

Treball de recerca

L'AMENANÇA FANTASMA

Estudi sobre l'ecotoxicitat dels encoixinats biodegradables

Montserrat Roig Kim

Dirigit per Maria Josep Claramunt

Col·legi Arabell 2013

*Al Departament d'Hortofructicultura d'Agrònoms
i a la família pel suport constant.*

*"A person who never made a mistake
never tried anything new"
Albert Einstein*

Abstract

Nowadays, plastic is a very common material that can be found in many different areas. In agriculture, there is a wide range of uses such as mulching. The term mulch refers to the plastic film that is used to cover crops.

Since plastic waste disposal causes environmental pollution, a biodegradable alternative has been created to reduce the impact on the planet. But do these biodegradable plastics have any effect on the crops?

The aim of this project was to prove the ecotoxicity of biodegradable mulches. First of all, you will learn about the history of plastics and the description and the application of mulches. Secondly, you will find the results of an experiment carried out to study the development of a species of lettuce cultivated in an *in vitro* medium that contains a plastic compound.

In other words, with this research project, an unknown side of plastics has been discovered.

Índex

0. Introducció	6
1. Marc teòric.....	9
1.1 Visió històrica.....	9
1.2 Plàstics per ús agrícola	10
1.2.1 Actualitat	10
1.2.2 Principals aplicacions	13
1.2.2.1 Hivernacles.....	13
1.2.2.2 Mulching	14
1.2.2.2.1 Valoració	15
1.2.2.2.2 Classificació	17
1.3 Mulch biodegradables: l'alternativa	19
1.4 Estudi previ.....	22
2. Marc pràctic	23
2.1 Hipòtesi	23
2.2 Variables.....	23
2.3 Introducció	23
2.4 Desenvolupament de l'experiment.....	25
2.5 El medi de cultiu	29
2.6 Mesura de dades.....	32
2.6.1 Taxa de germinació.....	32
2.6.2 Pes sec	32
2.6.3 pH final del medi	33
2.6.4 Concentració de clorofil·la	33
2.7 Resultats i discussió.....	34
2.7.1 Taxa de germinació.....	34
2.7.2 Pes sec	36
2.7.3 pH.....	38
2.7.4 Contingut en clorofil·les (SPAD)	40
2.7.5 Prolina	42
2.7.6 Seguiment visual del desenvolupament de les plàntules	44

3. Conclusions.....	49
4. Prospectiva	52
5. Biblioheerografia.....	54
6. Annexos.....	56
Annex 1: Protocol de preparació de medi de cultiu	56
Annex 2: Protocol d'esterilització de llavors.....	57
Annex 3: Precaucions especials.....	58

0. Introducció

L'home, com a habitant dominant de la Terra, no s'adapta a les condicions del medi que l'envolta. Al contrari, fa les modificacions necessàries per no només garantir la seva supervivència sinó també per viure de la millor manera possible.

En l'àmbit de l'agricultura, els plàstics permeten alterar els paràmetres convenients per així crear un espai amb les condicions òptimes pel desenvolupament d'una determinada espècie vegetal en funció dels beneficis que aporta a l'home.

Últimament, la tendència recau sobre la sostenibilitat cosa que ha fet que els investigadors busquin alternatives ecològiques per reduir els impactes provocats.

La principal causa del creixement de l'interès per materials alternatius és el problema que planteja la gestió de residus inorgànics i el perill per la fauna silvestre que presenten les deixalles plàstiques convencionals.

És per això que han sorgit els *films* biodegradables que tenen la propietat de ser eliminats en el mateix terreny de cultiu cosa que minimitza la contaminació.

Ara bé, quin és l'impacte sobre l'espècie vegetal? Tenen algunes conseqüències negatives que afectin el seu desenvolupament?

Aquest treball pretén esbrinar si els encoixinats biodegradables que s'utilitzen en els camps, tenen algun efecte nociu sobre les plantacions.

La **primera part** del treball, conté la informació teòrica extreta majoritàriament de la xarxa. A més a més, vaig poder accedir a bases de dades, com SCOPUS, a partir de la Universitat de Lleida i descarregar en format digital articles referents als *films* biodegradables.

En primer lloc, es fa una visió global sobre els usos dels plàstics al llarg de la història.

Després, s'emfatitza en els *mulch* i es presenta l'alternativa ecològica al voltant de la qual gira l'experiment posterior.

La **segona part** d'aquesta recerca engloba l'experiment realitzat a les instal·lacions del Departament d'Hortofructicultura de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària (ETSEA) de Lleida.

Aquí, es presentaran els passos seguits per conduir l'experiment que vaig executar al llarg dels mesos de juliol i agost. En ell, vaig observar els efectes sobre plantes d'enciam *Lactuca sativa cv. Trocadero* cultivades in vitro en un medi amb presència de dos dels compostos més comuns dels *films* biodegradables, l'àcid adípic i l'àcid succínic.

Seguidament, s'han recopilat i interpretat els resultats que confirmen la meua **hipòtesi**: els encoixinats biodegradables són tòxics per la planta i, per tant, tenen una influència negativa en el seu creixement.

La **tercera part** mostra les conclusions a les quals podem arribar mitjançant la informació de la primera part i també a partir de les dades obtingudes un cop finalitzada la pràctica.

En darrer terme, s'adjunta la bibliografia consultada i l'apartat d'annexos on s'hi poden trobar els protocols seguits per realitzar el marc experimental.

El que em va dur a realitzar aquest estudi va ser la curiositat i a la vegada les ganes de demostrar l'omnipresència de la contaminació i que, per molt que ho intentem ignorar, tot apunta a què té un origen antropogènic.

A més, era l'oportunitat perfecta per conèixer les tasques de treball d'un laboratori i també exposar que el fet que el plàstic sigui un material àmpliament utilitzat i molt comú no ens permet assumir que sigui totalment beneficiós.

La principal **dificultat** que em vaig trobar durant l'evolució del treball va ser l'exigència que demana el marc pràctic, és a dir, el treball al laboratori.

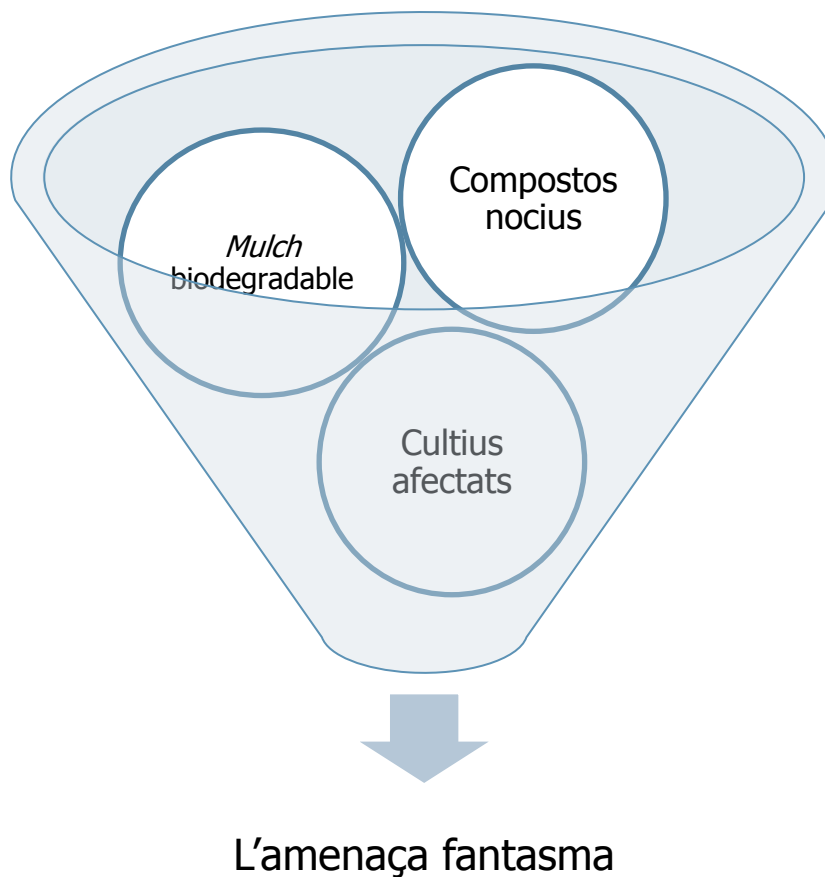
Per una banda, no havia realitzat mai cap experiment d'aquesta envergadura i vaig haver d'aprendre les tasques a seguir per realitzar un cultiu *in vitro*.

Per una altra banda, la limitació del temps va fer que la recerca se centrés en els mesos d'estiu i, per tal d'observar l'evolució i creixement de les plàntules, havia de desplaçar-me a diari durant gairebé dos mesos per tal de compilar el màxim de dades possible.

Com tota investigació, a l'iniciar el treball de recerca em vaig proposar una sèrie d'**objectius generals**.

Des del moment en què vaig començar a plantejar-me un tema, tenia molt clar que volia realitzar alguna pràctica en un laboratori. Majoritàriament, perquè depenent de la impressió final, em podria ajudar a decidir la carrera universitària que vull cursar.

També m'ha permès formar part d'un equip d'investigació i veure el mètode de treball i les tasques que es realitzen per tal de demostrar una determinada hipòtesi.



1. Marc teòric

1.1 Visió històrica

El primer moment històric en què l'home controla el clima d'un entorn, va ser en època romana. Concretament, durant el govern de l'Emperador Tiberi (14 – 37 d.C). La idea va sorgir de la recomanació del metge de Tiberi de menjar un cogombre al dia. Per això, els seus jardiniers van haver de desenvolupar un mètode de cultiu de manera que l'Emperador es trobés un cogombre al plat cada dia de l'any. Aquest sistema consistia en col·locar les plantes sota unes estructures cobertes de teles impregnades d'oli, que rebien el nom de "*specularia*", o bé amb làmines de mica.

Uns segles més tard, el segle XIII, a Itàlia apareixen els primers hivernacles moderns que són de vidre. Aquest microclima servia per protegir les plantes exòtiques que els exploradors i investigadors portaven. D'aquesta manera, es podien conservar i seguir cultivant lluny de les seves terres d'origen. Aquest experiment, va ser ràpidament estès sobretot cap a Holanda i Anglaterra.

Tot i la innovació i l'admiració vers aquests productes estrangers, es van començar a manifestar dificultats. En concret, aquestes estructures requerien molta feina per ser tancades durant la nit i durant l'hivern, és a dir, eren difícils de ser aïllades de les temperatures exteriors i mantenir un nivell tèrmic adequat era una tasca complicada.

Arreu del continent europeu, els hivernacles rebien diversos noms. Per exemple, els anglesos a vegades els coneixien com "*conservatoires*" perquè la seva funció era la de conservar les plantes i a França els primers hivernacles s'anomenaven "*orangeries*" ja que s'utilitzaven per protegir els tarongers de les gelades.

Al segle XIX, destaca l'hivernacle dels "Kew Gardens", a Anglaterra, que era un exemple de *conservatoire* victorià.

Al segle XX, sobretot després de la Segona Guerra Mundial, el desenvolupament econòmic va impulsar la construcció d'hivernacles de vidre. Holanda va superar les 5.000 hectàrees a mitjans del segle XX, amb cultius especialment dedicats a la tomata.

La substitució del vidre per un material més resistent i econòmic no es va fer fins a meitat del segle XX.

Així, podem afirmar que la utilització de plàstics en el món agrari és relativament recent.

1.2 Plàstics per ús agrícola

1.2.1 Actualitat

Les dades que es tenen dels primers plàstics utilitzats en el camp de l'agricultura, són de l'any 1948 quan el professor E.M. Emmert de la Universitat de Kentucky, als Estats Units, no tenia prou diners per comprar-se un hivernacle de vidre i va decidir utilitzar una estructura de fusta coberta per *film* d'acetat de cel·lulosa que més tard va substituir per *film* de polietilè.

A Espanya, els primers hivernacles de plàstic es van instal·lar el 1958 a les Illes Canàries i no es van estendre per la Península fins l'any 1965.

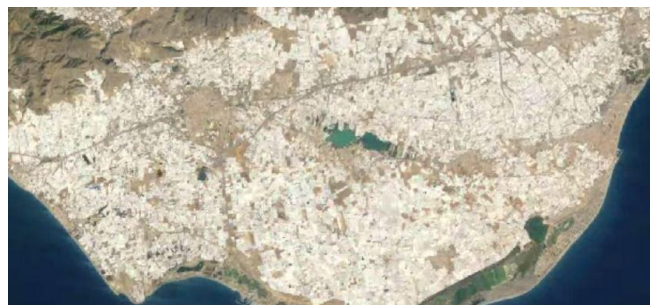
Un cop consolidats, aquests *films* han tingut una funció que ha revolucionat l'antiga concepció de les terres de cultiu: han fet possible que una zona desèrtica i aparentment improductiva es converteixi en un terreny que aporta aliments i beneficis econòmics.

Un exemple molt clar i recent és el de la província d'Almeria, al sud d'Espanya. Abans era coneguda pels seus deserts i servia de zona de rodatge per les pel·lícules "western" caracteritzades per extenses terres àrides. Actualment, la situació ha canviat completament i hi ha una gran concentració d'hivernacles convertint-se així en un model de desenvolupament agrari a nivell mundial.

Fig. 1.1: Evolució de la zona d'El Ejido, a Almeria en 28 anys¹



1984



2012

¹ Imatges satèl·lit extretes de Google Earth Engine

Des de llavors, els plàstics han experimentat una expansió geogràfica significativa i han deixat el vidre en un segon pla ja que és emprat majoritàriament com a material que garanteix un tancament o aïllament total.

L'any 2012, es va enregistrar una producció de plàstics mundial de 256 milions de tones distribuïda en diferents països segons el diagrama de sectors següent:

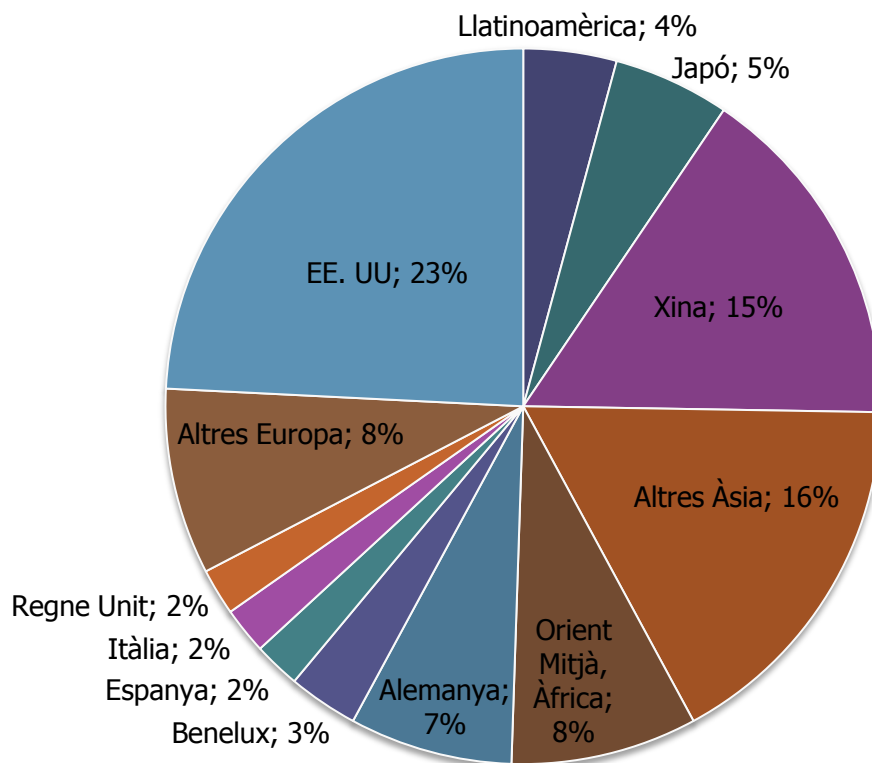


Fig. 1.2: Producció mundial de plàstics per país o regió²

² Mónica CONDE, *Presente Futuro de la Industria del Plástico* (2012)

Segons un balanç publicat l'Octubre de 2013 per PlasticsEurope³, les aplicacions amb fins agraris representen un 4,20% de la demanda total de plàstics a nivell europeu.

