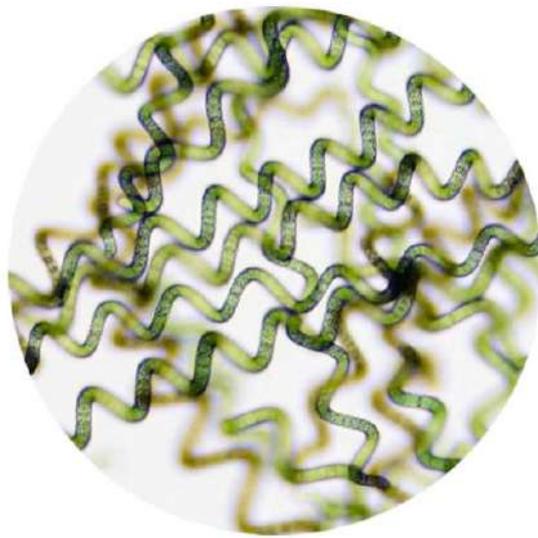


# **Effetto delle Variabili Ambientali sulla Fotosintesi della Spirulina Immobilizzata in Sfere di Alginato di Calcio**



Lavoro di maturità in Chimica

**Alessia Berti**

Liceo Lugano 2

2024

Docenti responsabili: Prof. Paolo Lubini e Prof. Giancarlo Parisi

## Sommario

1. Abstract .....	4
2. Introduzione .....	5
3 Fotosintesi .....	6
3.1 I cloroplasti .....	7
3.2 Teoria dell'endosimbiosi .....	8
3.3 Luce .....	8
3.4 Le fasi della fotosintesi .....	11
3.4.1 La fase luminosa .....	11
3.5 La chemiosmosi .....	13
3.6 Il flusso ciclico degli elettroni.....	14
3.7 La fase oscura.....	14
3.8 Come distinguere l'attività fotosintetica da quella della respirazione cellulare.....	15
4 Alginati .....	16
4.1 Struttura .....	16
4.2 Proprietà .....	17
5 Spirulina.....	18
5.1 Fotosintesi nella spirulina .....	18
6 Parte sperimentale.....	19
6.1 Introduzione .....	19
6.2 La scelta del cianobatterio.....	19
7 Esperimenti preliminari .....	20
7.1 Coltivazione di spirulina .....	20
7.1.1 Scopo .....	20
7.1.2 Materiale .....	20
7.1.3 Procedimento .....	20
7.1.4 Risultati .....	20
7.1.5 Conclusioni .....	20
7.2 Costruzione delle palline .....	21
7.2.1 Scopo .....	21
7.2.2 Materiale .....	21
7.2.3 Procedimento .....	22
7.2.4 Risultati .....	22
7.2.5 Conclusioni .....	22

7.3 Indicatore .....	23
7.3.1 Scopo .....	23
7.3.2 Materiale .....	23
7.3.3 Procedimento .....	23
7.3.4 Risultati .....	23
7.3.5 Conclusioni .....	23
7.3.6 Uso dell'indicatore nello studio della fotosintesi .....	24
7.4 Utilizzo di soluzioni tampone .....	24
7.4.1 Scopo .....	25
7.4.2 Materiale .....	25
7.4.3 Procedimento .....	25
7.4.4 Risultati .....	26
7.4.5 Conclusioni .....	27
8 Esperimenti sull'attività fotosintetica e sulla respirazione cellulare .....	28
8.1 Effetto dell'intensità luminosa .....	28
8.1.1 Scopo .....	28
8.1.2 Materiale .....	29
8.1.3 Procedimento .....	29
8.1.4 Risultati .....	29
8.1.5 Conclusioni .....	30
8.2 Quantità di spirulina nelle sfere .....	31
8.2.1 Scopo .....	31
8.2.2 Materiale .....	31
8.2.3 Procedimento .....	31
8.2.4 Risultati .....	32
8.2.5 Conclusioni .....	33
8.3 Lunghezza d'onda .....	33
8.3.1 Scopo .....	33
8.3.2 Materiale .....	34
8.3.3 Procedimento .....	35
8.3.4 Risultati .....	35
8.3.5 Conclusioni .....	35
9 Conclusioni finali .....	37
10 Bibliografia .....	38

# 1. Abstract

Il presente lavoro si focalizza sull'analisi dell'attività fotosintetica della spirulina (*Arthrospira platensis*) e sull'immobilizzazione di questo cianobatterio in sfere di alginato di calcio. Oltre a studiare i processi fotosintetici, l'obiettivo è valutare l'efficacia della metodologia sperimentale adottata. Questo approccio ha consentito di analizzare l'influenza di diverse variabili ambientali e biologiche sulla fotosintesi: la lunghezza d'onda della luce, la concentrazione di spirulina nelle sfere e l'intensità luminosa. Per monitorare l'attività fotosintetica è stato utilizzato un indicatore pH altamente sensibile alle variazioni di CO<sub>2</sub> in soluzione, che ha permesso di distinguere l'attività fotosintetica da quella respiratoria. I risultati sperimentali hanno dimostrato che ciascuna variabile incide significativamente sull'attività fotosintetica, confermando l'affidabilità e la validità del metodo utilizzato. La metodologia proposta si è rivelata uno strumento efficace per condurre analisi semi-quantitative della fotosintesi in un sistema controllato e riproducibile.

## 2. Introduzione

Questo lavoro di maturità si focalizza sullo studio dell'attività fotosintetica della spirulina (*Arthrospira plantensis*), un batterio fotosintetico. L'approccio sperimentale prevede l'utilizzo di palline di alginato di calcio come sistema di immobilizzazione, una metodologia che consente di creare un ambiente controllato e riproducibile per il monitoraggio della fotosintesi. Il lavoro è stato ispirato da studi precedenti [10] e [11] che hanno condotto esperimenti simili, utilizzando però *scenedusmus quadricauda*.

L'idea di focalizzare questo lavoro sulla fotosintesi della spirulina proviene dall'interesse per le capacità fotosintetiche e adattative dei cianobatteri. Questi organismi sono tra i più antichi sulla Terra e contribuiscono alla produzione di ossigeno su di essa. La loro capacità di svolgere la fotosintesi ha modificato notevolmente la composizione dell'atmosfera terrestre arricchendola di ossigeno e ha favorito lo sviluppo di organismi complessi. Essendo considerati gli antenati diretti dei cloroplasti, gli organelli fotosintetici di piante e alghe, rappresentano un modello biologico ideale per lo studio della fotosintesi. Inoltre, studiare la fotosintesi è fondamentale per comprendere i meccanismi alla base della vita, poiché è responsabile della produzione di ossigeno e di energia chimica necessari alla maggior parte degli organismi. Attraverso questo processo, piante, alghe e cianobatteri convertono l'energia solare in zuccheri e altre molecole organiche.

L'obiettivo del lavoro è di studiare il bilancio netto tra fotosintesi e respirazione cellulare nella spirulina, analizzando come variabili ambientali (come intensità luminosa e lunghezza d'onda) e biologiche (come la concentrazione di cianobatteri nelle sfere) influiscono sul tasso fotosintetico; attraverso un metodo che prevede l'utilizzo di sfere di alginato contenenti spirulina immobilizzata. Le sfere sono porose e consentono quindi alla spirulina di continuare a svolgere la fotosintesi al loro interno. Questo approccio sperimentale sfrutta un indicatore del pH estremamente sensibile alla variazione della concentrazione di CO<sub>2</sub> fornisce una misura indiretta ma affidabile dell'attività fotosintetica, distinguendola dalla respirazione cellulare. Come indicatore dell'attività fotosintetica viene utilizzata l'assorbanza a 550 nanometri, che ha relazione di proporzionalità diretta con il pH della soluzione, come suggerito da lavori già condotti [11]. Lo studio si propone inoltre di valutare l'efficacia della metodologia adottata.

Le palline di alginato, oltre ad offrire un ambiente controllato, permettono di studiare l'effetto di diverse condizioni sperimentali sulla fotosintesi, modificando variabili come la lunghezza d'onda della luce e l'intensità luminosa per determinare quali lunghezze d'onda sono più efficaci per massimizzare la fotosintesi e come varia il tasso fotosintetico della spirulina in funzione dell'intensità luminosa. Grazie alla sensibilità dell'indicatore è possibile isolare l'effetto delle variabili studiate, come intensità luminosa e lunghezza d'onda, e correlare direttamente le variazioni osservate all'attività fotosintetica della spirulina.

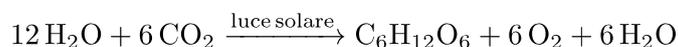
Il lavoro è strutturato in due parti principali: la prima parte introduce i concetti teorici di fotosintesi, alginati e spirulina, mentre la seconda presenta gli esperimenti svolti e i risultati ottenuti.

### 3 Fotosintesi

La fotosintesi è un processo biochimico in cui l'energia luminosa proveniente dal Sole viene utilizzata per produrre ossigeno e zuccheri a partire da acqua e diossido di carbonio.

Grazie alla fotosintesi, l'energia luminosa proveniente dal Sole viene convertita in energia chimica e sfruttata per sintetizzare le molecole organiche, che sono la fonte principale di nutrimento per la maggior parte degli esseri viventi. Per questo motivo, gli organismi come le piante, le alghe e varie specie di protisti ed eucarioti, che sono in grado di produrre le sostanze nutritive necessarie attraverso la fotosintesi, sono detti autotrofi o produttori. Al contrario, gli organismi che ottengono le sostanze organiche necessarie nutrendosi di piante o di altri animali vengono chiamati eterotrofi o consumatori. In un ambiente acquatico alghe e batteri fotosintetici costituiscono i principali produttori.

La reazione complessiva può essere schematizzata come segue:

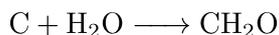
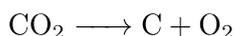


Il prodotto finale della fotosintesi non è esattamente il glucosio, ma uno zucchero a tre atomi di carbonio (gliceraldeide-3-fosfato, o G3P), anche se qui viene indicato come glucosio per rendere più evidente il legame tra fotosintesi e respirazione cellulare. Oltre alla fotosintesi avviene anche la respirazione cellulare:



La fotosintesi è costituita da molte reazioni di ossidoriduzione, o redox, in cui le molecole d'acqua si ossidano, perdendo elettroni, mentre il  $\text{CO}_2$  si riduce.

