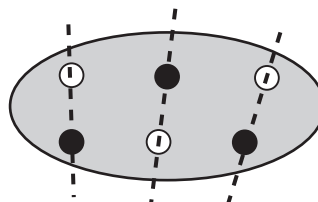
Passades les 72 h

6. Desembolqueu les patates i talleu-les amb un ganivet pels punts d'inòculs tal com es mostra:



Esquema del tall. Autor: O. Serra

En cas que els punts d'inòcul no haguessin quedat en una mateixa línia de tall, talleu de la manera següent:



Esquema del tall. Autor: O. Serra

7. amb una cullera de postres el macerat corresponent als inòculs d'*Eca* i control i poseu-lo en una placa de Petri reutilitzada. **Controleu sempre els foradets amb gomet corresponent als inòculs control.**

8. Mesureu amb un peu de rei el diàmetre màxim de l'extensió de la podridura per cada inòcul.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### Resultats individuals

1. Varietat i nombre de mostres analitzades i registre d'incidències:

2. Apunteu els valors dels diàmetres de les punxades obtinguts pel grup i calculeu-ne els paràmetres estadístics:

**Taula 7**

| Varietat Àgata, punxades control (mm) |        |         |                     |
|---------------------------------------|--------|---------|---------------------|
|                                       | Valors | Mitjana | Desviació estàndard |
| 1                                     |        |         |                     |
| 2                                     |        |         |                     |
| 3                                     |        |         |                     |

**Taula 8**

| Varietat Àgata, punxades <i>Eca</i> (mm) |        |                          |         |                     |
|--|--------|--------------------------|---------|---------------------|
|  | Valors | Valors - mitjana control | Mitjana | Desviació estàndard |
| 1  |        |                          |         |                     |
| 2  |        |                          |         |                     |
| 3  |        |                          |         |                     |

**Taula 9**

| Varietat Vitelotte, punxades control (mm) |        |         |                     |
|---|--------|---------|---------------------|
|   | Valors | Mitjana | Desviació estàndard |
| 1   |        |         |                     |
| 2   |        |         |                     |
| 3   |        |         |                     |

**Taula 10**

| Varietat Vitelotte, punxades <i>Eca</i> (mm) |        |                          |         |                     |
|--|--------|--------------------------|---------|---------------------|
|  | Valors | Valors - mitjana control | Mitjana | Desviació estàndard |
| 1  |        |                          |         |                     |
| 2  |        |                          |         |                     |
| 3  |        |                          |         |                     |

1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (Eca)  
**RESULTATS GLOBALS**

Resultats globals de l'experiment

I. Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 11

| Àgata: extensió de la podridura per efecte d'Eca (mm) |         |                     |                |                     |
|---|---------|---------------------|----------------|---------------------|
| De cada patata  |         |                     | De la varietat |                     |
| Núm. grup   | Mitjana | Desviació estàndard | Mitjana        | Desviació estàndard |
| 1   |         |                     |                |                     |
| 2   |         |                     |                |                     |
| 3   |         |                     |                |                     |
| 4   |         |                     |                |                     |
| 5   |         |                     |                |                     |
| 6   |         |                     |                |                     |
| 7   |         |                     |                |                     |
| 8   |         |                     |                |                     |
| 9   |         |                     |                |                     |

Taula 12

| Vitelotte: extensió de la podridura per efecte d'Eca (mm) |         |                     |                |                     |
|---|---------|---------------------|----------------|---------------------|
| De cada patata  |         |                     | De la varietat |                     |
| Núm. grup   | Mitjana | Desviació estàndard | Mitjana        | Desviació estàndard |
| 1   |         |                     |                |                     |
| 2   |         |                     |                |                     |
| 3   |         |                     |                |                     |
| 4   |         |                     |                |                     |
| 5   |         |                     |                |                     |
| 6   |         |                     |                |                     |
| 7   |         |                     |                |                     |
| 8   |         |                     |                |                     |
| 9   |         |                     |                |                     |

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

2. Representació gràfica dels resultats de l'experiment:

#### Discussió i conclusions

- a. Les dades obtingudes responen al problema plantejat? Justifiqueu la resposta.
- b. S'ha confirmat la hipòtesi de partida? Justifiqueu la resposta.

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### c. Supervivència cel·lular

##### Disseny experimental

##### 1. Definició del problema:

##### 2. Definició de conceptes:

- a. Variable independent:
- b. Variable dependent:
- c. Constants:
- d. Grup control:
- e. Grup experimental:
- f. Control negatiu de l'experiment:

##### 3. Formulació de la hipòtesi:

##### 4. Disseny del procediment experimental:

Cada alumne/a analitzarà una patata de tal manera que cada grup (parella d'alumnes) analitzarà una patata de la varietat Vitelotte i una de la varietat Àgata. Per cada unitat experimental no es faran rèpliques internes, però sí que es farà un control negatiu, el qual consistirà a inocular aigua en comptes d'Eca. Tot i que per a cada anàlisi s'utilitzaran 3 discos de medul·la interna, aquests no es poden considerar rèpliques ja que no s'analitzaran per separat.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

Taula 13

| Grup | Nom i cognom dels estudiants del grup | Varietat d'estudi | Mostres a analitzar                           |
|------|---------------------------------------|-------------------|---|
| 1    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 2    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 3    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 4    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 5    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 6    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 7    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 8    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
| 9    |                                       | Vitelotte         | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |
|      |                                       | Àgata             | 2 ( <i>Eca</i> i aigua en una mateixa patata) |

1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*)  
ANÀLISI DE DISSENY EXPERIMENTALS

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

**Procediment**

El procediment utilitzat per a l'assaig de la **supervivència cel·lular** a través de la tinció amb un colorant vital (vermell neutre) es basa en el mètode descrit per Wegener (2002) amb modificacions.

Abans de començar cal que tingueu clar el disseny experimental i el protocol que fareu servir. Per a més informació sobre l'espectrofotometria d'absorció podeu consultar l'annex 2.c. També cal que localitzeu el material i els aparells que necessitareu per a la pràctica.

**Material:**

(per grup)

- Patates (1 Àgata i 1 Vitelotte)
- 30 ml d'inòcul d'Eca a  $5 \times 10^5$  cfu ml<sup>-1</sup>
- 30 ml d'inòcul control
- Bec de Bunsen
- Encenedor
- 4 papers de filtre de 6 x 6 cm<sup>2</sup>
- 4 plaques de Petri estèrils
- Tallador
- Retolador de vidre
- Foradataps d'1,2 cm diàmetre
- Parafilm
- Pinces
- Contenidor de residus biològics
- Incubadora a 22°C
- Agitador orbital
- 4 tubs de Falcon de 50 ml reutilitzables
- Aigua milli-Q autoclavada
- Solució de vermell neutre 50 mg l<sup>-1</sup> dissolta en 0,2 M de tampó fosfat pH 7,5; 0,8 M KNO<sub>3</sub>
- Etanol 96%
- Àcid sulfúric (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,02 N
- Espectrofotòmetre
- 8 cubetes d'espectrofotometria
- Gradeta de tubs de Falcon de 50 ml
- Gradeta per a cubetes
- Contenidor de residus biològics
- Recipient amb alcohol per flamejar les pinces
- Cronòmetre
- Proveta de 50 ml
- Paper de plata

**Protocol:**

S'han de mantenir les **condicions estèrils!** Tot el material que hagi estat en contacte amb el bacteri *Eca* s'ha d'abocar en recipients especials per a residus biològics.

**En parella:**

1. Disposeu de patates prèviament desinfectades (procediments previs).
2. Disposeu de 30 ml d'un inòcul d'Eca a  $5 \times 10^5$  cfu ml<sup>-1</sup> en aigua de l'aixeta estèril i del seu control pertinent (30 ml d'aigua de l'aixeta estèril), els quals heu de mantenir en condicions estèrils durant tot el procés (procediments previs).
3. Flamegeu les pinces per esterilitzar-les. Utilitzeu-les per disposar en una placa de Petri estèril prèviament retolada dos papers de filtre de 6 x 6 cm<sup>2</sup>. Tot seguit, aboqueu-hi els 30 ml de l'inòcul control (aigua estèril).



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

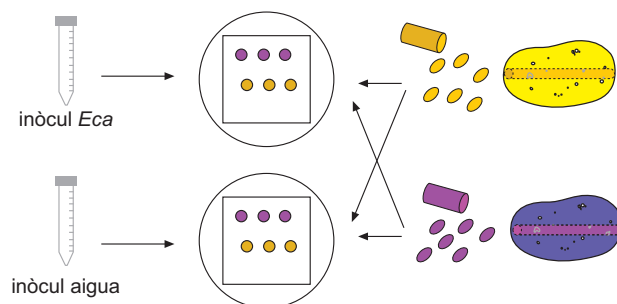
### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

4. Repetiu el pas 3 en una nova placa però afegint-hi 30 ml d'inòcul d'*Eca*.
5. Amb les pinces estèrils agafeu un dels papers submergits en l'inòcul control, deixeu que perdi l'excés de líquid i poseu-lo dins una nova placa de Petri prèviament retolada amb el núm. de grup, el tipus d'inòcul i la data. Recordeu de tancar les plaques.
6. Repetiu el pas 5 en una nova placa però amb l'inòcul d'*Eca*.

**Cada membre de la parella treballarà, si pot ser alhora, amb una varietat de patata diferent seguint el protocol següent.**

7. Amb l'ajuda d'un foradataps d'1,2 cm de diàmetre, extreu el cilindre medular d'una patata de la varietat amb la qual treballis.
8. De manera ràpida però curosa utilitza el tallador format per la doble fulla d'afaitar per tallar 6 discos de patata (faran uns 2 mm) evitant els extrems finals (descarta la pela). Ajuda't amb les pinces prèviament flamejades.
9. Dels 6 discos obtinguts, col·loca'n 3 en cada placa de Petri preparada en els punts 5 i 6.

La suma del treball individual dels dos membres del grup donarà que a cada placa de Petri hi haurà 6 discos, 3 de Vitelotte i 3 d'Àgata, tal com es mostra a l'esquema següent:



Esquema del procediment. Autor: O. Serra

#### En parella:

10. Amb les pinces estèrils agafeu el paper que està submergit en l'inòcul control, deixeu que perdi l'excés de líquid i col·loqueu-lo dins la placa de Petri corresponent tapant els discos de patata. Assegureu-vos que la superfície dels discos està en contacte per les dues cares amb els papers inoculats.
11. Repetiu el pas 10 però amb la placa de Petri corresponent a l'inòcul *Eca*.
12. Amb cura per no desplaçar els discos, segelleu les plaques de Petri amb parafilm i emboliqueu-les amb paper de plata (foscor).

## 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

13. Incubeu-les tota la nit (16 h) a 22°C.

Passades les 16 h feu la tinció vital amb vermell neutre.

A partir d'aquí es pot treballar en **condicions NO estèrils**. Cada membre del grup treballarà individualment amb una varietat de patata.

14. Recupereu les plaques de Petri incubades durant la nit corresponents al vostre grup.

15. Per a la teva varietat de treball, col·loca els discos de patata que hagin estat en *Eca* o control en tubs de Falcon de 50 ml diferents, prèviament retolats amb el núm. del teu grup, el nom de la varietat elegida i el tipus d'inòcul (aigua o *Eca*). Això implica que cada membre del grup treballi amb 2 tubs.

16. Afegeix-hi 20 ml d'aigua i deixa-ho 60 min en agitació horitzontal suau.

17. Treu l'aigua per abocament i afegeix-hi 15 ml d'una solució de vermell neutre. Deixa-ho que es tenyeixi 90 min en agitació horitzontal suau.

18. Recupera el colorant per abocament i renta els discos amb 20 ml d'aigua per eliminar l'excés de colorant.

19. Treu l'aigua per abocament i renta novament amb 20 ml d'aigua.

20. Treu l'aigua per abocament i afegeix-hi 10 ml d'etanol 96% per extreure el colorant. Deixa-ho 15 minuts en agitació horitzontal suau.

21. Recupera l'extracte de colorant en un tub prèviament retolat (núm. de grup, nom de la varietat elegida i tipus d'inòcul).

22. Afegeix als discos de patata 10 ml més d'etanol 96% com a segona extracció del colorant. Deixa-ho 15 minuts en agitació horitzontal suau.

23. Recupera el 2n extracte de colorant en el mateix tub del punt 21 i afegeix-hi 30 ml d'àcid sulfúric ( $H_2SO_4$ ) 0,02 N.

**En grup:**

24. Per tal de mesurar l'absorbància de l'extracte, afegiu en una cubeta 1 ml de blanc d'espectrofotometria amb les mateixes proporcions de solvents que té la mostra - etanol 96%:  $H_2SO_4$  0,02 N (2:3).

25. Prepareu les 4 cubetes de les vostres mostres amb 1 ml d'extracte de colorant.

26. Mesureu l'absorbància a  $\lambda = 535$  nm.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### Resultats individuals

1. Varietat i nombre de mostres analitzades, i registre d'incidències:

1.b.2. Infecció amb *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Eca*)  
**RESULTATS INDIVIDUALS**

2. Apunta els valors d'absorbància obtinguts a  $\lambda = 535$  nm.

**Taula 14**

|           | Absorbància $\lambda = 535$ nm |         |
|-----------|--------------------------------|---------|
|           | <i>Eca</i>                     | control |
| Àgata     |                                |         |
| Vitelotte |                                |         |

3. Les mostres inoculades amb el control es considera el 100% de viabilitat. D'aquesta manera estima el percentatge de supervivència de les varietats Àgata i Vitelotte del teu grup i anota'l a la taula de resultats.

**Taula 15**

|           | % supervivència |  |
|-----------|-----------------|--|
| Àgata     |                 |  |
| Vitelotte |                 |  |

1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

Results globals de l'experiment

I. Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 16

| Núm. grup | Àgata: % supervivència   |                |                     |
|-----------|--------------------------|----------------|---------------------|
|           | De cada patata           | De la varietat |                     |
|           | Valors supervivència (%) | Mitjana        | Desviació estàndard |
| 1         |                          |                |                     |
| 2         |                          |                |                     |
| 3         |                          |                |                     |
| 4         |                          |                |                     |
| 5         |                          |                |                     |
| 6         |                          |                |                     |
| 7         |                          |                |                     |
| 8         |                          |                |                     |
| 9         |                          |                |                     |

Taula 17

| Núm. grup | Vitelotte: % supervivència |                |                     |
|-----------|----------------------------|----------------|---------------------|
|           | De cada patata             | De la varietat |                     |
|           | Valors supervivència (%)   | Mitjana        | Desviació estàndard |
| 1         |                            |                |                     |
| 2         |                            |                |                     |
| 3         |                            |                |                     |
| 4         |                            |                |                     |
| 5         |                            |                |                     |
| 6         |                            |                |                     |
| 7         |                            |                |                     |
| 8         |                            |                |                     |
| 9         |                            |                |                     |

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

2. Representació gràfica dels resultats de l'experiment:

#### Discussió i conclusions

- a. Les dades obtingudes responen al problema plantejat? Justifiqueu la resposta.
- b. S'ha confirmat la hipòtesi de partida? Justifiqueu la resposta.

1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

1.b.3. Observació al microscopi òptic de la morfologia del tubercle de patata

Introducció

El tubercle de patata (*Solanum tuberosum*) és un òrgan de reserva que es forma per l'engruiximent de l'extrem lliure d'un estoló o tija subterrània. Es tracta d'un òrgan polaritzat ja que se'n poden distingir dos pols: el pol apical, que conté el meristema primari i és per on es donarà el creixement, i el pol basal, situat al costat de la tija de l'estoló. Com que s'origina d'una tija subterrània, el tubercle presenta gemmes amb fulles avortades (o escames), també conegudes com els ulls del tubercle. D'aquests ulls és d'on passat un temps de repòs es desenvoluparan els nous brots que donaran lloc a la nova planta. La forma del tubercle sol ser arrodonida o ovalada.

El tubercle de la patata té simetria radial. En secció, s'hi diferencien diferents tipus de teixit de l'interior a l'exterior: la medul·la interna i externa, el còrtex, l'anell vascular i el periderma (que conté la pell) (figura 3). El teixit que fa la funció de reserva de nutrients i que acumula una gran quantitat de midó contingut en amiloplasts es troba principalment a la medul·la externa i per això també se'l coneix com a parènquima de reserva. No obstant això, el còrtex i la medul·la interna també contenen midó. El periderma de la patata és un teixit secundari que

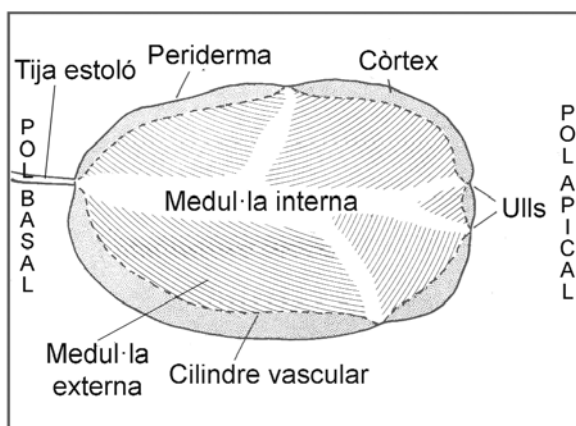


Figura 3. Secció longitudinal d'un tubercle de patata mostrant la disposició dels teixits. Modificat de: Pujol (2001)

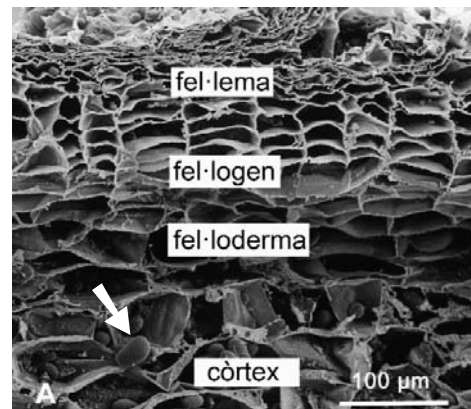


Figura 4. Secció transversal d'un tubercle de patata vist amb el microscopi electrònic de rastreig. S'hi mostra el periderma del tubercle, en el qual es distingeixen de fora cap endins: el fel·lema, el fel·logen i la fel·loderma. Més internament s'hi observa ja el teixit parenquimàtic del còrtex, el qual conté grànuls de midó (fletxa). Extret de Lulai i Freeman (2001).

confereix protecció contra la deshidratació i l'atac de patògens (figura 4). El periderma consta de:

- Fel·logen: meristema secundari format per una o dues capes de cèl·lules meristemàtiques que externament originarà el fel·logen i internament, la fel·loderma.
- Fel·lema: equivalent a la pell de la patata. Són 6-10 capes de cèl·lules que acumulen suberina a la seva paret cel·lular, un biopolímer format per compostos derivats d'àcids grassos i compostos fenòlics. El fel·lema és el responsable de la capacitat protectora del periderma.
- Fel·loderma: 0-2 capes de cèl·lules parenquimàtiques no sempre presents.

El blau de toluïdina és un colorant catiònic que tenyeix, a través de la unió mitjançant un enllaç iònic amb grups carregats negativament, determinades estructures, com grànuls secretors, fibres proteiques i cel·lulòsiques i àcids nucleics. El tipus de coloració que s'obté després de tenyir amb blau de toluïdina serveix per aportar una visió global de l'estructura del teixit per tal de poder fer-ne un diagnòstic histològic.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### Procediment

Abans de començar cal que tingueu clar les parts i el maneig del microscopi (annex 2.e.). Cal que localitzeu el material que necessitareu.