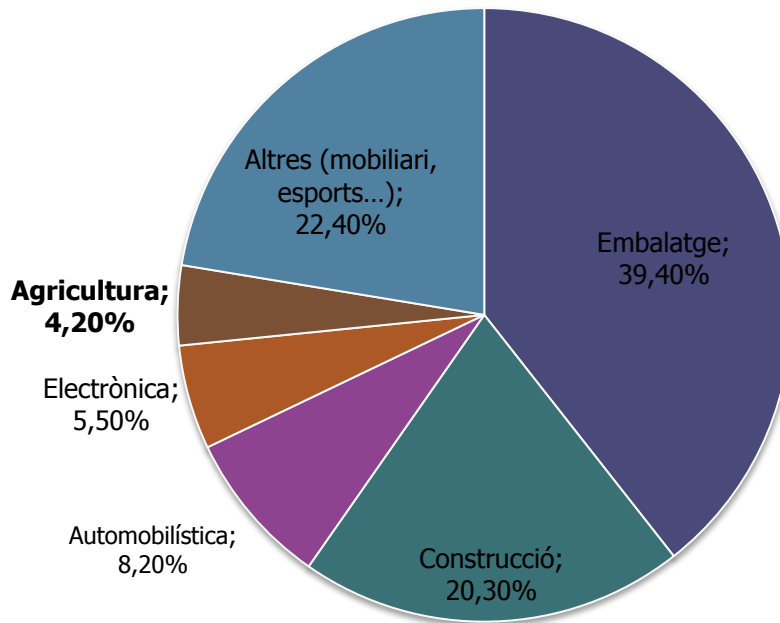


Fig.1.3: Demanda europea de plàstics l'any 2012 respecte un total de 45.9 milions de tones

A Espanya, l'any 2012 un 5,80% de la producció de plàstic era destinada al camp de l'agricultura.⁴

A més a més, són presents en gairebé tots els àmbits de l'agricultura i l'horticultura ja que la varietat de productes és enorme.

³ Plastics – The Facts 2013 (2013)

⁴ Dades facilitades per l'associació europea PlasticsEurope

1.2.2 Principals aplicacions

Quan parlem dels usos d'aquests polímers no ens referim només a la coberta d'estructures com serien els microtúnels o els macrotúnels. És a dir, no estan limitats a un únic període del desenvolupament de la planta.

Així, podem trobar-ne durant el cultiu, com els sistemes de reg o bé com a pas previ a la seva comercialització, que seria el cas de l'embalatge.

Dins la diversitat de productes i finalitats, en destaquen dues per la seva presència arreu del món: els hivernacles i el *mulching*.

1.2.2.1 Hivernacles

La gran majoria de la producció de plàstics agrícoles, és destinada a formar estructures cobertes per *films* conegudes com hivernacles. Entre d'altres, la seva finalitat és la d'allargar la temporada de cultiu ja que si fos a l'aire lliure es veuria condicionada i limitada pels fenòmens meteorològics.

A nivell de situació geogràfica, estan concentrats en dues zones: el 80% es troba a l'Orient Llunyà on destaquen la Xina, el Japó i Corea i un 15% és a la zona mediterrània.

Enrique Espí⁵, expert que es dedica sobretot a desenvolupar projectes relacionats amb plàstics per usos agraris a l'empresa petroquímica Repsol YPF, publica l'any 2006 un article on constata que l'àrea coberta d'hivernacles ha anat augmentant a una mesura d'un 20% cada any durant l'última dècada. Aquest creixement és remarcable al continent africà i a l'Orient Mitjà.

L'exemple més eminent és el de la Xina que ha crescut de 4.200 hectàrees l'any 1981 a unes 1,250 milions enregistrades l'any 2002. Això significa una crescuda d'un 30% per any. Així, si exclouem aquest país, la superfície mundial coberta per hivernacles es pot calcular de 350.000ha.

També destaca la província d'Almeria per la seva gran concentració d'hivernacles situant-se així en la primera posició a nivell mundial. Això suposa un creixement econòmic important. Durant la campanya de l'any 1975 es van aconseguir 57 milions d'euros una xifra sobrepassada pels 1.443 milions registrats en la campanya 2006-2007.

Això significa una producció total de 2.841 milions de tones, 1.512 milions de les quals es van exportar principalment a la Unió Europea.

Dins la distribució del terreny, trobem unes 53.800 hectàrees, que equivalen al 88% de la superfície, dedicades al cultiu d'hortalisses (tomata, pebrot,

⁵ Enrique ESPÍ et al., *Plastic films for agricultural applications* (2006)

cogombre, mongeta verda, maduixa, meló, síndria, albergínia, carabassó i enciam, en ordre descendent d'importància). La producció de flors, principalment clavells i roses, i la de plantes ornamentals ocupa el 5% de l'àrea coberta. El plàtan és el principal cultiu en arbres sota plàstics i ocupa la resta de la superfície.

Aquest sector dóna treball de manera directa a 45.100 persones de la província d'Almeria dins les quals 21.300 són estrangeres.

De manera global, el volum total de plàstics destinats a la producció d'hivernacles és d'un milió de tones l'any.

1.2.2.2 Mulching

El *mulching* és la segona aplicació més important dels plàstics per ús agrari després de la mencionada en l'apartat anterior. Consisteix en posar un *film* prim de plàstic directament sobre el terra o les plantes en els primers estadis de creixement.

D'aquesta manera es pot modificar l'entorn al qual es veuen sotmesos els vegetals.

Gràcies al seu efecte aïllant, ajuda a millorar la qualitat i la quantitat de les collites.

L'any 1999, es van enregistrar més de 30 milions d'acres, que equivalen a unes 12 milions d'hectàrees, de terrenys agraris arreu del món coberts de *mulch*.

Des de llavors, el seu ús continua sent important i ha augmentat considerablement.

1.2.2.2.1 Valoració

A continuació, es mostraran els avantatges i els desavantatges de l'ús de *mulch* en els conreus tot fent una valoració de la influència que té sobre les plantes i sòls.

Els *mulch* influeixen **positivament** sobre el terreny i els cultius en els següents aspectes:

- Actuen com una barrera física que ajuda a mantenir unes condicions de temperatura i humitat del sòl determinades
- Optimitza els recursos hídrics perquè redueix l'evaporació de l'aigua del sòl i, per tant, la seva dessecació
- Impedeix el creixement de les males herbes ja que evita que la radiació lluminosa fotosintèticament activa penetri sota el plàstic. Això afavoreix un cultiu més ecològic perquè redueix l'ús d'herbicides
- Redueix determinades plagues d'insectes
- Garanteix una eficient absorció dels nutrients presents en els fertilitzants. D'aquesta manera, aquests no són enduts per l'aigua de la pluja i no s'evaporen per l'acció del sol
- Conserva l'estructura del sòl i així n'evita l'erosió
- Millora la gestió de l'aigua, un aspecte important en àrees amb recursos hídrics limitats, i aporta l'aigua de les precipitacions de manera gradual a mesura que va passant pels porus. Això és important perquè no s'inundi el sòl
- Protegeix les collites de la contaminació del sòl
- Millora l'aspecte i la qualitat dels fruits perquè evita que arribin a estar en contacte directe amb el terra
- L'augment de la temperatura a la zona de les arrels permet plantacions primerenques i, per consegüent, collites precoces. Per tant, és possible cultivar fora de temporada

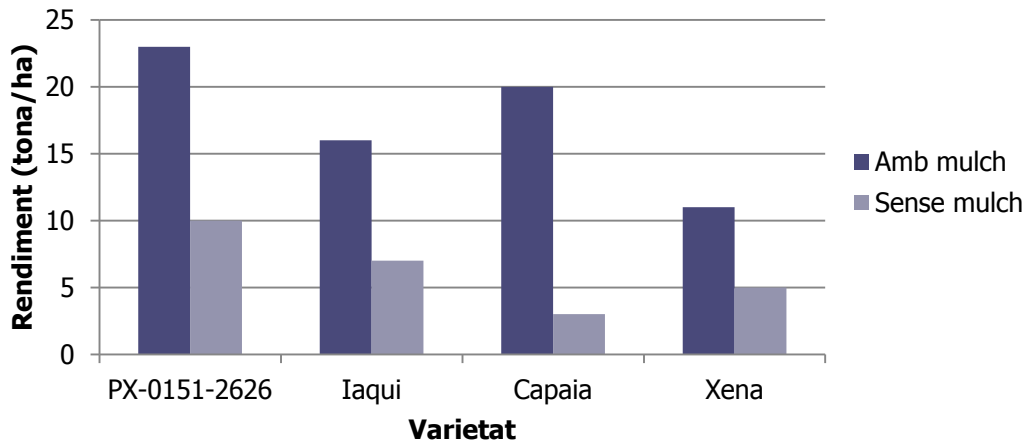


Fig. 1.4: Rendiment prematur de varietats de tomàquet cultivades amb i sense mulch⁶

D'altra banda, també cal destacar els efectes **no favorables** que comporta el fet de cobrir les plantacions amb aquets plàstics:

- Poden provocar un excés de la temperatura del sòl
- Perquè sigui efectiva, la seva retirada ha de ser manual
- El cost econòmic és elevat

El principal problema és el de l'eliminació d'aquests *films*.

Primerament, cal tenir en compte que si es volen retirar d'un camp extens, és necessari l'ús de maquinària. Ara bé, el procés és de cost elevat perquè retirar una hectàrea coberta de polietilè val entre 200 i 400€ i a més, el plàstic es pot trencar i deixar residus que persisteixen a la parcel·la.

A més a més, cal adonar-se del problema mediambiental que suposa la seva acumulació a llarg termini. Ja sigui la dels fragments trencats que resten en el terreny com la de les grans masses de plàstics quan deixen de ser útils. Sigui quina sigui la raó, si es conserven molt de temps en un espai determinat a l'aire lliure, acaben contaminant el sòl sobre el qual es troben. Cal recordar, que el plàstic és un dels materials que triga més a degradar-se i per això es recomana un reciclatge correcte.

L'horticultora **Sarah Limpus**, del Departament d'Agricultura del Govern de Queensland (Austràlia), afirma que quan l'encoixinat de polietilè deixa de tenir utilitat, comporta un problema pels cultivadors i un greu problema mediambiental.

"L'eliminació dels *mulch* està esdevenint insostenible a Austràlia on s'estan prenent mesures governamentals que rebutgen, restringeixen o apugen els costos per manejar els residus" diu ella.

⁶ Jesus MARTÍNEZ, *Acolchado en hortalizas*.

En definitiva, ecològicament parlant, els *mulch* són un impacte. Cada any, se n'utilitza un milió de tones internacionalment que s'acumulen a conseqüència d'una eliminació inadequada.

Per exemple, els pagesos no duen els plàstics usats a les deixalleries adequades perquè es requereix que estiguin nets i sense rastre de terra. Això suposa una despesa econòmica, energètica (perquè cal aigua) i de mà d'obra que duu als agricultors a acumular les restes en el seu terreny.



Fig. 1.5: Camps de cultiu del Segrià

1.2.2.2 Classificació

Actualment, podem trobar diversos tipus de *mulch* al mercat. El criteri seguit per fer-ne la distinció es basa en les seves propietats i en la seva coloració.

En general, el més utilitzat és el de polietilè negre però també en podem trobar d'altres.

La taula adjuntada a continuació mostra el grau d'eficàcia dels *films* en funció del pigment present en la seva composició:

	Absorció radiacions	Temperatura del sòl		Control	
		Capacitat d'escalfar	Capacitat de refredar	Males herbes	Plagues
Natural		Alta		Baix	
Negre	Alta	Alta		Excel·lent	
Plata	Alta				Alt
Blanc i negre	Alta		Alta	Alt	Alt
Plata i negre	Alta		Alta	Excel·lent	Alt

Fig. 1.6: Propietats de diferents tipus d'encoixinats

És molt freqüent trobar una combinació de colors. Aquest seria el cas de l'última fila de la Figura 1.6 on es combina el color alumini amb el negre. A la part exterior trobaríem el platejat, que protegeix les plàntules d'atacs vírics i garanteix una activitat fotosintètica màxima perquè millora la difusió dels rajos solars cap a totes les fulles, i la part interna de color negre controla el creixement de les males herbes.

1.3 Mulch biodegradables: l'alternativa

Tal i com es menciona en l'apartat anterior, la gestió inadequada dels residus plàstics és un problema en augment.

Per tal de frenar aquest impacte, s'ha dut a terme una sèrie d'estudis a finals del segle XX en què es proposava la substitució del plàstic tradicional per un de biodegradable amb la finalitat de reduir la contaminació.

Els plàstics biodegradables són aquells que són susceptibles a ser degradats pels microorganismes com poden ser bacteris o altres agents biològics.

Una vegada conclosa la vida del plàstic, els productes finals obtinguts són aigua, diòxid de carboni, metà i eventualment residus no tòxics pel medi ambient.

Per tant, el material es desintegra i només cal llaurar el terreny perquè les restes desapareguin.

Des d'una perspectiva ecològica, la millor manera de desfer-se d'un material no és ni el reciclatge ni la reutilització. L'opció més respectiva amb el medi ambient és la reducció. Aquesta és la que es vol aconseguir amb aquest plàstics degradables.

Els primers plàstics biodegradables estaven fets per materials provinents d'Itàlia fabricats a partir de productes naturals. Per exemple, de midó de blat de moro.

Actualment, no tenen una composició 100% natural. Sinó que tenen una part natural i una de sintètica perquè s'hi han afegit uns additius.

La primera part es pot obtenir a partir de resines naturals o sintètiques:

- Resines naturals o biopolímers. La seva base són recursos renovables com el midó i la cel·lulosa. A més, també poden provenir de proteïnes i pectines, polímers de l'àcid làctic que prové de la fermentació.
- Polímers sintètics. Tenen l'origen en el petroli i altres productes que inclouen polímers de polièster i polietilè.

Per tal d'unir les cadenes de carbonis que són la base dels plàstics, és essencial el paper dels compostos.

