

## LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

### ESPERIENZA: La fotosintesi: un approccio di natura laboratoriale

#### Indice dei contenuti

- Obiettivo
- Introduzione
  - Il processo della fotosintesi
  - Le piante modello
    - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
  - Scheda per lo studente
- Come elaborare i dati
- Domande
- Proposte per il Triennio: studio via spettrofotometrica
- Bibliografia/ sitografia

#### OBIETTIVO:

EVIDENZIARE L'IMPORTANZA DI ALCUNI FATTORI ( LUCE E DISPONIBILITÀ DI CO<sub>2</sub>)  
NELL'EFFICACIA DEL PROCESSO DELLA FOTOSINTESI

VERIFICARE ALCUNI MECCANISMI BIOCHIMICI ALLA BASE DELLA PRODUZIONE DI O<sub>2</sub>  
NELLA FASE I DELLA FOTOSINTESI

## INTRODUZIONE

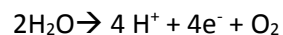
### Il processo della fotosintesi

La cattura dell'energia solare da parte di organismi fotosintetici e la sua conversione nell'energia chimica di composti organici ridotti è la fonte di quasi tutta l'energia biologica. Gli organismi fotosintetici intrappolano l'energia solare e formano ATP e NADPH che vengono poi utilizzati come fonte di energia per la produzione di carboidrati ed altri composti organici a partire da  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ; contemporaneamente questi processi rilasciano  $\text{O}_2$  nell'atmosfera.

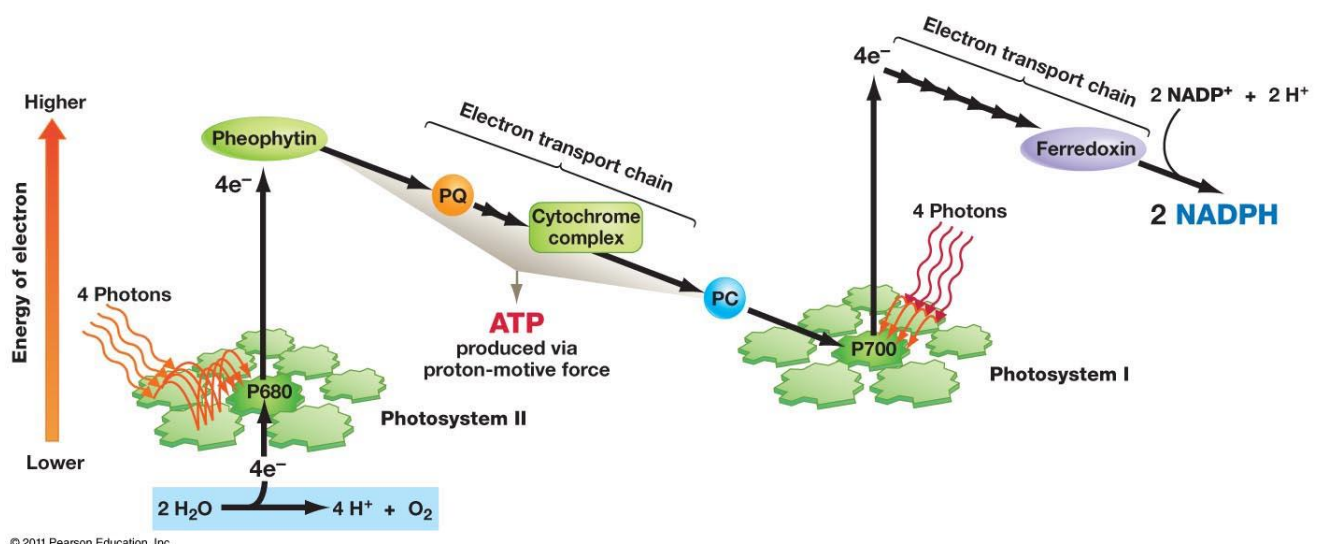
La reazione della fotosintesi è :  $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$  ed è divisa in due fasi: la fase di fotofosforilazione e il ciclo di Calvin.

