

NOM

PRENOM

Groupe



Licence de Biologie – L2-Semestre 3

SAE Physiologie Végétale

Travaux pratiques

Equipe pédagogique

Enseignants :

Sophie BOUTON (sophie.bouton@u-picardie.fr)

Jean-Marc DOMON (jean-marc.domon@u-picardie.fr)

Catherine RAYON (catherine.rayon@u-picardie.fr), responsable de la SAE

Responsable de la préparation des TP : My-Tuyen Le

SOMMAIRE

	Page
Recommandations.....	3
TP1 : LES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES.....	4
TP2 : LES ECHANGES GAZEUX.....	8
TP3 : LA NITRATE REDUCTASE.....	13
TP4 : EXAMEN TP	

RECOMMANDATIONS

Les séances des travaux pratiques sont obligatoires.

En cas d'impossibilité d'assister à la séance :

- Contacter l'enseignant qui vous permettra de suivre une séance avec un autre groupe.
- Aucun changement de groupe ne sera possible sans justificatif.
- Les **blouses** sont obligatoires pour des raisons de sécurité.
- **Votre zone de travail en salle de TP doit rester propre.**

Vous devez lire le TP avant de venir assister à la séance de TP.

Un contrôle écrit de 10 min aura lieu en début de chaque séance de TP.

Un contrôle individuel d'une durée de 1h30 se déroulera lors de la séance 4.

L'ensemble de ces notes constituera la note finale de TP de la session 1.

TP n°1 : LES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES

1) OBJECTIF DE LA MANIPULATION

L'objectif de ce TP est de caractériser les pigments photosynthétiques (i) en les séparant par chromatographie sur papier et (ii) en mesurant leur spectre d'absorption à la lumière blanche au spectrophotomètre.

2) SEPARATION DES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

2-1) PRINCIPE

La chromatographie est une technique de séparation qui présente une phase mobile qui entraîne la migration différentielle des molécules d'un mélange d'intérêt à partir d'une zone initiale pourvue de propriétés adsorbantes (phase stationnaire). Une solution d'extrait chlorophyllien est déposée sur la zone initiale du support chromatographique. Le support chromatographique est ensuite mis au contact de la phase mobile qui est constitué d'un mélange de solvants organiques (non-miscibles dans l'eau). Les divers pigments photosynthétiques (chlorophylle a, b, xanthophylles et carotènes), liposolubles, vont être séparés sur leur différence de solubilité dans ces solvants non-miscibles. Une fois la migration terminée, plusieurs tâches colorées apparaissent sur le chromatogramme, correspondantes aux différents pigments photosynthétiques. Cette méthode qualitative permet ainsi un suivi visuel de la migration des pigments photosynthétiques.

2-2) MATERIEL

- Feuilles d'épinard
- Mortier, sable de Fontainebleau, carbonate d'ammonium, sulfate de sodium éprouvettes de 50 et 500 mL, gaze, entonnoir, papier filtre Whatman (3 X 27 cm), plastique noir, bouchon de liège avec tige en métal.
- Acétone 80%, mélange de solvants (85% Ether / 10% Acétone / 5% Hexane ; v/v/v) sous la sorbonne.

2-3) PROTOCOLE

Attention : ne pas utiliser d'eau pour rincer le matériel au cours de cette expérience, utiliser du papier absorbant

a- Extraction globale des pigments

- Broyer dans un mortier **4 à 5 g de feuilles du matériel végétal fourni** préalablement coupées en petits morceaux avec un peu de **sable de Fontainebleau** (cela améliore le broyage).