Els compostos químics més habituals són:

- **Àcid adípic** ($C_6H_{10}O_4$)
- **Àcid succínic** ($C_4H_6O_4$)
- 1,4 –Butandiol ($C_4H_{10}O_2$)
- 1,6 Hexandiol ($C_6H_{14}O_2$)
- Àcid azelaic ($C_9H_{16}O_4$)
- Àcid sebàcic ($C_{10}H_{18}O_4$)
- Àcid tereftàlic (C_8H_6O)
- Àcid làctic ($C_3H_6O_3$)

La quantitat exacta d'aquests compostos present en els plàstics és desconeguda ja que no s'especifica en el producte comercial.

La matèria primera Mater-Bi que procedeix del midó del blat de moro i altres olis vegetals, és la base de la majoria dels *films* biodegradables.

A més a més d'aquesta base, s'hi poden afegir additius per modificar altres factors, com el color de l'encoixinat.

Des d'un punt de vista econòmic, aquests films són aproximadament de dues a tres vegades més cars que els de polietilè convencionals. De mitjana, i sense incloure les taxes d'enviament, cada acre de terra que es vol cobrir amb mulch biodegradable val uns \$550 mentre que el tradicional en val uns 220. Ara bé, s'ha de tenir en compte que a l'últim cas, s'hi ha d'afegir els costos per retirar els plàstics del camp.

Tenen l'avantatge que per la seva aplicació es pot utilitzar la mateixa maquinària que pels plàstics normals, ja que encara que presentin unes propietats mecàniques inferiors a les del polietilè, són suficientment resistents.

S'ha de tenir en compte que hi ha alguns aspectes en què són més dèbils. No només la seva composició química sinó també factors com:

- Les condicions ambientals i els paràmetres climàtics com les precipitacions, la temperatura o la radiació dels rajos ultraviolats. Per tant, és important l'època de cultiu perquè aquests paràmetres varien segons les estacions de l'any
- Condicions d'emmagatzematge, és a dir, abans d'aplicar-se al camp
- Espessor i color del producte
- Presència d'éssers vius que poden degradar la matèria abans del temps desitjat
- El contacte amb el terra és important perquè com més elevat sigui, més ràpida és la descomposició. Posem per cas, els cultius de pebrot o albergínia estan elevats del sòl. El cas contrari seria el de les maduixes.

Els *mulch* biodegradables fan les mateixes funcions que els tradicionals i no alteren el producte pel que fa a la quantitat i a la qualitat. Si observem els residus restats en finalitzar el cultiu, veiem que la part que ha quedat enterrada es descompon i la resta és fàcil de retirar.

Les idees aportades en aquest apartat coincideixen amb les conclusions d'un estudi liderat pel professor Mathieu Ngouajio del Departament d'Horticultura de la Universitat de Michigan realitzat l'any 2009 que demostra que els *mulch* biodegradables presenten les següents millores respecte els tradicionals:

- Es degraden completament al terreny
- Suporten la pressió de ser aplicats als camps mitjançant màquines

En addició, Sarah Limpus confirma: "Després d'un procés d'activitat microbiana, l'alternativa ecològica es degrada completament en aigua, carboni i biomassa".

Tot producte comercial, ha de complir els requisits establerts en el document oficial de la Norma Europea EN 13432⁷ del Setembre de l'any 2000. En l'apartat sobre els envasos i embalatge perquè aquests siguin acceptats i es puguin llençar al mercat.

Per que un envasat o embalatge sigui acceptat i pugui llançar-se al mercat, s'ha de fer un estudi sobre els seus efectes ecotòxics.

La norma estableix: "Es considera adequat qualsevol substrat si permet la germinació normal de les llavors i el creixement de la planta".

⁷ UNE-EN 13432 és la versió espanyola oficial de la Norma Europea EN 13432

1.4 Estudi previ

L'any 2003 Anu Kapanen, Olli Venelampi, Minna Vikman i Merja Itävaara van dur a terme un estudi titulat "Testing the ecotoxicity of biodegradable plastics".

El seu objectiu principal era mostrar que no es pot comercialitzar cap producte que alliberi substàncies nocives al medi ambient durant la seva degradació.

Els materials biodegradables emprats en l'agricultura passen directament al sòl. En canvi, els que s'utilitzen per altres aplicacions com l'embalatge, sofreixen un procés de compostatge abans de ser introduïts al medi ambient en forma de fertilitzant.

Per evitar l'acumulació de substàncies perjudicials, els materials biodegradables i els seus additius han de ser avaluats juntament amb la seva toxicitat.

Les mostres que es van escollir per realitzar aquest experiment provenien de plantes de compostatge municipals i es van classificar en funció del temps transcorregut des de l'inici de la degradació (menys de tres mesos, entre tres i sis mesos i més de sis mesos).

Aquest procés es va dur a terme en un entorn amb una temperatura constant de 58°C en el qual es mesurava la quantitat de CO₂ resultant per saber en quin punt del procés de degradació es trobava el compost.

Els resultats obtinguts van permetre concloure que els compostos immadurs, és a dir, de menys de tres mesos de compostatge, eren tòxics a diferència dels de més de sis mesos.

També afegeix: "Quan la degradació assoleix el 50%, que equival a 33 dies, és el moment en què el nivell de toxicitat és més elevat i augmenta a mesura que el procés prossegueix".⁸

A més a més, els efectes es podien observar a simple vista.

D'aquesta manera es va poder demostrar la rellevància d'avaluar l'ecotoxicitat de productes biodegradables fabricats a gran escala per tal de confirmar-ne la seva sostenibilitat i assegurar que no suposen un impacte mediambiental.

⁸ Anu KAPANEN et al., *Testing the Ecotoxicity of Biodegradable Plastics* (2003)

2. Marc pràctic

2.1 Hipòtesi

Els compostos presents en els encoixinats biodegradables poden tenir conseqüències negatives en el desenvolupament de la planta.

2.2 Variables

La **variable independent** d'aquest experiment és la concentració del compost. Aquesta és de 5, 50 o 500 mg/L de medi de cultiu.

Les **variables dependents** són:

- Període de germinació
- Pes sec final de la plàntula
- pH final del medi
- Concentració de clorofil·la final
- Prolina com a indicador d'estrès
- Aspectes visuals com el color de les fulles i l'aspecte general de la plàntula

2.3 Introducció

Per tal de demostrar la hipòtesi plantejada hem de conduir un experiment en què la variable independent sigui la concentració d'àcid adípic o àcid succínic present en els *mulch* biodegradables.

Primerament, prepararem els tubs necessaris per cada tractament amb una concentració de compost diferent entre si i els farem una esterilització superficial.

A continuació, cultivarem les llavors i les deixarem créixer en una càmera d'incubació.

A mesura que va transcórrer el temps, prendrem dades tant quantitatives com qualitatives, i farem fotografies per estudiar l'evolució de la planta.

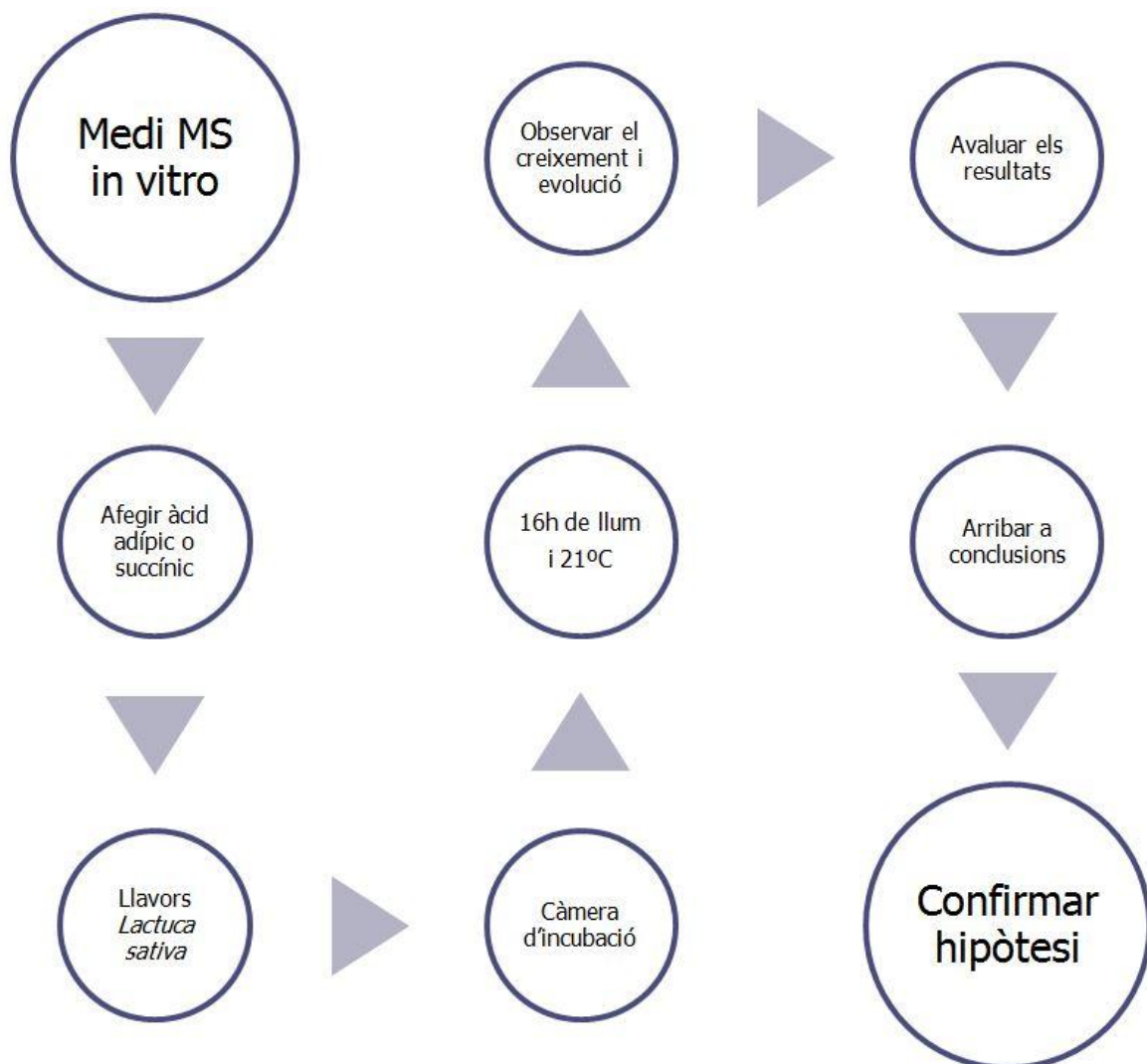
Finalment, elaborarem els resultats i arribarem a unes conclusions determinades que confirmaran o no la hipòtesi.

Tots els protocols seguits, es poden consultar a l'apartat d'Annexos del treball.

Els **objectius específics** que es volen complir amb la realització d'aquest experiment són dos.

El primer, és dissenyar un bioassaig mitjançant cultiu *in vitro* que permeti fer un seguiment precís i prolongat. Així podrem estudiar com determinats compostos presents als encoixinats poden afectar el desenvolupament de les plantes i especialment a aquelles espècies que es cultiven habitualment amb plàstics.

El segon, és analitzar i determinar l'efecte de dos compostos presents habitualment en *mulch* biodegradable, concretament àcid adípic i àcid succínic, en enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) a partir de l'assaig prèviament dissenyat.



2.4 Desenvolupament de l'experiment

En primer lloc, prepararem uns 20 tubs de cultiu amb medi Murashige i Skoog (1962), que és el més comú per fer cultius in vitro i ens servirà com a control. Seguirem el protocol establert⁹ per realitzar tots els medis.

Després, prepararem 60 tubs de cultiu més que equivalen a 20 tubs per concentració de cada compost. És a dir, 20 tubs amb 5mg/L de compost, 20 tubs amb 50mg/L i 20 més amb 500mg/L. Ara bé, per tal d'esterilitzar el medi de cultiu, s'ha de posar a l'autoclau i escalfar-lo a alta pressió i durant un cert temps.



Fig. 2.1: Autoclau

Aquest pas no es pot fer amb els compostos a analitzar perquè no consta que suportin altes temperatures. És per això que, un cop preparades les dissolucions amb la concentració d'àcid corresponent, haurem de treballar dins la cabina de flux laminar, que és un espai amb condicions estèrils, on podrem introduir els compostos als medis corresponents sense que hi hagi risc de contaminació. Aquest procés el farem amb una xeringa i un filtre estèril especial per petites quantitats de líquids i abans que el medi se solidifiqui.

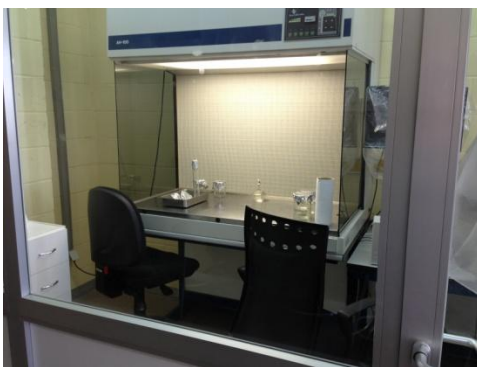


Fig. 2.2: Cabina de flux laminar



Fig. 2.3: Xeringa i filtre

⁹ Protocol adjunt a l'apartat Annexos

Un aspecte important pel que fa al medi de cultiu és que el seu pH ha de ser d'entre 5,7 i 5,8 ja que és el pH òptim per què l'absorció dels elements minerals sigui superior. Per defecte, aquest descendeix a 5,27 després de passar per l'autoclau. Però si mesurem el pH un cop afegit el compost observem que aquest s'ha vist modificat. Concretament les variacions en comparació amb el control són les següents (Taula 1).

Taula 1: Variació del pH en funció de la concentració del compost

	Control	Àcid adípic			Àcid succínic		
		5 mg/L	50 mg/L	500 mg/L	5 mg/L	50 mg/L	500 mg/L
pH inicial	5,70						
pH després d'autoclavar	5,27	5,18	4,38	3,85	5,03	4,32	3,70
Diferència*	0	0,09	0,89	1,42	0,24	0,95	1,57

* Diferència entre el control i el medi de cultiu amb àcid adípic o succínic en les concentracions respectives

Aquest és el primer problema que trobem. Per tal de corregir el pH, quan fem el medi no l'ajustarem a 5,7 sinó que ho farem a un valor més alt de manera que en afegir l'àcid corresponent, aquest descendirà a un valor comú en tots els tractaments que és 5,2.

