



Scienze Naturali e Ambientali

Laboratorio di ECOLOGIA **“Respiro dunque vivo”** **(Prof. Flora Angela Rutigliano)**

Introduzione

La respirazione cellulare è un processo fondamentale che accomuna quasi tutti gli esseri viventi: è il processo che trasferisce energia contenuta nei legami chimici dei composti organici all'ATP (adenosina trifosfato), il trasportatore universale di energia per gli organismi viventi che soddisfa le richieste energetiche delle cellule. È possibile pertanto determinare la vitalità di un sistema (organismo o insieme di organismi) verificando se e quanto respira.

La produzione di ATP durante la respirazione implica l'ossidazione di un composto organico, quale il glucosio, a molecole più semplici. In presenza di ossigeno, i prodotti finali della respirazione (detta “aerobica”) sono anidride carbonica (CO_2) ed acqua (H_2O). La respirazione può essere anche effettuata in assenza di ossigeno (respirazione “anaerobica”). Alcuni batteri possono, infatti, usare come accettori di elettroni alternativi all'ossigeno, alcuni composti inorganici ossidati, come il nitrato (NO_3^-) o il solfato (SO_4^{2-}), producendo comunque anidride carbonica. Pertanto, in ogni caso, la respirazione può essere stimata misurando la produzione di anidride carbonica da parte degli organismi. In assenza di ossigeno e di altri accettori di elettroni esterni, la produzione di ATP può avvenire anche mediante la “fermentazione”, un processo poco efficiente energeticamente che comporta un'ossidazione solo parziale dei composti organici, con produzione di molecole organiche più semplici e generalmente anidride carbonica.

Mentre piante e animali respirano utilizzando carboidrati presenti nei loro corpi (prodotti mediante la fotosintesi, nelle piante; ottenuti attraverso il cibo, negli animali), alcuni organismi microscopici, detti saprotrofi (batteri e funghi), possono invece respirare utilizzando sostanza organica morta (contenuta in corpi morti di piante, animali o microrganismi o loro parti) presente nel suolo o negli ambienti acquatici.

Obiettivo di questa esperienza è quello di verificare se un sistema apparentemente non vivente, il suolo, sia invece in grado di respirare, dimostrandoci che al suo interno vi siano organismi viventi (quali batteri, funghi e piccoli animali), sebbene la maggior parte di essi non sia visibile ad occhio nudo. A tale scopo sarà determinata la respirazione di campioni di suolo, precedentemente setacciati (maglia del staccio: 2 mm) per escludere pietre e radici delle piante, e saranno osservati al microscopio alcuni organismi che popolano il suolo (Fig. 1). L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) ha indicato la respirazione del suolo come uno degli indicatori di

“qualità del suolo” (ISPRA, 2008, “Indicatori di Biodiversità per la sostenibilità in Agricoltura”), laddove un suolo di buona qualità è un suolo in grado di funzionare in modo da assicurare un ambiente idoneo alla crescita delle piante e degli altri organismi che vivono in esso.

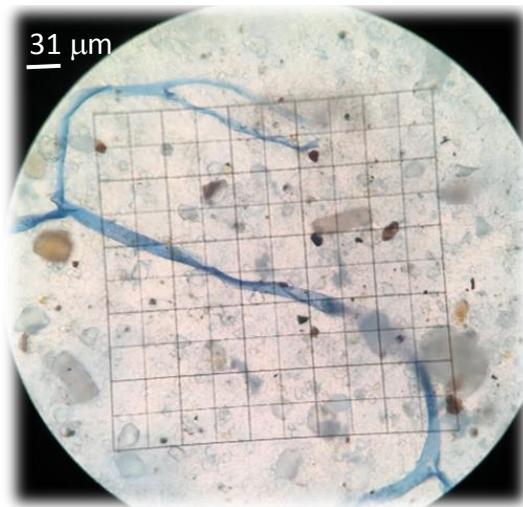


Fig. 1 – Ifa fungina estratta dal suolo e osservata al microscopio ottico.