Prima di scoprire che le molecole di ossigeno provenissero dall'acqua, numerosi scienziati ipotizzavano che la fotosintesi realizzasse la decomposizione del  $\text{CO}_2$  con l'aggiunta di acqua al carbonio:



Quest'ipotesi fu smentita utilizzando un isotopo pesante dell'Ossigeno, l'Ossigeno-18, per tracciare il percorso degli atomi d'Ossigeno durante la fotosintesi. Questo esperimento riuscì quindi a dimostrare che l'Ossigeno presente nel diossigeno prodotto dalla fotosintesi proviene dalle molecole d'acqua (Figura 1).

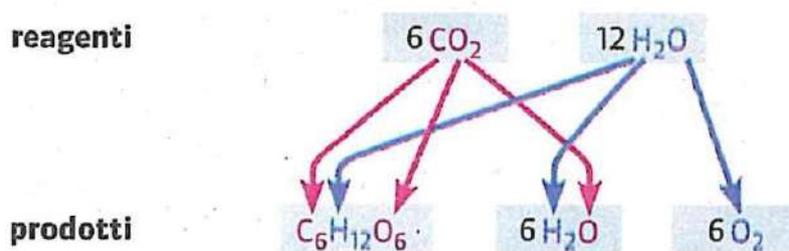


Figura 1 - Destino degli atomi nel processo fotosintetico [1].

### 3.1 I cloroplasti

La fotosintesi si svolge nei cloroplasti, organelli con una lunghezza compresa tra 3 e 6 micrometri, in grado di assorbire l'energia luminosa grazie alla presenza di pigmenti, enzimi e altre molecole situati nelle loro membrane. I cloroplasti si trovano in tutte le parti verdi che possono svolgere la fotosintesi (Figura 2); il colore è dovuto alla clorofilla.

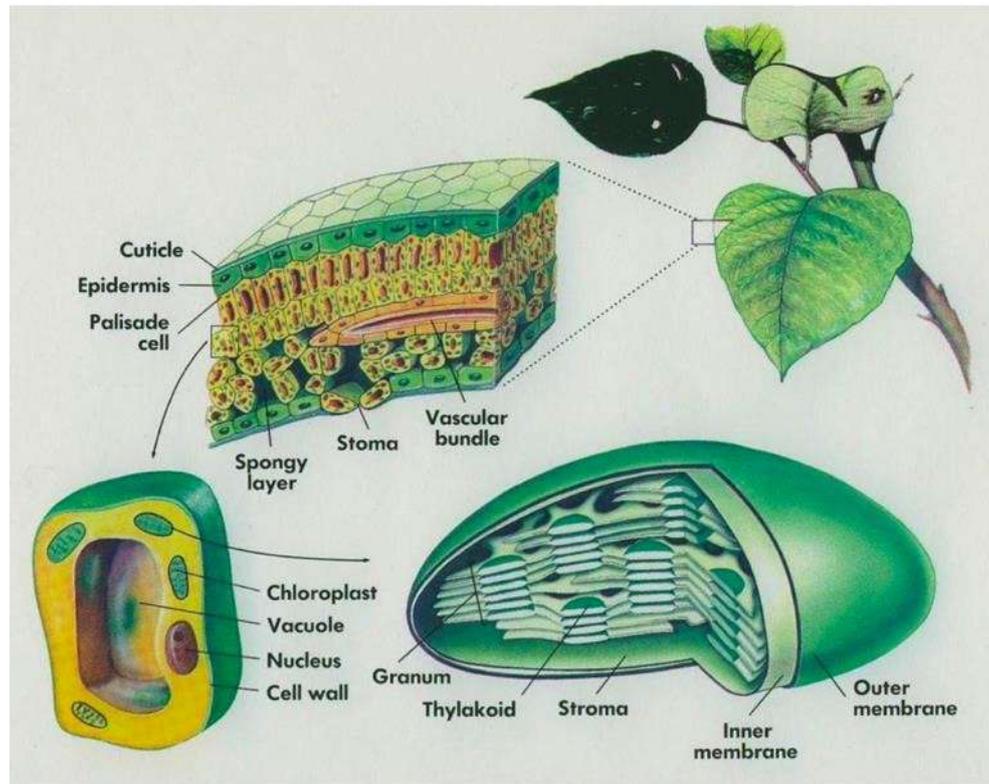


Figura 2 - Cellule fotosintetiche e cloroplasti [2].

All'interno dei cloroplasti si trova un sistema di membrane formato da strutture chiamate tilacoidi, contenenti la clorofilla, che si trovano disposti in pile chiamate grani. Lo stroma, fluido presente all'esterno dei tilacoidi, contiene il DNA del cloroplasto, insieme a ribosomi e vari enzimi. Le membrane dei tilacoidi contengono i fotosistemi, strutture organizzate costituite da molecole di clorofilla ed altri pigmenti legati a proteine. I complessi molecolari che costituiscono un fotosistema sono disposti attorno ad un centro di reazione e formano delle strutture simili ad antenne che si occupano di assorbire la luce. Il centro di reazione è un complesso proteico composto da una coppia di molecole di clorofilla *a* e da una molecola chiamata accettore primario di elettroni, che cattura gli elettroni eccitati, riducendosi. Esistono due tipi di fotosistemi: il fotosistema I e il fotosistema II, secondo l'ordine di scoperta, sebbene sia in realtà il fotosistema II ad agire per primo nel processo fotosintetico.

Nel centro di reazione del fotosistema II la clorofilla *a* è chiamata clorofilla P680, poiché assorbe meglio radiazioni elettromagnetiche con una lunghezza d'onda di 680 nanometri. La clorofilla del fotosistema I è invece chiamata P700, in quanto assorbe principalmente la luce con lunghezza d'onda di 700 nanometri.

### 3.2 Teoria dell'endosimbiosi

I cianobatteri, pur essendo procarioti, riescono a svolgere la fotosintesi in modo simile agli organismi eucarioti (Figura 3). Tali organismi sono tra i più antichi organismi fotosintetici sulla Terra. Invece di cloroplasti utilizzano delle membrane interne specializzate per compiere la fotosintesi. Queste membrane svolgono lo stesso ruolo dei tilacoidi negli organismi eucarioti. Le reazioni luminose avvengono nelle loro membrane plasmatiche, dove si trova la clorofilla.

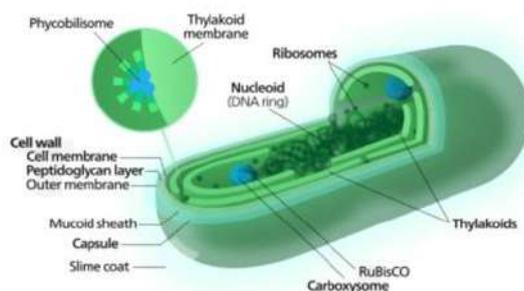


Figura 3 - Struttura di una cellula cianobatterica [3].

I cianobatteri presentano quindi molte caratteristiche simili ai cloroplasti. Ciò è evidenziato dalla teoria dell'endosimbiosi, che sostiene che i cloroplasti negli eucarioti derivano da antichi cianobatteri. Secondo la teoria, circa 1,5 milioni di anni fa, una cellula eucariote inglobò un cianobatterio tramite endocitosi. Il cianobatterio non venne distrutto e instaurò una relazione mutualistica con la cellula eucariote. L'eucariote forniva protezione, mentre il cianobatterio energia e nutrimento. Con il passare del tempo, i cianobatteri inglobati, evolsero in cloroplasti.

A sostegno della teoria ci sono molte somiglianze tra la loro struttura. Entrambi gli organismi possiedono membrane che contengono fotosistemi I e II, inoltre il DNA di entrambi è circolare e contiene dei geni molto simili.

### 3.3 Luce

La luce è una radiazione elettromagnetica composta da onde elettromagnetiche, che sono generate da cariche in movimento. La lunghezza d'onda è definita come la distanza tra due creste consecutive di un'onda elettromagnetica (Figura 4).

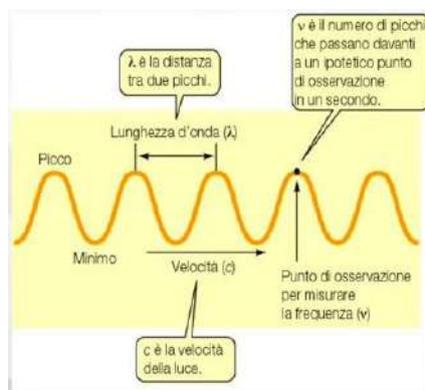


Figura 4 - Onde elettromagnetiche e luce [2].

L'intero spettro elettromagnetico (Figura 5), che copre tutte le radiazioni, include lunghezze d'onda che variano da meno di un nanometro a oltre un chilometro.

La frazione più importante dello spettro elettromagnetico per la vita comprende onde elettromagnetiche la cui lunghezza d'onda varia da 380 nm a 750 nm. Tale radiazione è la luce visibile, percepibile dall'occhio umano, ed è l'insieme delle radiazioni che forniscono energia alla fotosintesi. Il modello ondulatorio della luce riesce a spiegare il comportamento della luce in molti fenomeni; tuttavia, alcuni fenomeni sono spiegabili solo grazie al modello corpuscolare della luce, che suppone una natura particellare per la luce. Infatti, la luce si comporta per certi aspetti come se fosse composta da pacchetti di energia: particelle discrete chiamate fotoni. L'energia di un fotone dipende dalla frequenza ed è data dalla formula:  $E=h\nu$ , dove  $h$  è la costante di Planck ed equivale a  $6,626 \times 10^{-34}$  Js.