El càlcul realitzat és la suma del pH inicial (5,70) amb la diferència entre el pH del control (5,27) i el pH després d'autoclavar (aquesta diferència correspon a les dades de l'última fila de la Taula 1). Així, sabem el valor que haurà d'indicar el pH-metre abans d'introduir l'àcid al medi de cultiu. Aquests valors són:

Taula 2: pH al qual ajustarem els medis de cultiu de manera que es corregeixin al pH del control

	Control	Àcid adípic			Àcid succínic		
		5 mg/L	50 mg/L	500 mg/L	5 mg/L	50 mg/L	500 mg/L
pH	5,27	5,79	6,59	7,12	5,94	6,65	7,27

Després d'aquesta modificació, tornem a mesurar el pH per veure si els resultats són els desitjats. Efectivament, el pH del medi amb presència de compost és de 5,27 a excepció dels tubs amb una concentració de 500mg/L. Farem de nou un estudi per determinar la quantitat de dissolució de sosa càustica (NaOH) 1N que hem d'afegir perquè el pH es corregeixi com és esperat.¹⁰

A causa d'aquesta alteració, decidim afegir tres tractaments més per cada àcid a l'experiment. En aquests, no es corregirà el pH com es mostra en la Taula 2 sinó que es deixarà que descendeixi. Per tant, els valors d'aquests nous tractaments seran els de la Taula 1. Això ho fem per determinar si els resultats obtinguts són deguts a la presència de compostos *per se* o a l'efecte combinat que pugui tenir el compost i el descens del pH en el medi de cultiu provocat per la seva presència.

D'aquesta manera, el nombre total de tractaments per cadascun dels compostos és de 7:

- Control
- Concentració 5mg/L, pH corregit
- Concentració 50mg/L, pH corregit
- Concentració 500mg/L, pH corregit
- Concentració 5mg/L, pH no corregit
- Concentració 50mg/L, pH no corregit
- Concentració 500mg/L, pH no corregit

Es va atribuir un nom a cada tractament perquè a l'hora de presentar els resultats es poguessin identificar fàcilment. Aquests són:

Taula 3: Nomenclatura emprada per referir-se als diferents tractaments

Control		Àcid adípic	Àcid succínic
		TØ	T0
pH ajustat	[5]	TA	T1
	[50]	TB	T2
	[500]	TC	T3
pH no ajustat	[5]	TD	T4
	[50]	TE	T5
	[500]	TF	T6

¹⁰ Per tal de corregir el pH dels medis de cultiu amb 500ppm d'àcid adípic i succínic afegim:

- Àcid adípic: 15,5 gotes de NaOH 1N
- Àcid succínic: 2,5mL de NaOH 0,1N abans d'autoclavar i 8 gotes de HCl 0,1 N en veure després d'autoclavar que el pH era massa àcid

Finalment, el pH dels diferents medis de cultiu en el moment en què es van cultivar les llavors era:

Taula 4: pH del medi amb presència d'àcid adípic i succínic, respectivament, en el moment del cultiu

Àcid adípic		Àcid succínic	
TØ	5,270	T0	5,270
TA	5,224	T1	5,247
TB	5,189	T2	5,000
TC	5,203	T3	5,244
TD	5,178	T4	5,033
TE	4,390	T5	4,319
TF	3,760	T6	3,704

Una vegada hem obtingut els 14 medis distribuïts en un total de 280 tubs de cultiu, procedim a cultivar.

Primer de tot, distribuïm els tubs en gradetes identificades amb la data de cultiu i el tractament corresponent. A més a més, numerem els tubs per poder fer un seguiment més precís.

A continuació, preparam tot el material que necessitem i seguim les instruccions del protocol i les mesures de seguretat¹¹.

Comencem amb el cultiu a la cabina de flux laminar introduint dues llavors d'enciam de l'espècie *Lactuca sativa* cultivar Trocadero i prèviament esterilitzades amb hipoclorit sòdic¹², a cada tub.

Decidim cultivar llavors d'enciam perquè és un vegetal que es cultiva molt freqüentment amb encoixinats i, a més, en assajos anteriors ha demostrat tenir una alta sensibilitat. En canvi, altres espècies amb les quals es fan assajos d'ecotoxicitat, com el blat de moro, són molt més robustes i han demostrat poca sensibilitat a determinats compostos.

Un cop finalitzat el cultiu, duem les gradetes a la càmera d'incubació on hi ha les condicions adequades perquè creixin i es desenvolupin.

^{11 i 12} Documents adjunts a l'apartat Annexos

Per tal de garantir uns bons resultats, s'han mantingut constants una sèrie de paràmetres que són homogenis en el sistema d'assaig. Aquests són:

- Temperatura constant: 21°C
- Fotoperíode: 16 hores de llum / 8 hores de foscor
- Il·luminació: aportada per fluorescents "Gro-Lux"¹³
- Nutrients aportats (presentes en el medi de cultiu)
- Espècie de les llavors: *Lactuca sativa* cv. Trocadero

2.5 El medi de cultiu

El medi utilitzat pel cultiu de la planta està format per diversos components: sals, vitamines, aminoàcids, sucres, reguladors del creixement, agar o gelatina sintètica com "Gelrite" i aigua. Aquests components realitzen una o més funcions en el creixement *in vitro* de la planta.

Existeixen diversos medis de cultiu que es diferencien per les quantitats d'elements minerals, vitamines, sucres, etc. presents en la seva composició.

Els elements minerals se solen classificar en macro-nutrients i micro-nutrients en funció de les necessitats de la planta per realitzar les funcions corresponents (Taules 5 i 6).

¹³ Els fluorescents "Gro-Lux" són especialment indicats pel cultiu *in vitro* de vegetals perquè tenen una major quantitat de llum blava i vermella de longitud d'ona.

Taula 5: Macro-nutrients presents en el medi de cultiu i les seves funcions¹⁴

Element	Localització	Funció
Calci (Ca)	Paret cel·lular	Aporta resistència Per exemple, a infeccions de fongs
	Membrana plasmàtica	Dóna estabilitat. Sense calci, es desintegraria
	Citosol	És cofactor de reaccions enzimàtiques
Fòsfor (P)	Àcids nucleics	És essencial pel DNA i RNA perquè forma part de la seva estructura
	Bicapa lipídica	Està formada per fosfolípids i estabilitza la membrana
	Metabolisme energètic	Aporta energia a la planta amb les molècules d'ATP
Potassi (K)	Cloroplast	Regula el balanç iònic i el pH. Participa en la fotosíntesi
Magnesi (Mg)	Cloroplast	Els centres del fotosistema I i II (P700 i P680) tenen magnesi. Per tant, participa en la fotosíntesi
	Citosol	És cofactor de reaccions enzimàtiques
Nitrogen (N)	Citosol	Osmoregulació
	Citosol	És un element indispensable per la síntesi de proteïnes
Sofre (S)	Citosol	Síntesi proteïnes i clorofil·la

¹⁴ Dades sintetitzades de Duchefa Biochemie B.V., Catalogue 2010-2012

Taula 6: Micro-nutrients presents en el medi de cultiu i les seves funcions

Element	Localització	Funció
Bor (B)	Paret cel·lular	Participa en la lignificació ¹⁵
Clor (Cl)	Cloroplast	Participa en la fotòlisi de l'aigua al fotosistema II
	Fulles	Regula l'obertura i tancament dels estomes
	Vacúols	Regula el potencial osmòtic dels vacúols i s'encarrega dels processos relacionats amb la turgència
Ferro (Fe)	Citocroms, catalases i peroxidases	Es troba en la composició d'aquestes proteïnes que fan funcions importants, com el transport electrònic
	Cloroplasts	Contenen el 80% del ferro de la planta. S'encarrega de la biosíntesi de la clorofil·la.
Cobalt (Co)	Tilacoides dels cloroplasts	Funció desconeguda
Coure (Cu)	Cloroplasts	El 50% de coure que contenen està lligat amb la plastocianina, un citocrom que uneix el PS I amb el PS II Per tant, una manca de coure implica una reducció de l'activitat fotosintètica
	Mitocondri	Participa en la cadena de transport electrònic
Manganès (Mn)	Cloroplast	Participa en la fotòlisi de l'aigua al fotosistema II
	Citosol	És cofactor de reaccions enzimàtiques

¹⁵ Lignificació: Procés en què les parets cel·lulars de les cèl·lules vegetals acumulen lignina, un polímer que confereix duresa i resistència

2.6 Mesura de dades

En aquesta secció es mostrarà la manera en què es van mesurar les dades, és a dir, com es van obtenir els valors de les variables dependents.

2.6.1 Taxa de germinació

La germinació és l'emergència de la radícula¹⁶.

Seguint aquest criteri, es va fer la primera mesura tres dies després del cultiu.



Fig. 2.4: Fotografia de llavors germinades tres dies després del cultiu

2.6.2 Pes sec

Primerament, es van elaborar un total de 280 sobres de paper de plata.

Aquests petits sobres es van deixar a l'estufa per eliminar la possible humitat. Després, es van pesar en una bàscula i es va anotar la seva massa perquè ho necessitaríem per determinar el pes sec de la plàntula.

Un cop passades tres setmanes des del cultiu, es van extreure les plàntules dels tubs i es van introduir a cada sobre individualment, incloent la radícula i les fulles. Aquest procés es va repetir en un total de 10 tubs per tractament i, per tant, 20 mostres d'espècie vegetal.

Per tal que es deshidratessin, es van deixar a l'estufa durant un mínim de 24 hores. Passat aquest temps, es van pesar.

El càlcul realitzat per determinar els pesos secs de les plàntules és:

$$\text{Pes sec} = \text{pes sobre amb plàntula} - \text{pes sobre}$$



Fig. 2.5: Bàscula

¹⁶ Víctor LALLANA et al. (2002)

2.6.3 pH final del medi

Per mesurar el pH del medi de cultiu, primer hem d'extreure la plàntula amb l'ajuda d'unes pinces i després utilitzar un aparell que és el pH-metre.

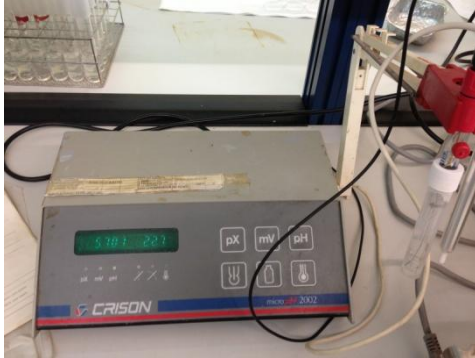


Fig. 2.6: pH-metre

2.6.4 Concentració de clorofil·la

Aquesta dada és donada en unitats SPAD per un aparell que rep el mateix nom.

A la part superior (**A**), en forma de pinça, és on es posa la fulla.

Com que mesura la concentració de clorofil·les, com més verda sigui la planta més alt serà el valor donat. Passarà el contrari quan les fulles són grogues.

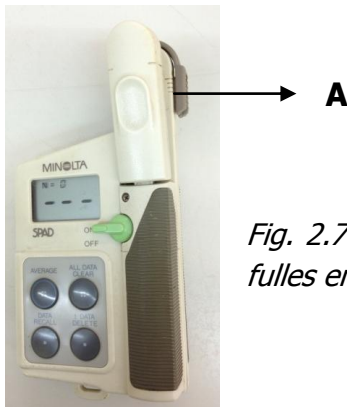


Fig. 2.7: Aparell per mesurar la quantitat de clorofil·les de les fulles en base de la seva coloració verda (SPAD)

Tots els aparells que es mostren en aquest apartat són del Departament d'Hortofructicultura de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària (UdL).

2.7 Resultats i discussió

A continuació es mostren els resultats obtinguts mitjançant les dades recollides. Les dades de pes sec, pH, SPAD i prolina es van agafar tres setmanes després del cultiu. La resta de dades s'han pres al llarg del temps de cultiu.

2.7.1 Taxa de germinació

Àcid adípic

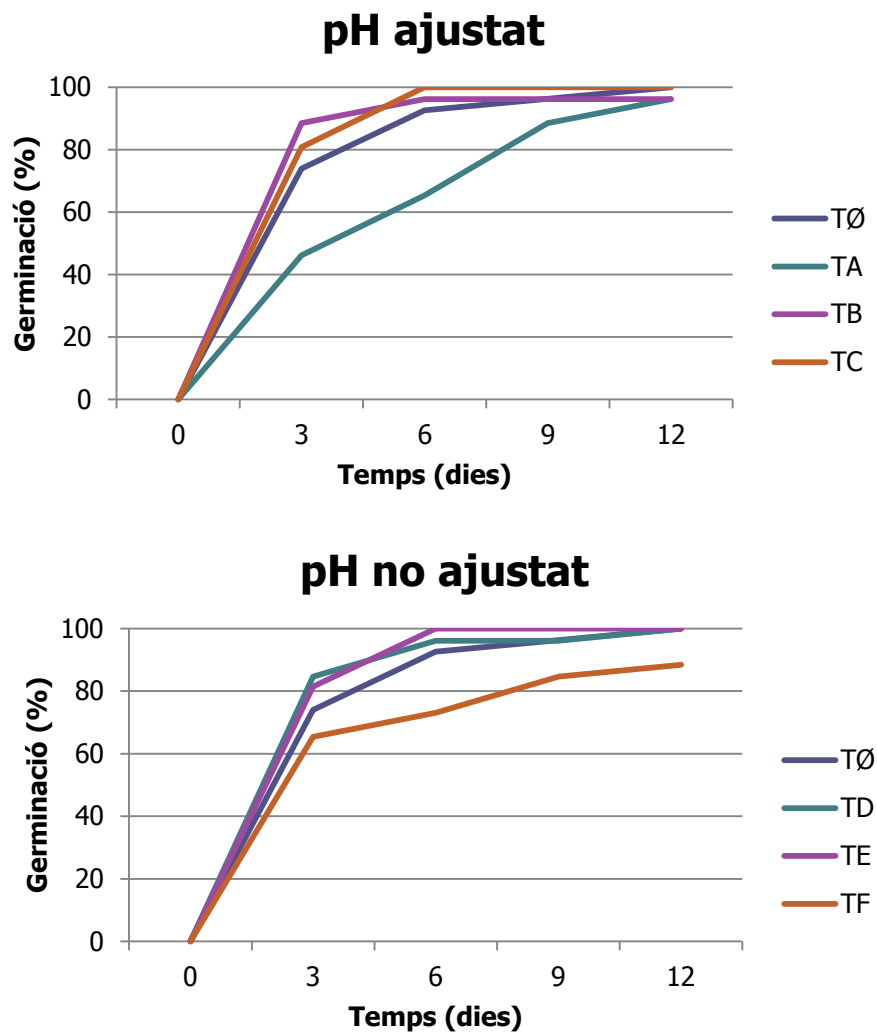


Figura 2.8: Evolució del percentatge de germinació de llavors d'enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) cultivades *in vitro* en diferents medis. Tractaments i concentració d'àcid adípic (mg/L): TØ = 0; TA i TD = 5; TB i TE = 50; TC i TF = 500

A partir d'aquestes gràfiques observem que el tractament més afectat és l'F en comparació amb la resta que pràcticament tenen un 100% de germinació passats 12 dies.

En finalitzar l'experiment, és a dir, al cap de 24 dies, encara hi havia llavors que no havien germinat cosa que ens permet afirmar que una alta concentració d'àcid adípic altera el creixement del vegetal.