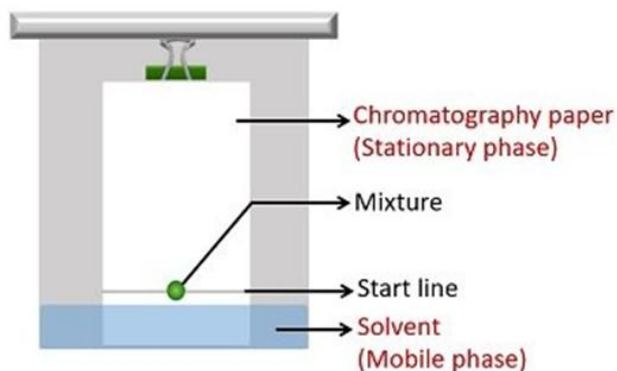
- Ajouter **30 mL d'acétone à 80 %** avec une **spatule de sulfate de sodium** et une spatule de **carbonate d'ammonium**. Le sulfate de sodium permet d'éliminer une partie de l'eau de l'échantillon et donc favorise une meilleure action du solvant. Le carbonate d'ammonium neutralise les acides organiques présents dans les vacuoles préservant ainsi l'intégrité des pigments.
- Broyer pendant 3 minutes.
- Laisser reposer quelques instants puis filtrer dans l'éprouvette 50mL.

b- Séparation des pigments par chromatographie papier

- Prendre une bande de papier filtre Whatman (3 X 27 cm) tout en prenant soin de ne toucher avec vos doigts que le haut de ce papier.
- Tracer un trait fin avec un crayon à papier à 2,5-3 cm de la base.
- Déposer **3 x 10 μ L de l'extrait brut au centre de la zone de dépôt. Sécher à l'aide du sèche cheveu entre chaque dépôt.**
- Verser 15 mL d'un mélange de solvants (phase mobile : 85% Ether / 10% Acétone / 5% Hexane ; v/v/v) sous la sorbonne.
- Accrocher la bande de papier au bouchon et la placer dans l'éprouvette graduée (500 mL), la base du papier devant baigner dans le mélange de solvants.
- Couvrir l'éprouvette avec un opacifiant (plastique noir) et **observer après 90 à 120 min.** de migration.

Résultats

- Retirer la bande et observer le chromatogramme obtenu. Il présente une succession de taches de formes et de couleur différentes qui correspondent à (de bas en haut) : chlorophylle b (vert olive), chlorophylle a (vert bleuâtre) mélange de xanthophylles non séparés (jaune) et de carotènes (jaune-orangé).
- Dessiner le contour des taches.
- Evaluer la distance de migration (calculer le facteur de rétention) pour chacun des pigments séparés.
- En déduire les pigments présentant le plus d'affinité pour la phase mobile et justifier?



<https://biologyreader.com/separation-of-plant-pigments-by-paper-chromatography.html>

R_f (facteur de rétention) = distance parcourue par le pigment/ la distance parcourue par le solvant (front du solvant)

c- Estimation de la concentration en chlorophylles *a* et *b* dans l'extrait brut

- Diluer au 1/10^{ème}, l'extrait directement dans la cuve spectrophotomètre en verre (Vol. final 3 mL). Faire le blanc avec l'acétone 80%
- Mesurer l'absorbance de cet extrait au spectrophotomètre aux longueurs d'onde suivantes : 646 et 663 nm
- Calculer les concentrations en Chl*a* et *b*
$$\text{Chl}a (\mu\text{g/mL}) = 12,18 \times A_{663} - 2,36 \times A_{646}$$
$$\text{Chl}b (\mu\text{g/mL}) = 20,19 \times A_{646} - 4,59 \times A_{663}$$
- Calculer le ratio Chl*a*/Chl*b*. En déduire la chlorophylle majoritaire.