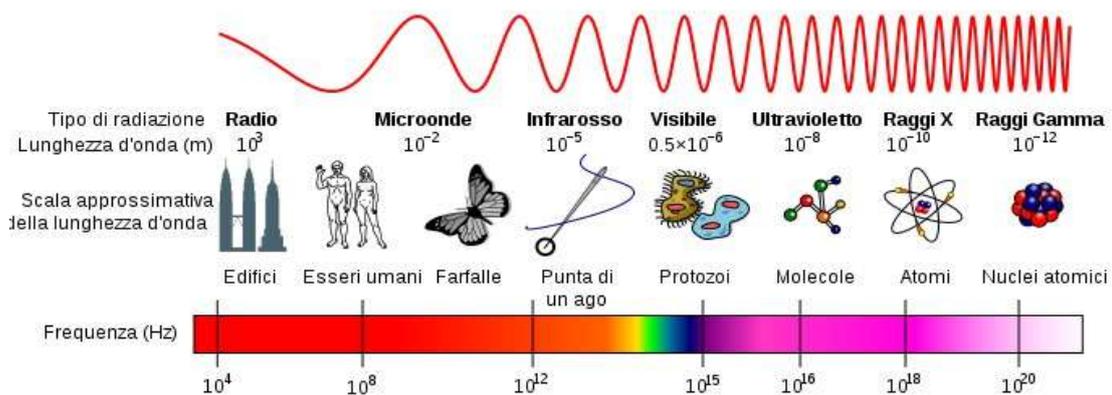


Figura 5 - Lo spettro elettromagnetico [4].

Quando la luce colpisce un oggetto può venire assorbita o riflessa. Le sostanze specializzate nell'assorbimento della luce sono chiamate pigmenti. Il colore che vediamo è quello che viene riflesso maggiormente. Ad esempio, la clorofilla è di colore verde perché riflette la luce verde (lunghezza d'onda 520 - 565 nm), mentre assorbe la luce rossa e blu (Figura 6).

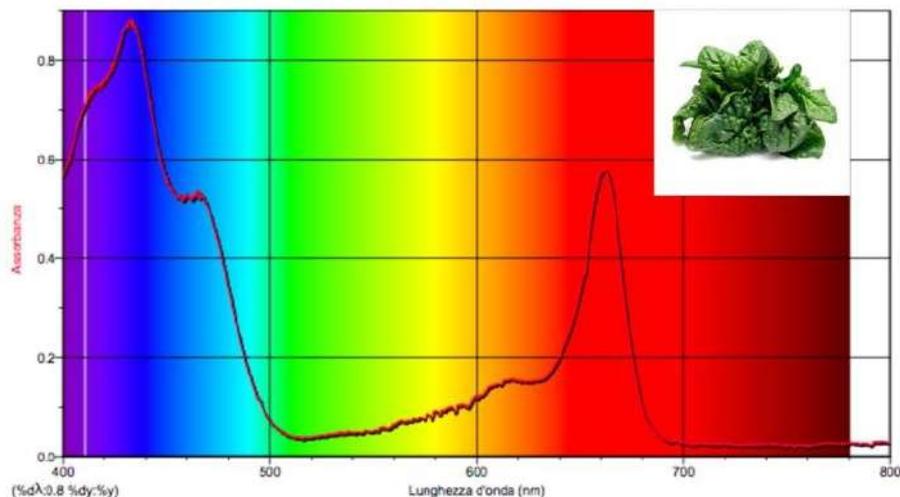
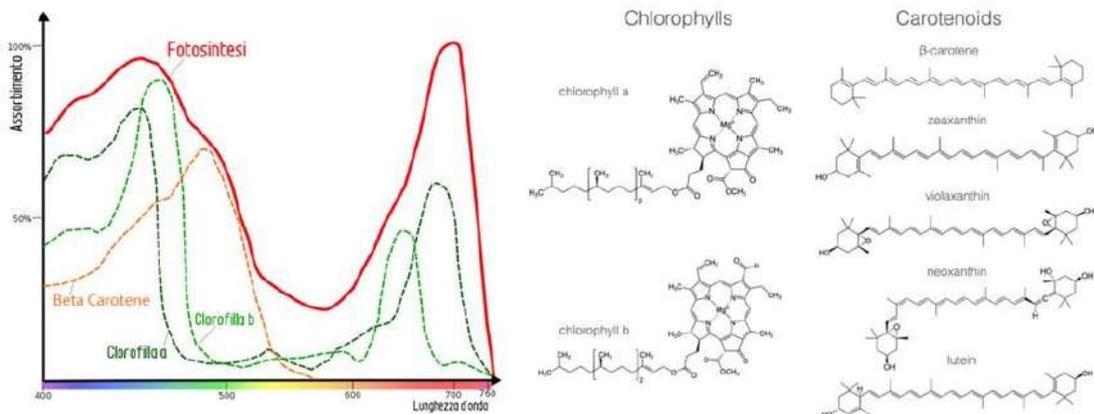


Figura 6 - Spettro di assorbimento di estratto di clorofilla.

Lo spettro di assorbimento di un pigmento è definito dall'assorbimento della luce da parte del pigmento in funzione della lunghezza d'onda. Gli spettri di assorbimento sono utili per comprendere l'efficacia delle varie lunghezze d'onda nella fotosintesi, in quanto la luce può agire nei cloroplasti solo se viene assorbita. Lo spettro d'azione mostra invece l'efficienza relativa delle

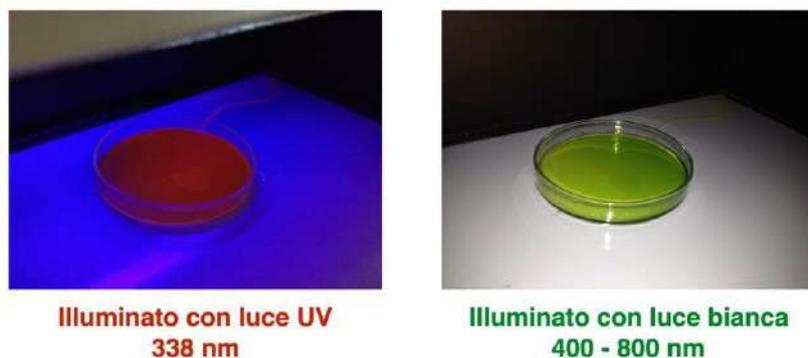
varie lunghezze d'onda. Confrontando lo spettro d'azione della fotosintesi con quello della clorofilla a, si può notare che i due non coincidono, in quanto quello della fotosintesi è più ampio. Questo accade perché la clorofilla a non è l'unico pigmento dei cloroplasti coinvolto nella fotosintesi (Figura 7).

Infatti, altri pigmenti presenti nella membrana dei tilacoidi, i carotenoidi come la clorofilla b, non partecipano direttamente alla fotosintesi, ma assorbono la luce e ne trasferiscono l'energia alla clorofilla a.



**Figura 7** - Spettri d'assorbimento [5] e struttura di alcuni pigmenti fotosintetici [6].

Quando una molecola di un pigmento dei cloroplasti assorbe un fotone, uno degli elettroni si sposta a un livello energetico superiore, partendo da un livello energetico più basso (stato fondamentale), raggiungendo uno stato eccitato. Lo stato eccitato è molto instabile e gli elettroni decadono tornando allo stato fondamentale dopo all'incirca un nanosecondo, liberando l'energia acquisita. I fotoni possono essere assorbiti solo quando la loro energia equivale alla differenza di energia tra lo stato fondamentale e quello eccitato. Questa differenza varia a dipendenza del tipo di atomo o di molecola, ecco quindi spiegato perché ogni pigmento possiede uno spettro di assorbimento specifico.



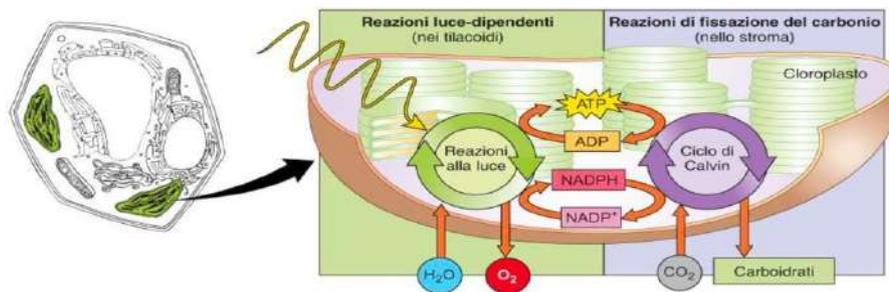
**Figura 8** - Estratto alcolico di clorofilla di spinaci e effetto della fluorescenza (a sinistra).

L'energia del fotone assorbito viene convertita in energia potenziale posseduta dall'elettrone. Di solito, gli elettroni eccitati tornano allo stato fondamentale in un miliardesimo di secondo, rilasciando l'energia sotto forma di luce o calore. Ciò accade anche alla clorofilla, che, quando è isolata emette una fluorescenza (Figura 8). Questo processo non è molto efficiente per la

fotosintesi, poiché l'energia luminosa viene dissipata. Il suo comportamento è però diverso quando si trova nei fotosistemi nella membrana dei tilacoidi, in quanto trasferisce i suoi elettroni eccitati alle molecole vicine.

### 3.4 Le fasi della fotosintesi

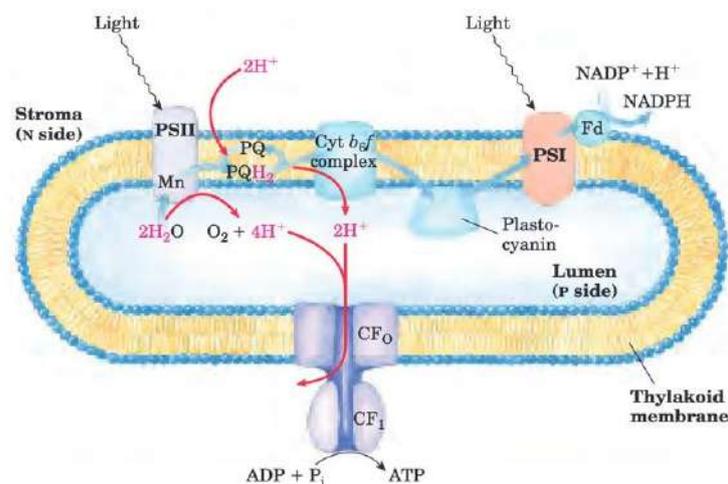
La fotosintesi si svolge in due fasi, la prima fase è chiamata fase luminosa in quanto necessita la presenza di luce, mentre la seconda fase, la fase oscura, non necessita direttamente la presenza di luce (Figura 9).