#### Material:

Preparació muntada de tall transversal de patata (fragment) tenyida amb blau de toluidina.

- Microscopi òptic.
- Paper de lents per netejar les lents del microscopi en cas que fes falta.
- Solució orgànica d'etanol al 70% per netejar les preparacions en cas que fes falta.

#### Protocol:

Per utilitzar el microscopi, seguiu els passos següents:

1. Col·loqueu el microscopi davant vostre per treballar amb comoditat i agafeu-lo pel braç.
2. Localitzeu totes les parts del microscopi per poder fer una bona observació, incloent-hi el condensador; que inicialment deixarem en la posició més alta possible (només microscopis amb condensador mòbil).
3. Assegureu-vos que l'interruptor està apagat i que el potenciòmetre que regula la intensitat de la llum està al mínim. Connecteu el microscopi al corrent elèctric. Després enceneu el microscopi i augmenteu la llum a la potència desitjada.
4. Mireu la preparació a contrallum i localitzeu la mostra.
5. Abaixeu la platina i col·loqueu la preparació centrada amb els comandaments de la platina.
6. Assegureu-vos que treballeu amb l'objectiu de menor augment (4x) i, mirant per fora els oculars i utilitzant el cargol macromètric, apugeu la platina fins tant a prop de l'objectiu com sigui possible sense tocar-lo.
7. Ajusteu els oculars a la distància interpupilar per veure la imatge simultàniament amb els dos ulls.
8. Abaixant la platina amb l'ajuda del cargol macro/micromètric, enfoqueu la mostra. No apugeu MAI la platina mirant pels oculars ja que podríeu trencar la preparació! Sempre l'heu d'apujar mirant per fora.
9. Ajusteu el diafragma i condensador per regular l'entrada de llum.
10. Una vegada hàgiu observat la preparació a menys augment, canvieu a un objectiu de més augment (10x) girant el revòlver i mirant per fora per evitar que l'objectiu col·lideixi amb la platina.

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

11. Ajusteu l'enfocament amb el cargol micromètric sempre allunyant l'objectiu de la platina.

12. Repetiu els passos 10 i 11 en cas de voler augmentar a un objectiu més gran. L'objectiu de més augment (100x) funciona amb oli d'immersió, per la qual cosa no es pot usar en sec. Per al diagnòstic histològic no l'utilitzarem.

13. Un cop s'ha acabat l'observació, gireu el revòlver d'objectius en el sentit invers, cap a l'objectiu de menys augment, i deseu la preparació.

14. El microscopi es deixa amb l'objectiu de menys augment posat i amb la platina a la part més baixa. Per tal d'evitar fondre la bombeta, abans d'apagar el microscopi s'ha d'abaixar la intensitat de llum al mínim. Desendolieu el microscopi i protegiu-lo de la pols cobrint-lo amb la funda.

#### Recordatoris:

- Les preparacions són molt valuoses, per la qual cosa n'heu de tenir cura en tot moment.
- En cas de no estar observant la mostra durant una estona abaixeu la intensitat de la llum.
- Si detecteu brutícia al sistema de lents del microscopi (objectius i oculars), s'ha de netejar amb paper de lents per evitar ratllades. No s'ha d'utilitzar mai etanol per netejar les lents ja que les gomes es ressequen i es malmet l'objectiu.
- Per netejar les preparacions de ditades useu etanol al 70% (no l'utilitzeu mai per netejar el microscopi!!!).



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

Observació realitzada:

1. Informació de la preparació observada:

2. Dibuix interpretatiu de la preparació correctament retolat:

1.b.3. Observació al microscopi òptic de la morfologia del tubercle de patata  
**PROCEDIMENT**

1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

1.b.4. Activitat polifenoloxidasa (PPO) en patates de la varietat Àgata i Vitelotte

Introducció

La polifenoloxidasa (PPO)

Les polifenoloxidasas (PPO), també conegudes com tirosinases, són enzims amb capacitat d'inserir un grup hidroxil en la posició -orto (carboni adjacent) d'un grup hidroxil d'un anell aromàtic i donar lloc a un difenol, el qual també serà oxidat per la PPO per donar lloc a la quinona corresponent. Durant la reacció s'utilitza oxigen molecular (figura 5). La PPO té una distribució gairebé universal ja que es troba en animals, plantes, fongs i bacteris. Especialment en plantes i bacteris la seva funció és desconeguda.

L'activitat PPO s'ha relacionat amb els primers estadis de la defensa de les plantes contra els patògens. No obstant això, encara es desconeix el mecanisme d'acció pel qual s'activa aquesta defensa i si aquest està relacionat directament o indirectament amb l'activitat PPO (producció de quinones). A més de la inducció per l'acció de patògens bacterians, l'activitat PPO també s'incrementa per l'atac d'herbívoros i per ferida.

En la patata, quan es produeix una ferida, ja sigui per l'acció mecànica o per la infecció d'un patògen, les cèl·lules es trenquen i alliberen grans quantitats de fenols solubles com la tirosina i l'àcid clorogènic. A més, també s'alliberen PPO que catalitzen l'oxidació de tots aquests fenols alliberats. Són aquests compostos els que donen les coloracions marrono-

ses (indicador d'oxidació) dels teixits vegetals. Es creu que els fenols i els fenols oxidats:

i) inhibeixen el creixement del bacteri *Erwinia carotovora* de la mateixa manera que inhibeixen l'activitat dels seus enzims, que degraden la paret cel·lular;

ii) funcionen com a precursors en la síntesi de la lignina i la suberina, ambdós polímers involucrats en l'enduriment de la paret cel·lular; per tal de crear barreres físiques capaces de bloquejar completament l'extensió dels bacteris. No obstant això, no es pot oblidar que els bacteris també poden tenir capacitat per inhibir i revertir l'oxidació de fenols, sobretot quan la quantitat de bacteris és alta.

Determinació de l'activitat PPO per seguiment d'una reacció enzimàtica

Per quantificar l'activitat enzimàtica d'un enzim d'un extracte proteic cal fer el seguiment de la cinètica de formació de producte a partir del substrat al llarg del temps d'incubació. En el nostre cas testarem l'activitat PPO al còrtex de la patata a través d'una cinètica enzimàtica, en la qual avaluarem la conversió del difenol catecol (substrat) a benzoquinona (producte) al llarg de 20 segons. A través de l'espectrofotometria mesurarem la benzoquinona que es forma durant aquest període de temps, ja que aquesta molècula és un cromòfor que presenta el màxim d'absorbància a 526 nm. Per obtenir un bon valor comparable entre mostres, és molt important que la cinètica sigui lineal. És a dir, que la taxa de formació de producte al llarg del temps sigui constant.

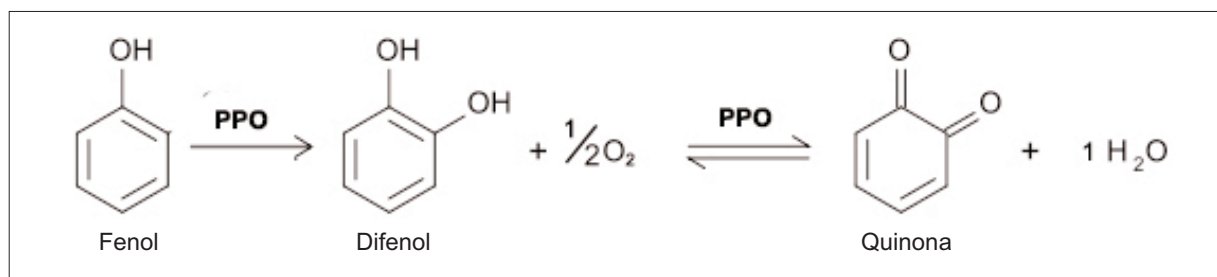


Figura 5. Reacció catalitzada per la PPO.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patògen bacterià

#### Disseny experimental de l'assaig d'activitat PPO

1. Definició del problema:

2. Definició de conceptes:

a. Variable independent:

b. Variable dependent:

c. Constants:

d. Grup control:

e. Grup experimental:

3. Formulació de la hipòtesi:

4. Disseny del procediment experimental:

En parella (grup) s'analitzarà una sola patata. La meitat dels grups de la classe analitzaran patates Àgata i l'altra meitat, patates Vitelotte. Cada grup farà l'experiment utilitzant tres rèpliques internes d'una mateixa patata, és a dir, de la mateixa unitat experimental.

1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

Taula 18

| Grup | Nom i cognom dels estudiants del grup | Varietat d'estudi | Mostres per analitzar              |
|------|---------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 2    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 3    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 4    |                                       | Vitelotte         | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 5    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 6    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 7    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 8    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |
| 9    |                                       | Àgata             | 3 rèpliques (d'una mateixa patata) |

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

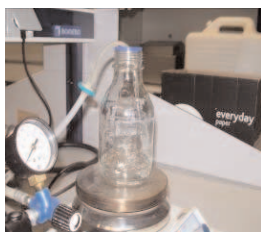
#### Procediment

L'assaig que fem servir per determinar l'**activitat PPO** es basa en el mètode descrit per Wegener (2002) amb modificacions.

Abans de començar cal que tingueu clar el disseny experimental i el protocol que fareu servir. Per a més informació sobre l'espectrofotometria d'absorció i com funciona una cinètica enzimàtica podeu consultar els annexos 2.c. i 2.d. També cal que localitzeu el material i els aparells que necessitareu per a la pràctica.

#### Material:

- Tampó de fosfat sòdic pH 6,0 **oxigenat** prèviament a 20°C un mínim de 2 h



Oxigenació del tampó de fosfat sòdic. Autor: M. Pérez-Garay

- Solució de **catecol** (2 mg ml<sup>-1</sup>). Preparada afegint 40 mg de catecol en 20 ml de tampó de fosfat oxigenat. Cal **protegir-la de la llum**.
  - Solució de **prolina** (5 mg ml<sup>-1</sup>). Preparada afegint 100 mg de prolina en 20 ml de tampó de fosfat oxigenat. Cal protegir-la de la llum.
- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Una patata (v. Àgata o v. Vitelotte)</li><li>• Foradataps</li><li>• Tallador</li><li>• Placa de Petri</li><li>• Pinces</li><li>• Bisturí</li><li>• Morter i mà de morter</li><li>• Nitrogen líquid i recipient per mantenir-lo</li><li>• Espàtula</li><li>• Guants</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Espectrofotòmetre</li><li>• Tubs d'Eppendorf d'1,5 ml</li><li>• Pipetes i puntes</li><li>• Centrífuga d'Eppendorf</li><li>• Cubetes d'espectrofotometria</li><li>• Gradeta de cubetes</li><li>• Gradeta d'Eppendorf</li><li>• Balança</li><li>• Gel i caixa de porexpan</li></ul> |
|--|---|

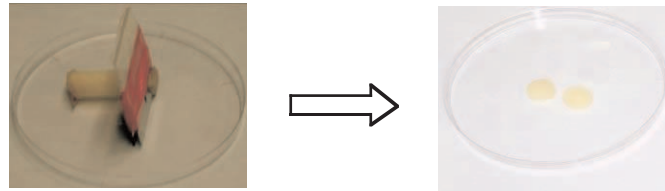
#### Protocol:

Per a cada una de les rèpliques internes:

1. Peseu un tub d'Eppendorf i anoteu-ne el pes.
2. Extraieu un cilindre de patata amb el foradataps i dipositeu-lo en una placa de Petri.

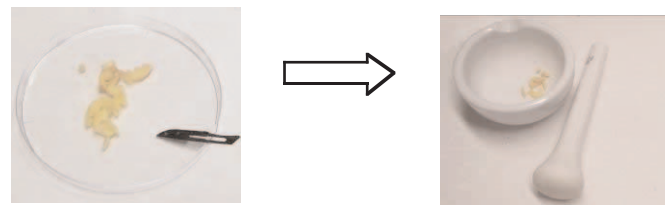
### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

3. Ràpidament amb el tallador tal·leu **just per sota la pell** per obtenir un disc de còrtex de cada extrem. Feu-ho a sobre la placa de Petri i de manera ràpida per evitar que l'aigua del teixit s'evapori. **Tingueu cura de no ferir-vos quan feu servir el tallador!**



Imatges del mètode de tall. Autor: M. Pérez-Garay

4. Trossegeu els discos en fraccions amb l'ajuda del bisturí i passeu-los al morter.



Imatges del procés de trossejament. Autor: M. Pérez-Garay

5. Afegiu amb **molta cura** nitrogen líquid al morter per congelar el teixit. Deixeu evaporar fins que gairebé no en quedi i tritureu la patata congelada amb la mà de morter. Repetiu el procés les vegades necessàries (3-5) per tal d'obtenir una pols de patata congelada. **El nitrogen líquid està a  $-196^{\circ}\text{C}$ , sigueu prudents i tingueu cura de no cremar-vos.**



Imatge de la congelació amb nitrogen líquid. Autor: M. Pérez-Garay

6. Transferiu ràpidament tot el contingut del morter a un tub d'Eppendorf **prèviament pesat al punt 1**. Torneu a pesar-lo i anoteu-ne el pes de nou.

**Repetiu els passos 1-6 per cada rèplica interna a analitzar.**

7. Centrifugueu els extractes 5 min a 13.000 rpm. Recordeu equilibrar la centrífuga.

8. Recolliu cada sobrenedant en un nou tub d'Eppendorf, sense emportar-vos sediment. **A partir d'aquí manteniu els extractes sempre en gel.**

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

9. Si la patata és blava feu una dilució 1/40 del sobrenedant en un tampó de fosfat sòdic oxigenat. Si la patata és blanca feu una dilució 1/20. **Manteniu les dilucions dels extractes sempre en gel.**

10. En una cubeta d'espectrofotometria prepareu **el blanc** afegint-hi 425 µl de la solució de prolina. Just abans que pugueu disposar de l'espectrofotòmetre per fer les lectures, traieu l'extracte diluït del gel. Afegiu a la cubeta 50 µl **de la dilució** de l'extracte de patata diluït. Ràpidament tapeu-ho amb parafilm i barregeu-ho. Mesureu l'absorbància a una  $\lambda$  de 526 nm. **Vigileu de no posar la cubeta fins al fons.**

11. Per mesurar l'activitat PPO a la mostra, traieu la cubeta de l'espectrofotòmetre i afegiu-hi 425 µl de la solució de catecol, tapeu-ho ràpidament amb el parafilm i barregeu-ho, i **immediatament** mesureu la cinètica de la reacció (í 526 nm) durant 20 s (programat de 5 a 25 s). Recordeu que cal que la **cinètica** sigui **lineal**.

**PROCEDIMENT**  
1.b.4. Activitat polifenoloxidasa (PPO) en patates de la varietat Àgata i Vitelotte

1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

1.b.4. Activitat polifenoloxidasa (PPO) en patates de la varietat Àgata i Vitelotte  
**RESULTATS INDIVIDUALS**

Resultats individuals

1. Varietat i nombre de mostres analitzades i registre d'incidències:

2. Valors d'absorbància obtinguts a la cinètica ( $\lambda = 526 \text{ nm}$ ) de la PPO i càlcul de les unitats enzimàtiques:

Taula 19

|   | Varietat _____ |           |           |
|---|----------------|-----------|-----------|
|   | Rèplica 1      | Rèplica 2 | Rèplica 3 |
| <b>Pes Eppendorf (g)</b>  |                |           |           |
| <b>Pes Eppendorf + pols patata (g)</b>  |                |           |           |
| <b>Pes fresc pols patata (g)</b>  |                |           |           |
| <b>U Abs a t = 0 s</b>  |                |           |           |
| <b>U Abs a t = 20 s</b>   |                |           |           |
| <b><math>\Delta\text{Abs min}^{-1}</math></b>   |                |           |           |
| <b>U enzimàtiques* = <math>\Delta\text{Abs min}^{-1} \mu\text{l}^{-1}</math> extracte assajat</b> |                |           |           |
| <b>U enzimàtiques / g pes fresc</b>   |                |           |           |
| <b>Mitjana <math>\pm</math> desviació estàndard</b>   |                |           |           |

\* Cal tenir en compte que l'assaig es fa d'un extracte proteic diluït.



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

#### Resultats globals de l'experiment

I. Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 20

| Núm. grup | Varietat  | Unitats enzimàtiques (UA min <sup>-1</sup> µl <sup>-1</sup> ) / g pes fresc |                     |                  |                     |
|-----------|-----------|---|---------------------|------------------|---------------------|
|           |           | De cada patata  |                     | De cada varietat |                     |
|           |           | Mitjana   | Desviació estàndard | Mitjana          | Desviació estàndard |
| 1         | Vitelotte |   |                     |                  |                     |
| 2         | Vitelotte |   |                     |                  |                     |
| 3         | Vitelotte |   |                     |                  |                     |
| 4         | Vitelotte |   |                     |                  |                     |
| 5         | Àgata     |   |                     |                  |                     |
| 6         | Àgata     |   |                     |                  |                     |
| 7         | Àgata     |   |                     |                  |                     |
| 8         | Àgata     |   |                     |                  |                     |
| 9         | Àgata     |   |                     |                  |                     |

2. Representació gràfica dels resultats de l'experiment:

### 1. Resistència de la patata enfront d'un patogen bacterià

1.b.4. Activitat polifenoloxídasa (PPO) en patates de la varietat Àgata i Vitelotte  
**RESULTATS GLOBALS**