Misura della respirazione del suolo

La respirazione del suolo dipende dallo stato fisiologico delle cellule e può essere influenzata da differenti fattori, quali la temperatura, il contenuto di acqua nel suolo e la disponibilità di substrato ossidabile, che influiscono sull'attività della comunità che vive nel suolo (“comunità edafica”). Un basso contenuto di acqua nel suolo può ridurre la respirazione di batteri e funghi, in quanto è in soluzione acquosa che questi microrganismi assorbono le sostanze necessarie al proprio metabolismo ed è in soluzione acquosa che avvengono tutti i processi metabolici.

Il metodo utilizzato si basa sull'incubazione di un campione di suolo all'interno di un barattolo a chiusura ermetica per un tempo definito, durante il quale l'anidride carbonica liberata dal suolo viene legata all'idrossido di sodio e successivamente determinata mediante una titolazione acido/base.

Occorrente

- 1) Campioni di suolo
- 2) Bilancia
- 3) Barattoli di vetro a chiusura ermetica
- 4) Capsuline
- 5) Beaker
- 6) Pipette graduate
- 7) Burette
- 8) Agitatori
- 9) Ancorette magnetiche
- 10) Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 M

- 11) Cloruro di bario (BaCl₂) 0,75 M
- 12) Acido cloridrico (HCl) 0,05 M
- 13) Indicatore (fenolftaleina)

Procedimento

Per la determinazione della respirazione del suolo viene utilizzato il Metodo Ufficiale n° II.1.1 del Supplemento Ordinario alla G.U. n° 61 del 13/3/2004. Il principio del metodo è quello di valutare l'evoluzione di CO₂ da parte di un campione di suolo incubato per un'ora all'interno di un barattolo chiuso ermeticamente. La CO₂ prodotta, intrappolata da una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) posta sul fondo del barattolo, viene determinata mediante una titolazione con acido cloridrico (HCl), previa aggiunta di cloruro di bario (BaCl₂) e dell'indicatore fenolftaleina.

Una quantità nota di suolo (5 g) viene pesata in una capsulina a sua volta posta all'interno di un barattolo a chiusura ermetica (Fig. 2A). Nello stesso barattolo viene anche introdotto un beaker contenente acqua per mantenere costante l'umidità del suolo e, sul fondo, 10 mL di una soluzione di NaOH 0,1 M (Fig. 2B). Parallelamente vengono allestite anche prove di bianco, utilizzando contenitori a chiusura ermetica preparati allo stesso modo, senza però la capsulina contenente il suolo. Tutti i contenitori vengono chiusi ermeticamente e lasciati in incubazione al buio per un'ora a 20°C (Fig. 2C). Durante l'incubazione la CO₂ prodotta dal suolo si lega all'NaOH formando il carbonato di sodio (Na₂CO₃; reazione 1). Dopo l'incubazione, vengono tolti dal barattolo la capsulina con il suolo e il beaker con l'acqua (avendo cura di sciacquarne le pareti esterne con acqua distillata) e vengono aggiunti 2 mL di BaCl₂ 0,75 M sul fondo del barattolo, in modo da trasformare il carbonato di sodio prodotto durante l'incubazione in carbonato di bario (BaCO₃; reazione 2), che è insolubile e precipita, non partecipando alla successiva reazione. Successivamente si effettua la titolazione con una soluzione di HCl 0,05 M, utilizzando 3-4 gocce dell'indicatore per titolazione acido-base fenolftaleina (che conferisce colore rosa fucsia alla soluzione), fino al viraggio del colore da rosa fucsia ad incolore (Fig. 2D, E). Durante questa reazione l'eccesso di idrossido di sodio che non ha reagito con la CO₂ durante l'incubazione viene titolato con HCl (reazione 3).