**Figura 9** - La fotosintesi consiste di reazioni dipendenti dalla luce, che hanno luogo nei tilacoidi, e di reazioni di fissazione del carbonio, che avvengono nello stroma [2].

#### 3.4.1 La fase luminosa

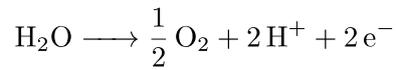
La fase luminosa avviene nelle membrane dei tilacoidi dove l'energia luminosa viene convertita in energia chimica contenuta nelle molecole di ATP e NADPH, e viene liberato  $O_2$  (Figura 10). I prodotti finali del processo sono quindi ATP e NADPH, che forniscono energia alle reazioni della fase oscura, e  $O_2$ . La luce assorbita dalla clorofilla trasferisce elettroni e idrogeno dell'acqua ad un accettore:  $NADP^+$ .



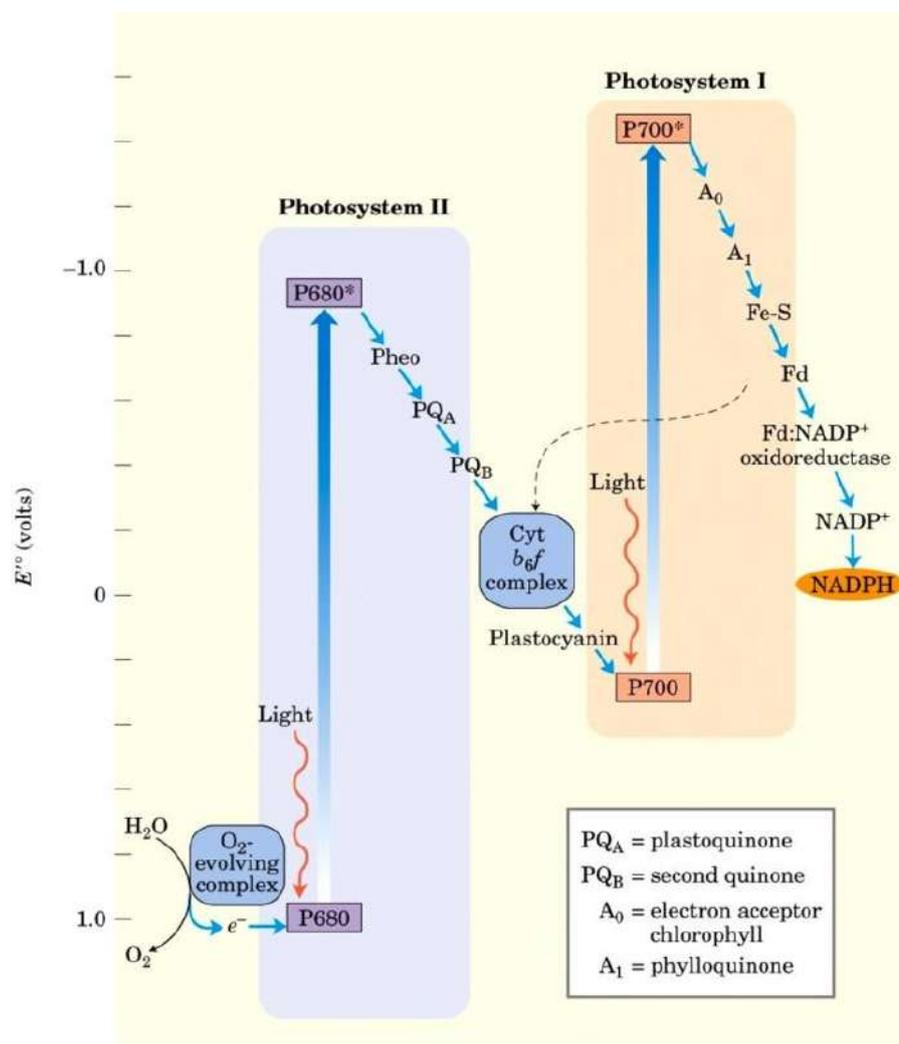
**Figura 10**- Flusso di protoni ( $H^+$ ) ed elettroni nei tilacoidi durante la fase luminosa della fotosintesi [7].

La fase luminosa ha inizio quando una molecola di pigmento del fotosistema II assorbe un fotone, e l'energia viene trasferita ad altre molecole di pigmento fino a raggiungere il centro di reazione. Qui, la clorofilla P680 assorbe l'energia, eccitando uno dei suoi elettroni. L'elettrone eccitato viene poi catturato dall'accettore primario di elettroni, tramite una reazione di ossidoriduzione.

Successivamente, una molecola d'acqua viene scissa all'interno del tilacoide:



L'acqua viene quindi decomposta in due ioni idrogeno e un atomo di ossigeno, che si combina istantaneamente con un altro atomo di ossigeno,  $\text{O}_2$  viene quindi liberato. Gli elettroni vengono ceduti alla clorofilla P680, sostituendo quelli ceduti all'accettore primario e vengono poi trasferiti dal fotosistema II al fotosistema I tramite una catena di trasporto degli elettroni. Questa catena include il trasportatore di elettroni chiamato plastoquinone (Pq), un complesso di due citocromi e la plastocianina, una proteina contenente rame. Durante questo processo, l'energia rilasciata viene utilizzata per sintetizzare ATP, grazie al trasferimento di ioni  $\text{H}^+$  attraverso la membrana del tilacoide, che permette l'aggiunta di un gruppo fosfato all'ADP, in un processo noto come fosforilazione. Gli elettroni quindi, percorrendo la catena di trasporto, cadono a un livello energetico minore e l'energia rilasciata viene sfruttata per la sintesi dell'ATP.



**Figura 11** - Lo schema a "Z" mostra il percorso degli elettroni dall'acqua al  $\text{NADP}^+$  durante la fotosintesi [7].



### 3.6 Il flusso ciclico degli elettroni

In certe condizioni gli elettroni eccitati prendono una via alternativa nel fotosistema I. Gli elettroni passano a ritroso dalla ferredossina (Fd) al complesso dei citocromi della catena di trasporto degli elettroni e poi ritornano alla clorofilla P700 (Figura 11). In questo processo, chiamato fosforilazione ciclica, non avviene la produzione di NADPH, né il rilascio di ossigeno, ma viene prodotto ATP, grazie al mantenimento del gradiente protonico, che alimenta l'ATP sintetasi. Infatti, il flusso ciclico degli elettroni è un cortocircuito: dopo essere giunti alla clorofilla P700, gli elettroni vengono eccitati e ricominciano il ciclo passando dalla ferredossina al complesso dei citocromi, ciò permette di rilasciare energia per la sintesi di ATP tramite la chemiosmosi.

Il flusso ciclico di elettroni serve a compensare la differenza del consumo di ATP del ciclo di Calvin, che viene consumato in maggiore quantità rispetto al NADPH.

### 3.7 La fase oscura

La fase oscura della fotosintesi, che si svolge nello stroma, non richiede direttamente la presenza di luce, ma utilizza l'ATP e l'NADPH prodotte durante la fase luminosa della fotosintesi. Questa fase comprende una serie ciclica di reazioni, chiamata ciclo di Calvin, che sintetizza le molecole di zucchero a partire dal CO<sub>2</sub> proveniente dall'atmosfera, e ATP e NADPH, formate durante la fase luminosa.

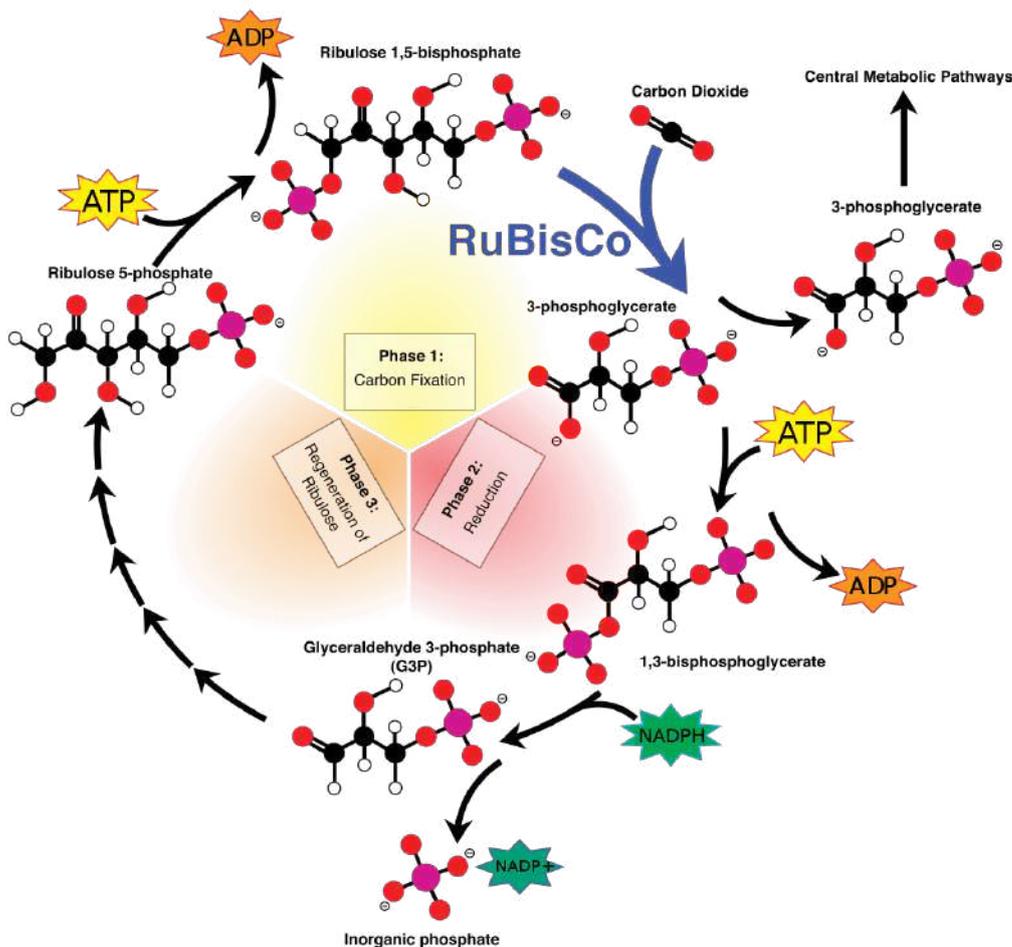


Figura 13 - Il ciclo di Calvin [8].