#### Discussió i conclusions

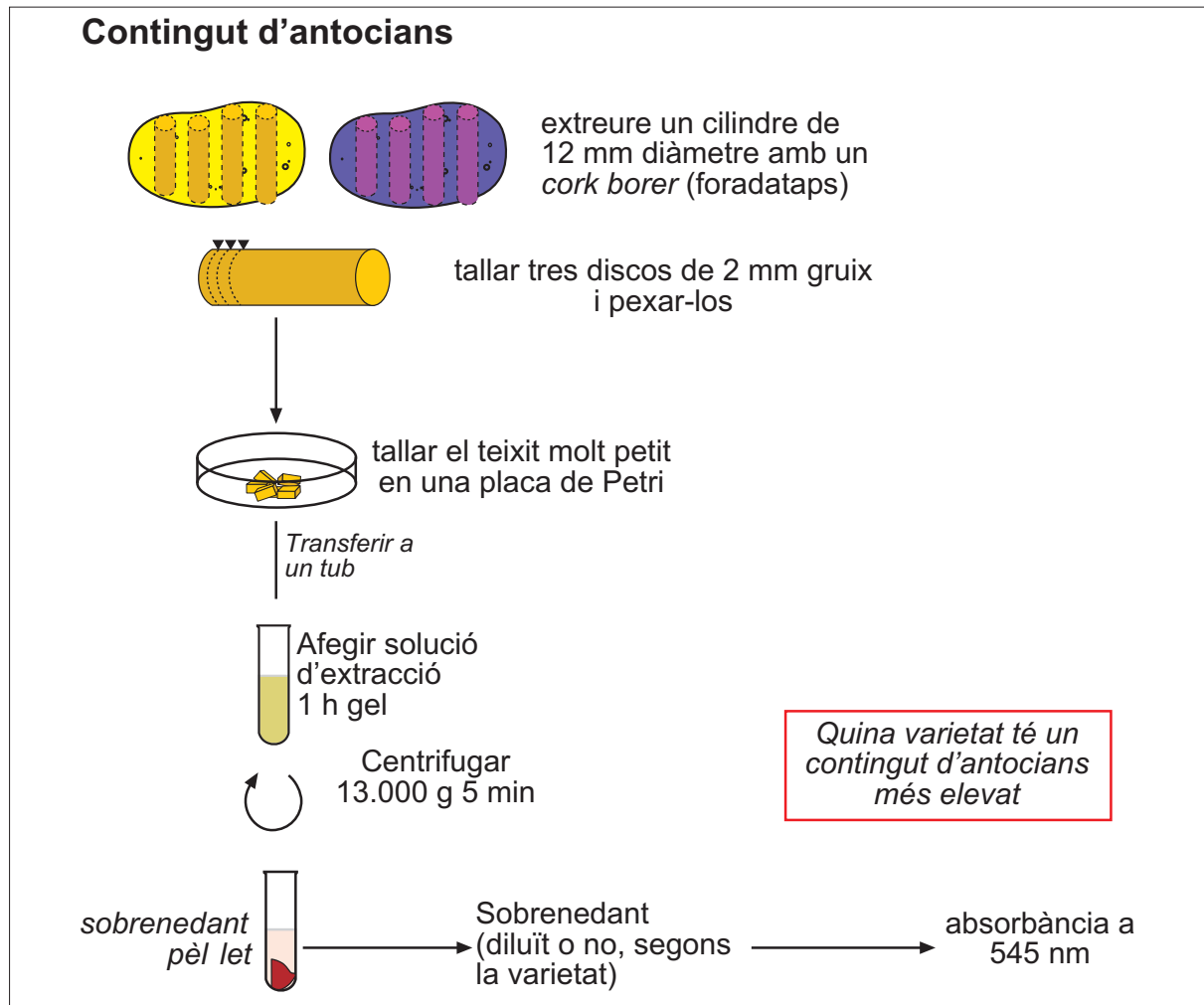
- Les dades obtingudes responen al problema plantejat? Justifiqueu la resposta.
- S'ha confirmat la hipòtesi de partida? Justifiqueu la resposta.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

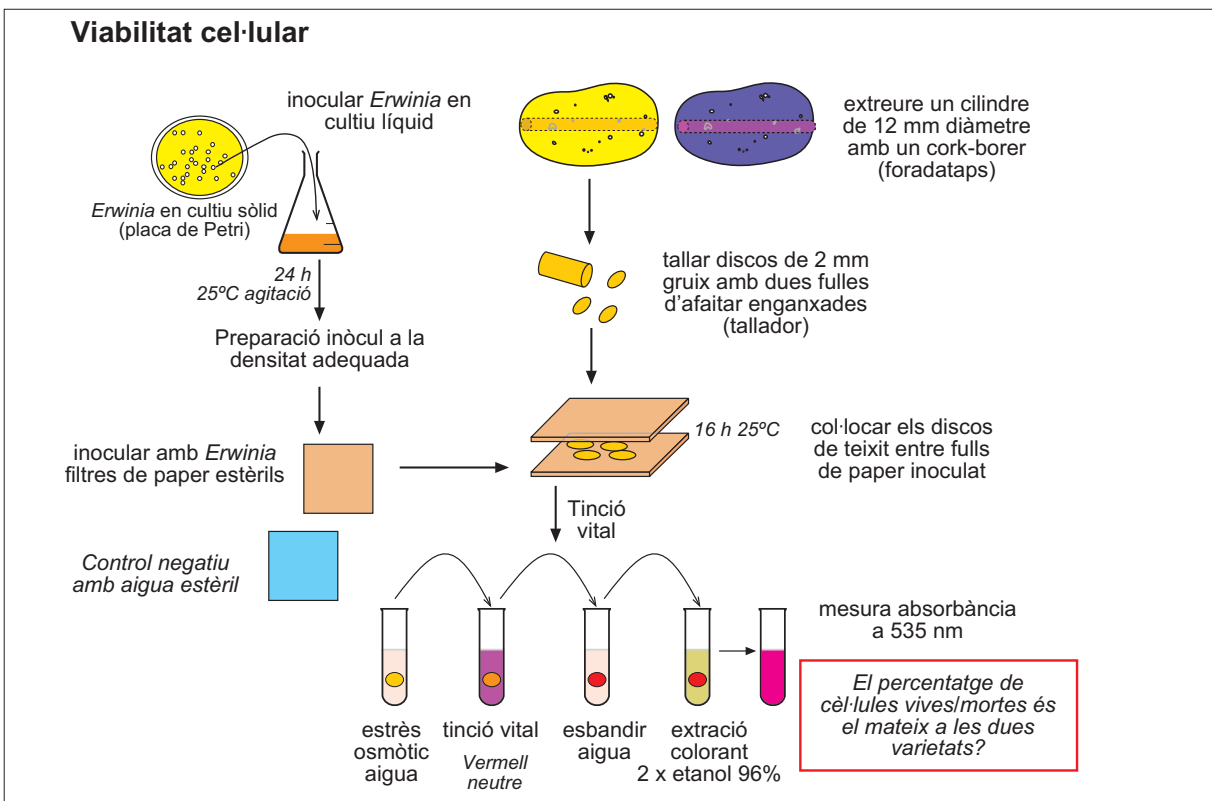
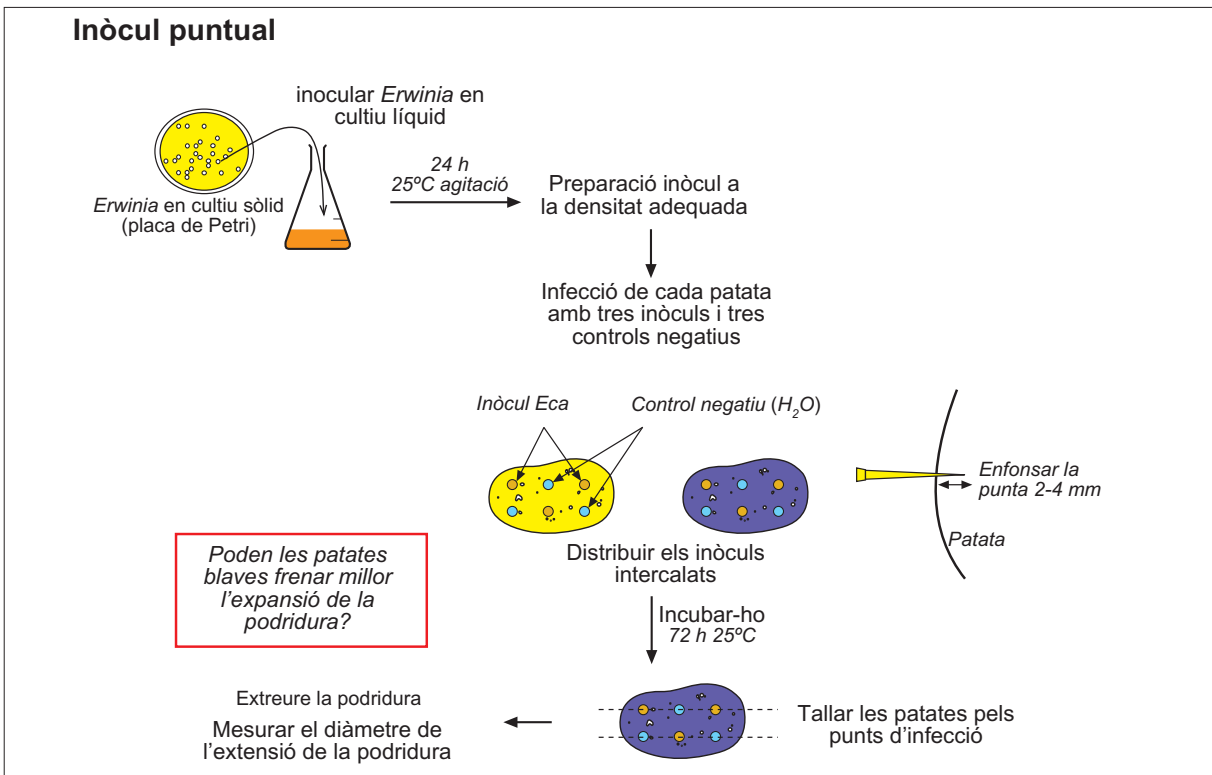
Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 2. Annexos

#### 2.a. Esquemes dels protocols



Autor de l'esquema: O. Serra

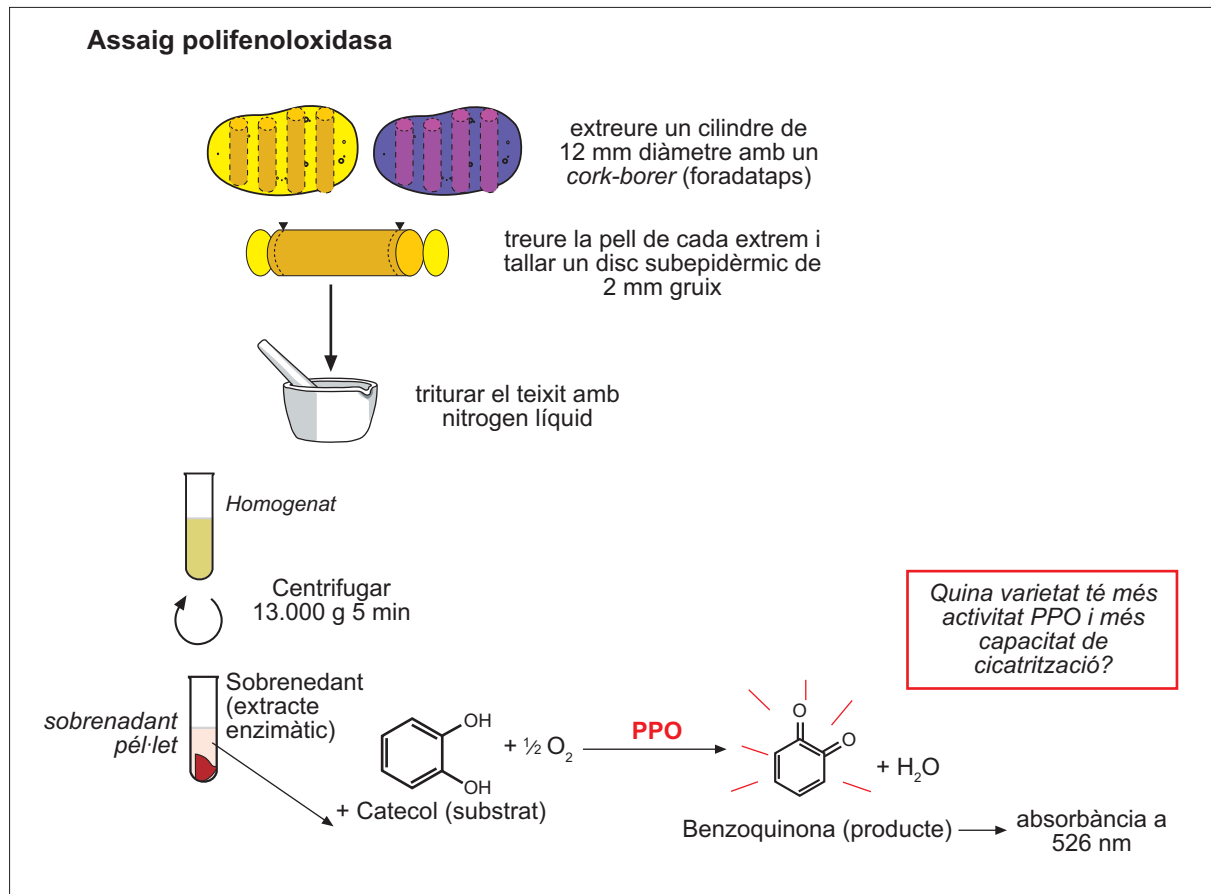


Autor dels esquemes: O. Serra

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 2. Annexos



Autor de l'esquema: O. Serra

## 2. Annexos

**2.b. Preparació del brou nutritiu**

Per tal de poder fer créixer el bacteri *Erwinia carotovora ssp. atroseptica* (*Eca*) utilitzarem un medi de cultiu anomenat *brou nutritiu*. Aquest medi és l'adequat per fer créixer *Eca*, ja que conté tots els requisits necessaris perquè es dugui a terme el creixement i divisió.

Preparació del medi de cultiu brou nutritiu:

- a) Barregeu i dissolcu els diferents components segons la quantitat necessària de cultiu.

| Component           | Quantitat per 1 litre |
|---------------------|-----------------------|
| Extracte de vedella | 5 g                   |
| Peptona             | 10 g                  |
| Clorur sòdic (NaCl) | 5 g                   |
| Aigua destil·lada   | enrasar a 1 l         |

- b) Ajusteu el pH a 7,2 amb NaOH 5 N (assegureu-vos que el pH-metre està calibrat).

- c) Autoclaveu durant 20 min a 121°C i 1 atm.

Per tal de fer créixer *Eca* en un medi sòlid només caldrà afegir agar (15 g l<sup>-1</sup>) a la barreja de brou nutritiu abans d'autoclavar. Aleshores aquest medi s'anomenarà *agar nutritiu*.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 2. Annexos

#### 2.c. Espectroscòpia d'absorció

L'espectroscòpia d'absorció és una de les tècniques emprades amb més assiduitat als laboratoris de biologia. Aquesta tècnica subministra informació qualitativa i quantitativa sobre substàncies capaces d'absorbir la llum a una longitud d'ona determinada ( $\lambda$ ). Aquesta propietat és donada per la capacitat d'alguns electrons de la molècula d'agafar l'energia dels fotons d'una radiació electromagnètica.

Un exemple molt senzill de molècules capaces d'absorbir la llum són els pigments (per exemple clorofil·les, antocians, carotenoides...). Els pigments contenen cromòfors, els quals són responsables del seu color perquè són capaços d'absorbir llum i emetre-la a una longitud d'ona diferent dins la regió visible. Aquesta llum emesa d'una longitud d'ona específica determinarà el color del pigment. Per extensió, es parla de cromòfor per identificar una part d'una molècula (o la molècula sencera) que té la capacitat d'absorbir una radiació de longitud d'ona determinada.

No totes les molècules poden absorbir la llum (no totes són cromòfors); i les que ho fan només absorbeixen les radiacions d'unes certes longituds d'ona. La llum forma part del que anomenen *espectre electromagnètic*: un conjunt de radiacions electromagnètiques amb diferent longitud d'ona. La llum visible, concretament, està formada per radiacions d'entre 380 i 750 nm de longitud d'ona (aproximadament), mentre que les radiacions ultraviolades i els raigs X són radiacions de menor longitud d'ona (i menys energia), i l'infraroig o les microones són radiacions de major longitud d'ona (i més energia).

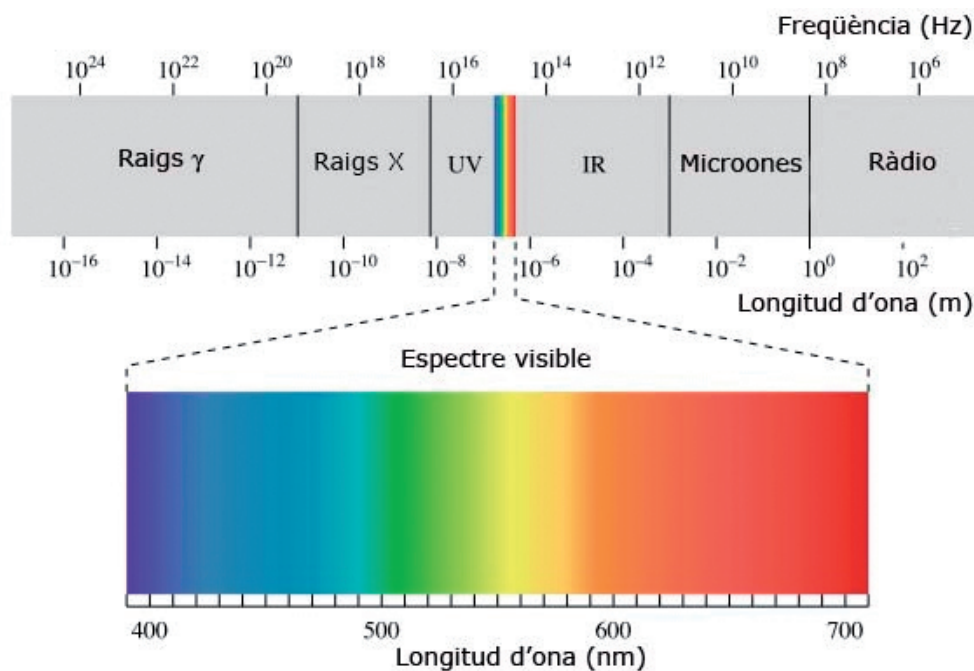


Figura 6. Espectre electromagnètic. Extret de <http://www.rcg.cat/articulos.php?id=162>

Per tal de determinar la capacitat d'absorció i/o la longitud d'ona d'absorció d'una molècula utilitzem l'espectrofotòmetre. L'espectrofotòmetre és un instrument dissenyat per dirigir un feix de llum monocromàtica (d'una única longitud d'ona) a través d'una mostra i mesurar la intensitat del feix lluminós emergent (la

## 2. Annexos

intensitat de llum que detectem un cop aquesta ha travessat la mostra). La fracció de llum absorbida per una solució a una longitud d'ona determinada està descrita per la llei de Lambert-Beer:

En els experiments proposats, aquesta capacitat d'absorció es mesura a la regió visible de l'espectre electromagnètic. No obstant això, mesures en altres longituds d'ona com l'ultraviolat són també comunes quan es quantifiquen àcids nucleics o proteïnes.

**Llei de Lambert-Beer. Coeficient d'extinció**

Quan un feix de llum incideix sobre una molècula amb capacitat d'absorció, una part d'aquesta radiació és absorbida. Si això succeeix és perquè aquesta molècula és o conté un cromòfor, és a dir, estructures capaces d'absorbir aquesta radiació electromagnètica. En aquest cas, la intensitat ( $I$ ) del feix que arriba al detector de l'aparell (emergent) serà:

$$I = I_0 - I_a$$

on  $I_0$  és la intensitat de llum inicial emesa per l'espectrofotòmetre, i  $I_a$  és la intensitat de llum absorbida durant el trajecte.

A la pràctica, l'espectrofotòmetre no mesura pròpiament la intensitat de la llum absorbida, sinó una magnitud relacionada amb ella: l'**absorbància (A)**. L'absorbància es defineix com el valor del logaritme decimal de la relació d'intensitats de la llum incident i emergent, i és una magnitud adimensional (no té unitats).