3) IDENTIFICATION DES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES PAR SEPARATION DE PHASE - SPECTRE D'ABSORPTION

3-1) PRINCIPE

La séparation de phase permet de séparer les pigments photosynthétiques (chlorophylles, xanthophylles et carotènes) en fonction de leur caractère hydrophile (polaire) ou lipophile (apolaire). En effet, certains pigments possèdent des groupements esters (chlorophylles) ou des structures de type hydrocarbure (carotènes) ce qui les rendent ainsi solubles dans les solvants apolaires (Ether de Pétrole). D'autres pigments présentent des fonctions hydroxyles (xanthophylles) qui sont hydrophiles permettant ainsi leur solubilisation dans les solvants polaires (Ethanol). Les pigments absorbent des radiations lumineuses spécifiques. Les caroténoïdes absorbent dans la région bleue-verte (400-500 nm). Les chlorophylles absorbent dans le rouge (646 nm (chl*a*), 663 nm (chl*b*)) et dans le bleu (372 nm (chl*a*) et 392 nm (chl*b*)).

3-2) MATERIEL

- Extrait global des pigments obtenu en première partie du TP, fioles coniques avec bouchons, pipettes en verre, tubes à essai avec bouchon à vis
- Ether de pétrole (sous la hotte), potasse alcoolique 5N à 5%
- Spectrophotomètre, cuves en verre

3-3) PROTOCOLE

Attention : ne pas utiliser d'eau pour rincer le matériel au cours de cette expérience, utiliser du papier absorbant

a- Séparation de phase

Etape 1 :

- Verser 10 mL de filtrat (**extrait brut, partie 1 du TP**) dans une fiole conique. Ajouter 10 mL d'éther de pétrole, boucher puis agiter doucement de façon continue pendant 3 minutes par un mouvement de rotation en dégazant 2 fois pendant les 30 premières secondes.
- Verser dans un tube à essai et laisser décanter 3 minutes.

Observations :

Deux phases liquides se séparent :

Phase supérieure verte foncée (Ether, phase organique) : chlorophylles, carotènes et xanthophylles

Phase inférieure jaune (Acétone, phase aqueuse) : divers composés hydrosolubles

Etape 2 :

- Recueillir dans une fiole conique à l'aide d'une pipette, 5 mL de la phase supérieure. Ajouter 5 mL de solution alcoolique de potasse 5N à 5%.
- Laisser reposer quelques minutes.
- Verser lentement 5 mL d'éther de pétrole.
- Agiter doucement pendant 3 minutes.
- Transvaser dans un tube à essai puis laisser décanter pendant 5 minutes.

Observations :

Deux phases liquides se séparent :

Phase supérieure jaune (Ether, phase organique) : caroténoïdes

Phase inférieure vert (Alcool, phase aqueuse) : chlorophylles

L'utilisation de la potasse (KOH) permet la saponification des fonctions esters des chlorophylles les rendant ainsi solubles dans les solvants aqueux (l'éthanol)

Etape 3 :

- Recueillir dans une fiole conique à l'aide d'une pipette, 3 mL de la phase supérieure.
- Ajouter 3 mL de solution alcoolique de potasse 5N à 5%.
- Ajouter 3 mL d'Ether de Pétrole
- Agiter doucement pendant 3 minutes.
- Transvaser dans un tube à essai puis laisser décanter pendant 3 minutes.

PS/ Si le volume de la phase supérieure à prélever, est inférieur à 3 mL, alors prélever 2 ou 2,5 mL et ajuster les volumes de solution alcoolique et celui d'Ether de Pétrole.

Observations :

Deux phases se séparent :

Phase supérieure jaune paille (Ether, phase organique) : carotènes

Phase inférieure jaune clair (Alcool, phase aqueuse) : xanthophylles

c- Observation d'un spectre d'absorption de la lumière blanche

La lumière blanche est composée de différentes radiations visibles dont la longueur d'onde varie de 350 nm à 750 nm. Les différents pigments n'absorbent pas à la même longueur d'onde de la lumière visible. Un spectre d'absorption des différents pigments sera réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre.

Vous réaliserez un spectre d'absorption des chlorophylles.

La solution de chlorophylles (prélever 300 µL) sera diluée au 1/10ème avec de la potasse alcoolique 5N à 5% (vol. final 3 mL). Le blanc sera de la potasse alcoolique. Dessinez/prenez une photo des différentes courbes d'absorption obtenues.