Àcid succínic

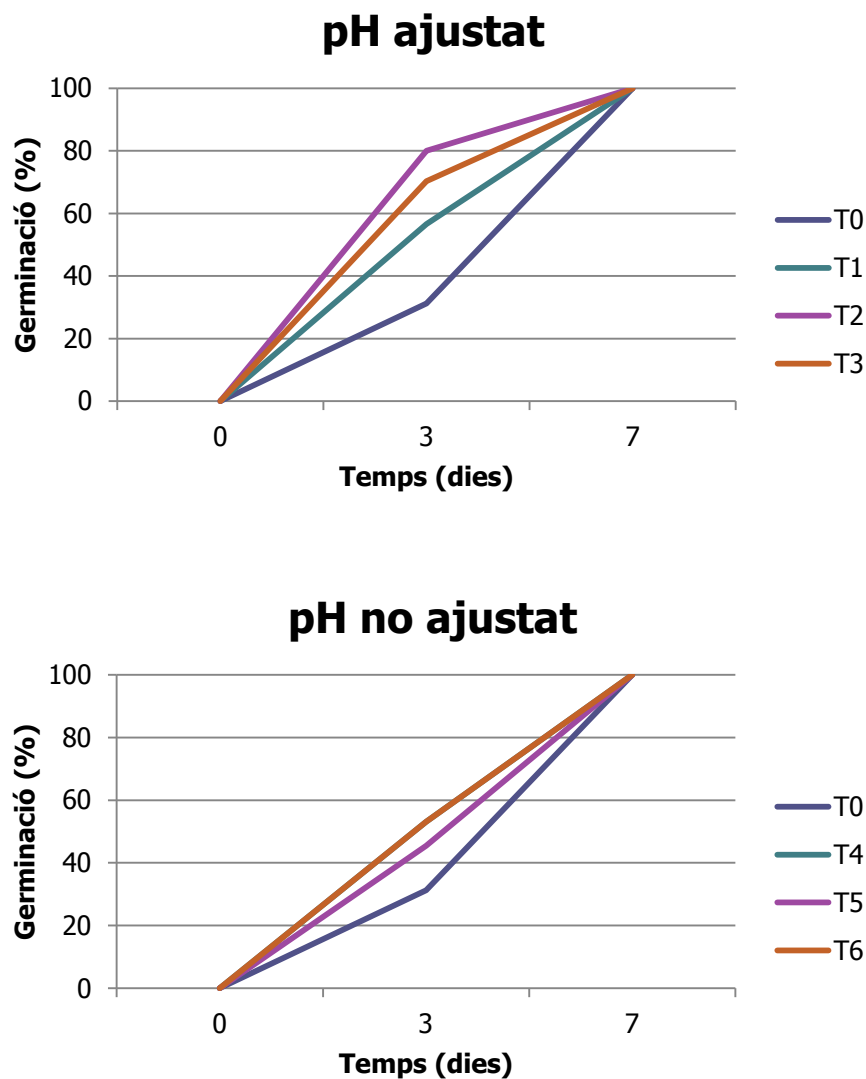


Figura 2.9: Evolució del percentatge de germinació de llavors d'enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) cultivades in vitro en diferents medis. Tractaments i concentració d'àcid succínic (mg/L): T0 = 0; T1 i T4 = 5; T2 i T5 = 50; T3 i T6 = 500

En el cas de l'àcid succínic, tots els tractaments assoleixen un 100% de germinació en una setmana.

2.7.2 Pes sec

Àcid adípic

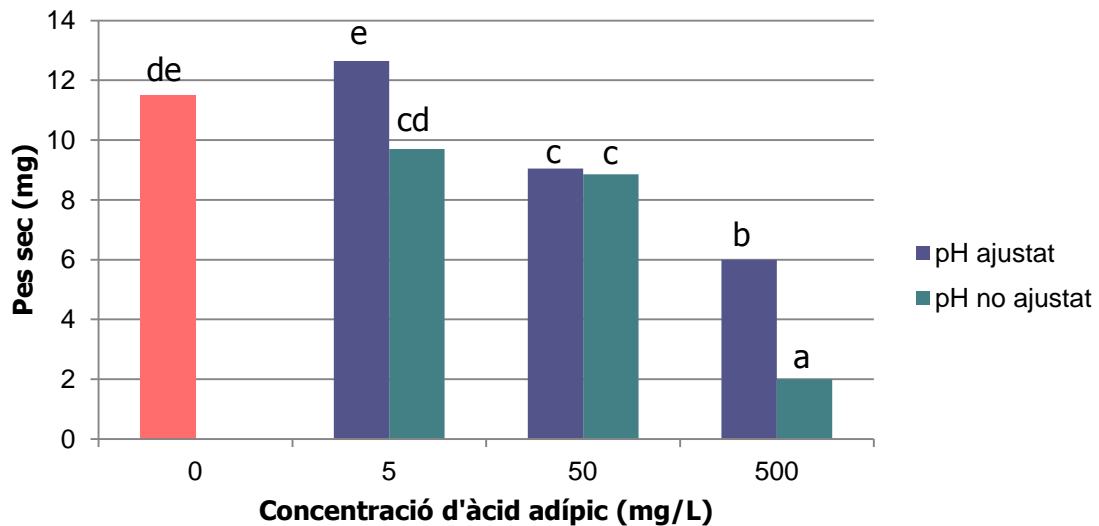


Fig. 2.10: Pes sec de plàntules d'enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) cultivades *in vitro* en diferents medis després de 24 dies. 0 mg/L d'àcid adípic fa referència al tractament control

Les plantes amb una concentració de 5 mg/L d'àcid adípic amb el pH ajustat creixen millor que la resta, inclús millor que el control.

Estadísticament parlant, si observem les dades que ens proporciona l'ANOVA (Anàlisi de Variància), no podem afirmar que totes les plàntules creixin menys que el control, encara que sí que veiem que aquells tractaments que no tenen el pH ajustat, experimenten menys desenvolupament que els que tenen la mateixa concentració que aquests últims però el pH ajustat.

En altres paraules, TD (5 mg/L i pH no ajustat) creix menys que TA (5 mg/L i pH ajustat) i el mateix passa amb els altres tractaments.

A mesura que augmentem la concentració, la quantitat de matèria orgànica és més baixa respecte el control però disminueix de manera molt més pronunciada en el tractament F (500 mg/L d'àcid adípic i pH sense ajustar). Tal i com s'observa a les imatges de les plantes (Fig. 2.21), no va créixer cap fulla en aquest últim tractament.

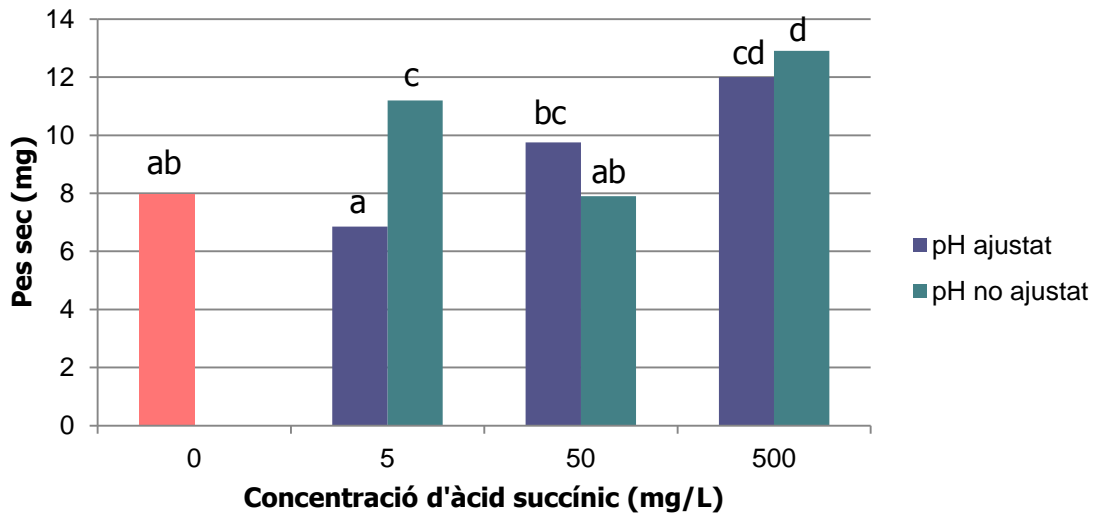
Àcid succínic

Fig. 2.11: Pes sec de plàntules d'enciam (Lactuca sativa cv. Trocadero) cultivades in vitro en diferents medis després de 21 dies. 0 mg/L d'àcid succínic fa referència al tractament control

En el cas dels tractaments amb el pH ajustat i 50 i 500 mg/L d'àcid succínic, l'augment del pes sec de les plàntules és proporcional al de la concentració. Les plàntules cultivades amb el pH sense ajustar, tenen totes un pes sec igual o superior al del tractament control independentment de la quantitat d'àcid succínic aportada.

Crida l'atenció que el pes sec d'aquestes plàntules generalment augmenta. Això és perquè l'àcid succínic forma part del metabolisme de la planta.

Si una planta té un compost de forma natural, també tindrà tota la maquinària metabòlica per fabricar-lo i per utilitzar-lo i formar altres compostos. És per això que la planta no detecta l'àcid succínic com una substància estranya sinó que l'aprofita i, per tant, el seu creixement és major que el del tractament control.

2.7.3 pH

Àcid adípic

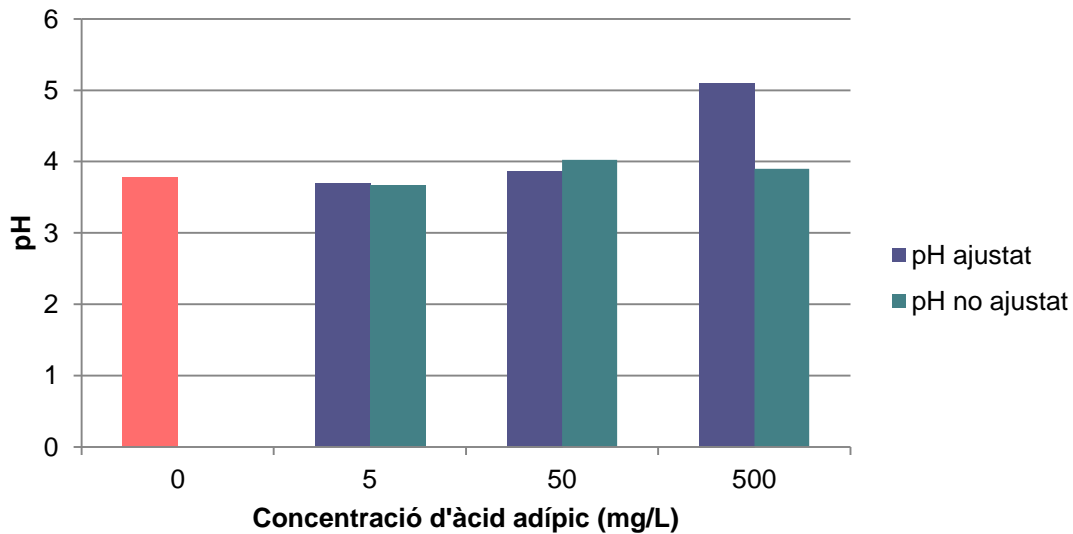


Figura 2.12: pH del medi de cultiu de plàntules d'enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) cultivades *in vitro* en diferents medis després de 24 dies. 0 mg/L d'àcid adípic fa referència al tractament control

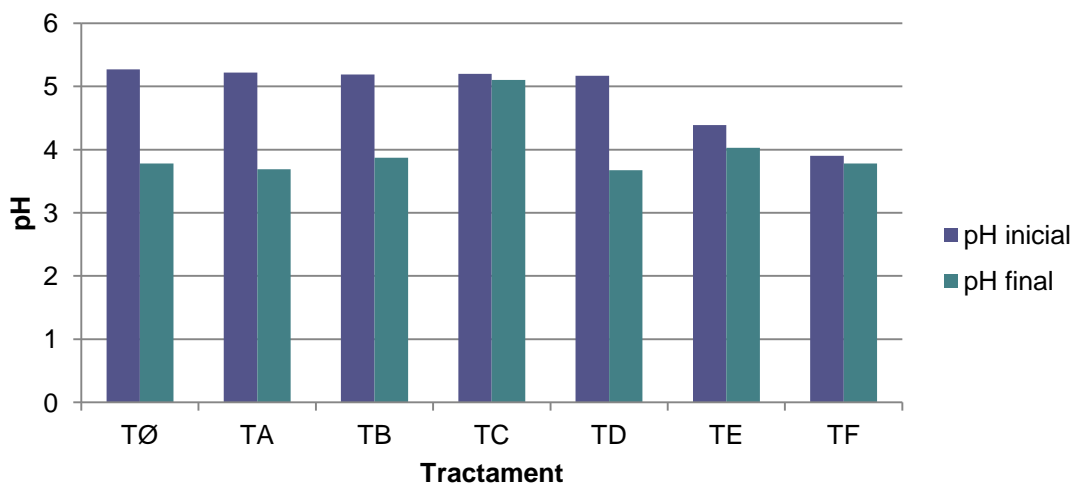


Figura 2.13: Comparació del pH del medi dels diferents tractaments en el moment del cultiu (pH inicial) i al final de l'experiment (pH final). Tractaments i concentració d'àcid adípic (mg/L): pH ajustat: TØ = 0; TA = 5; TB = 50; TC = 500. pH no ajustat: TD = 5; TE = 50; TF = 500

De manera natural, el pH disminueix quan la planta absorbeix nutrients del medi de cultiu. Per tant, un descens del pH més alt significa un major creixement de la planta.

El tractament F (500 mg/L d'àcid adípic i pH sense ajustar) manté el pH pràcticament constant perquè la plàntula no s'ha desenvolupat com la resta.