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Bioquímicament, l'absorbància d'una dissolució (l'absorció del medi) depèn de:

- La **concentració de solut (C)** amb capacitat per absorbir la llum a una  $\lambda$  concreta. Com més concentrat estigui aquest cromòfor, més intensitat de la llum incident absorbirà, i menys n'arribarà al detector.
- El **pas òptic (l)** o distància en centímetres que recorre la radiació electromagnètica en travessar la dissolució. Com més espai de dissolució hagi de travessar el feix de llum, més intensitat de llum pot ser absorbida pel cromòfor de la dissolució.
- El seu **coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ )** a la  $\lambda$  considerada. El coeficient d'extinció molar és un paràmetre característic de cada cromòfor i indica la capacitat que té aquest cromòfor particular per absorbir radiació a una  $\lambda$  determinada. El valor de  $\epsilon$  se sol donar per a una concentració d'1 M del solut i 1 cm de pas òptic (unitats  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

L'equació matemàtica que ens relaciona aquests tres paràmetres amb l'absorbància és l'**equació de Lambert-Beer**:

$$A = \epsilon C l$$

on l'**absorbància (A)** és directament proporcional a la **concentració de solut (C expressada en mols l<sup>-1</sup>)** tenint en compte tant la **distància (l expressada en cm)** que recorre la radiació en travessar la solució com la **capa-**



## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 2. Annexos

**coeficient d'absorció** ( $\epsilon$  expressada en  $M^{-1} cm^{-1}$ ) que té la molècula en concret. Cal notar que el resultat d'aquesta equació no té unitats, per això l'absorbància és adimensional.

#### Espectre d'absorció

L'espectre d'absorció ens indica la fracció de radiació electromagnètica incident absorbida per un material al llarg d'una regió de l'espectre electromagnètic. Per tant, els espectres d'absorció són gràfics que relacionen l'absorbància d'una molècula a diferents longituds d'ona, i són freqüentment utilitzats en bioquímica per a la caracterització i identificació de biomolècules. Els compostos que absorbeixen llum solen presentar un o diversos màxims d'absorció, coneguts com *longituds d'ona d'absorció màxima* ( $\lambda_{m\grave{a}x}$ ). Normalment, la  $\lambda_{m\grave{a}x}$  d'un compost és el que el diferencia d'altres i per això s'utilitza per identificar-lo (i per quantificar-lo). En l'espectre d'absorció del principal antocià de la patata de la varietat Vitelotte (figura 7), el malvidina-3-p-coumaril-glucòsid, es mostra el màxim d'absorbància al voltant de 545 nm. És per això que per quantificar-lo es fa la mesura a aquesta longitud d'ona.

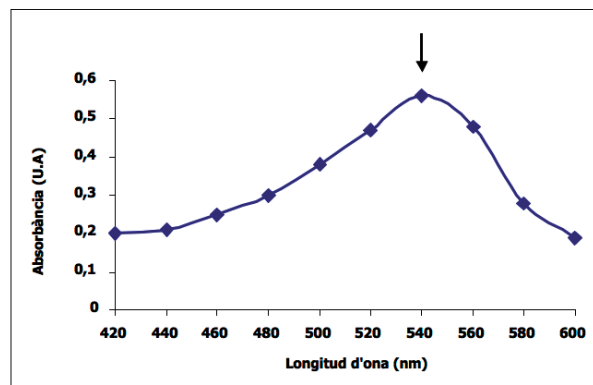
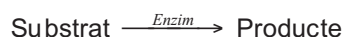


Figura 7. Espectre d'absorció de l'antocià malvidina-3-p-coumaril-glucòsid. Autor de la figura: M. Pérez-Garay

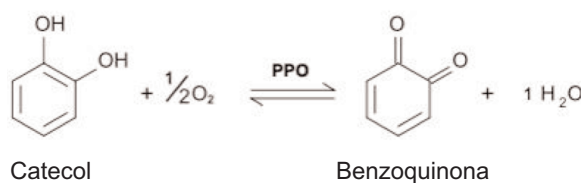
### 2.d. Seguiment d'una reacció enzimàtica

La cinètica enzimàtica és l'estudi de les reaccions químiques catalitzades per enzims, com és el cas de la conversió del fenol en benzoquinona catalitzada per la polifenoloxidasas (PPO).

Una reacció catalitzada per un enzim es pot simplificar de la manera següent:



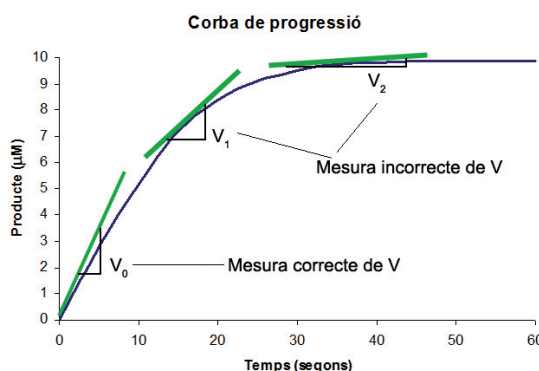
En el cas que ens ocupa, el substrat és un difenol (el catecol) i el producte és una quinona (la benzoquinona) (figura 8).



■ Figura 8. Reacció enzimàtica catalitzada per la PPO

En aquest cas, el que fem és mesurar, en condicions controlades de pH, temperatura i concentració de substrat, quina és la velocitat de formació de producte o taxa enzimàtica. És a dir, el que testarem és la formació del producte (benzoquinona) al llarg del temps. Encara que no ho fem, també podríem seguir la disminució del substrat, ja que ambdós paràmetres estan relacionats.

A l'hora de fer el seguiment d'una reacció enzimàtica al laboratori, observarem que la formació de producte al llarg del temps és inicialment constant. Passat un temps, que sol ser curt, aquesta producció comença a decaure progressivament fins que al final ja no es forma més producte (figura 9). Això passa perquè l'enzim va actuant mentre té substrat per fer-ho. A mesura que se li va acabant el substrat, la reacció s'alenteix fins que s'esgota el substrat per complet. Així doncs, en funció del punt de la progressió que escollíssim per calcular la velocitat de reacció, obtindríem valors diferents, alguns d'ells erronis (figura 9).



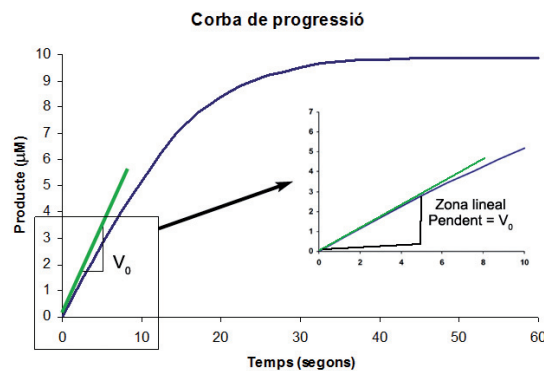
■ Figura 9. Corba de progressió: seguiment de la formació de producte al llarg del temps. Autor de la figura: S. Barrabés

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 2. Annexos

La velocitat de reacció enzimàtica s'obté del pendent de la tangent a la corba de progressió (formació de producte al llarg del temps) a temps inicials (figura 9), ja que aquesta és la velocitat màxima atesa una concentració de substrat inicial. Com a simplificació, el que fem és mesurar el pendent de la recta mentre la corba de progressió es manté lineal (figura 10).



■ Figura 10. Corba de progressió: càlcul de la velocitat inicial de la reacció. Autor de la figura: S. Barrabés

En l'experiment de la PPO, la cinètica ens permetrà mesurar la quantitat de catecol (substrat) que s'oxida i dona lloc a la benzoquinona (producte) durant un període d'un minut (temps). Aquestes unitats de mesura d'un enzim les anomenem *unitats enzimàtiques*. Aquesta mesura ens permet quantificar l'enzim que hi ha en una mostra. El valor que obtindrem indica que la quantitat d'enzim que hi ha a l'extracte de patata catalitza la formació d'una certa quantitat de benzoquinona en un minut (a 20°C). Com més quantitat d'enzim tingui una patata, més quantitat de benzoquinona es forma per minut, ja que la quantitat de producte que es pot formar en una unitat de temps és directament proporcional a la quantitat d'enzim que hi ha a la mostra.

**2.e. Microscòpia òptica**

En aquestes pràctiques s'utilitzen microscopis òptics per a l'observació de talls histològics. El microscopi consisteix en un grup de lents que permeten augmentar la imatge de l'objecte que es vol observar (vegeu la figura 11), però tan important és l'augment com la resolució. La resolució és determinada per les propietats físiques de la llum.

En un microscopi òptic convencional, les cèl·lules i estructures cel·lulars s'il·luminen amb llum visible. L'emissor de llum es troba a la part inferior i es fa incidir el feix de llum sobre la mostra col·locada a la platina per mitjà d'un condensador. Per sobre de la mostra, trobem la lent de l'objectiu i la lent de l'ocular, que són les que formen la imatge augmentada. Normalment, l'augment proporcionat per l'ocular és de 10x, mentre que podem tenir diferents objectius amb diferents augments (4x, 10x, 40x i 100x, aquest últim per utilitzar amb oli d'immersió), de manera que es poden obtenir augments totals de 40x, 100x, 400x i 1.000x, respectivament (figura 11).

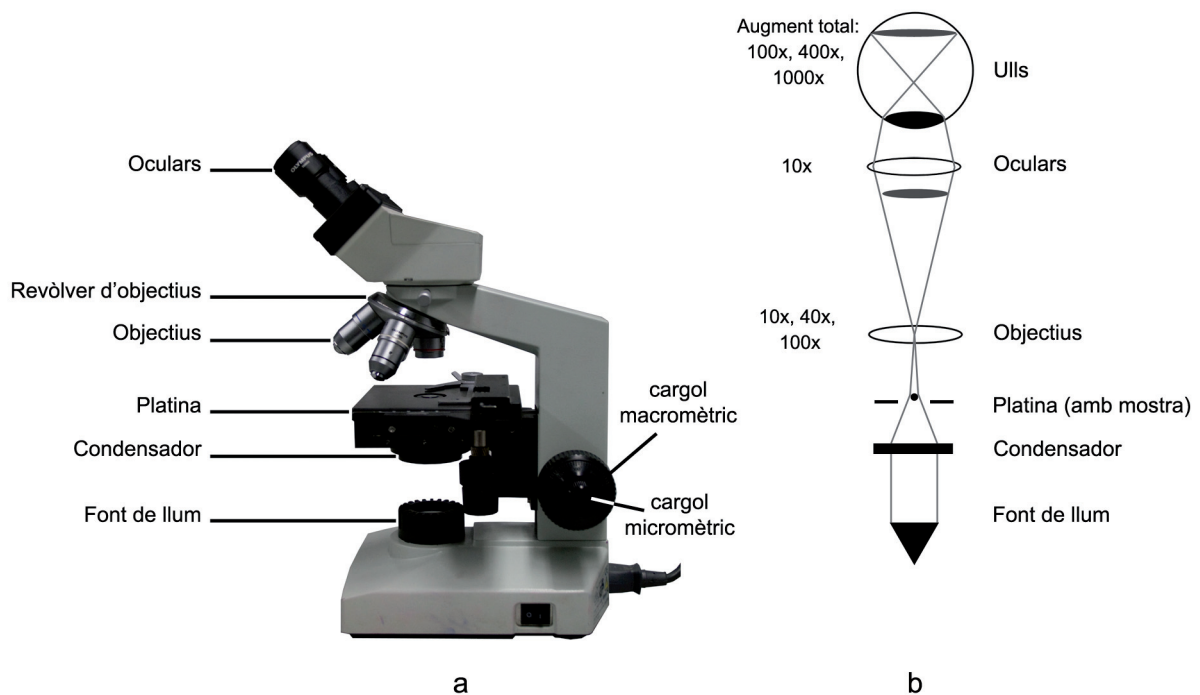


Figura 11. Parts d'un microscopi òptic compost (a) i la trajectòria de la llum a través de les lents (b). Autor de la figura: S. Barrabés

L'objectiu de 100x s'utilitza en cas de voler observar cèl·lules molt petites (com els microorganismes). Aquest objectiu requereix oli d'immersió per millorar la resolució de la imatge. Quan la llum passa d'un material amb un índex de refracció a un material amb un altre índex, com per exemple de vidre a aire o d'aire a vidre, canvia de direcció. La llum de diferents longituds d'ona es corba amb angles diferents, de manera que a mesura que s'augmenten els objectes la imatge es fa menys i menys nítida. Quan s'utilitzen objectius «secs» (sense oli d'immersió), la pèrdua de resolució impedeix l'ús d'augments totals superiors a 400x. De fet, fins i tot a 400x les imatges dels objectes més petits es distorsionen. Per això, l'oli d'immersió és essencial per a l'observació d'estructures molt petites. L'oli d'immersió utilitzat té el mateix índex de

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 2. Annexos

refracció que el vidre (figura 12). Aquest oli es posa entre el cobreobjectes i la lent de l'objectiu, de manera que s'eviten dues superfícies refractives (entre el cobreobjectes i l'aire, i entre l'aire i la lent). D'aquesta manera es poden utilitzar augments de 1.000x o superiors, i es manté una bona resolució. Per poder utilitzar l'oli d'immersió cal que l'objectiu estigui dissenyat específicament per a aquest ús. Si l'objectiu no ho especifica, l'ús de l'oli faria malbé les lents.

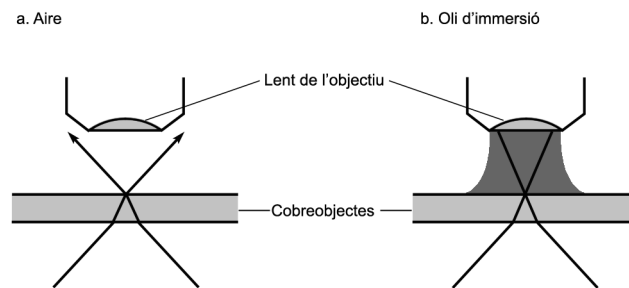


Figura 12. Esquema que mostra la ruta que segueixen els rajos de llum quan viatgen a través de l'aire (a) o a través de l'oli d'immersió (b). Els rajos entren a la lent en aquest segon cas perquè l'índex de refracció de l'oli és el mateix que el del vidre. Autor de la figura: S. Barrabés

La nostra observació del tubercle de la patata pretén centrar-se en l'organització dels teixits identificant les diferències cel·lulars. Aquesta observació histològica es pot resoldre amb l'observació amb objectius fins a 40x, és per aquest motiu que no utilitzarem l'objectiu de 100x, que requereix oli d'immersió.

## 6. Bibliografia

*Bibliografia bàsica*

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHONSON, A. *Introducción a la Biología Celular*. Barcelona: Panamericana, 2006.
- EVERT, R. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function and Development*. Hoboken, N. J.: John Wiley & Sons, Cop., 2006.
- GARCÍA-SEGURA, J. M.; GAVILANES, J.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; MONTERO, F.; OÑADERRA, M.; VIVANCO, F. *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*. Madrid: Síntesis, 2002.
- KLUG, W.; CUMMINGS, M.; SPENCER, CH. *Conceptos de Genética*. Madrid: Pearson Education, 2006.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Omega, 2007.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson Education, 2003.
- VOET, D.; VOET, J.; PRATT, CH. *Fundamentos de Bioquímica. La Vida a Nivel Molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007.

*Bibliografia citada i específica*

- AUSTIN, S.; LOJKOWSKA, E. [et al.]. «Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum*: a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot». *Phytopathology* (1988), 78(9), 1216-1220.
- ELPHINSTONE, J. G. «Soft rot and blackleg of potato; *Erwinia* spp». *Technical Information Bulletin* [Lima, Perú: International Potato Center] (1987), 21, 1-18,
- JANSEN, G.; FLAMME, W. «Coloured potatoes (*Solanum tuberosum* L.)-anthocyanin content and tuber quality». *Genetic Resources and Crop Evolution* (2006), 53, 1321-1331.
- JANSKY, S. H.; ROUSE, D. I. «Multiple disease resistance in interspecific hybrids of potato». *Plant Disease* (2003), 87(3), 266-272.
- LULAI, E. C.; FREEMAN, T. P. «The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) periderm». *Annals of Botany* (2001), 88(4), 555-561.
- PUJOL, M. *Cultius herbacis per a indústries agroalimentàries*. Capellades, 2001
- WEGENER, C.; JANSEN, G. «Soft-rot resistance of coloured potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.): The role of anthocyanins». *Potato Research* (2007), 50(1), 31-44.
- WEGENER, C. B. «Induction of defence responses against *Erwinia* soft rot by an endogenous pectate lyase in potatoes». *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2002), 60, 91-100.

## CAPÍTOL II. ESTUDI MANIPULATIU

Autors: Olga Serra, Sílvia Barrabés i Marta Pérez-Garay

### 6. Bibliografia

WEGENER, C. B.; JANSEN, G. [et al.]. «Special quality traits of coloured potato breeding clones: anthocyanins, soluble phenols and antioxidant capacity». *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2009), 89(2), 206-215.

ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; MARCZEWSKI, W. [et al.]. «QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers». *Crop Science* (2000), 40(4), 1156-1167.

#### Pàgines web consultades

CLUBE DE QUÍMICA. Prof. Genilson Pereira Santana. Universidad Federal do Amazonas (UFAM), 2006. <<http://www.cq.ufam.edu.br/>> [Consulta: 27 octubre 2010].

Arbiol, R. «SENSORS I CAPTACIÓ PRIMÀRIA DE DADES». V. 14 (37). *Revista Catalana de Geografia* [Institut Cartogràfic de Catalunya] (juliol 2009). <<http://www.rcg.cat/articles.php?id=162>> [Consulta: 27 octubre 2010].

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### 1.a. Sessió introductòria

Tal com ja s'ha exposat, en els estudis observacionals o mesuratis l'investigador simplement observa o mesura la variable d'estudi en diferents condicions o moments. S'observa la natura sense manipular-la, així que es tracta d'estudis els resultats dels quals són altament realistes, ja que s'estudien sistemes reals i no manipulats.

Molts investigadors només consideren veritables experiments els experiments manipulatis en els quals s'altera la variable dependent per tal d'observar el seu efecte sobre la variable independent. És per això que en molts casos només es parla de disseny experimental en els experiments de tipus manipulatiu, mentre que en els experiments observacionals o mesuratis es parla de disseny de mostreig o disseny mostral. En tot cas, en ambdós tipus d'experiments és imprescindible el plantejament curós de l'estudi per tal d'obtenir la resposta a les qüestions plantejades. Aquest disseny ha de tenir sempre en compte el tractament estadístic posterior de les dades mesurades.

Igual com en els experiments manipulatis, en els experiments observacionals els components bàsics de qualsevol estudi són:

- o L'objectiu de l'estudi
- o La hipòtesi de partida
- o El disseny experimental
- o L'execució de l'experiment
- o L'anàlisi estadística de les dades
- o La interpretació dels resultats

Un cop s'ha definit l'objectiu de l'estudi i la hipòtesi inicial, es fa el disseny experimental. S'estableixen els procediments pràctics que cal dur a terme per resoldre la qüestió plantejada. Així doncs, cal definir

tota una sèrie de paràmetres a partir de la bibliografia anterior o el nostre coneixement previ:

- la variable dependent: paràmetre mesurat.
- les constants: variables que no manipulem, factors que no canvien durant l'experiment.
- el grup control: grup en què totes les variables, fins i tot les dependents, es mantenen constants, i que ens serveix de referència.
- el grup experimental: grup en què la variable dependent pren un valor diferent.
- les rèpliques: nombre de vegades que repetim l'experiment, i que dóna robustesa als resultats.

A continuació s'executen els experiments, s'obtenen les dades i s'analitzen els resultats. Aquesta anàlisi ens ha de permetre validar o no la nostra hipòtesi inicial o, el que és el mateix, arribar a unes conclusions. Així doncs, es pot establir una nova problemàtica d'estudi o reajustar la hipòtesi inicial, dissenyar un nou estudi.