Vous réaliserez également celui des carotènes (ne pas diluer). Le blanc sera alors de l'éther de pétrole

TP n°2 : LES ECHANGES GAZEUX

1) OBJECTIF DE LA MANIPULATION

L'**objectif du TP** est de mettre en évidence (i) que le dégagement de dioxygène au cours de la photosynthèse nécessite un accepteur d'électrons (Réaction de Hill) et (ii) la production de dioxygène chez une plante aquatique, l'Elodée, à l'aide d'un oxymètre et la variation du dioxygène chez cette plante, en fonction de l'intensité lumineuse.

2) MISE EN EVIDENCE DE LA PHOTOLYSE DE L'EAU : LA REACTION DE HILL

2-1) PRINCIPE

Cette expérience (accomplie en 1939 par R. Hill) permet de séparer expérimentalement le dégagement d'O₂, c'est-à-dire la **réaction photochimique de l'oxydation de l'eau**, de celle de la fixation du CO₂.

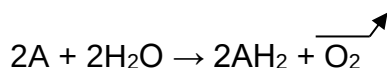
Robert Hill montre expérimentalement que le dégagement d'O₂, en présence de lumière lors de la photosynthèse, est la **conséquence d'une réaction d'oxydoréduction**.



<https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fwww.saburchill.com%2FIBbiology%2Fchapters01%2Fimages%2F11010335.jpg>

Le principe consiste donc à obtenir la première réaction seule grâce à un accepteur artificiel d'électrons. L'accepteur d'électrons utilisé par Hill était le ferricyanure de potassium.

Des chloroplastes isolés peuvent produire du dioxygène à la lumière en présence d'un oxydant (l'accepteur d'électrons = A) et en absence de CO₂.



Cette photodécomposition de l'eau peut aussi être mise en évidence par l'utilisation d'un **autre accepteur artificiel d'électrons**, le **2,6-dichlorophénol indo-phénol (DCPIP)** car sa réduction s'accompagne d'un changement de couleur.

Nous étudierons donc la vitesse de **réduction du DCPIP**, qui a la propriété d'être bleu sous sa forme oxydée et qui se décolore à l'état réduit, **en présence de différentes**

quantités de chloroplastes, organites contenant la chaîne photosynthétique indispensable à la réaction photochimique.

Le DCPIP présente des caractéristiques d'absorption au spectrophotomètre différente selon son état d'oxydo-réduction. La courbe de réduction du colorant est obtenue en mesurant en fonction du temps la diminution de l'absorbance (D.O.) d'une solution de DCPIP à 600 nm.

Certains composés couramment employés en tant qu'herbicides (atrazine, Diuron) sont **des inhibiteurs puissants de la réaction de Hill**. On utilisera le 3,4-dichlorophényl-1,1-diméthyl-urée (**DCMU**, appellation commerciale, Diuron) pour étudier ce type de réaction.

2-2) MATERIEL

1 microtube contenant une suspension de chloroplastes feuilles d'épinard déjà préparé ; 1 microtube contenant du DCMU (0,5 mM dans EtOH 95%) ; un flacon (en verre à bouchon bleu) contenant le tampon réactionnel ou TR (Na_2HPO_4 anhydre 0,2 M, KH_2PO_4 0,1 M, KCl 80 mM, Saccharose 0,5 M, Albumine bovine 0.1%, pH 7,5) ; un microtube contenant le DCPIP (sous sa forme oxydée, 1% dans H_2O) ; pot à bouchon rouge contenant du sulfite de sodium ; 8 tubes à Hémolyse ; Pipettes et pointes ; Becher en inox ; Spectrophotomètre et cuves en plastique.

