

Coltivazione della **Spirulina** (*Arthrospira platensis*)

Obiettivo Far crescere in laboratorio il cianobatterio *Arthrospira platensis*, meglio conosciuto con il nome di Spirulina, al fine di osservarne le caratteristiche morfologiche.

Autore Liceo Scientifico Filippo Buonarroti di Pisa
Primo classificato Mad for Science 2020
Progetto “Enjera con Spirulina”



Materiali e reagenti

- Coltura starter di Spirulina
- Componenti del terreno Zarrouk (vedi procedimento)
- Soluzione 1M di NaOH
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Spatole
- Acqua deionizzata
- Cilindro graduato da 1L
- Bacchetta di vetro



Strumenti

- Cappa chimica
- Vasca di un acquario
- Riscaldatore per acquario
- Aeratore per acquario
- Lampada per acquario con fotoperiodo
- Lastra di plastica o pellicola trasparente
- Bilancia
- pHmetro
- Termometro digitale



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Occhiali di protezione



Tempo

Un'ora circa per la preparazione dell'acquario e del terreno di coltura
2-3 settimane per l'adattamento e la crescita della Spirulina



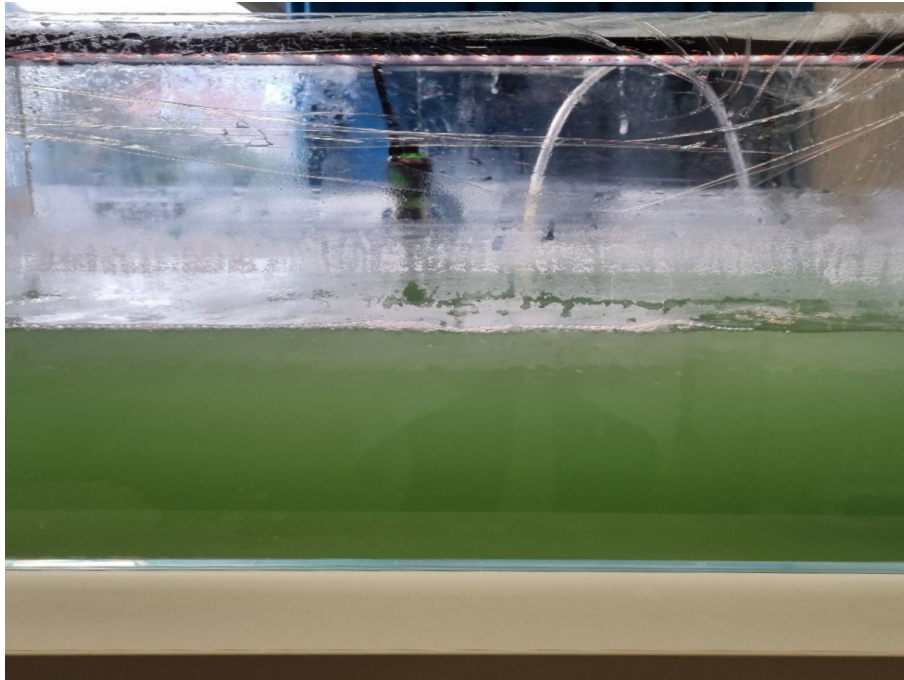
Procedimento

- 1.** Assemblare l'acquario in cui far crescere la Spirulina:
 - collocare la vasca dell'acquario su una superficie piana e solida (ad esempio, un banco da laboratorio), e, se possibile, vicino ad una finestra;
 - inserire nella vasca dell'acquario il riscaldatore, impostato a una temperatura di 30-31°C, e il tubo dell'aeratore;
 - posizionare sulla sommità della vasca dell'acquario una lampada, impostata con fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio;
 - chiudere la vasca dell'acquario con una lastra di plastica o con pellicola trasparente per impedire l'ingresso della polvere.
- 2.** Preparare il terreno Zarrouk per la crescita della Spirulina:
 - con un cilindro graduato misurare e trasferire nella vasca dell'acquario 20L di acqua deionizzata. Adeguare il volume di acqua alle dimensioni dell'acquario a disposizione;
 - sotto cappa chimica, pesare ogni componente del terreno di crescita della Spirulina, secondo le quantità riportate nella tabella sottostante. Adeguare proporzionalmente le quantità delle polveri al volume d'acqua inserito nell'acquario;
 - trasferire le polveri direttamente nell'acqua dell'acquario e mescolare bene la soluzione con una bacchetta di vetro;
 - misurare il pH del terreno di coltura, che deve registrare un valore compreso tra 9 e 9.5, direttamente nella vasca dell'acquario. Se necessario tamponare il terreno con una soluzione 1M di NaOH.
- 3.** Versare la coltura starter di Spirulina (200 ml per 20L di terreno) direttamente nell'acquario.
- 4.** La Spirulina impiega circa 7-10 giorni ad adattarsi (fase di latenza) per poi iniziare a moltiplicarsi. La fase esponenziale della crescita della Spirulina è riconoscibile dal cambiamento del colore del terreno di coltura in cui è immersa: si noterà un viraggio verso un verde sempre più intenso (vedi immagine). Al contrario, quando le cellule iniziano a morire la soluzione di crescita scolorisce e ritorna alla colorazione iniziale chiara.