### La fase I : la fotofosforilazione

I pigmenti che assorbono la luce presenti nelle membrane dei tilacoidi sono disposti in gruppi funzionali chiamati fotosistemi: le piante vascolari hanno due fotosistemi, ognuno con le sue molecole di clorofilla antenna, capaci di assorbire l'energia luminosa e di trasferirla a un centro di reazione, costituito da poche molecole di clorofilla in grado di trasformare l'energia luminosa in energia chimica. Queste molecole infatti trasferiscono un elettrone a degli accettori di elettroni che fanno parte di una catena di trasporto (che genererà con complesse reazioni ATP e NADPH, essenziali per la seconda fase della fotosintesi). La molecola di clorofilla che ha emesso inizialmente l'elettrone per ritornare nella sua configurazione iniziale acquisterà quindi un elettrone da un donatore elettronico: a donare elettroni sarà l'acqua (donatore sempre disponibile nell'ambiente cellulare), secondo la reazione



Lo schema seguente (schema Z) riassume visivamente i complessi passaggi della prima parte della fotosintesi.



Uno dei modi con cui rilevare l'entità del processo fotosintetico potrebbe quindi passare attraverso la rilevazione della quantità di  $O_2$  prodotto in una certa unità di tempo: non si tratta di una misura diretta ( la pianta infatti compie contemporaneamente la reazione della respirazione cellulare ) ma c'è proporzionalità tra la velocità con cui si compie la fotosintesi e la quantità di  $O_2$  prodotto dalla pianta.

### **Le piante modello**

Le piante acquatiche utilizzate nell'esperimento ( *Elodea canadensis*, *Limnophila sessiflora*, *Cabomba aquatica* ) sono caratterizzate dall'aver elevati tassi di crescita e un metabolismo molto veloce. Sono per questo particolarmente usate nella nel trattamento di purificazione delle acque, in quanto particolarmente abile ad estrarre da esse il nutrimento. La *Cabomba* inoltre è un efficace accumulatore di metalli pesanti e ha pertanto un grande potenziale come fitoremediatore di acque cariche di questo tipo di inquinanti.

Sono inoltre piante robuste che prediligono temperature non elevate e la loro conservazione in laboratorio non esige particolari cure.

Rispondono in modo immediato alle variazioni di condizioni di luminosità e la quantità di ossigeno liberato dal fusto tagliato varia in modo misurabile.

### L'idea portante dell'esperimento

La fotosintesi viene studiata sia nel Biennio che nel Triennio, dapprima dal punto di vista cellulare e poi dal punto di vista biochimico. Questa esperienza è quindi stata pensata sdoppiata in due parti: la prima comporta un approccio semplice dal punto di vista sperimentale, la seconda uno più raffinato.

Nella prima parte useremo le piante modello descritte nella introduzione: il fatto che le piante modello siano delle piante acquatiche ci permette una immediata visualizzazione dell'ossigeno prodotto ( bolle ) e una valutazione approssimativa della intensità del processo fotosintetico. Le piante acquatiche posseggono un parenchima specializzato ( aerenchima ) nel permettere il passaggio e il rifornimento di gas negli organi sommersi: tagliando il fusto ( e l'aerenchima ) l'ossigeno si libera sotto forma di bolle che si evidenziano nell'acqua.

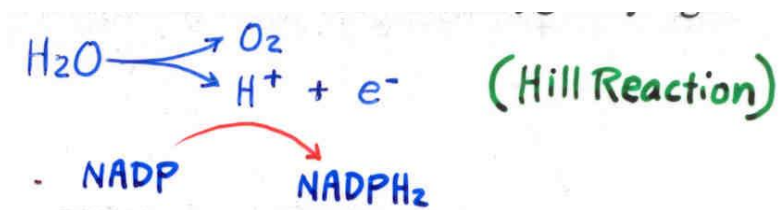
La presenza di luce è essenziale al processo fotosintetico: nel corso dell'esperimento si possono variare le condizioni di luminosità ambientale o le caratteristiche della luce incidente ( utilizzando sia la luce bianca che luce monocromatica ).

La soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  in cui immergere le piantine durante l'esperimento ha la funzione di evitare che la  $\text{CO}_2$  possa fungere da reagente limitante.

Lo scopo dell'esperimento è quello di investigare sui fattori che influenzano la velocità del processo fotosintetico.

Agli studenti sarà indicata la procedura base : potranno, una volta acquisitala, progettare il loro esperimento in modo personale. Dopo averlo descritto o al docente o al tecnico di laboratorio, potranno passare alla fase di realizzazione. Sarà permesso loro l'utilizzo di smartphone o tablet per raccogliere materiale video utile ad elaborare la relazione finale, che dovrà contenere una analisi quantitativa dei dati ottenuti.