2-3) PROTOCOLE

- Préparer 8 tubes à hémolyse et les numéroter comme il est présenté dans le tableau ci-dessous.
- Ajouter dans l'ordre suivant :

Tube N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Tube	50	100	150	Obs	DCMU	B 50	B 100	B 150
Tampon TR (en mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
DCPIP (en μL)	10	10	10	10	10	10	10	10
					DCMU 10 μL	Sulfite de sodium	Sulfite de sodium	Sulfite de sodium
Extrait Chloroplastes (en μL)	50	100	150	100	100	50	100	150

B50, B100 et B150 : Blancs servant à calibrer le spectrophotomètre avant de mesurer respectivement l'échantillon 50, 100 et 150

- Bien mélanger le contenu des tubes.
- Verser dans des cuves spectrophotomètres (Remplir au 2/3 max.)
- Placer la cuve Obs.(obscurité) sous un Becher inox.
- **Pour les blancs uniquement, mettre quelques cristaux de sulfite de sodium** (puissant réducteur) dans les tubes à hémolyse avant de verser dans les cuves.
- Faire une mesure pour tous les échantillons (faire toujours le zéro avec le blanc correspondant). On obtient alors une D.O. à T=0 minute.

- Placer les cuves à la lumière (sauf Obs.) et **suivre la cinétique de décoloration du DCPIP, donc de sa réduction, à la lumière, à l'obscurité ou en présence d'un inhibiteur de la photosynthèse (DCMU).**
- Faire des mesures tous les 5 min pendant 20 minutes et noter la D.O. pour chacun des points de cinétique.
- **N'oublier pas de régler toujours le 0 avec le blanc** correspondant au volume de chloroplastes, avant chaque mesure des échantillons.
- **Tracer les courbes à partir des valeurs obtenues dans chaque condition donnée : $f(\text{temps}) = \text{DO}$.**

3) MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION DU DIOXYGENE AU COURS DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ UNE PLANTE AQUATIQUE - INFLUENCE DE L'INTENSITE LUMINEUSE

Une plante produit du dioxygène (O_2) à la lumière en présence de carbone :



Il est possible d'évaluer quantitativement la photosynthèse en mesurant la concentration en dioxygène produit par la plante

3-1) PRINCIPE

Une plante aquatique, l'Elodée, est plongée dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (source de CO_2). La plante est placée sous différentes conditions lumineuses et la quantité de dioxygène produite par la plante est mesurée, à l'aide d'une électrode à oxygène. Cette production en dioxygène correspond à la photosynthèse nette (P_n).

3-2) MATERIEL

- Elodées
- Solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 1%
- Agitateur magnétique, oxymètre, feuille de papier aluminium, barreau aimanté

Pour mesurer le dégagement d' O_2 , on utilise une électrode à oxygène qui transmet un courant proportionnel à la quantité d' O_2 présent dans le milieu.

L'électrode à oxygène ou sonde de Clark (Figure 1) est formée d'une cathode en or ou en platine, et d'une anode en argent reliée par une solution de KCL conductrice, l'électrolyte. L'ensemble électrodes/électrolyte est isolé du milieu extérieur par une membrane de polyéthylène ou de PTFE (Poly-Tétra-Fluoro-Ethylène = Téflon®) perméable à l'oxygène mais totalement imperméable aux ions et à l'eau. Lorsque l'on impose une différence de potentiel constante entre ces deux électrodes, le courant électrique qui circule est alors directement proportionnel à la quantité de dioxygène dissous dans l'électrolyte. Ce très faible courant est amplifié puis converti en une valeur de concentration en O_2 dissous (mg/L).

Ainsi, l'oxygène contenu dans la solution va diffuser à travers la membrane ce qui va modifier la conductivité de l'électrolyte par suite d'une action de réduction de l'O₂ au niveau de la cathode générant le passage d'un courant électrique.
La mesure du courant sera donc significative de la teneur en oxygène de l'eau.