Il ciclo prende il nome dal biochimico Melvin Calvin, che iniziò a chiarire le tappe della via metabolica alla fine degli anni '40. La fase oscura è un processo ciclico, in quanto il composto di partenza, uno zucchero a cinque atomi di carbonio chiamato ribulosio di fosfato o ribulosio-1,5-difosfato (RuBP), viene costantemente rigenerato.

Il ciclo di Calvin può essere suddiviso in tre fasi (Figura 13):

La prima fase è la fissazione del carbonio. In questa fase il CO<sub>2</sub> viene fissato al RuBP, già presente nei cloroplasti. L'enzima che catalizza questa reazione è il rubisco (ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi), che è considerato l'enzima più abbondante in natura. Il prodotto della reazione è un composto intermedio instabile a sei atomi di carbonio, che si decompone immediatamente a metà formando due molecole di 3-fosfoglicerato (o acido-3-fosfoglicerico, 3-PGA), un acido con tre atomi di carbonio.

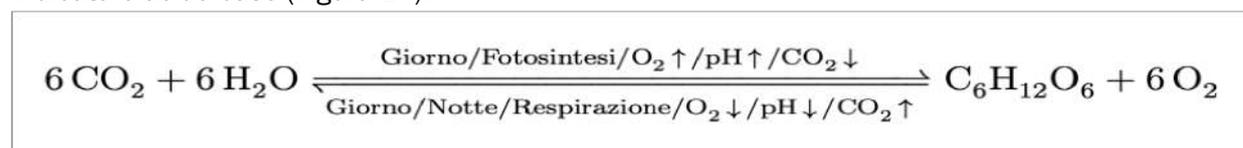
Durante la seconda fase, la riduzione, ogni molecola di 3-fosfoglicerato riceve un gruppo fosfato addizionale dall'ATP trasformandosi in 1,3 bisfosfoglicerato. In seguito, una coppia di elettroni provenienti dal NADPH riduce l'1.3 bisfosfoglicerato a G3P, utilizzando l'energia immagazzinata nell'ATP. Il G3P è uno zucchero a tre atomi di carbonio, chiamato anche gliceraldeide-3-fosfato. Per ogni tre molecole di CO<sub>2</sub> fissate, vengono sintetizzate sei molecole di G3P, ma solo una delle molecole lascia il ciclo come prodotto finale. Le altre cinque molecole vengono riciclate per rigenerare le tre molecole di RuBP, utilizzando l'energia dell'ATP.

Nell'ultima fase del ciclo, la rigenerazione del RuBP, gli scheletri carboniosi delle cinque molecole di G3P vengono ridisposti in tre molecole di RuBP. Per ottenerle, il ciclo consuma le ultime tre molecole di ATP. Per la sintesi netta di una molecola di G3P vengono utilizzate nove molecole di ATP e sei molecole di NADPH. Il G3P che lascia il ciclo come prodotto netto viene utilizzato per sintetizzare altri composti organici come glucosio e altri carboidrati.

### 3.8 Come distinguere l'attività fotosintetica da quella della respirazione cellulare

Il bilancio della CO<sub>2</sub> dovrebbe permettere di prevedere l'andamento del pH nella soluzione acquosa che contiene i batteri fotosintetici. Il processo di respirazione cellulare ha come conseguenza una produzione di CO<sub>2</sub>, mentre quello di fotosintesi un consumo.

Se durante le ore di luce la quantità di CO<sub>2</sub> consumata (fissata) dal processo fotosintetico è maggiore di quella prodotta, il pH della soluzione acquosa dovrebbe aumentare. Viceversa, durante le ore di buio (assenza del processo fotosintetico) la produzione di CO<sub>2</sub> ha il sopravvento e il pH dovrebbe diminuire. Queste variazioni di pH sono visibili grazie all'utilizzo di un appropriato indicatore acido-base (Figura 14).



**Figura 14** - Effetto della fotosintesi e della respirazione cellulare sul pH della soluzione acquosa.

## 4 Alginati

Gli alginati sono polisaccaridi naturali che costituiscono il 40% della massa secca delle pareti cellulari delle alghe brune appartenenti alla classe Phaeophyceae. La loro funzione principale è di struttura: forniscono rigidità e flessibilità all'alga, grazie alla loro capacità di trattenere acqua. Sono stati scoperti nel 1880 dal chimico britannico Stanford e svolgono un ruolo fondamentale nella resistenza e nella flessibilità delle alghe in ambienti marini. Gli alginati sono sali di acido alginico, un polisaccaride lineare composto da due monomeri: l'acido  $\beta$ -D-mannuronico e acido  $\alpha$ -L-guluronico (Figura 15).

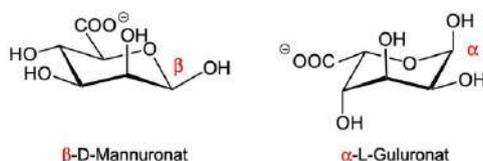


Figura 15 – Monomeri dell'alginato [9].

### 4.1 Struttura

Gli alginati sono una famiglia di polisaccaridi solubili in acqua, sono formati da catene lineari di composte da due tipi di acidi: l'acido  $\beta$ -D mannuronico (M) e l'acido  $\alpha$ -L guluronico (G), di composizione e sequenza variabile. Questi monomeri possono infatti essere organizzati in blocchi omopolimerici (blocchi M e G) o in blocchi alternati (blocchi MG). La composizione di questi blocchi varia dalla specie di alga e influenzano le proprietà dell'alginato (Figura 16). Possono essere caratterizzati come sali di acido poliuronico.

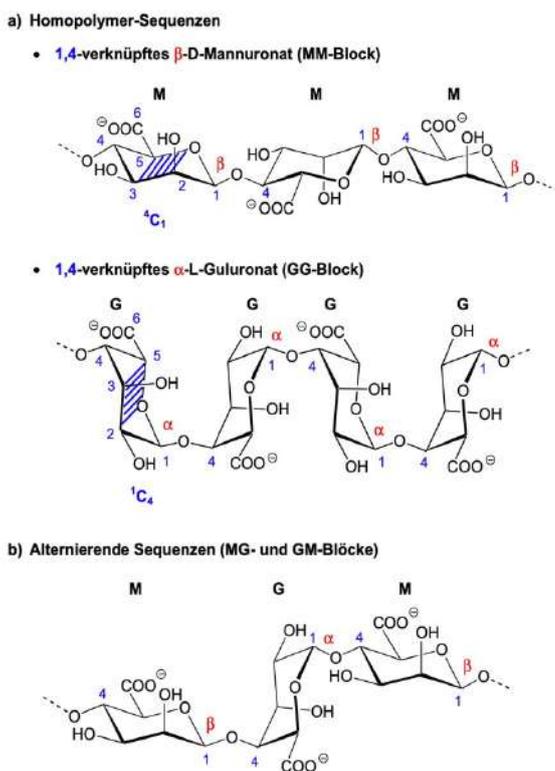
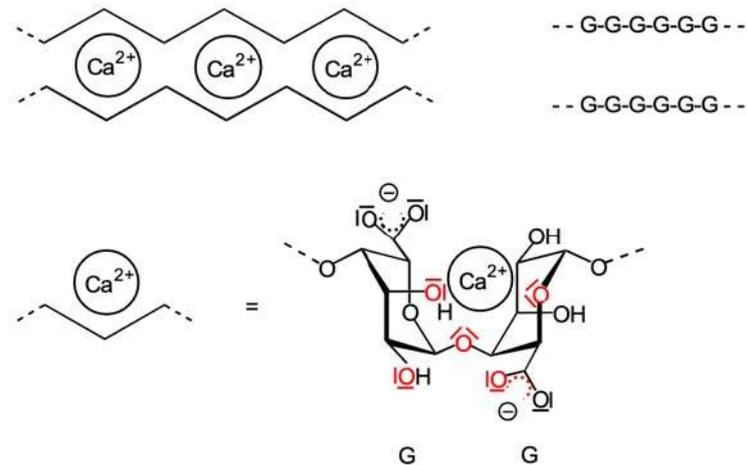


Figura 16 - Tipi di strutture a blocco di alginati [9].

## 4.2 Proprietà

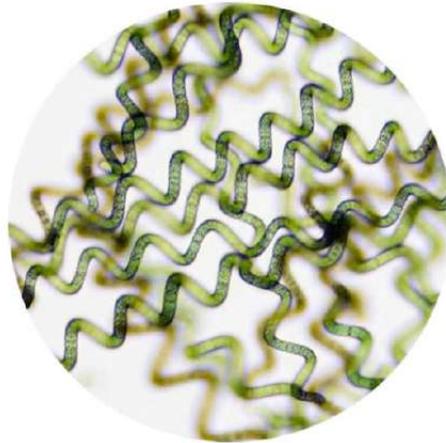
Un'importante proprietà fisica degli alginati è quella di legare cationi bivalenti come gli ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), il che permette di formare gel stabili e reticoli tridimensionali (Figura 17). Questa capacità varia in base alla composizione dell'alginato. In particolare, gli ioni calcio si legano meglio ai blocchi di acido guluronico. Quando una soluzione di cloruro di calcio interagisce con una soluzione di alginato di sodio, si forma istantaneamente un gel. I fattori che influenzano la gelificazione sono la concentrazione di ioni calcio e quella dell'alginato: più sono elevate, più denso è il gel.



**Figura 17** - Legame del calcio da parte di sequenze di acido poliguluronico secondo il "modello egg-box" proposto da Grant: i cinque atomi di ossigeno con cui ogni ione  $\text{Ca}^{2+}$  è coordinato all'interno di un dimero di guluronato sono evidenziati in colore [9].