Nella seconda parte useremo invece un estratto di cloroplasti e con l'utilizzo di una molecola "supplente " degli accettori di elettroni "naturali" condurremo una misura spettrofotometrica che ci permetterà di valutare l'entità della reazione di Hill: la molecola supplente, il 2,6-diclorofenoloindofenolo ( DCPIP ) infatti nella forma ossidata è blu, in quella ridotta è incolore. Il DCPIP è un accettore di elettroni, esattamente come  $\text{NADP}^*$ : possiamo seguire così lo svolgimento della reazione



---

## LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

---

### Esperienza per il biennio

#### Materiali e reagenti

- Piantine acquatiche: Elodea densa, Cabomba aquatica, Limnophila sessiflora
- Soluzione  $\text{NaHCO}_3$  1% - almeno 500 mL per una serie significativa di prove

#### Vetreria e strumenti

- Provettone e portaprovette ( in alternativa sostegno con pinza )
- Forbici e pinzette
- Becher da 1000 mL
- Portalampade e lampade a lumen diversi ( 430, 630, 1800 lumen )
- Fogli di acetato in colori diversi
- Riga da 50 cm

SCHEDA PER LO  
STUDENTE**La fotosintesi: un approccio  
laboratoriale****MATERIALE****STRUMENTAZIONE E  
VETRERIA****PROCEDIMENTO**

**La serie di operazioni qui descritte è da seguire per i primi quattro punti: oltre la procedura è indicativa, serve solo da traccia per la progettazione autonoma dell'esperimento.**

**Prima di iniziare una qualsiasi variante dell'esperimento riferire al docente o al tecnico le modalità di procedura**

- Piantine acquatiche: Elodea densa, Cabomba aquatica, Limnophila sessiflora
- Soluzione  $\text{NaHCO}_3$  1% - almeno 500 mL per una serie significativa di prove

- Provettone e portaprovette ( in alternativa sostegno con pinza )
- Forbici e pinzette
- Becher da 1000 mL
- Bilancia tecnica
- Portalampade e lampade a lumen diversi ( )
- Fogli di acetato in colori diversi
- Riga da 50 cm

- Preparare una soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  all'1% ( almeno 500 mL).
- Riempire con la soluzione un provettone sino a  $\frac{3}{4}$  della sua altezza
- Scegliere la pianta modello

- Immettere nella provetta un rametto di Cabomba/Limnophila o Elodea della lunghezza di circa 7 cm, cercando di non rovinare le foglie e tagliando l'estremità superiore in corrispondenza di uno dei nodi del fusto. L'operazione è da compiersi preferibilmente tenendo la piantina sott'acqua.

- Posizionare il provettone nel portaprovette o sul sostegno.

- Predisporre la fonte luminosa posizionando la lampada ad una distanza di 5 cm, lasciar ambientare la piantina per 2-3 minuti

- Rilevare il numero di bolle rilasciato dalla pianta in 1 minuto ( eseguire per tre volte di seguito il conteggio ).

**Fase progettuale**

- Variare la quantità/qualità della luce che incide sulla pianta e rilevare, per ogni variazione, il numero di bolle rilasciato seguendo la stessa procedura ( iterazione della prova ).

## COME ELABORARE I DATI

I dati relativi al numero di bolle conteggiato nelle diverse prove saranno organizzati in tabelle in cui si riporteranno i valori secondo schemi diversi a seconda delle prove eseguite: ad esempio

Pianta modello: .....

Distanza dalla lampada a ...Lumen ( cm )	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Media

Distanza fissa ....cm e emissione luminosa variabile a ...Lumen	Prova 1	Prova2	Prova3	Media

Distanza fissa ...cm, emissione luminosa fissa ...Lumen, colore	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Media

---

## DOMANDE

---

- Sino a che punto ha senso confrontare dati relativi al numero di bolle raccolti da gruppi di lavoro diversi? Stiamo cercando la relazione tra una variabile indipendente e una dipendente. Quali altre variabili potrebbero rendere poco significativo il confronto tra numero di bolle? Potrebbe essere meglio paragonare l'andamento dei grafici?
- Costruire i grafici relativi ai dati ottenuti.