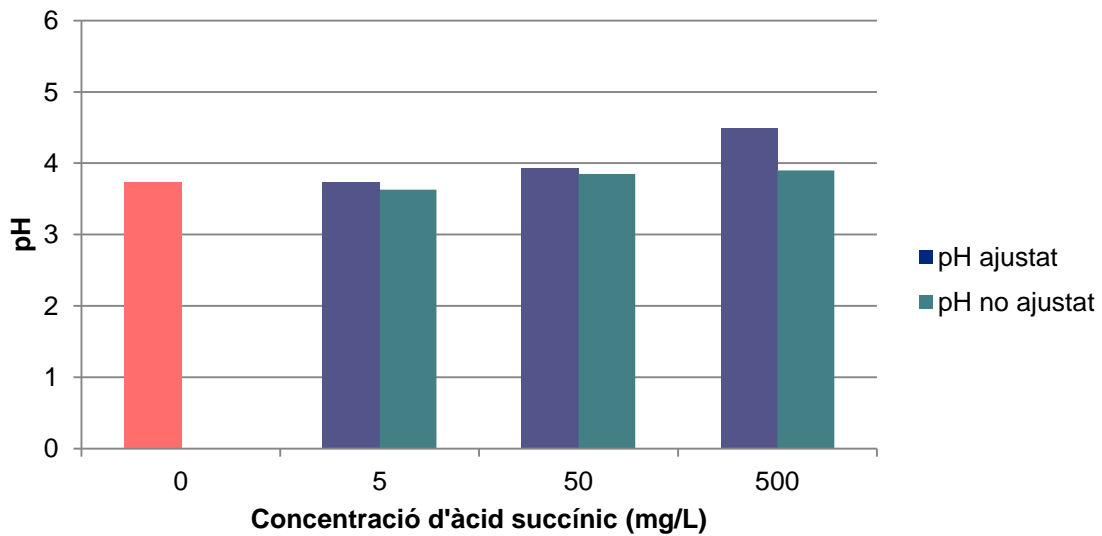
Àcid succínic

Figura 2.14: pH del medi de cultiu de plàntules d'enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) cultivades *in vitro* en diferents medis després de 21 dies. 0 mg/L d'àcid succínic fa referència al tractament control

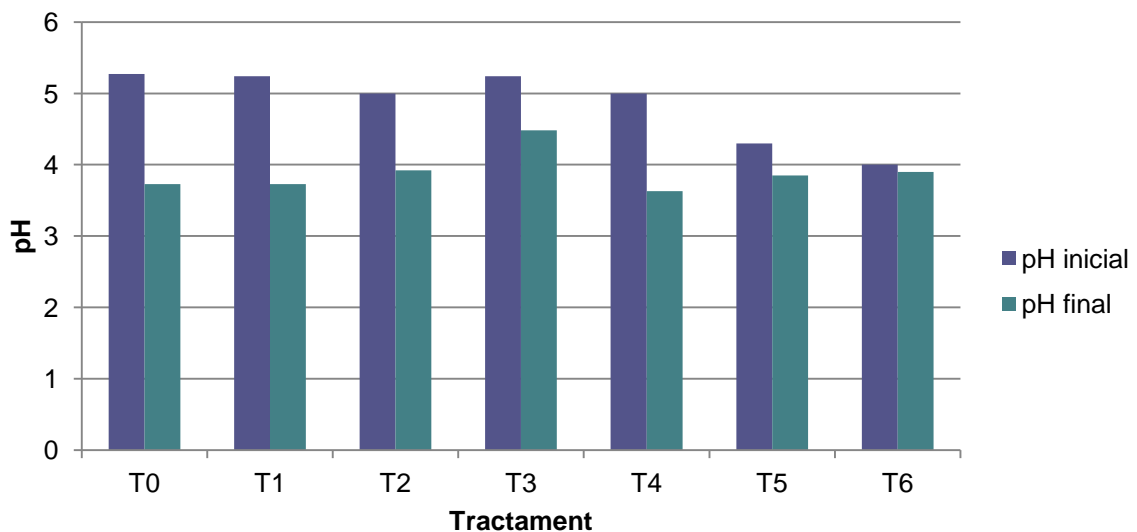
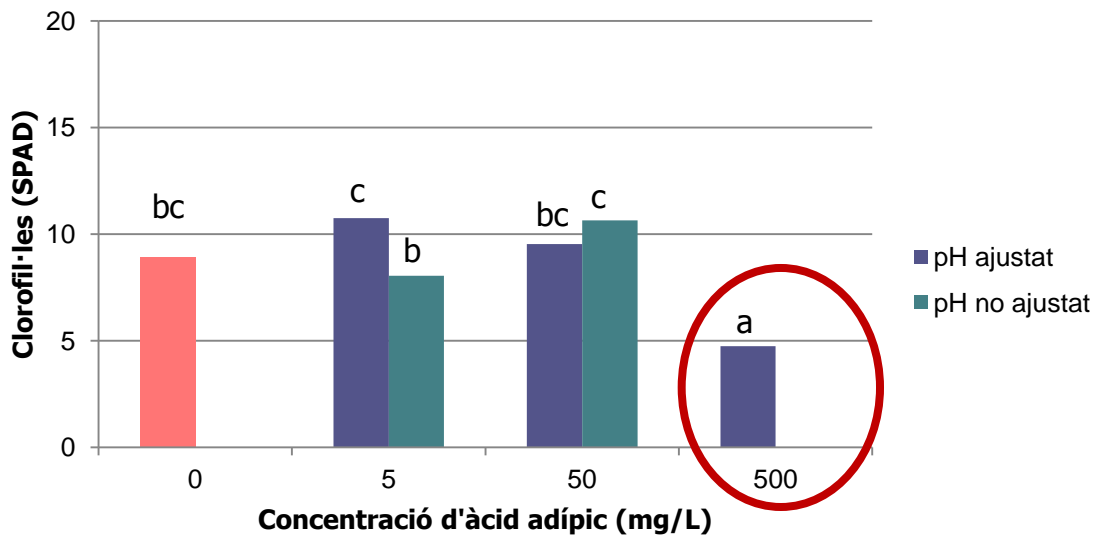


Figura 2.15: Comparació del pH del medi dels diferents tractaments en el moment del cultiu (pH inicial) i al final de l'experiment (pH final). Tractaments i concentració d'àcid succínic (mg/L): pH ajustat: T0 = 0; T1 = 5; T2 = 50; T3 = 500. pH no ajustat: T4 = 5; T5 = 50; T6 = 500

Com que l'àcid succínic és un metabòlit de la planta, el seu creixement no es veu alterat per la presència d'aquest compost. Per això, els valors del pH final són tots inferiors a l'inicial cosa que significa que la planta ha crescut en tots els tractaments.

2.7.4 Contingut en clorofil·les (SPAD)

Àcid adípic



*Figura 2.16: Contingut de clorofil·les en unitats SPAD de plàntules d'enciam (*Lactuca sativa* cv. Trocadero) cultivades in vitro en diferents medis després de 24 dies. 0 mg/L d'àcid adípic fa referència al tractament control*

Les dades significatives les trobem en els tractaments de concentració d'àcid adípic 500 mg/L on apreciem una diferència important del contingut de clorofil·les respecte el tractament control.

En els tubs amb el pH ajustat, els valors de SPAD són baixos perquè, tal i com s'observa en la Figura 2.20, les fulles no són verdes com en la resta de tractaments sinó que tenen un aspecte més aviat groguenc.

En els tubs en els quals el pH no es va ajustar, no va créixer cap fulla (veure Figura 2.21). Per tant, no es va poder prendre cap dada.

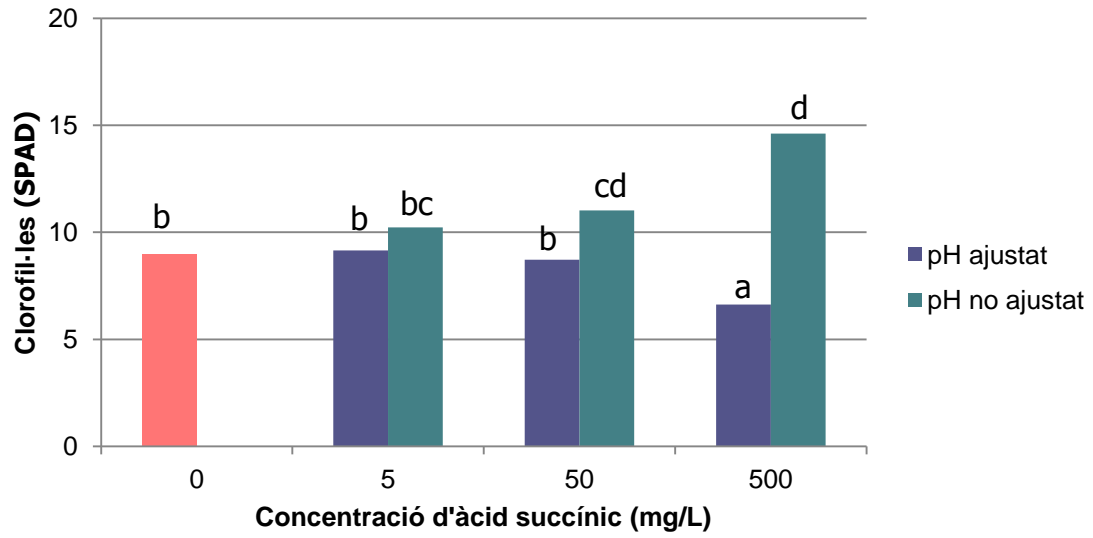
Àcid succínic

Figura 2.17: Contingut de clorofil·les en unitats SPAD de plàntules d'enciam (Lactuca sativa cv. Trocadero) cultivades in vitro en diferents medis després de 21 dies. 0 mg/L d'àcid succínic fa referència al tractament control

2.7.5 Prolina

Àcid adípic

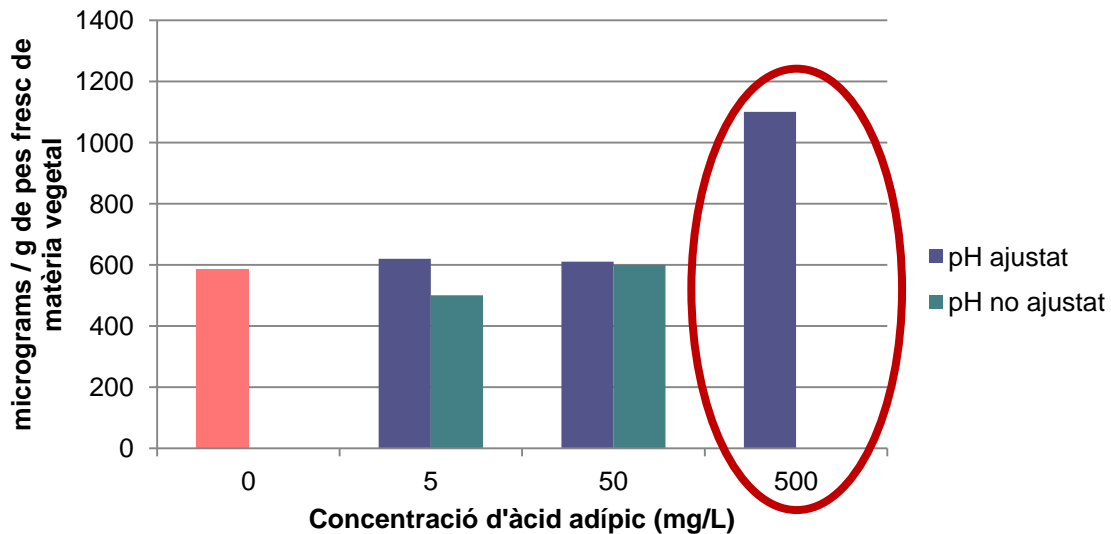


Figura 2.18: Contingut en prolina (micrograms per gram de pes fresc de matèria vegetal) dels diferents cultius d'enciam després de 24 dies. 0 mg/L d'àcid adípic fa referència al tractament control

La prolina és un indicador de l'estrès que pateix la planta. Com més alts siguin els seus valors, vol dir que la planta està sota més estrès i això té repercussions negatives sobre el seu creixement.

Cal destacar els valors obtinguts en els tractaments amb 500 mg/L d'àcid adípic.

Per una banda, deduïm que els valors molt elevats del tractament C (500 mg/L i pH ajustat) són deguts a la quantitat de dissolució d'hidròxid de sodi (NaOH) afegida al medi de cultiu inicial. Això es va fer per tal de corregir el pH del medi i reduir-ne l'acidesa.

Per una altra banda, l'absència de plàntula desenvolupada no va permetre agafar dades del tractament F (500 mg/L i pH no ajustat).

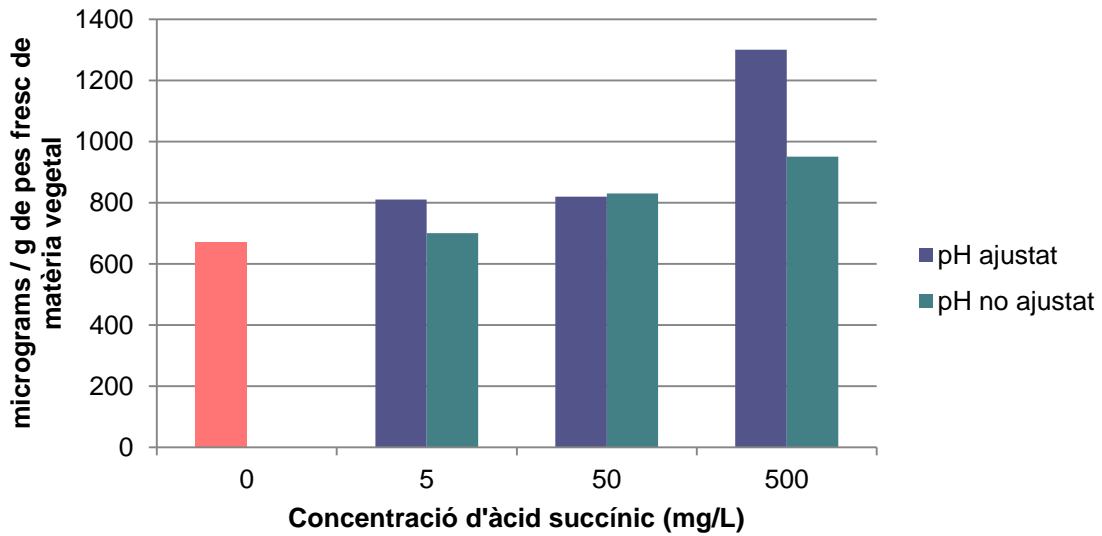
Àcid succínic

Figura 2.19: Contingut en prolina (micrograms per gram de pes fresc de matèria vegetal) dels diferents cultius d'enciam després de 21 dies. 0 mg/L d'àcid succínic fa referència al tractament control

Tal i com podíem observar en el tractament C (500 mg/L i pH ajustat) de la Figura 2.18, en el cas de l'àcid succínic també trobem alts valors de prolina en el tractament 3 (500 mg/L i pH ajustat).

Aquests valors són més alts en el cas de l'àcid succínic perquè la quantitat de sosa càustica afegida per corregir el pH va ser més elevada cosa que provoca un augment de l'estrès de les plàntules.

2.7.6 Seguiment visual del desenvolupament de les plàntules

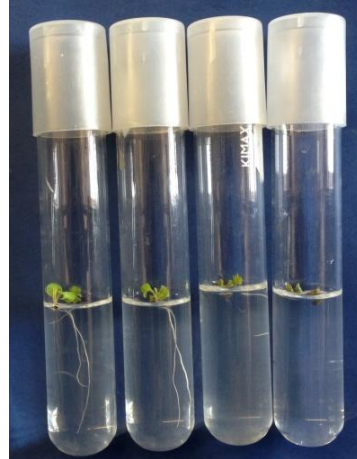
A continuació, es presenten les figures a partir de les quals es pot apreciar la coloració i l'aspecte de les plàntules.

L'ordre en què es troben disposats els tubs de cultiu és el següent:

Tractament control – 5 mg/L – 50 mg/L – 500 mg/L

Les fotografies de l'esquerra són dels tractaments d'àcid adípic i les de la dreta de succínic.

7 dies



11 dies



14 dies



24 dies (Àcid adípic)
21 dies (Àcid succínic)



Figura 2.20: Seguiment del desenvolupament de les plàntules d'enciam en els medis amb les diferents concentracions en mg/L d'àcid adípic (esquerra) i succínic (dreta) amb el pH ajustat

A partir de l'observació de les fotografies, podem concloure que tots dos compostos afecten la radícula de les plàntules però l'àcid adípic ho fa d'una manera més pronunciada, sobretot en els tractaments amb el pH sense ajustar.