Il tasso di respirazione, cioè la quantità totale di C-CO₂ prodotta durante l'incubazione (un'ora), viene calcolato secondo la seguente equazione:

$$\text{mg C-CO}_2 \text{ g s.s.}^{-1} \text{ h}^{-1} = \frac{(V_0 - V) \times M \times E}{P_s}$$

dove:

g s.s.= grammi di suolo (espresso come peso secco)

h: tempo di incubazione (espresso in ore)

V₀ = mL di HCl utilizzati per la titolazione del bianco

V = mL di HCl necessari per titolare il campione

M = 0,05 - Molarità del titolante HCl

E = Peso equivalente del carbonio¹ della CO_2 = 6

Ps.: peso di suolo secco utilizzato (corrispondente a 5 g di suolo fresco)

¹ Rapporto tra massa molare del C (=12) della CO_2 e numero di ioni H^+ che il C può scambiare nelle reazioni acido/base.

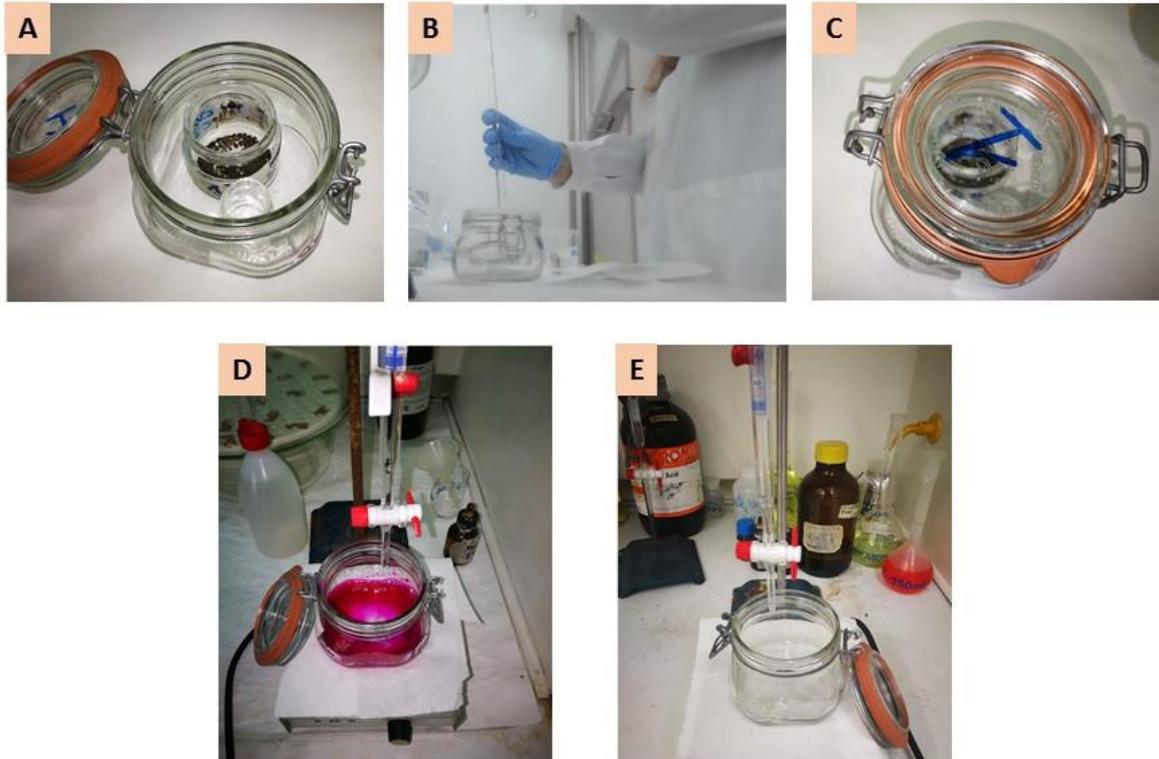


Fig. 2 – Le diverse fasi della misura di respirazione del suolo: A) sistemazione della capsulina contenente il suolo e del beaker contenente acqua all'interno del barattolo a chiusura ermetica; B) aggiunta di idrossido di sodio sul fondo del barattolo; C) chiusura del barattolo da incubare per un'ora al buio; D) titolazione con acido cloridrico, previa aggiunta di cloruro di bario e dell'indicatore fenolftaleina; E) viraggio dell'indicatore.