## 5 Spirulina

La spirulina (*Arthrospira plantesis*) è un batterio fotosintetico, appartenente al gruppo dei cianobatteri. Si trova generalmente in ambienti tropicali e subtropicali nei corpi d'acqua alcalini caratterizzati da un pH elevato. Viene classificata come microalga dai botanici, in quanto contiene la clorofilla a. Tuttavia, secondo i batteriologi è un batterio, poiché presenta caratteristiche procarioti. Questo cianobatterio ha una forma filamentosa e a spirale (Figura 18).



**Figura 18** - *Spirulina* osservata al microscopio ottico (100x).

La spirulina è composta principalmente da proteine (55%-70%), carboidrati (15%-25%), acidi grassi essenziali (18%), vitamine e pigmenti come clorofilla a, ficocianina e carotenoidi [15]. È composta da un DNA circolare, un sistema fotosintetico, una capsula, dei ribosomi e una parete cellulare pluristratificata: composta da quattro strati.

### 5.1 Fotosintesi nella spirulina

La spirulina, come gli altri cianobatteri, non possiede cloroplasti, le sue strutture fotosintetiche sono collocate in membrane interne chiamate lamelle. Queste strutture contengono i pigmenti fotosintetici e sono incorporate nel citoplasma del cianobatterio e non sono organizzate come nelle piante. I pigmenti fotosintetici principali nei cianobatteri includono la clorofilla a e altri pigmenti come la ficocianina e carotenoidi.

Nei cianobatteri la fotosintesi e la respirazione cellulare avvengono nello stesso compartimento cellulare. Infatti, sia le catene di trasporto di elettroni fotosintetiche che respiratorie sono contenute nella membrana dei tilacoidi. Questa caratteristica, che consente alla spirulina e agli altri cianobatteri di adattarsi a condizioni ambientali estreme, è probabilmente uno dei motivi per cui sono sopravvissuti così a lungo: sono appunto tra gli organismi più antichi della Terra e risalgono a 3,5 miliardi di anni fa.

La catena di trasporto degli elettroni nei cianobatteri è identica a quella nelle piante. Ad alte intensità luminose, la catena di trasporto degli elettroni fotosintetici ha una superiore capacità di flusso di elettroni, rispetto alla catena respiratoria. Mentre al buio o a intensità luminose molto basse, la catena respiratoria ha una capacità superiore.

## 6 Parte sperimentale

### 6.1 Introduzione

Lo scopo di questo lavoro è di indagare le possibilità offerte dai cianobatteri inglobati in palline di alginato per studiare in modo semi quantitativo alcuni aspetti legati alla fotosintesi e alla respirazione cellulare.

La fotosintesi può essere infatti studiata utilizzando cianobatteri come la spirulina o altri microrganismi come *scenedesmus quadricauda*, immobilizzandoli in sfere di alginato di calcio. L'immobilizzazione dei microrganismi in sfere di alginato offre un ambiente stabile che non compromette le loro capacità fisiologiche, permettendo loro di continuare il normale processo di fotosintesi. Siccome le sfere di alginato contengono circa lo stesso numero di cianobatteri è possibile svolgere delle analisi semi-quantitative sulla fotosintesi con questo metodo.

Per calcolare il tasso di fotosintesi viene sfruttata la variazione di concentrazione di  $\text{CO}_2$ , osservabile guardando il cambiamento di colore di un indicatore acido-base di bicarbonato e misurabile con colorimetro per avere dei dati quantitativi. L'indicatore indica il pH della soluzione, che aumenta con l'aumentare dell'attività fotosintetica, poiché il  $\text{CO}_2$  viene consumato.

Sono state individuate diverse variabili che potrebbero influenzare il tasso di fotosintesi dei cianobatteri nelle palline di alginato. Gli esperimenti svolti si focalizzano su alcune variabili chiave: l'intensità luminosa, la densità delle sfere e la lunghezza d'onda della luce. È inoltre opportuno ricordare che contemporaneamente alla fotosintesi avviene anche la respirazione cellulare, che, producendo diossido di carbonio fa diminuire il pH della soluzione. Per gli esperimenti svolti è stato presupposto che il tasso della respirazione cellulare rimanga costante. Di conseguenza, il cambiamento del colore dell'indicatore e gli altri valori misurati sono riconducibili solamente alla variazione del tasso dell'attività fotosintetica. È importante notare che ciò che viene effettivamente misurato dall'indicatore e quindi analizzato non è il tasso di fotosintesi in sé, ma il tasso di fotosintesi in relazione al tasso della respirazione cellulare. Questo significa che i risultati ottenuti riflettono il bilancio netto tra la fotosintesi, che consuma  $\text{CO}_2$ , e la respirazione cellulare, che lo produce.

### 6.2 La scelta del cianobatterio

La scelta del cianobatterio utilizzato ha rappresentato una delle principali variabili analizzate. Il tipo di cianobatterio influisce sulla velocità e sull'efficienza della fotosintesi e della respirazione cellulare. Infatti, diverse specie possono presentare tassi di assorbimento e produzione di  $\text{CO}_2$  variabili. [10] Oltre ai cianobatteri è possibile utilizzare anche diverse specie di microalghe per svolgere esperimenti analoghi. Diversi studi hanno già condotto esperimenti simili utilizzando la microalga *Scenedesmus quadricauda*, mentre l'attuale ricerca si concentra sulla spirulina. *Scenedesmus quadricauda*, essendo una microalga, è un organismo eucariote, al contrario della spirulina che è procariote [11]. Per studiare questa variabile l'obiettivo è confrontare i risultati ottenuti dalle due specie. Si prevede che i risultati numerici degli esperimenti condotti da questa ricerca possano differire da quelli da quelli effettuati con la microalga, a causa delle caratteristiche biologiche delle specie. Tuttavia, è atteso che le tendenze generali come la variazione del pH e dell'assorbanza in relazione alla fotosintesi e alla respirazione cellulare siano analoghe.

## 7 Esperimenti preliminari

In un primo tempo sono stati svolti alcuni esperimenti per definire le condizioni sperimentali migliori per studiare il processo fotosintetico.

### 7.1 Coltivazione di spirulina

#### 7.1.1 Scopo

Il primo esperimento preliminare condotto ha riguardato la coltivazione della spirulina, finalizzato a determinare le condizioni ottimali per il suo utilizzo nello studio della fotosintesi, inglobandola in palline di alginato. Inoltre, è stato utile per determinare le sue condizioni di vita ottimali.

La spirulina, come altri cianobatteri, è estremamente facile da coltivare e ha una grande capacità di sopravvivenza in condizioni ambientali variabili. Siccome richiede risorse limitate per la crescita, può essere coltivata anche a casa.

#### 7.1.2 Materiale

Il materiale utilizzato è il seguente:

- 2 bottiglie di PET da due litri
- Coltura di spirulina già pronta
- Acqua del lago di Origlio

#### 7.1.3 Procedimento

La coltura è stata effettuata in bottiglie di PET da 2 litri, poste sul davanzale di una finestra. In queste condizioni, la spirulina è sopravvissuta grazie alla luce naturale che le ha permesso di svolgere la fotosintesi. Le bottiglie sono state aperte una volta al giorno per permettere lo scambio gassoso e assicurando alla spirulina di ottenere il CO<sub>2</sub> necessario per la fotosintesi. Inoltre, le bottiglie sono state scosse manualmente ogni due giorni, per prevenire la formazione di grumi, che avrebbero impedito ai cianobatteri al centro di ricevere la luce e, quindi, di svolgere la fotosintesi.

Le colture sono state divise in due gruppi: metà delle alghe sono state cresciute utilizzando l'acqua del rubinetto, mentre per l'altra metà è stata sfruttata l'acqua del lago di Origlio, prelevata dalla superficie della riva. L'acqua è stata cambiata ogni due settimane.

#### 7.1.4 Risultati

Durante l'esperimento è stato osservato che i cianobatteri cresciuti con l'acqua del lago di Origlio hanno mostrato una crescita più rigogliosa, rispetto a quelli cresciuti in acqua del rubinetto, che hanno comunque proliferato. È stato inoltre notato che i cianobatteri morti tendevano a galleggiare in superficie e a presentare una colorazione più scura rispetto a quelli vivi. Questo fenomeno è stato molto più evidente nelle colture in cui la concentrazione di spirulina era superiore.

#### 7.1.5 Conclusioni

Ciò suggerisce che l'acqua del lago, ricca di nutrienti naturali ha favorito una crescita più rigogliosa. Alcuni cianobatteri sono morti a causa dell'eccessiva densità della coltura, che ha limitato l'accesso a luce e a nutrienti necessari per la loro sopravvivenza, impedendo la

fotosintesi. Questi esperimenti preliminari hanno quindi fornito preziose informazioni per l'ottimizzazione delle condizioni di coltivazione della spirulina, preparandola adeguatamente per studi successivi sulla fotosintesi all'interno delle sfere di alginato.

## 7.2 Costruzione delle palline

La spirulina è stata immobilizzata in sfere di alginato di calcio, per facilitare l'esperimento, poiché le sue dimensioni rendono difficile l'esecuzione diretta in acqua. Al contrario, quando la spirulina viene immobilizzata in sfere di alginato di calcio, si trova in condizioni ottimali per lo svolgimento degli esperimenti. Le palline sono infatti facili da realizzare e vengono prodotte in poco tempo. Inoltre, è possibile svolgere delle analisi accurate e semi quantitative, in quanto le sfere hanno approssimativamente lo stesso volume e contengono lo stesso numero di cianobatteri. Infatti, le palline sono state create utilizzando la spirulina proveniente dalla stessa coltura, così da poter produrre sfere con all'interno lo stesso numero di cianobatteri, garantendo uniformità nelle condizioni sperimentali. Per la loro realizzazione, è stata utilizzata la stessa pipetta, tagliata per aumentare il volume delle palline. Ciò ha permesso di ottenere palline con lo stesso volume. Queste palline sono porose, il che permette alle sostanze di entrare e uscire, permettendo il normale svolgimento della fotosintesi. Prima di utilizzare la coltura, la bottiglia di PET che la conteneva è stata scossa per omogeneizzarla, facendo sì che il numero di cianobatteri fosse circa lo stesso in ogni punto.