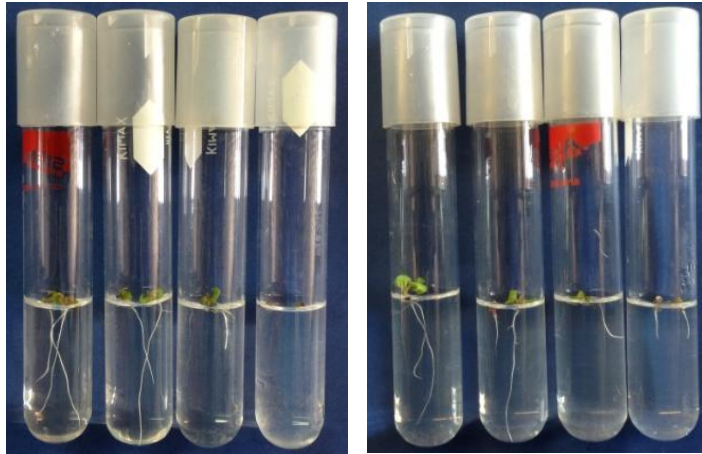
L'àcid succínic no altera significativament el creixement de la planta mentre que en els tractaments amb àcid adípic es pot apreciar una reducció important tant de fulles com d'arrels. Aquesta reducció augmenta a mesura que la concentració d'aquest compost en el medi de cultiu és més elevada.

La dada rellevant és el canvi de color que experimenten les plàntules del tractament C (500 mg/L d'àcid adípic). Aquest aspecte groguenc de les fulles queda corroborat pels valors inferiors de clorofil·les (SPAD), representats a la Figura 2.16.

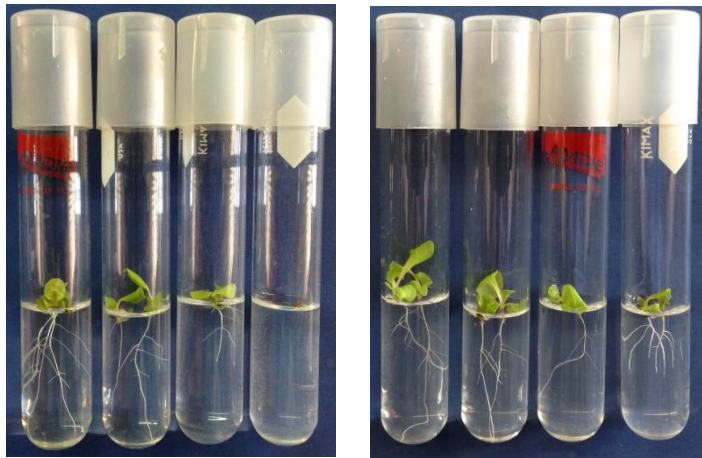
A més a més, aquest mateix tractament mostra un greu endarreriment respecte la resta i sobretot respecte el control perquè tant la part aèria com la submergida són ínfimes.

Pel que fa a l'àcid succínic, a primer cop d'ull sembla que les elevades dades del pes sec no s'ajusten al que observem en la Figura 2.20. Aquesta diferència és deguda a l'estrès sota el qual es troba la plàntula. Els resultats elaborats a partir de l'estudi de la prolina (Figura 2.19) ens han permès observar un grau d'estrès elevat sobretot en el tractament amb 500 mg/L i pH ajustat d'àcid succínic. L'estrès condiciona l'aspecte visual de la planta i fa que, en aparença, el pes fresc sembli més baix.

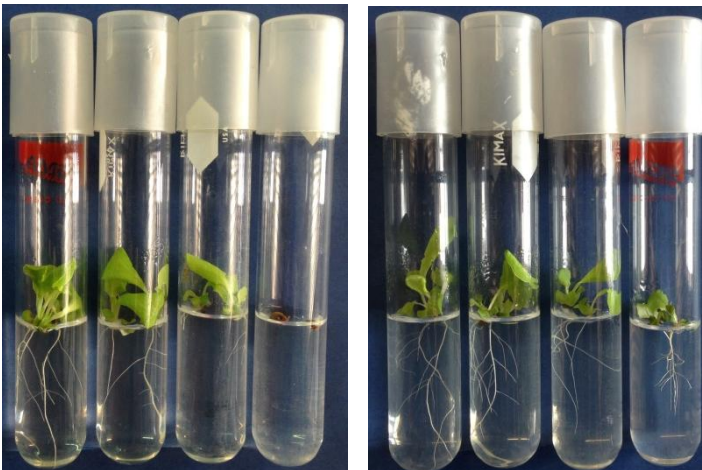
7 dies



11 dies



14 dies



24 dies (Àcid adípic)
21 dies (Àcid succínic)

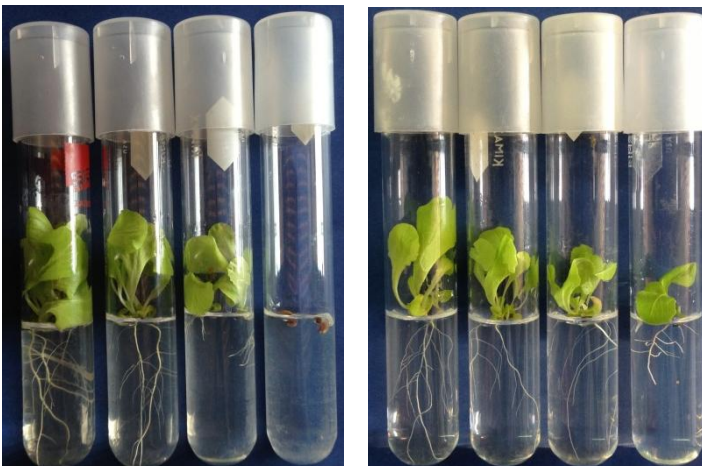


Figura 2.21: Seguiment del desenvolupament de les plàntules d'enciam en els medis amb les diferents concentracions en mg/L d'àcid adípic (esquerra) i succínic (dreta) amb el pH no ajustat

De la mateixa manera que observàvem en els tractaments de pH ajustat (Figura 2.20), aquí es veu clarament com, a major concentració, els efectes sobre la planta són més pronunciats.

En els tractaments de la Figura 2.21, també hi ha una tendència al descens del creixement a mesura que la concentració de tots dos compostos és més elevada.

A més a més, destaquem el cas de l'àcid adípic amb la concentració de 500 mg/L i pH sense ajustar que sí que ha germinat però l'arrel que n'ha sortit és mínima i no hi ha fulles.

En canvi, en els tractaments amb àcid succínic, encara que hi hagi diferències, es pot observar un desenvolupament en totes les plàntules.

3. Conclusions

Primerament, aquest treball ha presentat una visió general de la producció de plàstics a escala mundial. La xifra de més de 250 milions de tones de plàstic produïdes és un indicador per afirmar que l'ús d'aquest material és excessiu. A més, dins la quotidianitat, es troba per exemple en aplicacions d'un sol ús com l'emalatge d'aliments quan precisament la seva degradació és lenta i provoca impactes mediambientals.

Després, ja dins el camp de l'agricultura, hem vist una important aplicació que és la dels encoixinats i, curiosament, en cap de les fonts d'informació consultades es menciona una possible ecotoxicitat.

Pel que fa al marc pràctic, podem afirmar que els **objectius** proposats es van assolir:

- Hem elaborat un bioassaig que permet una avaluació dels efectes, tant qualitatis com quantitatis, de dos compostos presents en encoixinats biodegradables, l'àcid adípic i l'àcid succínic, sobre les plantes
- Podem afirmar que es confirma la nostra hipòtesi: els compostos analitzats dels *mulch* biodegradables que s'utilitzen en l'agricultura, tenen efectes nocius sobre els cultius.

A partir de l'assaig realitzat podem concloure que:

- Els resultats elaborats a partir de les dades de germinació són la prova que cap dels dos compostos afecta la plàntula en aquest aspecte. Arribem a aquesta conclusió perquè en tots els tractaments s'ha assolit pràcticament el 100% de la germinació
- L'àcid adípic limita més el creixement que el succínic
- S'han observat uns efectes més pronunciats en els medis amb 500 mg/L d'àcid adípic. Els que tenen el pH ajustat creixen amb unes fulles d'aspecte groguenc mentre que els que no tenen el pH corregit, no presenten un desenvolupament de la plàntula
- En els tractaments amb àcid succínic es pot apreciar una reducció del creixement a mesura que la concentració augmenta però de tota manera l'àcid adípic té uns efectes més greus
- Totes les plàntules tractades mostren un increment de prolina, un indicador d'estrès, d'entre 2,25 i 14,5 vegades respecte el control
- S'ha demostrat una alta sensibilitat de resposta inclús en tractaments amb concentracions de 5 mg/L de compost

Tal i com he mencionat anteriorment, la formulació de materials biodegradables ha estat fruit de la necessitat que han vist les empreses productores de cercar una alternativa als plàstics convencionals. Aquesta ha resultat ser un substitut dels plàstics tradicionals de polietilè tant en termes agronòmics com productius, perquè permeten ser manipulats amb la maquinària normal.

No obstant això, no hem d'oblidar que els encoixinats de polietilè no es degraden en molts anys i no interaccionen amb l'ambient en què es troben mentre que els altres, pel fet de ser biodegradables, produiran compostos que restaran i s'integraran al medi agrícola. En consegüent, el perill es troba en els cultius posteriors a la degradació dels encoixinats perquè creixeran en un sòl amb presència de certs compostos dissolts.

És molt necessari avaluar els seus efectes potencials tant a curt com a llarg termini. Hi ha pocs tests que analitzin l'efecte dels compostos sobre plantes i pocs casos en que s'hagin vist uns efectes tant clars com els que es presenten en aquest treball.

Gràcies a aquesta investigació, m'he adonat del grau de rigor, precisió i dedicació que exigeix la recerca científica. Cal tenir en compte que el fet de treballar amb ésser vius, dóna cabuda a respostes inesperades, és a dir, es poden donar situacions imprevistes que modifiquin la planificació inicial.

En el cas d'aquest assaig, va haver-ne dues. La primera va ser durant la preparació dels medis de cultiu quan ens vam trobar amb unes variacions pronunciades del pH en afegir els compostos analitzats.

La segona es va donar durant el moment del cultiu de les llavors d'àcid adípic quan al cap d'una setmana es va poder apreciar la presència de fongs en tots els tubs de cultiu. Aquesta contaminació va suposar la repetició dels tractaments en qüestió i l'endarreriment de l'experiment.

A més a més, juntament amb la recerca feta en un altre treball, he tingut l'oportunitat de presentar aquests resultats en un congrés de cultiu *in vitro* a Saragossa el dia 24 d'Octubre de 2013, la X Reunió SECIVTV (Societat Espanyola de Cultiu In Vitro de Teixits Vegetals).

El treball es va presentar en forma de pòster on se sintetitzen els resultats elaborats.

Test de ecotoxicidad mediante cultivo in vitro de lechuga (*Lactuca sativa*)



Botet R., Martín-Closas LI., Cervelló S., Roig M., Pelacho A.M.



Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Universidad de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191. 25198 Lleida, España. pelacho@hbj.udl.cat

INTRODUCCIÓN

En el ámbito agrícola se está promoviendo la sustitución de los acolchados de polietileno por otros de materiales total o parcialmente biodegradables. Durante su proceso de descomposición, la matriz polimérica se degrada y sus componentes (aditivos, plastificantes, monómeros, etc.) son liberados al suelo, donde antes de degradarse pueden entrar en contacto con las plantas. Para valorar la ecotoxicidad de un compuesto en plantas existen algunos tests basados en la germinación y primeras etapas del desarrollo. Este trabajo propone un sistema de cultivo in vitro que permite una evaluación precisa, efectiva y sistemática de los efectos de estos compuestos en el crecimiento y desarrollo de cultivos, durante un periodo de tiempo más prolongado.

MATERIALES Y METODOS

Se incorporaron a medios de cultivo MS compuestos de uso frecuente en los acolchados: ácido adipico (AA), ácido succínico (SA), ácido láctico (LA), y 1,4-Butanodiol (BUT), evaluándolos en tres concentraciones: 5, 50 y 500 mg·L⁻¹. Se sembraron en tubos semillas de lechuga, *Lactuca sativa* cv. Trocadero, y se incubaron a fotoperíodo de 16 horas de luz y 21°C. Se determinó la dinámica de la germinación, aspectos visuales del desarrollo de la parte aérea y radicular, y el peso de los explantos al final del cultivo. Se analizó la concentración de prolina como potencial marcador de estrés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas germinaron en todos los tratamientos en 1-3 días. En los tratamientos de 500 mg·L⁻¹ AA las plántulas crecieron de forma extremadamente reducida y anormal, con escaso desarrollo de la raíz (Figuras 1, 4 y 5); concentraciones muy bajas, 5 mg·L⁻¹, también redujeron significativamente el peso de los explantos.

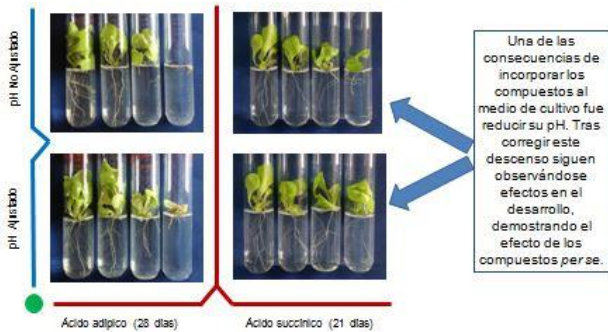


Figura 1. De izquierda a derecha en cada imagen, control y concentraciones de 5, 50 y 500 mg·L⁻¹ del compuesto correspondiente. Arriba, medios con pH no ajustado; abajo, pH ajustado a 5.7.

El crecimiento de los explantos en 500 mg·L⁻¹ LA y SA fue anormal en su parte aérea y principalmente inhibiendo el desarrollo de las raíces (Figuras 1 y 2), si bien los tratamientos de SA no tuvieron efecto significativo sobre el peso final de los explantos. Aunque menos acusado que con AA, tratamientos con LA y BUT 5 mg·L⁻¹ afectaron significativamente al crecimiento (Figuras 2 y 5).

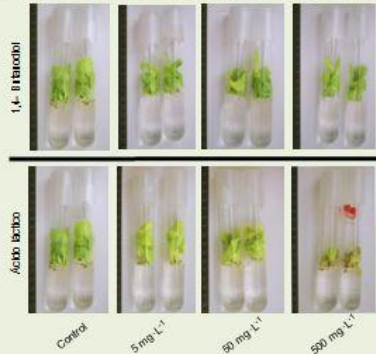


Figura 2. Plántulas cultivadas durante 20 días en medios con diferentes concentraciones de 1,4-Butanodiol y ácido láctico.