Aquests tipus d'estudis (els observacionals o mesuratis) s'associen bàsicament amb estudis en el medi natural. Així doncs, si els comparem amb els estudis manipulatis: **a)** són generalment estudis relativament fàcils de dur a terme, **b)** com que no requereixen manipulacions no se'n deriven efectes no esperats i relacionats amb la manipulació i **c)** en la gran majoria dels casos podem estar segurs que obtenim dades reals que responen a una variació biològica (natural). Per contra, **a)** aquests estudis generalment donen lloc a problemes d'escala i **b)** ens poden portar a deduir de manera errònia unes certes relacions entre els factors i les dades.

Les activitats d'aprenentatge següents pretenen introduir l'estudiant en el disseny experimental d'aquest tipus d'estudi.



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### 1.a.1. Definició de la problemàtica

##### Treball previ a la sessió d'aula

**Objectius formatius:** Establir una problemàtica d'estudi a partir d'un exemple concret. Lectura dels textos i elaboració d'un primer esborrany per a un possible projecte d'estudi.

**Mida dels grups:** individual

**Tipus d'activitat:** individual i prèvia a la sessió d'aula

Durada de la lectura prèvia i resolució de l'exercici **fora de l'aula: 30 min.** El docent avaluarà aquesta activitat prèvia en entrar a l'aula. Durada de la resolució de l'activitat **dins de l'aula: 15 min.**

A les pàgines següents trobareu un text que s'ha de treballar abans d'assistir a la sessió de grup mitjà. Et proposem que et posis a la pell d'un professional, un biòleg. Un ajuntament et truca i t'ofereix la possibilitat de demanar un projecte. Volen saber l'abundància que hi ha de formiga argentina en una zona concreta. La Generalitat ha tret a concurs uns diners. Així doncs, a partir del text que s'adjunta, La formiga argentina, i de manera similar a la sessió anterior has d'assentar les bases per demanar un projecte. Hauràs de **plantejar la problemàtica** i proposar un **pla de treball**.

Desenvolupant els punts següents en l'ordre que apareixen pots arribar a l'objectiu final: redacció preliminar d'un projecte per tal d'obtenir finançament per dur a terme l'estudi i poder respondre a les peticions de l'ajuntament.

##### Plantejament de la problemàtica:

1. Llegeix els textos i subratlla les **idees/conceptes principals/importants** de cada un.
2. A partir d'aquestes idees/conceptes principals **descriu la problemàtica** causada per l'espècie objecte d'estudi (pensa un **títol** per al projecte/estudi).

##### Pla de treball:

3. Explica molt breument **quin interès científic** es pot derivar del que acabes de llegir; és a dir, què creus que es podria estudiar? (poden sorgir multitud d'estudis).
4. Explica d'una manera general **com duries a terme** l'estudi proposat.

##### Text I: La formiga argentina

Informació extreta de *La formiga argentina* (*Linepithema humile*) al Parc Natural de Cap de Creus i riscos del desmantellament del Club Mediterrannée respecte de l'expansió d'aquesta espècie invasora. Informe adreçat al Parc Natural de Cap de Creus elaborat pel Grup de Recerca en Pertorbacions Ecològiques i Comunitats Animals Terrestres (Pecat), grup de recerca consolidat per la Generalitat de Catalunya (2005SGR01035). Febrer de 2008.

«Formiga argentina» és el nom comú amb què es coneix l'espècie *Linepithema humile*. És un formícid de la subfamília *Dolichoderinae*. Es tracta d'una formiga petita, d'uns 2-3 mm de longitud les obreres, de super-

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

ffície llisa i brillant i color marró. Destaca sobretot pel seu caràcter actiu i de moviment ràpid. Actualment aquesta espècie està inclosa dins les 100 pitjors espècies invasores del món segons l'Invasive Species Specialist Group (grup d'experts en espècies invasores de la UICN).

La distribució original o nativa d'aquesta espècie es limita a la conca del riu Paraná, entre el nord de l'Argentina, el sud del Brasil, l'Uruguai i el Paraguai. És per tant una espècie sud-americana d'ecosistemes subtropicals. Actualment, però, la seva distribució inclou la majoria d'hàbitats de clima mediterrani i subtropical del planeta, i és present en tots els continents del planeta excepte l'Antàrtida i en nombroses illes oceàniques.

A la península Ibèrica la primera cita que documenta la seva aparició és del 1907. La seva introducció, però, es va produir probablement anys abans (segle XIX) mitjançant el comerç transatlàntic. A Espanya va ser detectada per primer cop a València l'any 1923. Des de llavors aquesta espècie ha anat estenent la seva distribució, mostrant, però, una preferència marcada per les zones litorals i prelitorals, probablement fruit de la seva necessitat de climes temperats i humitats elevades. L'absència d'agressivitat entre individus de nius diferents en les poblacions introduïdes afavoreix moltíssim el caràcter invasor de la formiga argentina. Aquest comportament extraordinari origina supercolònies compostes de múltiples nius interconnectats i cooperatius amb milions d'individus. La gran superioritat numèrica de la formiga argentina enfront de les espècies de formigues natives determina una superioritat competitiva sense paral·lelisme. Però la formiga argentina presenta unes altres característiques que la fan una bona colonitzadora de nous hàbitats. D'una banda, la seva poliginia, el fet que dins un mateix niu hi conviui un nombre elevat de reines, afavoreix que un fragment de colònia pugui ser viable reproductivament. De l'altra, la seva afinitat pels hàbitats alterats i pertorbats, que en molts casos són ambients humanitzats. Això fa que sigui fàcilment transportada pels humans amb el transport de matèries primeres, fustes, aliments, terra, runes, restes de jardineria, etc. Així, els humans proporcionen a la formiga argentina el mitjà per a una dispersió a llarga distància, l'anomenada *dispersió per salts* o *jump-dispersal*. Un cop arribada a un nou indret, si les condicions li són propícies, aquesta petita població començarà a créixer, fins a formar una nova supercolònia. A partir dels hàbitats alterats l'espècie penetra molt sovint als hàbitats naturals propers. Aquesta segona forma de dispersió té lloc per la mateixa capacitat de reproducció i expansió de la formiga argentina. En comptes de fer un vol nupcial com la majoria d'espècies de formigues, en aquesta les reines i els mascles s'aparellen dins el niu. A continuació surten caminant per cercar un indret on formar un nou niu, normalment proper (la gemmació o budding). Aquest és un *procés de difusió* que afavoreix una expansió lenta però eficaç de la colònia. Quant a les condicions ambientals, la seva expansió requerirà un clima temperat i humit com el d'una bona part del litoral mediterrani. Altrament, l'espècie troba condicions favorables en àrees urbanes i suburbanes, en hàbitats més àrids però adjacents a cursos d'aigua i en zones rurals amb regadius.

#### Text 2: Impactes ecològics de la formiga argentina en ecosistemes naturals

Informació extreta de *La formiga argentina (Linepithema humile) al Parc Natural de Cap de Creus i riscos del desmantellament del Club Mediterrannée respecte de l'expansió d'aquesta espècie invasora*. Informe adreçat al Parc Natural de Cap de Creus elaborat pel Grup de Recerca en Pertorbacions Ecològiques i Comunitats Animals Terrestres (Pecat), grup de recerca consolidat per la Generalitat de Catalunya (2005SGR01035). Febrer de 2008.

La invasió de la formiga argentina comporta malauradament nombrosos efectes negatius en els ecosistemes naturals.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### Efectes sobre la comunitat de formigues

Potser l'efecte més ben documentat de la invasió a les àrees envaïdes és el desplaçament de les espècies de formigues natives. Es creu que aquest fet es produeix com a conseqüència de la superioritat competitiva de la formiga argentina, més eficaç que les espècies natives en la localització dels recursos i en la defensa d'aquests recursos un cop localitzats. Potser també per agressió interespecífica directa.

En qualsevol cas, es produeix una greu reducció de la diversitat local de formigues. En hàbitats mediterranis, com prats o matollars, comunitats de formigues formades per una vintena o una trentena d'espècies poden quedar reduïdes a tan sols una o dues espècies d'hàbits més subterranis després de la invasió.

#### Efectes sobre altres artròpodes

D'altra banda, la formiga argentina genera una reducció de les poblacions d'artròpodes després de la invasió, i provoca la desaparició local d'algunes espècies.

Estudis d'arreu del món han documentat aquest impacte en papallones, escarabats, aranyes, miriàpodes, etc. Això és conseqüència de la depredació o la competència que l'espècie exerceix sobre altres artròpodes.

#### Efectes sobre vertebrats

Fins i tot en alguns casos s'han descrit efectes negatius sobre espècies de vertebrats. Es tracta sobretot d'efectes indirectes per alteració de la dieta dels vertebrats a causa de la disminució de les preses d'aquests després de la invasió.

#### Efectes sobre mutualismes

L'alteració de la comunitat de formigues que significa la invasió comporta canvis importants en les relacions mutualistes en les quals estan implicades les formigues. Entre aquests hi ha la relació entre formigues i homòpters secretors de melassa, la pol·linització de les flors i la dispersió de les llavors; tots ells, processos fonamentals per a les comunitats vegetals i animals, i per a la recuperació de l'ecosistema davant de perturbacions com ara els incendis forestals.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### 1.a.2. Anàlisi de diferents dissenys experimentals a partir de dades bibliogràfiques

**Objectius formatius:** A partir de diferents articles científics en anglès, els estudiants hauran de definir el problema, formular la hipòtesi d'estudi, definir conceptes com la variable independent, la dependent, les constants, etc., i omplir les fitxes corresponents a aquesta activitat que trobaran al final d'aquest apartat.

**Mida dels grups:** grups de 3-4 persones

**Tipus d'activitat:** aprenentatge cooperatiu (AC), activitat tipus puzzle. Durada: 2 h

**Disseny de l'activitat:**

A. **Formació dels grups.** La classe es dividirà en grups de 3-4 estudiants/grup.

B. **Lectura dels tres articles.** Treball individual (20 min). Cada component del grup ha de llegir un fragment d'un article, i contestar les preguntes assignades al seu text.

C. **Reunió d'experts.** Els estudiants que han llegit el mateix text es reuneixen en grups de 3-4 «experts» i s'expliquen el text per mirar de trobar els punts en comú, comparar i discutir les respostes a les preguntes; per tal de trobar les respostes més adequades. Treball en grup (15 min). En aquesta reunió és convenient assignar rols als diferents participants; en aquest cas es pot tractar de rols estàtics: **els ponents** (expliquen què han entès del material assignat) i **el secretari** (s'assegura que la discussió s'acaba en el temps previst).

D. **Reunió dels grups inicials.** Cada estudiant explica a la resta del grup el que ha llegit. És important que s'arribi a una comprensió correcta del material que cada estudiant explica. En aquesta reunió també s'assignen rols, però en aquest cas es tracta de rols dinàmics, van fent rotacions: **el ponent** («l'expert» de cada cas o article), **un interrogador** (demana aclariments, intentant entendre al màxim les explicacions per tal d'assolir la comprensió adequada de cada article) i **un secretari** (controla el temps assignat a l'explicació de cada article). Treball en grup (10 min/estudiant o article = 30 min).

E. **Discussió general.** Posada en comú dels tres articles. Es trien tres alumnes a l'atzar que sortiran davant la classe i exposaran breument les conclusions a les quals ha arribat el seu grup amb referència a un dels textos. L'alumne seleccionat no podrà exposar el text que tenia assignat a l'inici de l'exercici. Treball en grup (30 min).

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### Article 1

Llegeix l'article i respon els punts següents. Posteriorment hauràs d'explicar a la resta del teu grup el que has llegit. Al final es posarà en comú el que heu entès i identificat per a cada article.

1. Defineix el problema i formula la hipòtesi d'estudi:

2. Defineix:

- a) Variable independent:
- b) Variable dependent:
- c) Constants:
- d) Grup control:
- e) Grup experimental:

3. Identifica les metodologies d'estudi:

- a) Mètodes de mostreig
- b) Tipus de mostreig: a l'atzar simple, estratificat, sistemàtic?
- c) Nombre de rèpliques:

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### Article 2

Llegeix l'article i respon els punts següents. Posteriorment hauràs d'explicar a la resta del teu grup el que has llegit. Al final es posarà en comú el que heu entès i identificat per a cada article.

1. Defineix el problema i formula la hipòtesi d'estudi:

2. Defineix:

- a) Variable independent:
- b) Variable dependent:
- c) Constants:
- d) Grup control:
- e) Grup experimental:

3. Identifica les metodologies d'estudi:

- a) Mètodes de mostreig
- b) Tipus de mostreig: a l'atzar simple, estratificat, sistemàtic?
- c) Nombre de rèpliques:

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### Article 3

Llegeix l'article i respon els punts següents. Posteriorment hauràs d'explicar a la resta del teu grup el que has llegit. Al final es posarà en comú el que heu entès i identificat per a cada article.

1. Defineix el problema i formula la hipòtesi d'estudi:

2. Defineix:

- a) Variable independent:
- b) Variable dependent:
- c) Constants:
- d) Grup control:
- e) Grup experimental:

3. Identifica les metodologies d'estudi:

- a) Mètodes de mostreig
- b) Tipus de mostreig: a l'atzar simple, estratificat, sistemàtic?
- c) Nombre de rèpliques:

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

#### 1.a.3. Proposta d'un disseny DISSENY MOSTRAL

#### 1.a.3. Proposta d'un disseny

**Objectius formatius:** A partir de dos «mapes» on es defineixen diferents situacions i en resposta a una pregunta concreta, els estudiants hauran de proposar i justificar dos possibles dissenys de mostreig.

**Mida dels grups:** grups de 3-4 persones

**Tipus d'activitat:** aprenentatge cooperatiu (AC). Durada: 30 min

**Disseny de l'activitat:**

A. **Formació dels grups.** La classe es dividirà en grups de 3-4 estudiants/grup (els mateixos que en l'activitat anterior).

B. **Estudi dels mapes i disseny de l'activitat.** Treball en grup (20 min). Cada mapa serà treballat per una part de la classe, dividida en diferents grups. Així doncs, treballant en grup i amb la informació prèvia derivada dels treballs dels diferents articles, els estudiants han de ser capaços de proposar un possible mostreig per tal de dur a terme l'estudi proposat.

C. **Discussió general.** Posada en comú de les dues propostes. Es trien dos alumnes a l'atzar que sortiran davant la classe i exposaran de manera justificada la seva proposta. Treball en grup (10 min).

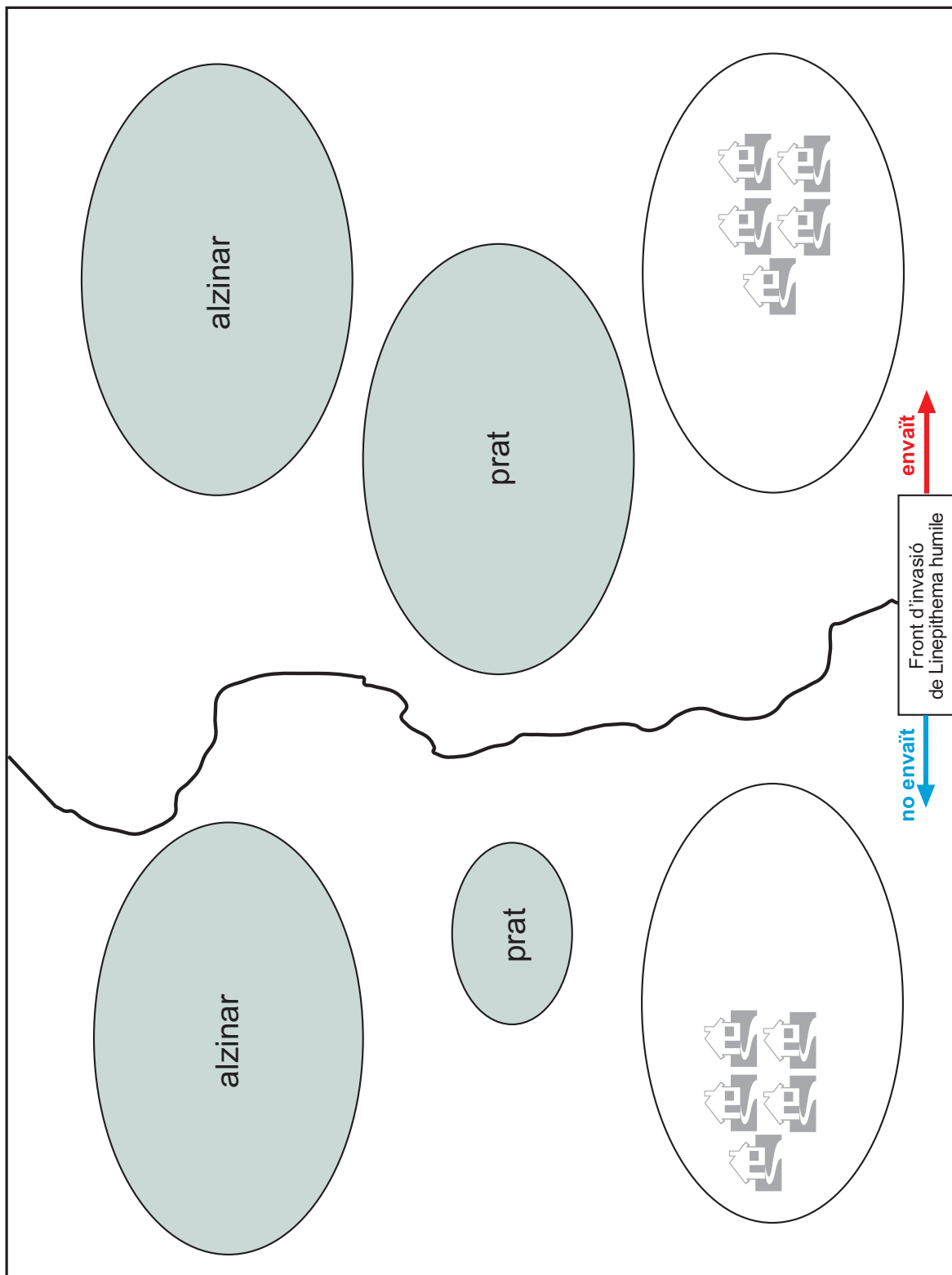


# CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

## 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

Mapa 1. Autor de la imatge: N. Sánchez



1.a.3. Proposta d'un disseny  
**DISSENY MOSTRAL**

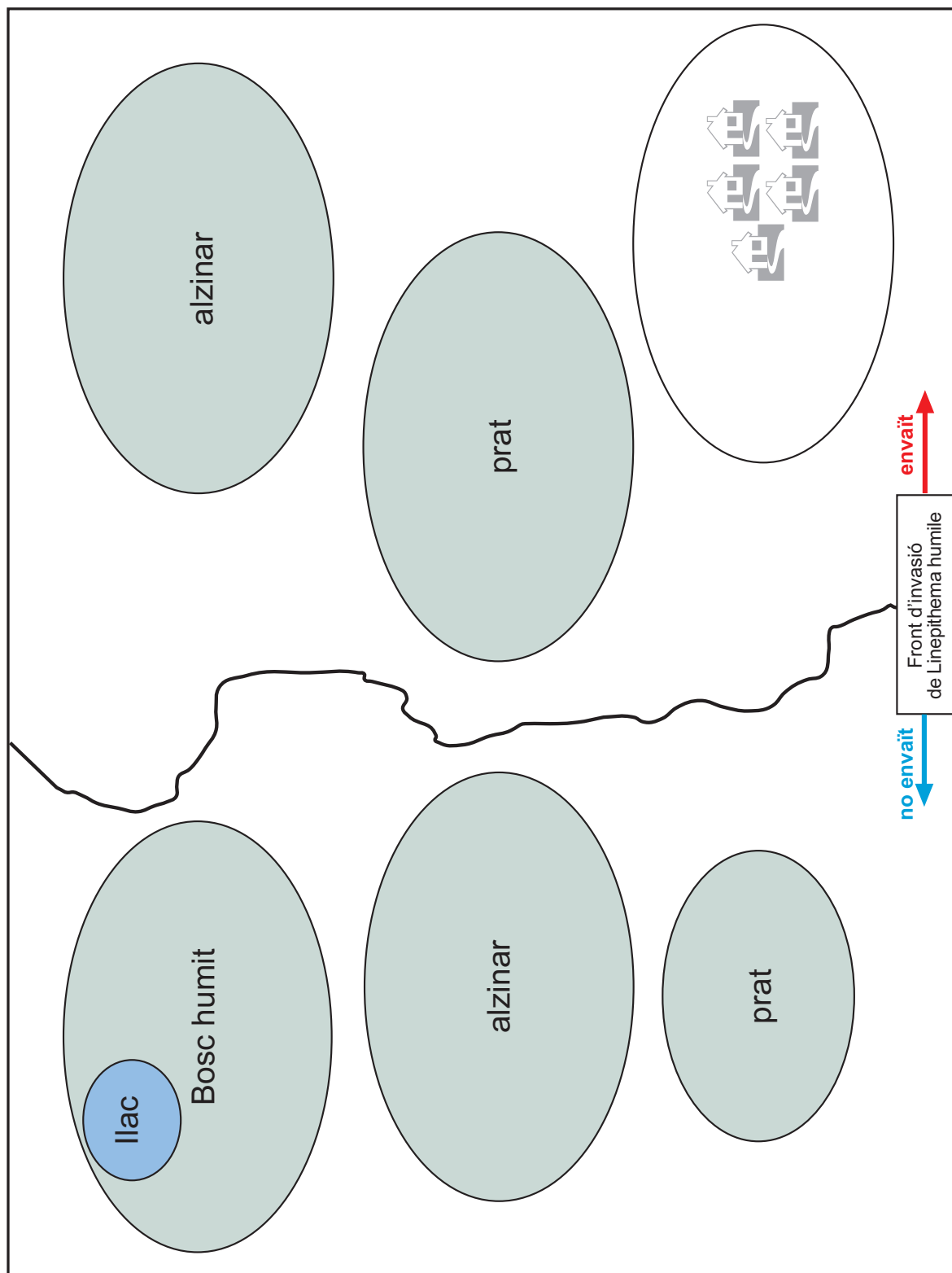
# CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