COMPONENTI DEL TERRENO ZARROUK	GRAMMI PER 1L DI TERRENO	GRAMMI PER 20L DI TERRENO
NaHCO ₃	18 g	360 g
NaNO ₃	2.5 g	50 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g	10 g
K ₂ SO ₄	1 g	20 g
NaCl	1 g	20 g
CaCl ₂	0.04 g	0.8 g
Na ₂ EDTA	0.08 g	1.6 g
MgSO ₄ eptaidrato	0.2 g	4 g
FeSO ₄ eptaidrato	0.01 g	0.2 g
H ₃ BO ₃	2.86 g	57.2 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.02 g	0.4 g
MnCl ₂ tetraidrato	1.8 g	36 g
Cu ₂ SO ₄	0.08 g	1.6 g
ZnSO ₄ eptaidrato	0.22 g	4.4 g

5. Durante tutto il periodo di coltura della Spirulina, è necessario rispettare alcune importanti condizioni di crescita:

- mantenere la coltura ad una temperatura di 30-31°C, utilizzando un riscaldatore per acquari. Con un termometro digitale, 2-3 volte a settimana, controllare che la temperatura di crescita della Spirulina non subisca variazioni;
- illuminare la coltura con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio;
- garantire l'adeguato apporto di ossigeno, mediante l'azione dell'aeratore;
- in caso di evaporazione evidente, aggiungere acqua deionizzata e l'adeguata quantità di tutte le componenti del terreno Zarrouk (da calcolare proporzionalmente al volume di acqua aggiunto), al fine di ripristinare i nutrienti consumati dal cianobatterio. Misurare il pH in modo da mantenere valori compresi tra 9 e 9.5.



Coltura di Spirulina in acquario.

6. Procedere con l'analisi microscopica delle caratteristiche strutturali e morfologiche della Spirulina, secondo il protocollo "Osservazione della Spirulina al microscopio ottico" nella sezione "Microscopia e istologia".

Note

- *Arthrospira platensis*, o *Spirulina*, è un batterio filamentoso Gram negativo appartenente alla classe dei cianobatteri e, quindi, in grado di compiere la fotosintesi. In particolare, *Arthrospira platensis* è un batterio fotoautotrofo, per cui grazie all'energia della luce solare converte anidride carbonica ed acqua in zuccheri. Quindi, il fattore più importante per la crescita della *Spirulina* è proprio la presenza di luce.
- I filamenti di *Spirulina* appaiono di colore verde perché le sue cellule contengono clorofille e altri pigmenti per eseguire la fotosintesi.
- L'acqua per la crescita della *Spirulina* deve essere priva di cloro: non utilizzare l'acqua del rubinetto.
- Si consiglia di posizionare la vasca dell'acquario vicino ad una finestra: in caso di rottura della lampada con fotoperiodo, la coltura di *Spirulina* continuerebbe a svolgere la fotosintesi sfruttando la luce solare.
- Non utilizzare il depuratore per acquari, perché la filtrazione potrebbe danneggiare la *Spirulina*.
- Leggere attentamente le schede di sicurezza di ogni componente del terreno Zarrouk e attuare le adeguate misure di sicurezza.
- Il terreno Zarrouk è costituito principalmente da bicarbonato di sodio per creare un ambiente basico a pH 9-9.5, poiché in natura la *Spirulina* cresce in laghi salati, caratterizzati da acque calde e alcaline. Il pH basico della coltura, oltre a favorire la crescita della *Spirulina*, evita anche la contaminazione da parte di altri batteri.
- La coltura starter di *Spirulina*, usata per questo protocollo, è una coltura viva, che viene acquistata online da siti di e-commerce non specializzati e spedita in 100 ml di terreno di coltura, funzionale per la crescita di *Spirulina* in acquari da 10L. Per questo protocollo, sono state acquistate due confezioni di coltura starter per la crescita in 20L di terreno di coltura.
- La coltura starter di *Spirulina* viene spedita al buio, per cui arriva a destinazione di colore scuro e sofferente. Prima di procedere alla crescita di *Spirulina* in acquario si consiglia di mescolare la coltura starter, capovolgendo alcune volte la confezione in cui la *Spirulina* viene spedita, e di mantenerla con il tappo leggermente allentato davanti ad una finestra ben illuminata. Già dopo qualche ora si inizia a vedere la formazione di bollicine, indice del fatto che la fotosintesi è ricominciata.
- La crescita della *Spirulina* può anche essere allestita in una beuta a bocca larga da 1L: posizionare la beuta davanti a una finestra ben illuminata (date le piccole dimensioni, è possibile omettere l'utilizzo della lampada con fotoperiodo) e inserirvi all'interno il tubo dell'aeratore e il riscaldatore. Se ciò risulta difficile, è possibile posizionare la beuta vicino ad un termosifone e non inserire il riscaldatore. La temperatura per la crescita in beuta della *Spirulina* è da impostare a valori di 21-22°C, in quanto il ridotto volume della beuta permette ugualmente di raggiungere la temperatura di 30-31°C richiesta dalla *Spirulina* per la sua crescita (se il riscaldatore venisse, infatti, impostato a valori di 30-31°C, la temperatura interna della beuta raggiungerebbe i 45°C). Seguire il procedimento sopra descritto per la preparazione del terreno Zarrouk, tenendo presente che il volume da preparare è di 1L, e per il mantenimento delle condizioni di crescita. Anche l'inoculo della coltura starter di *Spirulina* deve essere fatto in proporzione: 10 ml di *Spirulina* in 1L di terreno di crescita (bisognerà, quindi, preparare più beute per utilizzare tutta la coltura iniziale).
- La coltura di *Spirulina* nella fase di crescita esponenziale si mantiene per circa una ventina di giorni in acquario, mentre in beuta raggiunge anche un mese.