El ácido adipico y el succínico mayoritariamente, pero también el ácido láctico y el 1,4-butanodiol, aumentaron la concentración de prolina en las plántulas, registrada a los 24 y 90 días de cultivo. Estos resultados fueron igualmente significativos en los medios con pH corregido. Aunque en algún caso no se apreciaron otras anomalías, todas las plántulas mostraron un incremento entre 2,25 y 14,2 veces (Figura 3).

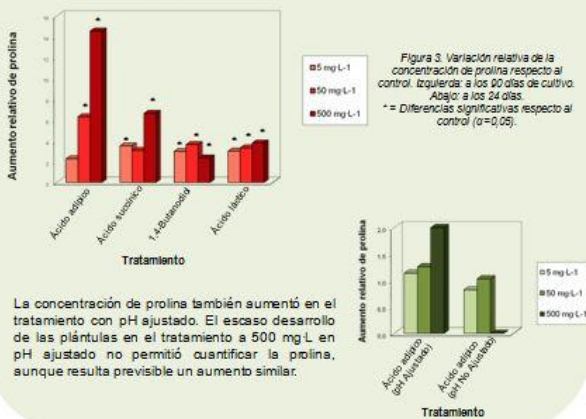


Figura 3. Variación relativa de la concentración de prolina respecto al control. Izquierda: a los 24 días de cultivo. Abajo: a los 90 días. * = Diferencias significativas respecto al control ($\alpha=0,05$).

La concentración de prolina también aumentó en el tratamiento con pH ajustado. El escaso desarrollo de las plántulas en el tratamiento a 500 mg·L en pH ajustado no permitió cuantificar la prolina, aunque resulta previsible un aumento similar.



Figura 4. Imagen superior: Efecto del ácido adipico (500 mg·L⁻¹) respecto al control (izquierda) tras 35 días en cultivo. Imagen inferior: Tratamiento de ácido adipico 50 mg·L⁻¹ a 21 y 28 días de cultivo.

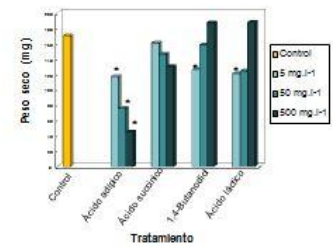


Figura 5. Efecto de la incorporación de los compuestos al medio de cultivo sobre el peso seco de los explantos tras el periodo de cultivo. * = Diferencias significativas respecto al control ($\alpha=0,05$).

Los compuestos ensayados son utilizados en la industria de los plásticos biodegradables de uso agrícola, pero además son conocidos como implicados en el metabolismo primario o secundario de las plantas, o han sido identificados como compuestos producidos por microorganismos con efectos sobre las plantas; por ello es razonable que hayan afectado al desarrollo vegetal, si bien no se esperaba una sensibilidad de respuesta tan elevada, con alteraciones incluso cuando son aportados en cantidades muy reducidas.

- La metodología propuesta ha resultado adecuada para determinar efectos a corto y medio plazo de los compuestos.
- Se ha demostrado una alta sensibilidad de respuesta con parámetros sencillos, superior a la manifestada en los ensayos previos de toxicidad a estos compuestos.
- Se ha puesto de manifiesto un marcado efecto de los compuestos sobre el sistema radical.

Figura 2.22: Pòster presentat a la X Reunió SECIVTV a Saragossa

4. Prospectiva

Aquest treball de recerca es pot ampliar de diverses maneres.

En primer lloc, podria repetir-se el mateix experiment però analitzant altres compostos per poder comparar els resultats i establir quin és el compost que perjudica més l'espècie vegetal.

En addició, es podria fer un cultiu en testos, és a dir, cultiu *in vivo*. Aquests contindrien terra que ha estat coberta pel mateix tipus de plàstic biodegradable però en períodes de temps diferents. D'aquesta manera, el que hagi estat exposat menys temps tindrà una concentració de compostos dissolts més baixa i el que hagi estat sota els efectes del *film* durant molt temps, en tindrà una concentració més elevada.

Així, es pot estimar quin és el període de temps òptim per utilitzar films sense que tinguin efectes nocius per la planta.

A més a més, es podria anar més enllà i observar si hi ha alguns efectes per la salut humana. En altres paraules, si la ingesta de vegetals cultivats tant amb l'ús de plàstics biodegradables com en sòls prèviament contaminats per acumulació dels seus compostos, podria tenir alguna conseqüència negativa per l'home i manifestar-se en forma de malaltia.

En darrer lloc, es podria fer un experiment amb la pregunta següent: "Hi ha perill de contaminació de les aigües subterrànies?" D'aquesta manera es demostraria si determinats compostos poden alterar la composició de les aigües de possibles aqüífers sota els cultius. En cas afirmatiu, es tractaria del fenomen de la lixiviació.

Agraïments

Les persones que anomenaré a continuació són aquelles a les quals vull donar les gràcies pel seu paper en la realització del treball de recerca.

A l'Ana Maria Pelacho, per la confiança, tot i que jo vaig demostrar des d'un inici no tenir cap coneixement de botànica ni de cultius *in vitro*, i per posar a la meva disposició tots els mitjans necessaris per dur a terme aquesta investigació. A més, li vull agrair d'haver resolt els imprevistos o totes aquelles situacions en què no sabia realment com continuar.

A la Sandra Cervelló, per la seva paciència en introduir-me al món de la investigació, tenint en compte que no havia emprat mai els estris d'un laboratori. També, per repetir les explicacions quan calia i per donar-me consells i fer més amens els matins de l'estiu.

A la meva assessora, la Maria Josep Claramunt per resoldre'm tots els dubtes i per donar forma al grapat d'idees desordenades que li vaig presentar després de l'estiu.

A la Yuki, la meva germana, per la companyia a distància fins altes hores de la nit, per ajudar-me en l'estètica del treball i per suportar llargs monòlegs sobre les meves aventures a Agrònoms.

Als meus pares, pels viatges diaris al laboratori, pels ànims, el suport i l'entusiasme que han mostrat des del primer moment.

Les meves més sinceres gràcies a tots.

5. Bibliohemerografia

Bibliografia

Duchefa Biochemie B.V., Catalogue 2010-2012

Kapanen, A., Venelampi, O., Vikman, M., Itävaara, M. (2003). *Testing the Ecotoxicity of Biodegradable Plastics*. 107-111

Articles en format digital descarregats de la base de dades "SCOPUS" el 12.07.2013

Bonora, M., & De Corte, D. (2003). Additives for controlled degradation of agricultural plastics: ENVIROCARE™. *Macromolecular Symposia*, 197, 443-453

Espí, E., Salmerón, A., Fontecha, A., García, Y., Real, A.I. (2006) *Journal of Plastic Film and Sheeting* 22: 85-102

Kasirajan, S., & Ngouajio, M. (2012). Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), 501-529

Laverde, G. (2002). Agricultural films: Types and applications. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 18(4), 269-277

Markarian, J. (2005). Plasticulture comes of age. *Plastics, Additives and Compounding*, 7(1), 16-19

Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71-78

Vert, M., Dos Santos, I., Ponsart, S., Alauzet, N., Morgat, J. -, Coudane, J., & Garreau, H. (2002). Degradable polymers in a living environment: Where do you end up? *Polymer International*, 51(10), 840-844

Pàgines web consultades

<http://www.navarraagraria.com/n150/arplasti.pdf> [consultada 25.06.2013]

http://www.omaaragon.org/riesgos/ficheros/_3590.pdf [consultada 25.06.2013]

http://www.ciencias-marinas.uvigo.es/bibliografia_ambiental/agricultura_ecoloxica/Tratado%20Agricultura%20Ecoloxica.pdf [consultada 25.06.2013]

http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_31.pdf

[consultada 27.06.2013]

http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rhg289/12_21.pdf

[consultada 27.06.2013]

<http://plasticoagricola.blogspot.com.es/p/acolchados.html>

[consultada 15.09.2013]

<http://www.horticulturablog.com/2012/03/plasticos-biodegradables.html>

[consultada 15.09.2013]

<http://articulos.infojardin.com/huerto/acolchado-mulching.htm>

[consultada 15.09.2013]

<http://www.interempresas.net/Agricola/Articulos/108744-Nace-una-nueva-generacion-de-plasticos-acolchados-biodegradables.html>

[consultada 30.09.2013]

http://www.proexport.es/Documentos/Proyectos/200942113394804.13_Utilizaci%C3%B3n_de_pl%C3%A1sticos_biodegradables_para_la_agricultura.pdf

[consultada 30.09.2013]

<http://www.ptq.pemex.com/productosyservicios/eventosdescargas/Documents/Foro%20PEMEX%20Petroqu%C3%ADmica/2012/03%20Mercado%20pl%C3%A1sticos%202012.pdf>

[consultada 19.11.2013]

<http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus../hortalizas/8acolchado.pdf>

[consultada 19.11.2013]

<http://www.besana.es/es/web/201305/agricultura-concentro-58-demanda-plastico-espana-2012>

[consultada 20.11.2013]

<http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2013.aspx?FolID=2>

[consultada 20.11.2013]

http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/WEBFV_2010/mat_did/Ut_11GLSY.pdf

[consultada 23.11.2013]

Índex d'imatges

Figura 1:

<http://earthengine.google.org/#intro/v=36.838976,2.4610949000000346,12.240065980933288>

Imatge de la portada: Montserrat Roig Kim

Imatges de les figures 2.1-2.22 : Montserrat Roig Kim

6. Annexos

Annex 1: Protocol de preparació de medi de cultiu

Si volem elaborar dos litres de medi Murashige i Skoog introduïrem en un matràs aforat amb uns 1300ml d'aigua destil·lada les següents substàncies:

1. 200ml de macros
2. 20ml de micros
3. 10ml de ferro
4. 10ml de vitamines

A l'agitador magnètic, homogeneïtzem la dissolució i hi afegim 60 g de sucre.

Amb un pH-metre, ajustem el pH de la dissolució entre 5,7 i 5,8. Com que el pH inicial serà més àcid, afegim una dissolució de sosa càustica (NaOH) 0,1N fins obtenir el valor desitjat.

Seguidament, enrasem a 2L amb aigua destil·lada i hi introduïm 4g de gelatina sintètica.

Perquè aquest últim producte es dissolgui, ha de ser escalfat. Per tant, apliquem a l'autoclau el programa a 110°C durant 5 minuts.

Com a precaució, no s'ha d'obrir mai l'autoclau si la temperatura és superior a 100°C.

Després, distribuïrem el medi de manera que n'hi hagi 20mL a cada tub de cultiu i procedirem a esterilitzar-los.

El programa d'esterilització a l'autoclau és de 121°C durant 20 minuts.

Annex 2: Protocol d'esterilització de llavors

Material necessari:

- 500ml d'una dissolució d'hipoclorit de sodi al 20%
- Aigua estèril
- Dos vasos de precipitats estèrils
- Pincetes de te esterilitzades
- Placa Petri
- Discs de paper de filtre estèril
- Llavors

Procediment:

Dins la cabina de flux laminar, aboquem els 500ml de dissolució de lleixiu a un dels vasos de precipitats.

Després, col·loquem un nombre no molt elevat de llavors a les pincetes de te i ho submergim tot a la dissolució. Removem amb vigor durant dos minuts però sense crear escuma.

Passats els dos minuts, retirem les llavors del primer vas i les introduïm en un segon vas amb aigua estèril. Tornarem a remoure durant dos minuts més per eliminar restes de la dissolució d'hipoclorit sòdic. Si convé, es pot repetir aquest últim pas.

Col·locar les llavors en una placa de Petri sobre un disc de paper de filtre estèril.

Ara ja es poden cultivar amb l'ajuda d'unes pincetes prèviament esterilitzades.

Annex 3: Precaucions especials

Les següents són les mesures de seguretat i aspectes a tenir en compte a l'hora de treballar en un laboratori de cultiu *in vitro*.

A les taules de laboratori

Abans de començar a cultivar, comprovar l'existència de tot el material necessari.

Identificar l'ús al que estan destinats, especialment els materials subministrats com estèrils.

A l'acabar, netejar la cabina de flux laminar, rentar tot el material i deixar-lo escorrent. Avisar de qualsevol incidència.

Esterilització en superfície del material vegetal

Es recomana utilitzar bata de laboratori per evitar els efectes de possibles esquitxades.

Cabina de flux laminar

Abans d'introduir cap element a la cabina de flux laminar ha d'estar el més net possible. Les mans s'han de rentar amb aigua i sabó, eixugar i polvoritzar amb etanol 70%.

Un cop es comença a treballar, s'ha d'evitar tot tipus de moviments a la sala (circulació de persones, obertura i tancament de portes...). Idealment, el treball s'ha de fer individualment i en absència de qualsevol persona al voltants.

Tots els moviments de mans, braços i cap a l'interior de la cabina s'han de reduir al mínim possible i ser fermes i suaus. S'ha d'evitar tossir, esternudar o respirar amb força cap a l'interior de la cabina. El cap s'ha de mantenir totalment fora de la cabina i s'ha de procurar treballar el més interior possible. Mai s'ha de passar objectes o mans per sobre d'altres objectes sobre la taula i a les cabines de flux horitzontal, no s'ha de posar res entre el fons i la zona de treball.

Identificar bé els tubs amb dissolució d'etanol 80% i els tubs amb aigua estèril dins la cabina. Posem dos tubs que es disposen en un ordre concret i fix: el primer tub des de l'esquerra és d'etanol per les pinces i el següent és d'aigua destil·lada per refredar les pinces.

L'etanol és inflamable per tant s'ha de prendre precaucions especials cada vegada que es flamegen les pinces: tenir els avantbraços ben secs de l'etanol que prèviament hem polvoritzat, no permetre que la flama es dirigeixi cap a les mans... La flama d'alcohol es poc visible; en cas de notar cremades quan es flamegen els instruments, soltar-los immediatament i separar les mans cap als costats. Si la sensació de calor continua, treure les mans de la cabina. Després de flamejar els instruments, s'ha d'esperar que la flama a la seva superfície s'apagui abans de submergir-lo als tubs d'aigua estèril perquè si per error s'introduïssin un altre cop a l'etanol, hi ha risc de que aquest s'incendii.

Abans de començar a treballar a la cabina, s'ha de comprovar que al lloc de treball hi ha tots els instruments necessaris.

Al finalitzar, la cabina ha de quedar neta i preparada perquè una altra persona pugui treballar-hi. S'haurà de passar un paper de filtre polvoritzat amb etanol 70% sobre la superfície de la taula.

Manipulació del material vegetal dins la cabina de flux laminar

Les pinces s'utilitzen per agafar amb fermesa el material vegetal però amb compte per no produir danys. El bisturí s'ha d'utilitzar per fer talls nets, amb moviments verticals i mai pressionar directament sobre la zona de tall perquè es podrien veure afectats els teixits.

Si qualsevol líquid cau sobre la superfície de treball, s'ha d'assecar immediatament amb paper que s'ha de tenir a mà dins la cabina. Evitar també residus sòlids.

Quan es treballa amb tubs, aquests hauran d'estar en una gradeta identificada amb el nom de la persona que cultiva, el teixit cultivat, la data i el medi de cultiu. També s'han de numerar els tubs de cada tractament. A l'acabar de cultivar, els tubs s'han de portar a la càmera d'incubació.