## 1. Estudi de l'abundància d'una espècie animal invasora

1.a.2. Anàlisi de diferents dissenys experimentals a partir de dades bibliogràfiques  
**DISSENY EXPERIMENTAL**

Mapa 2. Autor de la imatge: N. Sánchez



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.a. Sessió introductòria

Igual com en l'apartat anterior, però amb un nou exemple, les activitats d'aprenentatge següents pretenen introduir l'estudiant en el disseny experimental d'un estudi observacional o mesuratiu.

##### 2.a.1. Definició de la problemàtica i elecció del lloc de mostreig

**Treball previ:** Treball en forma de classe expositiva dels conceptes bàsics i necessaris per contextualitzar l'estudi que es proposa. Durada: 20 min.

**Objectius formatius:** Els estudiants continuaran treballant el disseny dels estudis observacionals. En aquest cas, el docent planteja un estudi en el qual es compararan dos ecosistemes a partir dels productors primaris. Amb l'ajuda d'unes qüestions concretes i d'una imatge aèria (ortofotomapa), els estudiants hauran de proposar i justificar una possible localització de l'estudi.

**Mida dels grups:** grups de 3-4 persones

**Tipus d'activitat:** aprenentatge cooperatiu (AC). Durada: 30 min

##### Disseny de l'activitat:

A. **Formació dels grups.** La classe es dividirà en grups de 3-4 estudiants/grup (els mateixos que en l'activitat anterior).

B. **Estudi de l'ortofotomapa.** Treball en grup (20 min). Els estudiants han de resoldre i fer propostes a les qüestions plantejades pel docent d'una manera justificada. Així doncs, treballant en grup, gràcies a la informació prèvia derivada de la classe expositiva i el suport de la imatge aèria (figura 1), els estudiants han de ser capaços de proposar les possibles localitzacions de l'estudi.

C. **Discussió general.** Posada en comú de les propostes. El docent pregunta a l'atzar les diferents propostes, que es discutiran entre tota la classe. Treball en grup (10 min).

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

2.a.1. Definició de la problemàtica i elecció del lloc de mostreig  
**DISSENY EXPERIMENTAL**

#### *Definició de la problemàtica i elecció del lloc de mostreig*

1. Quin tipus de sistema escolliríeu, d'entre els terrestres (forestal, arbustiu, herbaci) i d'entre els aquàtics (la sèquia, la llacuna) i per què?

2. Quin/quins punts de mostreig triaríeu? I per què?



Figura 1. Elaboració pròpia a partir de l'ortofotomapa 1:2 500 de Sils. Autor: M. Doncel  
Font original: Institut Cartogràfic de Catalunya (2009).

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.a.2. Disseny experimental

**Objectius formatius:** Els estudiants hauran de definir el problema, formular la hipòtesi d'estudi i definir els conceptes i variables de l'estudi.

**Mida dels grups:** grups de 3-4 persones

**Tipus d'activitat:** aprenentatge cooperatiu (AC). Durada: 30 min

**Disseny de l'activitat:**

A. **Formació dels grups.** La classe es dividirà en grups de 3-4 estudiants/grup (els mateixos que en l'activitat anterior).

B. **Definició dels conceptes i les variables de l'estudi.** Treball en grup (20 min). Els estudiants han de ser capaços de definir el problema d'estudi, els conceptes i les variables, formular la hipòtesi i proposar una primera aproximació del procediment experimental.

C. **Discussió general.** Posada en comú de les respostes i propostes. El docent pregunta a l'atzar les diferents propostes que es discutiran entre tota la classe. Treball en grup (10 min).

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.a.2. Disseny experimental DISSENY EXPERIMENTAL

##### *Disseny de l'experiment*

1. Defineix el problema i formula la hipòtesi d'estudi:

2. Defineix:

- a. Variable dependent:
- b. Constants:
- c. Grup control:
- d. Rèpliques:

3. Disseny el procediment experimental (proposa possibles protocols de mostreig):

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b. Sessions experimentals

##### Preàmbul

La sessió preparativa de grup mitjà ens va servir per definir el disseny mostral/experimental que portaríem a terme per tal de poder desenvolupar aquest estudi i comparar els dos tipus d'ecosistemes (terrestre i aquàtic).

Durant aquestes pràctiques es desenvoluparà el disseny treballat anteriorment a l'aula i s'incidirà en els conceptes estudiats, com la definició de la problemàtica, la hipòtesi, les variables, les rèpliques i els controls. No obstant això, l'objectiu principal d'aquesta setmana se centra a desenvolupar els procediments de mostreig i experimentals encarats a la consecució i l'anàlisi dels resultats que permetran respondre la problemàtica plantejada, per tal de poder acceptar o rebutjar la nostra hipòtesi de treball.

Per abordar la nostra problemàtica, en aquestes sessions es duran a terme diversos procediments tant al camp com al laboratori:

##### ✓ Sortida de camp

- Caracterització de l'àrea estudiada
- Mostreig en medi terrestre
- Mostreig en medi aquàtic

##### ✓ Anàlisi de clorofil·la

- Anàlisi de clorofil·la en productors primaris d'origen terrestre
- Anàlisi de clorofil·la en productors primaris d'origen aquàtic

##### ✓ Anàlisi de les dades

A continuació es detalla la planificació temporal de la setmana:

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

| <b>Activitat</b>  | <b>Dilluns</b>  | <b>Dimarts</b>   | <b>Dimecres</b>   | <b>Dijous</b>  | <b>Divendres</b>                              |
|---|---|--|---|--|---|
| <b>Preparació de l'experiment i estudi dels protocols</b> | -Qüestionari<br>-Estudi i preparació dels protocols de camp i laboratori<br>-Preparació sortida de camp |  |   |  |   |
| <b>Sortida de camp</b>                                    |   | -Caracterització de l'àrea d'estudi<br>-Mostreig en medi terrestre i aquàtic |   |  |   |
| <b>Anàlisi de clorofil·la</b>                             |   |  | -Quantificació de clorofil·la<br>-Obtenció de resultats |  |   |
| <b>Anàlisi de les dades (treball fora de l'aula, NP)</b>  |   |  |   | -Preparació de la llibreta de laboratori<br>-Preparació dels càlculs i conclusions preliminars |   |
| <b>Anàlisi de les dades</b>                               |   |  |   |  | -Càlculs<br>-Debat i discussió dels resultats |



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.1. Els protocols

**Objectius formatius:** Reconèixer els punts clau d'un protocol, i identificar el material i els aparells necessaris per reproduir-lo posteriorment de manera autònoma, tant al camp com al laboratori.

**Mida dels grups:** grups de 3-4 persones

**Tipus d'activitat:** aprenentatge cooperatiu (AC), activitat tipus puzzle

**Disseny de l'activitat:**

A. **Formació dels grups.** La classe es dividirà en grups de 3-4 estudiants/grup.

B. **Lectura dels tres protocols.** Treball individual (15 min). Cada component del grup ha de llegir un protocol dels tres que es troben al guió, tant el protocol de camp com el de laboratori.

C. **Reunió d'experts.** Els estudiants que han llegit el mateix protocol es reuneixen en grups d'«experts» i s'expliquen el text per mirar de trobar els punts en comú, identificar l'aparell i discutir els passos a seguir; treball en grup (15 min). En aquesta reunió és convenient assignar rols als diferents participants. En aquest cas es pot tractar de rols estàtics: **els ponents** (expliquen què han entès del material assignat) i **el secretari** (s'assegura que la discussió s'acaba en el temps previst).

D. **Reunió dels grups inicials.** Cada estudiant explica a la resta del grup inicial el que ha llegit. És important que s'arribi a una comprensió correcta del material que cada estudiant explica. En aquesta reunió també s'assignen rols, però en aquest cas es tracta de rols dinàmics, van fent rotacions: **el ponent** (l'«expert» de cada cas o article), **un interrogador** (demana aclariments, intentant entendre al màxim les explicacions per tal d'assolir la comprensió adequada de cada article) i **un secretari** (controla el temps assignat a l'explicació de cada article). Treball en grup (10 min/estudiant o article = 30 min).

E. **Discussió general.** Posada en comú dels tres protocols. Es trien tres alumnes a l'atzar que sortiran davant la classe i exposaran breument les conclusions a les quals ha arribat el seu grup amb referència a un dels textos. L'alumne seleccionat no podrà exposar el text que tenia assignat a l'inici de l'exercici. Treball en grup (30 min).

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.2. Sortida de camp

##### Introducció

##### Ecosistemes aquàtics i terrestres: els productors primaris

En el conjunt de la Terra diferenciem entre ecosistemes aquàtics: marins i epicontinental (fluvials, lacustres, embassaments, estanys, etc.) i terrestres. Més del 70% de la superfície del planeta correspon als oceans (ecosistemes marins), mentre que els ecosistemes continentals, que inclouen els sistemes terrestres i els aquàtics epicontinental, ocupen només una tercera part del total de la Terra.

L'aprofitament de la llum i la distribució dels productors primaris és molt diferent en els sistemes aquàtics i en els terrestres. Així doncs, en els sistemes aquàtics els productors primaris planctònics són bàsicament organismes microscòpics. Si la llum arriba al sediment es desenvolupen productors primaris bentònics, que poden arribar a ser identificables amb l'observació directa (macròfits), però sempre són de tal·lus herbaci, on la funció fotosintètica està repartida per tota l'estructura de l'organisme, a diferència dels sistemes terrestres, on els productors primaris contenen una gran part de material fotosintèticament no actiu a les tiges i als troncs. Per tant, en els sistemes terrestres la funció fotosintètica es troba bàsicament concentrada a les fulles, que són les parts productives de les plantes i presenten un metabolisme més actiu que el de les parts de sosteniment o conductores. La proporció entre parts actives i parts estructurals varia entre ecosistemes i pot arribar a ser un índex útil per identificar caràcters funcionals dels ecosistemes.

Hi ha diferències notables en l'estructura dels productors primaris aquàtics i terrestres. Als ecosistemes terrestres la planta creix cap amunt, buscant la llum, però depenent dels nutrients que capta del sòl a través de les arrels. Això obliga a una organització basada en el creixement vertical i en la presència d'elements estructurals de suport (tija o tronc, branques, arrels). Tot al contrari, els productors pri-

maris del plàncton depenen dels moviments i la circulació de l'aigua per mantenir-se en suspensió en llocs on hi hagi llum i nutrients per créixer (Margalef, 1992). Malgrat les notables diferències estructurals que hi ha entre els productors primaris aquàtics i terrestres, tots tenen en comú la presència de clorofil·la, pigment indispensable per a la fotosíntesi. Així doncs, la mesura de la quantitat de clorofil·la per unitat de superfície (o de volum) és una bona estima de la biomassa de productors primaris que hi ha en un ecosistema determinat.

Tenint en compte els ecosistemes que podem classificar en general en el medi terrestre diferenciem:

- ✓ Sistemes forestals
- ✓ Formacions arbustives
- ✓ Sistemes herbacis o pradencs

Mentre que, a grans trets, en el medi aquàtic diferenciem:

- ✓ Sistema planctònic
- ✓ Sistema bentònic

En el nostre estudi treballarem en una zona determinada en la qual hi són presents sistemes terrestres i aquàtics. Es tracta d'una zona inundable en la qual trobem sistemes forestals, formacions arbustives, prats i zones aquàtiques, més o menys estanques (estanys). L'objectiu és determinar com es distribueix la biomassa dels productors primaris entre els ecosistemes aquàtics i terrestres, utilitzant el contingut de clorofil·la com a estima de la biomassa. Analtzarem, així, si a l'estany de Sils la clorofil·la és més abundant als sistemes aquàtics o als terrestres.

##### L'àrea d'estudi: L'estany de Sils

L'estany de Sils és al municipi amb el mateix nom, en concret al sud del nucli urbà, a la comarca de la Selva (figura 2).



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Valors naturals

##### La flora i la vegetació

Al paisatge vegetal domina la vegetació de llocs inundats com els creixenars, els canyissars, els bogars, les comunitats de lleties d'aigua i els herbassars de ciperàcies i juncàcies, i també els boscos mixtos de ribera.

El prat de dall és un dels elements més importants del paisatge d'aquest entorn. Es tracta d'una comunitat on trobem una gran diversitat de plantes herbàcies, és seminatural i es desenvolupa sobre terrenys parcialment inundables. El seu manteniment només és possible amb una gestió adequada, és necessària una explotació tradicional (dallades o pastures), perquè, sense això, el prat acaba degenerant i és substituït per comunitats de ribera o aiguamolls que fan desaparèixer la diversitat pròpia d'aquesta comunitat. A més a més, quan l'embassament de l'aigua es manté durant temporades excessivament llargues, el prat de dall és substituït per altres comunitats d'aiguamoll, herbassars de balcalló (*Carex riparia*), balcars, jonqueres, canyissars i altres plantes aquàtiques de caràcter anual.

La vegetació de ribera està representada per formacions forestals de freixes, verns, gatells i salzes. No és, però, la més abundant a l'entorn de l'estany; de fet, on es troba més ben representada és a les rieres del voltant, com la riera de Vallcanera. A l'entorn de l'estany i gràcies a la gran varietat de microclimes i tipus de sòls es pot trobar una vegetació formada per rouredes, suredes, pinedes, brolles i prats secs, on hi ha representades espècies tan centreeuropees com mediterrànies.

##### La fauna

L'element més emblemàtic són els ocells, ja que l'estany és un punt d'aturada per a moltes espècies migratòries, una àrea força singular perquè és una llacuna situada a l'interior. A l'estany podem trobar ànecs de diverses espècies, bernats, martinets, becadells, fredelugues i altres aus limícoles. Diverses espècies d'aus utilitzen aquest espai com a indret

per a la reproducció, per exemple el cabusset (*Tachybaptus ruficollis*) i el martinet menut (*Ixobrychus minutus*). De fet, la gran diversitat d'hàbitats permet que s'hi trobin ocells especialitzats en cada zona en particular.

També és de destacar l'existència d'altres grups de vertebrats com la tortuga d'estany (*Emys orbicularis*), el tritó palmat (*Triturus helveticus*) i el tritó jaspiat (*T. marmoratus*).

En contraposició als valors ecològics de la zona, cal destacar la presència cada cop més problemàtica d'espècies exòtiques que ocasionen un fort impacte sobre el medi com la gambúsia (*Gambusia affinis*), la carpa (*Cyprinus carpio*), la tortuga de Florida (*Trachemys scripta*), el cranc americà (*Procambarus clarkii*) i el visó americà (*Mustela vison*).

#### Gestió de la zona

Actualment i a causa de l'interès de l'àrea en qüestió, hi ha diversos projectes relacionats amb la gestió i recuperació de l'estany de Sils. Alguns d'aquests projectes són:

- *Projecte de recuperació dels hàbitats naturals i seminaturals de l'estany de Sils*
- *Recuperació ambiental del segon tram de la riera de Vallcanera - Recuperació ambiental del rec Clar a l'espai PEIN estany de Sils*
- *Divulgació i educació ambiental a l'entorn de l'espai natural de l'estany de Sils*
- *Restauració d'hàbitats i ordenació dels usos públics de l'estany de Sils - Taller d'ocupació de restauració d'espais naturals*
- *Gestió de les basses temporals*
- *Millora paisatgística i ambiental de la sèquia de Sils*
- *Projecte LIFE - Natura Restauració i gestió de l'estany de Sils*

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### a. Caracterització de l'àrea estudiada

**Objectiu:** Conèixer l'àrea d'estudi per tal d'identificar els possibles punts de mostreig treballats prèviament sobre la imatge aèria en les sessions de grup mitjà.

Al llarg de la sortida es recorrerà la zona d'estudi per tal de caracteritzar, a grans trets, les diferents comunitats vegetals presents a la zona.

A l'estany s'han identificat diferents comunitats:

- Boscos mediterranis i submediterranis
- Vegetació fluvial
- Brolles mediterrànies
- Prats mediterranis
- Herbassars higròfils
- Prats de dall de la regió mediterrània
- Plantacions de pollancre i plàtans
- Cultius herbacis i arbustius
- Vegetació ruderal

Així doncs, al llarg del recorregut s'identificaran les diferents comunitats vegetals i les espècies característiques de cadascuna i es decidiran de manera justificada els possibles llocs de mostreig.

En aquest context i després de reconèixer la zona d'estudi:

- ✓ Podries marcar en l'ortofotomapa altres punts de l'estany de Sils on es podria fer el mateix mostreig?
  
- ✓ Quina és la planta que s'utilitzarà per fer la quantificació de l'ecosistema terrestre? Per què? Raona la teva resposta.
  
- ✓ Després de la visita i de llegir els diferents projectes que es duen a terme, valora la gestió de l'estany. Faries alguna proposta?