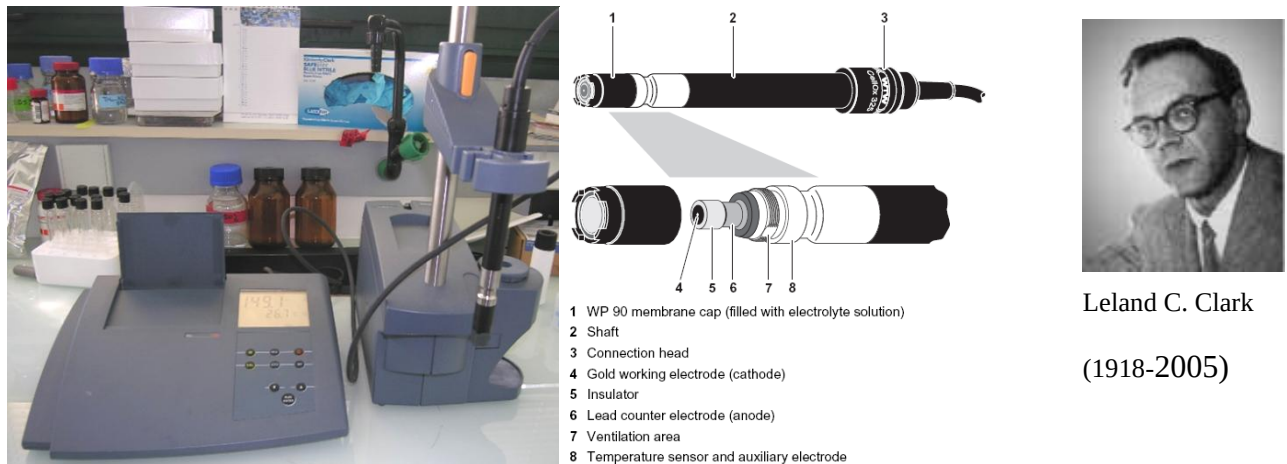


Figure 1 : Oxymètre (Inolab, oxy730)- Détail d'une Sonde oxymétrique (Clark) CelloX® 325

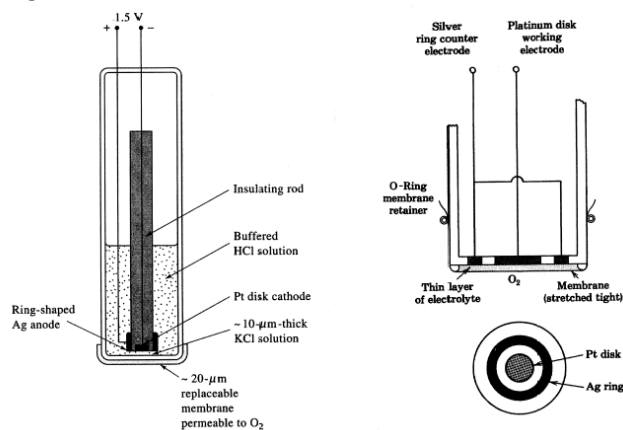


Figure 25-15 The Clark voltammetric oxygen sensor. Cathode reaction: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$. Anodic reaction: $Ag + Cl^- \rightarrow AgCl(s) + e^-$.

Fig. 29.25 Schematic diagram of oxygen electrode. (a) Cross-sectional view. (b) View of electrode assembly from bottom.

3-3) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- La fiole contient une **solution d'hydrogénocarbonate à 1%**.
- Plonger **délicatement** l'électrode dans la fiole à vide qui contient un barreau aimanté
- Prélever une tige feuillée de 10 cm et la plonger dans la fiole
- Couvrir avec du parafilm pour rendre l'ensemble hermétique
- Démarrer doucement l'agitation (**Ne pas mettre en contact l'électrode et le barreau aimanté !!**)
- L'appareil de mesure est déjà calibré.