---

## APPROFONDIMENTO PER IL TRIENNIO

---

In rete abbiamo trovato alcuni spunti interessanti nei seguenti siti:

<http://www.nuffieldfoundation.org/print/2776>

[http://www.biologia.unipi.it/uploads/media/Laboratorio\\_2\\_-\\_Reazione\\_di\\_Hill\\_03.pdf](http://www.biologia.unipi.it/uploads/media/Laboratorio_2_-_Reazione_di_Hill_03.pdf)

La procedura sperimentale ci porta ad investigare sul legame esistente nel processo fotosintetico tra le reazioni dipendenti dalla luce e quelle indipendenti e si spinge in profondità nei meccanismi della fotosintesi ( si lavora infatti con un accettore di elettroni come il 2,6-diclorofenolo indofenolo come sostituto di NADP ).

Il DCPIP nella forma ossidata è blu, in quella ridotta è incolore. La reazione alla base dell'esperienza è la seguente:

luce, cloroplasti



La velocità del rilascio di ossigeno in cloroplasti isolati può venire quindi determinata per via strumentale misurando la perdita di colore blu a mano a mano che il DCPIP viene ridotto.

### Reagenti

- Soluzione  $1,1 \cdot 10^{-4}\text{M}$  di DCPIP in tampone fosfato
- Tampone Tricina

### Strumenti/ Vetreria

- Provette e portaprovette
- Pipetta da 10 mL e micropipette
- Mortaio e pestello
- Apparecchiatura per filtraggio a vuoto
- Centrifuga
- Spettrofotometro

## La reazione di Hill – studio per via spettrofotometrica

### Reagenti

- **Soluzione 1,1  $10^{-4}$ M di DCPIP in tampone fosfato**
- **Tampone Tricina**

### Materiali e strumenti

- **Provette e portaprovette**
- **Pipetta da 10 mL e micropipette**
- **Mortaino e pestello**
- **Apparecchiatura per filtraggio a vuoto**
- **Centrifuga**
- **Spettrofotometro**

### Isolamento dei cloroplasti

- Prendere 4 o 5 foglie di spinaci, eliminare le venature più grosse e pesare 1,5 g di lembo fogliare
- Sminuzzare e pestare in un mortaio per qualche minuto in 7,5 mL di tampone tricina freddo
- Filtrare sotto vuoto il contenuto del mortaio, usare al max 2,5 mL di tampone per lavare il mortaio
- Centrifugare per 5 min a 4000 xg e scartare il surnatante
- Lavare il precipitato due volte con 3 mL di soluzione tampone ciascuna, centrifugare ancora come sopra e risospendere il precipitato in 1,2 mL di tampone

#### Preparazione dei campioni

- Avvolgere una provetta in carta stagnola per impedire l'esposizione alla luce (provetta 2)
- Immettere in tre provette le seguenti quantità
  - Provetta 1: 5mL tampone tricina, 0,025 mL sospensione cloroplasti
  - Provetta 2 (avvolta in stagnola): 2,5 mL tampone tricina, 2,5 mL soluzione DCPIP, 0,025 mL soluzione cloroplasti
  - Provetta 3: 2,5 mL tampone tricina, 2,5 mL soluzione DCPIP, 0,025 mL soluzione cloroplasti
- Porre le provette in un becher da 3L esposto alla luce di lampade da 300 W. Far partire il cronometro: 15 minuti dopo si spengono le luci
- Si misura allo spettrofotometro l'assorbanza di ciascuna miscela a 575 nm, utilizzando l'acqua come bianco.

#### Elaborazione dei dati:

Si sottrae la densità ottica della miscela nella provetta 1 a quella delle altre (valore dovuto all'assorbimento da parte dei pigmenti verdi dei cloroplasti). Si calcola l'estinzione dell'assorbanza dovuta al DCPIP in 3 a confronto con 2 (in cui DCPIP è a concentrazione  $55\mu\text{M}$ )

---

## BIBLIOGRAFIA / SITOGRAFIA

---

B.Alberts et. Al, *Biologia molecolare della cellula*, Zanichelli, 2015

Per caratteristiche delle piante modello

<https://en.wikipedia.org/wiki/Cabomba/Elodea/Limnophila>

Per le procedure:

Biennio

[www.saps.org.uk](http://www.saps.org.uk)

<http://www.nuffieldfoundation.org/print/2776>

Triennio

[http://www.biologia.unipi.it/uploads/media/Laboratorio\\_2 - Reazione di Hill 03.pdf](http://www.biologia.unipi.it/uploads/media/Laboratorio_2_-_Reazione_di_Hill_03.pdf)