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

2.b.2. Sortida de camp  
CARACTERITZACIÓ DE L'ÀREA



Figura 3. Ortofotomapa 1:500 de Sils. Font: Institut Cartogràfic de Catalunya (2008)

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### b. Mostreig en medi terrestre

##### Objectiu:

Presa de dades per a la determinació de la concentració de clorofil·la present en un ecosistema terrestre. Es mostra una àrea coneguda, a posteriori es podrà extrapolar a l'àrea total.

Recorda:

*Les clorofil·les són especialment sensibles a la llum i a la temperatura. Cal manipular les mostres sempre a temperatures baixes i amb la mínima exposició a la llum possible, per evitar-ne la degradació.*

##### Material per al camp:

- Tisores de podar
- Regla per fer un quadrat de 10 × 10 cm
- Bosses d'escombraries
- Etiqueta i llapis (o bolígraf)
- Balança de pesar
- Plat de plàstic per a la balança
- Botes d'aigua (fins a mitja cama)
- Nevera i acumuladors de fred

##### Metodologia al camp:

1. Col·loqueu el regle a sobre de la superfície a mostrejar (quadrat de 10 × 10 cm).
2. Amb les tisores de podar retalleu tota la biomassa de planta inclosa en el quadrat i col·loqueu-la en un plat.
3. Peseu tota la biomassa recollida i anoteu-ne el pes.
4. Poseu-la en una bossa de plàstic, feu-hi un nus per tal que quedi ben tancada i a fora enganxeu-hi una etiqueta que indiqui: el **grup de classe**, el **subgrup** (número de parella), la **data** i el **pes** de la biomassa recollida.
5. Poseu a la nevera la bossa ben tancada i amb l'etiqueta corresponent.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.2. Sortida de camp MOSTREIG EN MEDI AQUÀTIC

#### c. Mostreig en medi aquàtic

##### c.1) Mostreig del compartiment plantònic

#### Objectiu:

Determinar la concentració de clorofil·la present a l'aigua, mitjançant la filtració d'aquesta i l'extracció posterior del pigment retinut al filtre amb un solvent orgànic. A partir de la concentració de clorofil·la present en un volum conegut, es podrà extrapolar a l'àrea total.

#### Recorda:

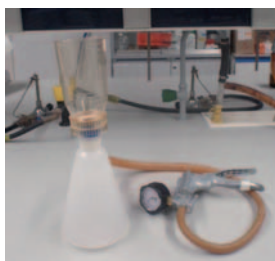
*Les clorofil·les són especialment sensibles a la llum i a la temperatura. Cal manipular les mostres sempre a temperatures baixes i amb la mínima exposició a la llum possible, per evitar-ne la degradació.*

#### Material per al camp:

- Equip de filtració
- Filtres Whatman GF-F
- Aigua destil·lada
- Pincas i/o espàtula
- Vials de 30 ml (dins hi ha 5 ml d'acetona 90%), amb tap que tanqui hermèticament
- Provena d'1-2 litres
- Paper d'alumini
- Retolador permanent, llapis i etiqueta
- Recipient per desar els vials
- Nevera i acumuladors de fred

#### Metodologia al camp:

1. Poseu un filtre net a l'aparell de filtració.



Equip de filtració.

Autor de la imatge: N. Sánchez

2. Filtreu una quantitat coneguda d'aigua (anoteu la quantitat exacta).
3. Traieu el filtre de l'aparell amb les pincas i doblegueu-lo per la meitat (amb les clorofil·les a dins).



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

4. Col·loqueu el filtre dins un vial tapat amb paper d'alumini (amb 5 ml d'acetona 90%), que quedi ben tancat (perquè l'acetona no s'evapori).



Vials de 30 ml.  
Autor de la imatge: N. Sánchez

5. Netegeu l'aparell de filtració amb aigua destil·lada.

6. Tritureu el filtre amb un objecte punxant (pinces o espàtula) perquè totes les parts amb clorofil·la entrin en contacte amb l'acetona i es desprenguin del filtre. Comproveu que tot el filtre queda submergit i està **ben triturat**.

7. Enganxeu una etiqueta al vial, on han de constar totes les dades: el **grup de classe**, el **subgrup** (número de parella), el **tipus de mostra**, la **data** i el **volum filtrat**.

8. Deseu-lo a dins del recipient i a dins de la nevera (entre 20-24 hores), amb el vial ben tapat per evitar que l'acetona s'evapori.

#### c.2) Mostreig del compartiment bentònic

**Objectiu:** Determinar pigments al sediment a partir d'un volum/superfície conegut. A partir de la concentració de clorofil·la present es podrà extrapolar a l'àrea total.

*Recorda:*

*Les clorofil·les són especialment sensibles a la llum i a la temperatura. Cal manipular les mostres sempre a temperatures baixes i amb la mínima exposició a la llum possible, per evitar-ne la degradació.*

**Material per al camp:**

- Tubs de core
- Pal on va el core
- Botes d'aigua (fins a la cintura)
- Vials de 30 ml (dins hi ha 8 ml d'acetona 90%)
- Recipient per col·locar els vials
- Nevera i acumuladors de fred
- Pal prim
- Ganivet o cúter
- Regla
- Paper d'alumini

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Metodologia al camp:

1. Poseu un tub de core al pal.



Imatge dels tubs de core i muntatge del core per utilitzar-lo en el mostreig. Autor de les imatges: N. Sánchez

2. Claveu el pal al fons de la bassa, introduint el core uns quants centímetres.
3. Feu moviments circulars amb el pal, abans d'extreure'l.
4. Traieu el pal amb molt de compte, perquè el core no es quedi al fons de la bassa.
5. Traieu el core del pal amb l'ajuda del pal prim, mantenint-lo sempre vertical, perquè l'aigua no es barregi amb el sediment.
6. Etiqueteu el vial, on han de constar totes les dades: el **grup de classe**, el **subgrup** (número de parella), el **tipus de mostra** i la **data**.
7. Anant molt alerta, talleu el primer centímetre de sediment (de la part superior del core), poseu-lo al vial corresponent (on hi ha 8 ml d'acetona 90%), tapeu-lo amb paper d'alumini i deseu-lo a la nevera.
8. Mesureu la fondària de la bassa.
9. Un cop al laboratori, poseu els vials en un **bany d'ultrasons** durant 15-30 minuts.
10. Deseu els vials al congelador 24 hores.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.3. Anàlisi de clorofil·la

##### Introducció

##### Què és la clorofil·la?

La clorofil·la és la molècula responsable de la primera etapa de transformació de l'energia de la llum solar en energia química i és, consegüentment, la molècula responsable de l'existència de vida superior a la Terra. És un pigment fotosintètic de color verd, que és el resultat de la longitud d'ona reflectida (és a dir, no absorbida). Així doncs, la clorofil·la absorbeix totes les longituds d'ona de l'espectre visible amb l'excepció del verd, que és reflectit i captat per la nostra retina. Tal com comprovareu durant la setmana de pràctiques, es tracta d'un pigment soluble en dissolvents polars, com l'alcohol o l'acetona.

Quan la clorofil·la absorbeix energia lumínica poden succeir tres coses:

- 1) Que l'energia sigui atrapada i convertida en energia química com succeeix en la fotosíntesi.
- 2) Que es dissipï en forma de calor.
- 3) Que l'energia absorbida sigui immediatament remesa amb una longitud d'ona superior, de manera que una part de l'energia es perd en forma de radiació fluorescent.

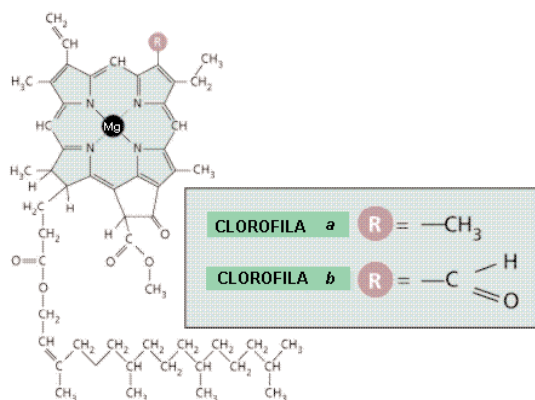


Figura 4. Representació de la molècula de clorofil·la. Extret de <http://www.biologia.edu.ar/images/>

##### Clorofil·la a i Clorofil·la b

Hi ha diversos tipus de clorofil·la. Les més importants són, la **clorofil·la a** i la **clorofil·la b**. La diferència entre elles és que la clorofil·la **b** té un grup formil (-CHO) en lloc del grup metil (-CH<sub>3</sub>) que té la **clorofil·la a** en un dels carbonis de l'anell de porfirina (figura 4). Cal destacar que en els vegetals la clorofil·la **a** és la més abundant; tot i això, en alguns productors primaris aquàtics podem trobar també altres tipus de clorofil·la, com la **c** i la **d**.

##### La clorofil·la com a biomassa dels productors primaris

Els productors primaris són els organismes fotosintètics que es troben a la base de la piràmide tròfica i que permeten la transformació de l'energia química en energia lumínica. La massa (o biomassa) d'aquests productors primaris, és de gran importància en ecologia, ja que la biomassa de productors primaris que es genera per unitat de temps és una mesura de l'entrada d'energia en un ecosistema. Prenent com a exemple un ecosistema aquàtic i la seva biomassa en productors primaris (biomassa pigmentària), la concentració de **clorofil·la a** és l'estimador químic més utilitzat (Papageorgiou et al., 2009). Per tant, l'anàlisi de clorofil·les es pot interpretar com una mesura de l'abundància de productors primaris, que pot relacionar-se amb altres variables d'interès ecològic, com la concentració de nutrients i la producció secundària. De fet, hi ha nombrosos treballs que relacionen la **clorofil·la a**, el contingut de nutrients i la biomassa del zooplàncton (Rezanka, 2003; Morgan et al., 2006; Huot et al., 2007).

És important tenir en compte que les mesures de clorofil·la per unitat de superfície (o de volum) ens donen una estima de la biomassa de productors primaris, i no de la producció de productors primaris. La biomassa (mg de clorofil·la per m<sup>2</sup>) és la quantitat de productors primaris que hi ha en un moment determinat. En canvi, la producció (mg de clorofil·la per m<sup>2</sup> i h<sup>-1</sup>) és la quantitat de biomassa que es genera per unitat de temps. La producció és

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

la variable relacionada amb l'entrada d'energia en un ecosistema.

#### Mesures de biomassa i concentració de clorofil·la

La biomassa d'un sistema es pot mesurar i expressar de diferents maneres: quantitat de carboni, pes del material fresc, pes del material sec, etc. Tal com hem apuntat en l'apartat anterior, en el cas dels productors primaris es poden fer estimacions de biomassa a partir de la quantitat de clorofil·la.

La quantitat de clorofil·la continguda en un organisme vegetal o d'un sistema natural sol expressar-se en relació amb la superfície (o amb el volum quan es tracta de plàncton). Així doncs, amb l'anàlisi de la clorofil·la estimem la quantitat de pigments fotosintètics (que s'estima com a part majoritària de **clorofil·la a**). Aquest càlcul és representatiu de la biomassa dels productors primaris i permet la seva comparació entre diferents ambients, malgrat que els organismes siguin tan diferents com les algues i les plantes terrestres.

#### Concentració de clorofil·la en els diferents organismes i sistemes

La quantificació dels diferents pigments es basa en la lectura, mitjançant l'espectrofotòmetre, de la den-

sitat òptica a les longituds d'ona en què l'absorbància de la llum és màxima per a un pigment determinat. Amb una sèrie de coeficients transformem aquestes densitats òptiques en concentracions pigmentàries, que seran les dades que nosaltres utilitzarem com a mesura de comparació entre ambdós ecosistemes.

Diferents ecosistemes presenten diferents concentracions de clorofil·la per unitat de superfície (figura 5). En aquest sentit, cal destacar que la concentració de clorofil·la té un límit superior d'utilització. Aquest límit se situa aproximadament en els 300 mg de clorofil·la/m<sup>2</sup>. Si ens fixem en comunitats que s'estenen en forma d'una capa prima (per exemple, els revestiments d'algues i els líquens sobre roques), la falta d'espessor de la comunitat dificulta l'accessibilitat als elements nutritius i actua com a factor limitant. Aquest tipus de comunitats sol presentar entre 20 i 200 mg de clorofil·la per m<sup>2</sup>, concentracions que no arriben al límit eficaç (Margalef, 1992). Unes altres comunitats, com per exemple les representades per la vegetació terrestre, que en general són força estructurades i estratificades, estan adaptades a la utilització de llum repetidament reflectida i difosa, i normalment contenen concentracions de clorofil·la que excedeixen el límit eficaç.

|  | Clorofil·la<br>(mg/m <sup>2</sup> ) |
|--|-------------------------------------|
| Pècton en llacs de muntanya  | 2-50                                |
| Embassament de Sau (mitjana)   | 219                                 |
| Algues sobre pedres en rius de muntanya                              | 300-370                             |
| Algues sobre pedres en rius de muntanya mitjana, Catalunya           | 113-273                             |
| Perífiton de llacs de Masuria  | 300                                 |
| Praderia d'aiguamoll de <i>Spartina alterniflora</i> , Massachusetts | 306-2.260                           |
| Comunitats bentòniques marines                                       | 300-2.750                           |
| Tundra àrtica  | 300-770                             |
| Camps abandonats   | 300-600                             |
| Praderies i pastures   | 700-1.000                           |
| Sabana   | 600-1.000                           |
| Bosc de <i>Pinus-Quercus</i>   | 3.100                               |
| Bosc montà d'ombra, Puerto Rico                                      | 2.200-2.670                         |
| Cultius de gramínies i soia  | 900-2.700                           |

Figura 5. Concentració de clorofil·la per unitat de superfície en diverses comunitats vegetals. Extret de Margalef, 1992

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

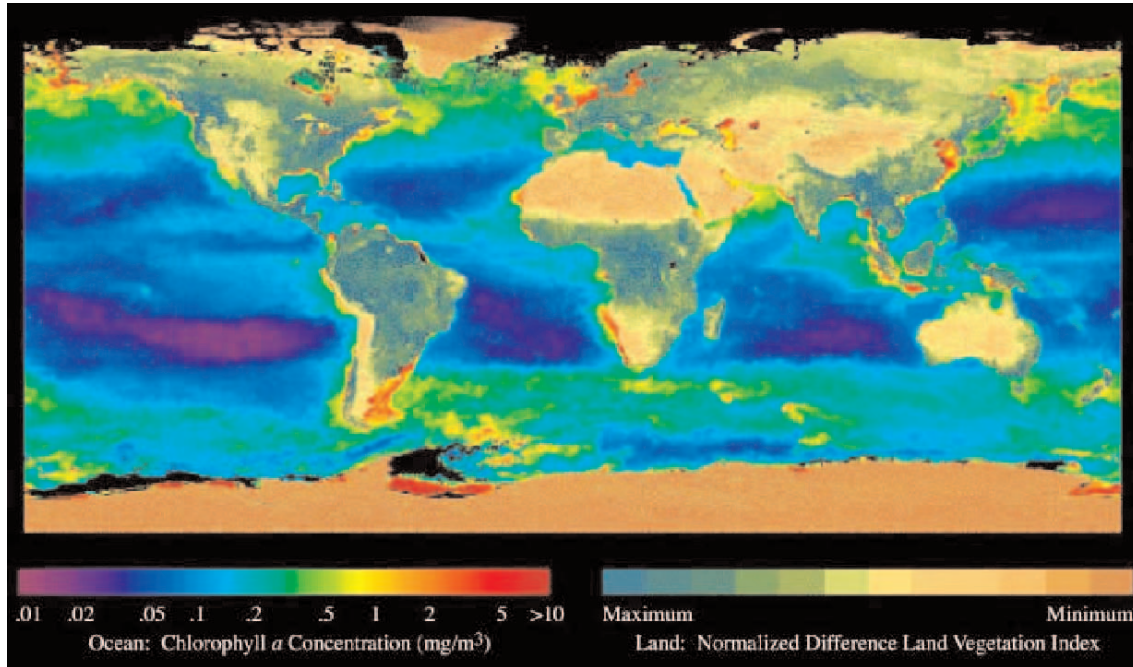


Figura 6. SeaWiFS Project, NASA/Goddard Space Flight Center and ORBIMAGE. Extret de [http://www.windows2universe.org/earth/Life/images/biosphere\\_seawifs\\_lg.jpg](http://www.windows2universe.org/earth/Life/images/biosphere_seawifs_lg.jpg)

Actualment, en estudis a gran escala s'utilitza la reflectància espectral de la superfície aquàtica a la regió visible o de l'infraroig proper per estimar la concentració de clorofil·la en grans extensions. Els radiòmetres SeaWiFS i MODIS-Aqua són un exemple dels instruments emprats per estimar aquesta concentració en grans extensions (figura 6).

D'altra banda, cal destacar que la relació entre les diferents classes de pigments també pot ser indicativa tant de la composició taxonòmica de la mostra com de l'estat fisiològic de la comunitat.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.3. Anàlisi de clorofil·la PROCEDIMENT

##### a. Anàlisi de clorofil·la en productors primaris d'origen terrestre

###### Objectiu:

Determinar la concentració de clorofil·la present en una quantitat coneguda de vegetació terrestre, a posteriori es podrà extrapolar a l'àrea total mostrejada i a la superfície total de la zona escollida.

###### Disseny del procediment experimental

Cada parella (grup) analitzarà una mostra de vegetació terrestre recollida. El conjunt de tota la classe analitzarà nou mostres de vegetació terrestre.

###### Procediment

###### Material per al laboratori:

- Cubetes d'espectrofotometria de vidre
- Provetes de vidre (100 ml)
- Morter i mà de morter
- Embut de Büchner
- Placa de Petri
- Bisturí
- Espàtules
- Pipetes de 10 ml
- Paper de filtre
- Paper d'alumini
- Gel
- Sorra de platja
- Acetona 80%
- Acetona 100%
- Carbonat càlcic ( $\text{CaCO}_3$ )
- Espectrofotòmetre
- Balança
- Estufa (a  $60^\circ\text{C}$ )

###### Protocol d'extracció de clorofil·les:

1. Peseu 0,15 g de fulles fresques (PF).

2. Talleu-les en trossos petits i col·loqueu-les al morter amb una mica de sorra (quatre granets) i un polsim de  $\text{CaCO}_3$ .



Mortor de porcellana. Autor: N. Sánchez

3. Dins de la **campana** d'extracció: afegiu 6 ml d'acetona 100% **un per un** alhora que tritureu les fulles, fins a obtenir un homogeneïtzat (durant 5-7 minuts).

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

- Afegiu-hi 6 ml d'acetona 80% fins a obtenir una homogeneïtzació correcta.
- Deixeu-ho reposar 15 minuts en un bany amb gel, tapat amb paper d'alumini perquè no hi penetri la llum.
- Talleu un paper de filtre de la mida de l'embut i col·loqueu-lo just al fons de l'embut.



Embut de Büchner de porcellana. Autor: N. Sánchez

- Humitegeu el filtre amb acetona 80%.
- Filtreu l'extracte en una proveta de vidre. Utilitzeu 6 ml d'acetona 80% per recuperar **totes les restes** d'extracte que han quedat al morter i la mà de morter, que també haureu de filtrar.
- Dilúiu l'extracte amb acetona 80% fins a aconseguir un volum final de 30 ml.
- Prepareu un blanc d'espectrofotometria en una cubeta de vidre amb 1 ml d'acetona 80%.
- Agiteu l'extracte i llegiu l'absorbància a 750 nm per determinar-ne la qualitat. Si el valor d'absorbància a 750 nm és superior a 0,5 torneu a filtrar fins que quedi una solució cristal·lina.
- Mesureu les absorbàncies de l'extracte a les longituds d'ona següents: 646 nm, 663 nm i 750 nm.