Mesures

- Réaliser les cinétiques de la teneur en O₂ en fonction des conditions lumineuses suivantes :

- 1) Obscurité (couvrir la fiole avec du papier aluminium)
- 2) Une lampe allumée, placée à 20 cm des Elodées
- 3) Deux lampes allumées, placées unilatéralement, à 20 cm des Elodées

Pour chaque condition :

- Laisser un temps de latence de **1 minute** avant de relever les mesures **pendant 15 minutes** à raison d'une mesure/ minute.
- Poursuivre l'enregistrement pendant 15 autres minutes, en allumant la seconde lampe, placée juste à côté de la première lampe.

Temps (Minute)	Concentration O ₂ (mg/L)
Lampes éteintes + papier Aluminium (obscurité)	
T0	
T1	
T2	
T3	
T4	
T5	
T6	
T7	
T8	
T9	
T10	
T11	
T12	
T13	
T14	
T15	

Temps (Minute)	Concentration O ₂ (mg/L)
1 Lampe allumée (Faible intensité lumineuse)	
T0	
T1	
T2	
T3	
T4	
T5	
T6	
T7	
T8	
T9	
T10	
T11	
T12	
T13	
T14	
T15	

Temps (Minute)	Concentration O ₂ (mg/L)
2 Lampes allumées (Forte intensité lumineuse)	
T0	
T1	
T2	
T3	
T4	
T5	
T6	
T7	
T8	
T9	
T10	
T11	
T12	
T13	
T14	
T15	

3-4) EXPRESSION DES RESULTATS

- 1) Tracer sur un même graphe les 3 courbes (concentration en O₂ (mg/L) = f (intensité lumineuse))
- 2) Déterminer l'intensité photosynthèse nette (P_n), la respiration à l'obscurité (R_O) en calculant la pente de chaque courbe à la lumière (P_n) ou à l'obscurité (R_O). En déduire la respiration à la lumière (R_L) et la photosynthèse brute (cf TD 2).
- 4) Conclure ?

TP n°3 : LA NITRATE REDUCTASE

1) OBJECTIF DE LA MANIPULATION

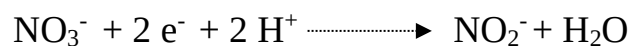
Cette manipulation, adaptée des travaux de BILLARD et LANGLOIS (1986), a pour but de déterminer l'activité de la NR de feuilles de blé provenant de plantules cultivées dans des conditions différentes ; en présence ou en absence de nitrate et à l'obscurité ou non pendant 24 h après une semaine de culture à la lumière.

L'objectif sera de mettre en évidence l'impact du nitrate et de la lumière sur l'activité de la nitrate réductase.

2) DETERMINATION *IN VIVO* DE L'ACTIVITE NITRATE REDUCTASE

2-1) PRINCIPE

L'activité NR est mesurée en dosant les nitrites présents dans les feuilles (d'après une courbe étalon réalisée avec des concentrations connues en NO_2^-) après pénétration dans les tissus foliaires de nitrates d'un milieu d'incubation et l'efflux total des nitrites produits par ces tissus.



2-2) MATERIEL VEGETAL

a – Conditions de culture

Des grains de blé sont semés sur de la vermiculite imbibée de solution nutritive de Homes (riche en nitrate et dépourvue d'ammonium) ou seulement imbibée avec de l'eau. Après deux jours, le couvercle des containers est enlevé et les jeunes plantes sont utilisées après une semaine de culture.

- en présence de nitrate ; 1 semaine à la lumière puis 24 h à l'obscurité
- en présence de nitrate ; 1 semaine à la lumière
- en absence de nitrate (eau) ; 1 semaine à la lumière

b – Préparation du matériel végétal

Les analyses sont réalisées sur du matériel « frais », récolté au moment de la manipulation. Les plantes sont coupées au ciseau près du « sol », environ 300 mg sont utilisés par échantillon (pesée précise à la balance de précision puis découpage en morceaux d'environ 1 cm). Chaque échantillon est placé dans un tube Falcon renfermant 5 mL de milieu d'incubation que l'on ne bouchera pas (composition du milieu d'incubation : nitrate de potassium KNO_3 150 mM dans propanol-1 3% (v/v) tampon phosphate 100 mM, pH 7,5).