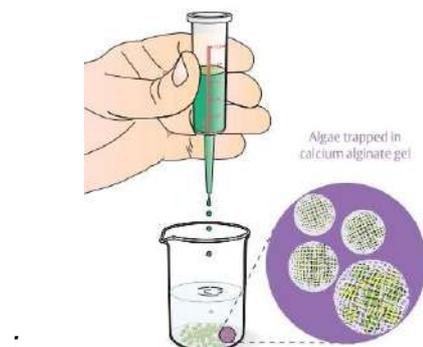
### 7.2.1 Scopo

Un ulteriore esperimento preliminare necessario è stata la costruzione delle sfere di alginato di calcio contenenti i cianobatteri. Lo scopo dell'esperimento è acquisire competenze nella preparazione delle palline e determinare se esse rappresentano un metodo efficace per studiare la fotosintesi.

### 7.2.2 Materiale

Per l'esperimento è stato utilizzato il seguente materiale:

- Coltura di spirulina
- Soluzione di alginato di sodio al 3% m/v (circa 20 mL)
- Soluzione di  $\text{CaCl}_2$  anidro al 1,5% m/v



- **Figura 19-** spirulina immobilizzata in sfere di alginato di calcio [11]

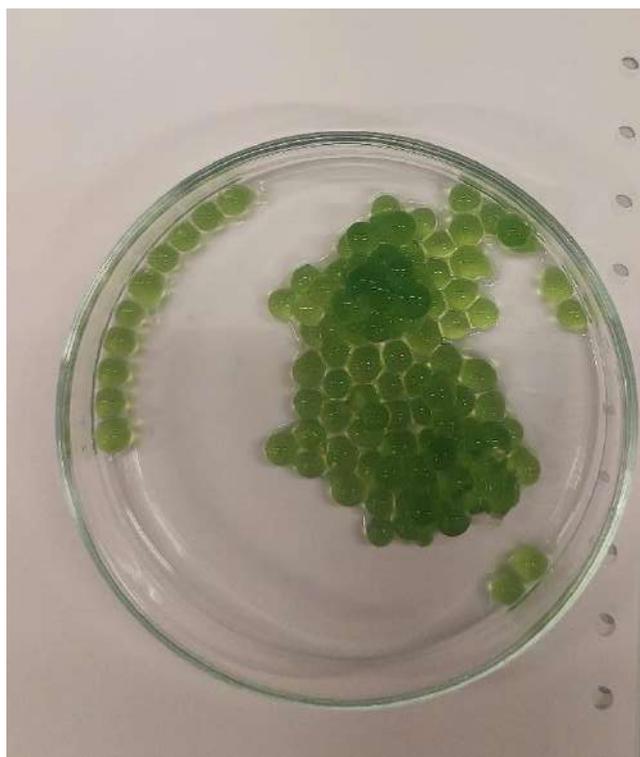
### 7.2.3 Procedimento

Per la preparazione delle palline di alginato, è stata utilizzata una coltura di spirulina, precedentemente centrifugata per rimuovere il surnatante. Successivamente, la spirulina è stata aggiunta a una soluzione di alginato di calcio al 3% m/v e mescolata. Questa miscela è stata poi pipettata goccia per goccia in una soluzione di cloruro di calcio anidro all'1,5% m/v per immobilizzare i cianobatteri. Le palline ottenute sono state successivamente filtrate e lavate con acqua distillata, pronte per essere utilizzate per studiare la fotosintesi.

Per i vari esperimenti condotti successivamente, sono state preparate delle fialette contenenti la stessa quantità di soluzione di indicatore di bicarbonato diluito con acqua distillata al 4%. È stato inoltre importante porre la stessa quantità di palline di alginato per fiala, per garantire condizioni sperimentali uniformi.

### 7.2.4 Risultati

Dopo pochi minuti nella soluzione di cloruro di calcio, le palline hanno acquisito maggiore resistenza meccanica. La procedura ha creato un gel semisolido, in cui erano immobilizzati i batteri fotosintetici (Figura 21) e (Figura 20). Le sfere misuravano approssimativamente 65, 45 mm<sup>3</sup>.



**Figura 20** - *palline di alginato di calcio contenenti la spirulina*

### 7.2.5 Conclusioni

Il gel si è formato grazie ai legami di reticolazione. Il processo di reticolazione, responsabile della formazione delle palline di alginato, si è verificato grazie all'interazione tra gli ioni calcio e le catene molecolari dell'alginato di sodio. Le sfere ottenute avevano approssimativamente lo stesso volume ed avevano una pari quantità di spirulina al loro interno, il che è utile per ridurre al minimo le

variabili per condurre esperimenti affidabili. Questo esperimento ha quindi permesso di acquisire le competenze necessarie per la realizzazione delle sfere contenenti i batteri fotosintetici e di osservare la loro gellificazione.

## 7.3 Indicatore

Un altro esperimento preliminare svolto è stato la preparazione dell'indicatore di bicarbonato, utilizzato per monitorare i cambiamenti della concentrazione di CO<sub>2</sub> dissolto in soluzione. L'indicatore di bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) è particolarmente utile per studiare la fotosintesi e la respirazione cellulare perché cambia colore a dipendenza della concentrazione di CO<sub>2</sub> dissolta. Quando il tasso di fotosintesi supera quello della respirazione cellulare la concentrazione di CO<sub>2</sub> diminuisce, mentre aumenta nel caso opposto.

### 7.3.1 Scopo

L'esperimento è stato finalizzato a preparare l'indicatore di bicarbonato, testare il suo funzionamento e la sua utilità nello studio della fotosintesi. [12]

### 7.3.2 Materiale

Per l'esperimento sono stati utilizzati:

- 0,1 grammi di rosso cresolo
- 0,2 grammi di blu di timolo
- 0,85 grammi di idrogenocarbonato di sodio
- 1 litro circa di acqua distillata appena bollita

### 7.3.3 Procedimento

Per preparare l'indicatore sono stati dissolti 0,1 grammi di rosso cresolo e 0,2 grammi di blu di timolo in 20 mL di etanolo. Dopodiché, 0,85 grammi di idrogenocarbonato di sodio sono stati dissolti in acqua distillata appena bollita, dunque priva di CO<sub>2</sub>. La soluzione di rosso cresolo e blu di timolo è stata poi aggiunta a quella contenente l'idrogenocarbonato di sodio. Infine, la miscela risultante è stata diluita fino a un volume totale di 1 litro utilizzando acqua distillata appena bollita.

Per testare la sensibilità e il funzionamento dell'indicatore, è stata utilizzata una cannuccia per soffiare delicatamente dell'aria nella soluzione, facendo aumentare la concentrazione di CO<sub>2</sub> dissolta e quindi diminuire il pH della soluzione. Dopodiché, la soluzione è stata scaldata e l'indicatore è tornato al colore iniziale.

### 7.3.4 Risultati

Dopo aver soffiato con la cannuccia, è stato osservato un cambiamento immediato del colore dell'indicatore, che è passato dall'arancione al giallo. Dopo aver scaldato la soluzione, l'indicatore è tornato arancione. Scaldandolo ulteriormente l'indicatore ha assunto una colorazione viola.

### 7.3.5 Conclusioni

L'indicatore è diventato arancione grazie all'aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> della soluzione, che ha provocato una diminuzione del valore del pH. Quando la soluzione è stata scaldata è diventata viola, in quanto l'aumentare della temperatura ha causato la diminuzione della solubilità

di CO<sub>2</sub> che ha provocato una riduzione della sua concentrazione e, di conseguenza, un aumento del pH.

L'esperimento ha mostrato che l'indicatore è molto sensibile ai minimi cambiamenti del pH; quindi, può essere utilizzato per determinare con precisione la concentrazione di diossido di carbonio in soluzione. Infatti, è sufficiente il dissolvimento di CO<sub>2</sub> dell'aria nella soluzione per far cambiare colore all'indicatore.

L'indicatore presenta un colore rosso quando la concentrazione di CO<sub>2</sub> dissolta è in equilibrio con quella dell'aria (0,04%). Con l'aumentare della concentrazione di CO<sub>2</sub>, il pH diminuisce e il colore dell'indicatore cambia dal rosso al giallo. In condizioni di ridotta concentrazione di CO<sub>2</sub> l'indicatore diventa invece viola, poiché il pH aumenta.

Ciò ha permesso di concludere che l'indicatore è uno strumento affidabile per monitorare i cambiamenti del pH e che è un mezzo altamente sensibile. La sua sensibilità permette di rilevare la minima fluttuazione della concentrazione di diossido di carbonio in soluzione, il che lo rende adatto a studiare la fotosintesi.

### 7.3.6 Uso dell'indicatore nello studio della fotosintesi

Il cambiamento del colore può essere misurato quantitativamente utilizzando un colorimetro, determinando l'assorbanza a 550 nanometri: la lunghezza d'onda della luce verde, a cui tutti i colori prodotti presentano un picco di assorbanza.

Quando le palline di alginato contenenti la spirulina vengono poste in una soluzione di indicatore e piazzate vicino ad una fonte luminosa, utilizzano il CO<sub>2</sub> dissolto per svolgere la fotosintesi. Di conseguenza, il colore dell'indicatore varia da arancione a viola. Se invece le sfere vengono tenute al buio, i cianobatteri non compiono la fotosintesi, e l'indicatore diventa giallo a causa del CO<sub>2</sub> prodotto dalla respirazione cellulare.

Il tasso di fotosintesi può essere influenzato da numerosi fattori; tuttavia, l'indicatore cambia completamente colore anche solo dopo quindici minuti. La variazione del pH della soluzione e quindi il tasso di fotosintesi, può essere valutata qualitativamente osservando il cambiamento del colore dell'indicatore. Per una valutazione quantitativa, si utilizza un colorimetro per determinare l'assorbanza a 550 nanometri, una lunghezza d'onda corrispondente alla luce verde, alla quale tutti i colori prodotti dall'indicatore presentano un picco di assorbanza. A questa lunghezza d'onda si ottiene una misurazione affidabile delle variazioni di CO<sub>2</sub> in soluzione, correlando direttamente i cambiamenti del colore all'attività fotosintetica dei cianobatteri.