#### Protocol d'obtenció del pes sec (PS):

- Peseu 3 g de fulles fresques (PF) de balcalló en un platet d'alumini prèviament tarat.
- Col·loqueu la mostra en una estufa a 60°C durant 48 hores.
- Traieu la mostra de l'estufa, deixeu-la refredar, peseu-la de nou i anoteu-ne el pes; aquest serà el pes sec (PS) que correspon a un pes fresc de 3 g. A partir d'aquest valor, podrem calcular el pes sec d'una mostra de la qual haguem pesat el pes fresc prèviament.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.3. Anàlisi de clorofil·la RESULTATS INDIVIDUALS

#### Resultats individuals

(Productors primaris d'origen terrestre)

1. Mostres analitzades i registre d'incidències:

2. Valors d'absorbància obtinguts:

Taula 1

| Longitud d'ona ( $\lambda$ ) | Unitats d'absorbància |
|------------------------------|-----------------------|
| 646 nm                       |                       |
| 663 nm                       |                       |
| 750 nm                       |                       |

3. Calculeu la concentració de clorofil·la a partir de les equacions següents (Lichtenthaler, 1987):

$$Cl a \text{ (mg/g PF)} = [12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}] \times (\text{ml de } V_{\text{final}} \times 10^{-3}) \times (\text{g de PF} \times 10^{-1})$$

$$Cl b \text{ (mg/g PF)} = [20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}] \times (\text{ml de } V_{\text{final}} \times 10^{-3}) \times (\text{g de PF} \times 10^{-1})$$

Taula 2

|                               | mg/g PF | mg/g PS |
|-------------------------------|---------|---------|
| <b>Cl a</b> mostra laboratori |         |         |
| <b>Cl b</b> mostra laboratori |         |         |



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

4. A partir dels resultats obtinguts a l'apartat 3, calculeu la quantitat de clorofil·la de la mostra recollida al camp (del quadrat de 10 x 10 cm). Calculeu-ho també en mg/m<sup>2</sup>:

Taula 3

|                                   |                          |                    |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>Cl a en 100 cm<sup>2</sup></b> | mg / 100 cm <sup>2</sup> | mg/cm <sup>2</sup> |
| <b>Cl b en 100 cm<sup>2</sup></b> | mg / 100 cm <sup>2</sup> | mg/cm <sup>2</sup> |

5. Sabent que l'herbassar de càrex té una superfície de 49.700 cm<sup>2</sup>, calculeu la quantitat de clorofil·la de tot l'ecosistema terrestre:

Taula 4

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| <b>Cl a</b> ecosistema terrestre | mg |
| <b>Cl b</b> ecosistema terrestre | mg |

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Results globals

(Productors primaris d'origen terrestre)

Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 5. Quantitat de clorofil·la en cada mostra

| Grup                       | Cl a (mg/m <sup>2</sup> ) | Cl b (mg/m <sup>2</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1                          |                           |                           |
| 2                          |                           |                           |
| 3                          |                           |                           |
| 4                          |                           |                           |
| 5                          |                           |                           |
| 6                          |                           |                           |
| 7                          |                           |                           |
| 8                          |                           |                           |
| 9                          |                           |                           |
| <b>Mitjana</b>             |                           |                           |
| <b>Desviació estàndard</b> |                           |                           |

Taula 6. Quantitat de clorofil·la en tot l'ecosistema terrestre

| Grup                       | Cl a (mg) | Cl b (mg) |
|----------------------------|-----------|-----------|
| 1                          |           |           |
| 2                          |           |           |
| 3                          |           |           |
| 4                          |           |           |
| 5                          |           |           |
| 6                          |           |           |
| 7                          |           |           |
| 8                          |           |           |
| 9                          |           |           |
| <b>Mitjana</b>             |           |           |
| <b>Desviació estàndard</b> |           |           |

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

✓ Amb quantes rèpliques es treballa en total?

✓ Es tracta de vertaderes rèpliques? Com les tractem en el camp dels càlculs (estadístics)?

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.3. Anàlisi de clorofil·la PROCEDIMENT

#### b. Anàlisi de clorofil·la en productors primaris d'origen aquàtic

##### b.1. Anàlisi per al compartiment planctònic

##### Objectiu:

Determinar la concentració de clorofil·la present en un volum d'aigua conegut, *a posteriori* es podrà estimar la clorofil·la que hi ha a la superfície total de la bassa.

##### Disseny del procediment experimental

Cada parella (grup) analitzarà una mostra de compartiment planctònic. El conjunt de tota la classe analitzarà nou mostres de compartiment planctònic.

##### Procediment

##### Material per al laboratori:

- Vials de vidre (amb la mostra)
- Acetona 90%
- Paper d'alumini
- Tubs d'Eppendorf de 2 ml
- Micropipeta de 1.000 µl i puntes blaves
- Cubetes d'espectrofotometria de vidre
- Cullereta
- Centrífuga
- Espectrofotòmetre

##### Protocol:

1. Tritureu el filtre amb la solució d'acetona per tal de facilitar la separació de l'extracte de les restes de filtre.
2. Filtreu el triturat amb un filtre de fibra de vidre i recolliu l'extracte
3. Prepareu el blanc d'espectrofotometria (cubeta de vidre) amb 1 ml d'acetona 90%.
4. Mesureu l'absorbància de l'extracte a 750 nm. Si supera el valor de 0,015 torneu a filtrar i a llegir (tot i que els resultats poden no ser tan fiables).
5. Mesureu les absorbàncies de l'extracte a les longituds d'ona següents: 630 nm, 647 nm, 664 nm, 750 nm.

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Resultats individuals

(Productors primaris al compartiment planctònic)

1. Mostres analitzades i registre d'incidències:

2. Valors d'absorbància obtinguts:

Taula 7

| Longitud d'ona ( $\lambda$ ) | Unitats d'absorbància |
|------------------------------|-----------------------|
| 630 nm                       |                       |
| 647 nm                       |                       |
| 664 nm                       |                       |
| 750 nm                       |                       |

3. Calculeu la concentració de clorofil·la de la mostra d'aigua recollida a partir de les equacions següents (Jeffrey & Humphrey, 1975):

$$Cl a (\mu\text{g/l}) = [11,85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1,54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0,08 \times (A_{630} - A_{750})] \times (V \text{ acetona } 90\% \text{ en ml} / V \text{ mostra filtrada en litres})$$

$$Cl b (\mu\text{g/l}) = [-5,43 \times (A_{664} - A_{750}) + 21,03 \times (A_{647} - A_{750}) - 2,66 \times (A_{630} - A_{750})] \times (V \text{ acetona } 90\% \text{ en ml} / V \text{ mostra filtrada litres})$$

Taula 8

|                          |                 |
|--------------------------|-----------------|
| <b>Cl a</b> mostra aigua | $\mu\text{g/l}$ |
| <b>Cl b</b> mostra aigua | $\mu\text{g/l}$ |

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

2.b.3. Anàlisi de clorofil·la  
RESULTATS INDIVIDUALS

4. Calculeu el volum de la columna d'aigua que correspon a una superfície determinada de la llacuna ( $V_{ca}$ ), per exemple, el volum d'aigua que hi ha en un cilindre que té una base de  $10 \times 10$  cm:

Base ( $b$ ): (Suposem que tenim un quadrat de 10 cm de costat.)

Alçada ( $h$ ): fondària de la bassa

$$V_{ca} = b (\text{costat} \times \text{costat}) \times h =$$

Calculeu quants litres conté la columna d'aigua:

5. Calculeu la concentració de clorofil·la per a la nostra columna d'aigua (a partir dels apartats 3 i 4). Calculeu-ho també en  $\text{mg}/\text{m}^2$ :

Cl a =

Cl b =

Taula 9

|            |                                  |                        |
|------------|----------------------------------|------------------------|
| Cl a aigua | $\mu\text{g} / 100 \text{ cm}^2$ | $\text{mg}/\text{m}^2$ |
| Cl b aigua | $\mu\text{g} / 100 \text{ cm}^2$ | $\text{mg}/\text{m}^2$ |

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Resultats globals

*(Productors primaris al compartiment planctònic)*

Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 10. Concentració de clorofil·la en la columna d'aigua

| Grup                       | Cl a (mg/m <sup>2</sup> ) | Cl b (mg/m <sup>2</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1                          |                           |                           |
| 2                          |                           |                           |
| 3                          |                           |                           |
| 4                          |                           |                           |
| 5                          |                           |                           |
| 6                          |                           |                           |
| 7                          |                           |                           |
| 8                          |                           |                           |
| 9                          |                           |                           |
| <b>Mitjana</b>             |                           |                           |
| <b>Desviació estàndard</b> |                           |                           |

✓ Amb quantes rèpliques es treballa en total?

✓ Es tracta de vertaderes rèpliques? Com les tractem en el camp dels càlculs (estadístics)?

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### b.2. Anàlisi per al compartiment bentònic

##### Objectiu:

Determinar la concentració de clorofil·la present en una superfície de sediment coneguda, a posteriori es podrà estimar la clorofil·la que hi ha a l'àrea total de la bassa.

##### Disseny del procediment experimental

Cada parella (grup) analitzarà una mostra de compartiment bentònic. El conjunt de tota la classe analitzarà nou mostres de compartiment bentònic.

##### Procediment

##### Material per al laboratori:

- Vials de vidre (amb la mostra)
- Acetona 90%
- Paper d'alumini
- Tubs d'Eppendorf de 2 ml
- Micropipeta de 1.000 ìl
- Cubetes d'espectrofotometria de vidre
- Centrifuga
- Espectrofotòmetre
- Puntetes blaves (1 ml)

##### Protocol:

1. Agafeu el vial amb la vostra mostra i **barregeu-la molt bé**.
2. Transferiu 2 ml d'extracte a un tub d'Eppendorf.
3. Centrifugueu-ho a 5.000 rpm durant 5 minuts.
4. Recolliu el sobrenedant a un nou tub d'Eppendorf **evitant agafar restes sòlides**.
5. Prepareu el blanc d'espectrofotometria (cubeta de vidre) amb 1 ml d'acetona 90%.
6. Comproveu que l'absorbància de l'extracte a  $\lambda$  750 nm no supera el valor de 0,015. Si fos així torneu a centrifugar i a llegir, tot i que els resultats poden no ser tan fiables.
7. Mesureu les absorbàncies de l'extracte a les longituds d'ona següents: 645 nm, 665 nm i 750 nm.



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Resultats individuals

(Productors primaris al compartiment bentònic)

1. Mostres analitzades i registre d'incidències:

2. Valors d'absorbància obtinguts:

Taula II

| Longitud d'ona ( $\lambda$ ) | Unitats d'absorbància |
|------------------------------|-----------------------|
| 630 nm                       |                       |
| 647 nm                       |                       |
| 664 nm                       |                       |
| 750 nm                       |                       |

3. Calculeu la concentració de clorofil·la de la mostra de sediment recollit:

$S_c$  = superfície del core ( $\text{cm}^2$ )

$$S_c = \pi \times r^2 =$$

Diàmetre del core: 1 cm

A partir de la superfície del core, calculeu la concentració de clorofil·la de la mostra d'aigua recollida a partir de les equacions següents (Jeffrey & Humphrey, 1975):

$$C_a (\mu\text{g/l}) = [11,85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1,54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0,08 \times (A_{630} - A_{750})] \times [V \text{ acetona } 90\% \text{ en ml} / (S_c \times 1.000)]$$

$$C_b (\mu\text{g/l}) = [-5,43 \times (A_{664} - A_{750}) + 21,03 \times (A_{647} - A_{750}) - 2,66 \times (A_{630} - A_{750})] \times [V \text{ acetona } 90\% \text{ en ml} / (S_c \times 1.000)]$$

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

Taula I2

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| <b>CI a</b> sediment core | mg/cm <sup>2</sup> |
| <b>CI b</b> sediment core | mg/cm <sup>2</sup> |

Calculeu quants cores tenim en 100 cm<sup>2</sup>:

4. Calculeu la quantitat de clorofil·la en 100 cm<sup>2</sup> de sediment i la quantitat de clorofil·la en 1 m<sup>2</sup>:

Taula I3

|                   |                          |                   |
|-------------------|--------------------------|-------------------|
| <b>CI a</b> aigua | µg / 100 cm <sup>2</sup> | mg/m <sup>2</sup> |
| <b>CI b</b> aigua | µg / 100 cm <sup>2</sup> | mg/m <sup>2</sup> |

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### Resultats globals

(Productors primaris al compartiment bentònic)

Resultats en el conjunt de la classe:

Taula 14. Concentració de clorofil·la en el sediment

| Grup                       | Cl a (mg/m <sup>2</sup> ) | Cl b (mg/m <sup>2</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1                          |                           |                           |
| 2                          |                           |                           |
| 3                          |                           |                           |
| 4                          |                           |                           |
| 5                          |                           |                           |
| 6                          |                           |                           |
| 7                          |                           |                           |
| 8                          |                           |                           |
| 9                          |                           |                           |
| <b>Mitjana</b>             |                           |                           |
| <b>Desviació estàndard</b> |                           |                           |

Taula 15. Taula resum de la concentració de clorofil·les a l'ecosistema aquàtic

| Compartiment                    | Cl a (mg/m <sup>2</sup> ) | Cl b (mg/m <sup>2</sup> ) |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Planctònic (aigua)              |                           |                           |
| Bentònic (sediment)             |                           |                           |
| <b>Total ecosistema aquàtic</b> |                           |                           |

Sabent que l'ecosistema aquàtic té una superfície de 42.300 m<sup>2</sup>, calculeu la quantitat de clorofil·la de tot l'ecosistema aquàtic:



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

#### 2.b.4. Anàlisi de les dades

A partir dels resultats obtinguts durant els diferents experiments, **analitza i verifica el disseny mostral-experimental que s'ha seguit**:

Omple aquesta fitxa a tall de compendi dels resultats i conceptes tractats durant el decurs de la setmana.

1. Definició del problema:

2. Definició de conceptes:

a. Variable dependent:

b. Constants:

c. Grup control:

d. Grup experimental:

e. Rèpliques:

3. Formulació de la hipòtesi:

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

2.b.4. Anàlisi de les dades  
**ANÀLISI**

4. Disseny del procediment experimental:

(Fes un esquema dels diferents procediments seguits.)

5. Obtenció i anàlisi dels resultats. Compara la concentració de clorofil·la en els dos sistemes.

Taula 17. Concentració de clorofil·la en els diferents ecosistemes estudiats

| Concentració de clorofil·la | Ecosistema terrestre | Ecosistema aquàtic |
|-----------------------------|----------------------|--------------------|
| Cl a (mg/m <sup>2</sup> )   |                      |                    |
| Cl b (mg/m <sup>2</sup> )   |                      |                    |
| Cl a (mg)                   |                      |                    |
| Cl a (mg)                   |                      |                    |

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 2. Comparació d'ecosistemes aquàtics i terrestres a partir dels productors primaris, mesures de clorofil·la

6. Conclusions:

- ✓ Les dades obtingudes responen al problema plantejat? Justifiqueu la resposta.
  
- ✓ S'ha confirmat la hipòtesi de partida? Justifiqueu la resposta.
  
- ✓ Valora el disseny mostral proposat. Com el milloraries?

## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 3. Bibliografia

#### *Bibliografia bàsica*

- FOLCH, R. *Història natural dels Països Catalans*. Vol. 14. Barcelona: Enciclopèdia Catalana, 1984.
- FOLCH, R. *Litorals i oceans*. Biosfera. Vol. 10. Barcelona: Enciclopèdia Catalana, 1994.
- GARCÍA-SEGURA, J. M.; GAVILANES, J.; MARTÍNEZ DEL POZO, A.; MONTERO, F.; OÑADERRA, M.; VIVANCO, F. *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*. Madrid: Síntesis, 2002.
- HUOT, Y.; BABIN, M.; BRUYANT, F.; GROB, C.; TWARDOWSKI, M. S.; CLAUSTRE, H. «Does chlorophyll a provide the best index of phytoplankton biomass for primary productivity studies?» *Biogeosci. Discuss* (2007), 4, 707-745.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Omega, 2007.
- MERCADAL, G.; VILAR, L.; GESTI, J. «Evolució de la vegetació de l'antic estany de Sils (la Selva) en els darrers 50 anys». *Butll. Inst. Cat. Hist. Nat.* (2006), 74, 117-131.
- MORGAN, A. M.; ROYER, T. V.; DAVID, M. B.; GENTRY, L. E. «Relationships among Nutrients, Chlorophyll-a, and Dissolved Oxygen in Agricultural Streams in Illinois». *J. Environ. Qual.* (2006), 35, 1110-1117.
- PAPEGEORGIOU, G. C. *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Dordrecht (Holanda): Springer, 2009.
- REZANKA, K. M. «Examining primary producer-consumer interactions in a Lake Superior tributary using <sup>15</sup>N-tracer, grazer-reduction, and nutrient-bioassay experiments». *J. N. Am. Benth. Soc.* (2003), 22, 371-387.
- ROS, J. D. (ed.). *Prácticas de Ecología*. Barcelona: Ediciones Omega, 1979.
- TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L.; BEGON, M. *Ecología*. Barcelona: Omega, 1999.
- VAN DEN BRINK, P. J.; HARTGERS, E. M.; FETTWEIS, U.; CRUM, S. J.; VAN DONK, E.; BROCK, T. C. «Sensitivity of macrophyte-dominated freshwater microcosms to chronic levels of the herbicide linuron. I. Primary producers». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (1997), 38, 13-24.

#### *Bibliografia citada i específica*

- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. «New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton». *Biochem. Soc. Trans* (1975), 11, 591-592.
- LICHTENTHALER, K. H. «Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes». *Methods in Enzymology* (1987), 148, 360-370.
- MARGALEF, R. *Ecología*. Barcelona: Ediciones Omega, 1992.



## CAPÍTOL III. ESTUDI OBSERVACIONAL O MESURATIU

Autors: Noemí Sánchez, Marta Doncel, Marta Pérez-Garay, Marc Yeste i Xavier Quintana

### 3. Bibliografia

VERDAGUER, D. *Pràctiques de Fisiologia vegetal*. Girona: Servei de Publicacions de la Universitat de Girona, 1997.

#### *Pàgines web consultades*

ESTANY DE SILS. <<http://www.estanydesils.cat>> [Consulta: 15 setembre 2010]

HIPERTEXTOS DEL ÀREA DE LA BIOLOGÍA. *Fotosíntesis: Conceptos previos*. Universidad Nacional del Nordeste: Fac. de Agroindustrias, Saenz Peña, Chaco y Fac. Ciencias Agrarias. República Argentina. Corrientes. ©1998-2008. <<http://www.biologia.edu.ar>> [Consulta: 27 octubre 2010]

WINDOWS TO THE UNIVERSE TEAM. *The Biosphere: An Integral Part of the Planet and its Climate*. Boulder, CO: © National Earth Science Teachers Association. <<http://www.windows2universe.org/>> [Consulta: 27 octubre 2010]