2-3) PROTOCOLE

a – Infiltration des échantillons

La pénétration du nitrate du milieu d'incubation dans les tissus foliaires et l'efflux du nitrite produit dans ces tissus sont assurés par la combinaison d'une infiltration sous vide et d'un traitement chimique au propanol-1 contenu dans le milieu d'incubation. Ces conditions expérimentales conduisent à un efflux total du nitrite, la perméabilité membranaire au mouvement du nitrate étant accrue.

L'infiltration est réalisée en mettant les tubes (sur le portoir) dans une cloche reliée à une pompe à vide 4 fois 1 minute.

b– Incubation des échantillons

Une incubation de 30 min (bain-marie 30°C, obscurité) est réalisée pour 2 des échantillons préparés (E₁ et E₂). Les deux autres lots non incubés sont utilisés comme témoins (T₁ et T₂).

Aussitôt après l'incubation des échantillons E₁ et E₂ ou immédiatement après l'infiltration pour les témoins, la réaction enzymatique est stoppée en portant très brièvement (5 min) le contenu des tubes à ébullition au bain-marie à 95°C.

Après refroidissement, une fraction aliquote de 2 mL sera prélevée dans chacune des fioles à vide (E₁ et E₂, T₁ et T₂) afin de déterminer la teneur en nitrites.

c – Dosage colorimétrique de la production de nitrites

Préparation de la gamme étalon

Avant d'effectuer le dosage des nitrites présents dans les échantillons, il est nécessaire de préparer des solutions à doser renfermant des concentrations connues de NO₂⁻. A partir d'une solution mère contenant 2 µg/mL de NO₂⁻ (PM 46 g/mol), préparer dans des tubes à hémolyse des solutions ayant des concentrations de 0 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 et 2 µg/mL de nitrite. Le volume final de chaque solution de la gamme sera de 5 mL.

[NO ₂ ⁻] µg/mL	0	0,25	0,5	1	2
Vol NO ₂ ⁻ (mL)	0				
Vol eau (qsp 5 mL)	5				
DO à 520 nm					

Mesures des densités optiques

Dans des tubes à hémolyse, déposer avec précision 2 mL des solutions d'incubation ou de la gamme étalon de nitrite. Ajouter ensuite, dans l'ordre et à l'aide d'une pipette, 1 mL de réactif de GRIESS I et 1 mL de réactif de GRIESS II. Chaque tube est ensuite fermé puis agité par renversement. Attendre 10 min, à température ambiante, l'apparition de la coloration rosée due à la formation d'un complexe azoïque.

Déterminer les Densités Optiques (DO) au spectrophotomètre (à 520 nm) en utilisant des cuves de trajet optique de 1 cm.

d – Expression des résultats

Après vérification de vos résultats, inscrivez au tableau vos valeurs d'absorbance.

En utilisant les absorbances obtenues à partir des solutions d'étalonnage, tracer une courbe en plaçant en abscisse les concentrations de NO₂⁻ en µg/mL de solution et en ordonnées les DO correspondantes. Utiliser ce graphique pour déterminer la concentration en NO₂⁻ des solutions d'incubation des tubes E. Exprimer l'activité NR en µg de NO₂⁻ produit par gramme de matière fraîche et par heure (µg NO₂⁻/g MF/h). Conclure par rapport à l'objectif du TP.

3) DONNEES PRATIQUES

Réactif de GRIESS I :

Acide sulfanilique 0.5 g

Acide acétique 50 mL

Eau distillée qsp 100 mL

Réactif de GRIESS II :

alpha-naphtylamine 0.2g

acide acétique 50 mL

eau distillée qsp 100 mL

Solution mère de nitrite de sodium 2 µg/mL dans propanol-1 3% (v/v) tampon phosphate