Per equilibrare l'indicatore la concentrazione di CO<sub>2</sub> presente nell'atmosfera, prima di ogni esperimento, l'indicatore è stato fatto scorrere ripetutamente da un becher all'altro. Questo processo ha fatto sì che l'indicatore fosse esposto all'aria, permettendo l'assorbimento di CO<sub>2</sub> atmosferico. L'indicatore ha cambiato visibilmente colore dopo ogni transizione, diventando sempre più chiaro con il dissolversi della CO<sub>2</sub>.

## 7.4 Utilizzo di soluzioni tampone

Studi recenti [11] hanno dimostrato una significativa correlazione tra il pH e l'assorbanza dell'indicatore di bicarbonato, misurata a 550 nanometri. In particolare, è stato osservato che l'assorbanza aumenta proporzionalmente all'aumentare del pH. Questo legame è cruciale per

quantificare l'attività fotosintetica utilizzando un colorimetro, poiché consente di monitorare con precisione le variazioni del pH che hanno luogo durante il processo fotosintetico. Un maggiore tasso di fotosintesi porta quindi ad un aumento del pH e dell'assorbanza a 550 nanometri.

#### 7.4.1 Scopo

Lo scopo dell'esperimento è la preparazione di soluzioni tampone (Figura 22) per analizzare la relazione tra l'assorbanza a 550 nanometri e il pH della soluzione.



**Figura 22-** soluzioni a pH noto

#### 7.4.2 Materiale

- borato di sodio
- acido borico
- acqua distillata
- matracci tarati

#### 7.4.3 Procedimento

Per la preparazione delle soluzioni tampone avrebbero dovuto essere stati utilizzati 12.4g di acido borico ( $H_3BO_3$ ) e portati ad un volume di 1L con acqua distillata. Ma siccome l'acido borico non era disponibile, è stata utilizzata la base coniugata.

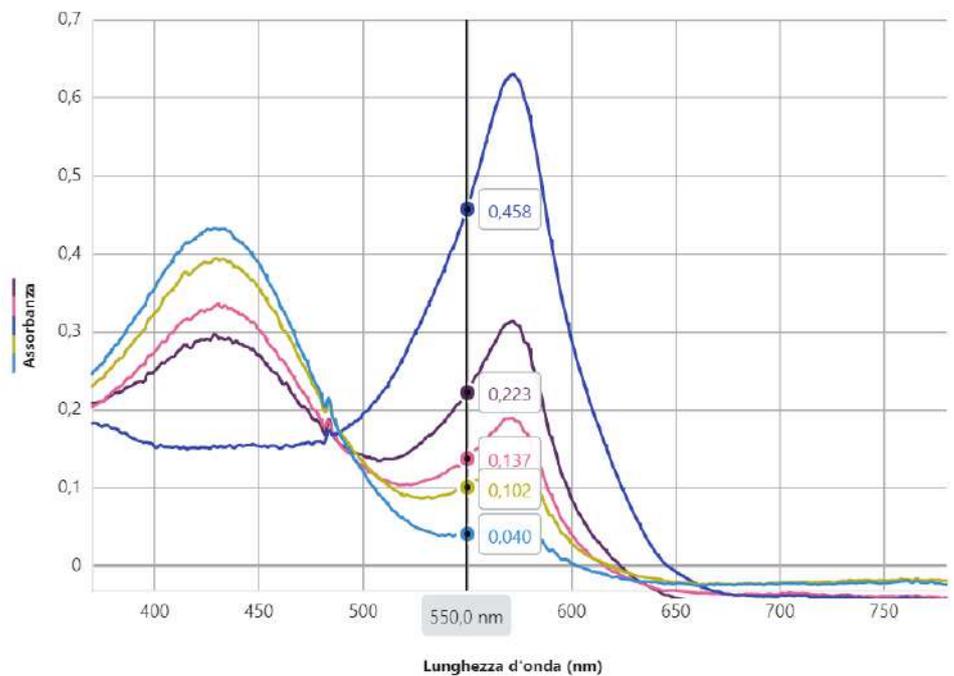
Parallelamente, sono stati preparati 9.5 g di borace sciolti in acqua distillata fino al volume di un litro. Dopodiché, 25 cm<sup>3</sup> della soluzione con la base coniugata sono stati aggiunti a 9 matracci da 100 cm<sup>3</sup> ciascuno. Ad ogni matraccio è stato aggiunto un quantitativo diverso della soluzione di borace (Tabella 1). Infine, sono stati aggiunti 100 mL di acqua distillata ad ogni matraccio.

valore del pH	7.6	7.8	8	8.2	8.4	8.6	8.8	9	9.2
vol. borace (cm <sup>3</sup> )	1.00	1.55	2.45	3.60	5.70	8.70	15.00	29.50	57.50
vol. acido borico (cm <sup>3</sup> )	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00

**Tabella 1-** volume della soluzione di borace da aggiungere

Una volta preparate le soluzioni tampone con valori di pH diversi, è stato preso un campione da ognuna di esse e posto in una cuvetta. L'assorbanza è stata misurata con un colorimetro. I dati sono stati utilizzati per stabilire la correlazione tra pH e assorbanza.

#### 7.4.4 Risultati

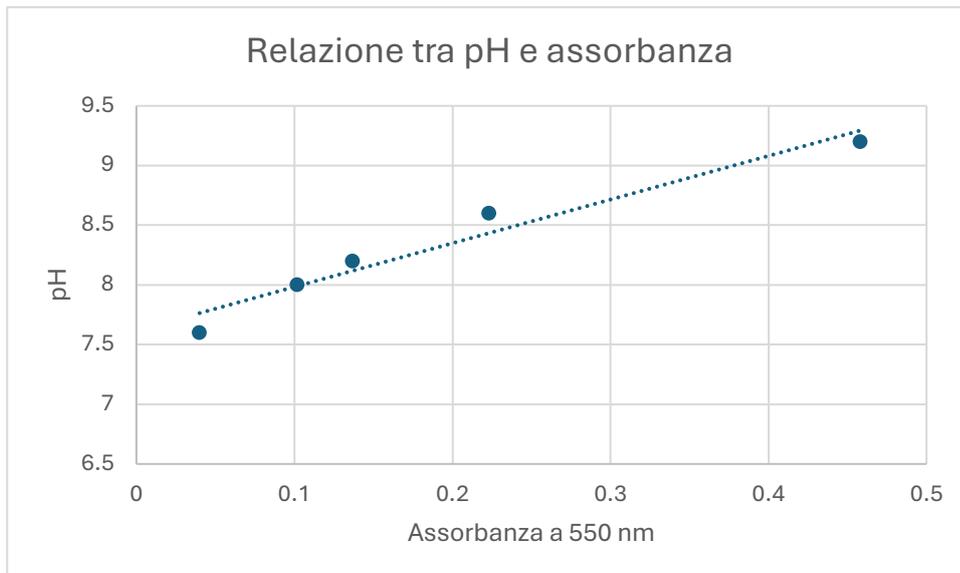


**Figura 23-** relazione tra l'assorbanza e la lunghezza d'onda. Ogni colore corrisponde a una soluzione tampone a pH noto

Il grafico (Figura 23) mostra che il picco di assorbanza di tutti i colori è a 571 nanometri. Inoltre, l'analisi delle soluzioni tampone a pH noto ha rivelato una chiara relazione tra il pH e l'assorbanza misurata a 550 nm. All'aumentare del pH della soluzione, l'assorbanza dell'indicatore è aumentata proporzionalmente.

assorbanza a 550 nm	pH
0.04	7.6
0.102	8.0
0.137	8.2
0.223	8.6
0.458	9.2

**Tabella 2-** relazione tra pH e assorbanza.



**Figura 24-** *relazione diretta tra assorbanza a 550 nanometri e pH.*

#### 7.4.5 Conclusioni

L'esperimento ha permesso di verificare la relazione diretta tra il pH della soluzione e l'assorbanza a 550 nm, in quanto il grafico presenta un andamento lineare (Figura 24).

Nonostante il picco massimo di assorbanza dell'indicatore si trovi a 571 nm, le misure per gli esperimenti successivi sono state effettuate a 550 nm poiché non era disponibile un colorimetro in grado di rilevare assorbanze a 571 nm. Tuttavia, la lunghezza d'onda selezionata si trova comunque in una regione dello spettro in cui l'assorbanza è direttamente proporzionale al pH, ideale per gli esperimenti successivi.

## 8 Esperimenti sull'attività fotosintetica e sulla respirazione cellulare

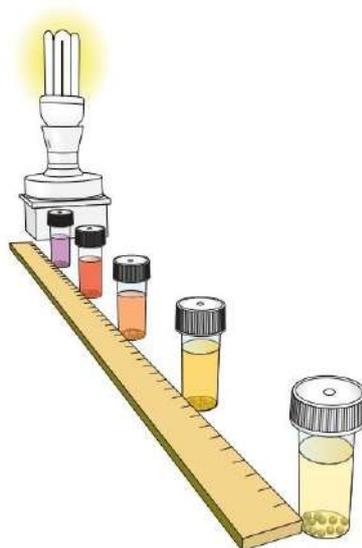
Per svolgere degli esperimenti semiquantitativi sulla fotosintesi e sulla respirazione cellulare sono state considerate le seguenti variabili: la quantità di cianobatteri nelle sfere, la distanza dalla sorgente luminosa e la lunghezza d'onda della luce.

Le palline sono state create nello stesso momento per ciascun esperimento. Infatti, se fossero state create in momenti diversi, le condizioni della coltura avrebbero potuto variare, influenzando la concentrazione di spirulina nelle sfere e compromettendo così la coerenza dei risultati sperimentali. Inoltre, la coltura di spirulina è stata sempre scossa prima della costruzione delle palline, per omogeneizzarla e garantire che le sfere contenessero la stessa quantità di cianobatteri.

Per ciascun esperimento, come indicatore dell'attività fotosintetica è stata misurata l'assorbanza a 550 nanometri. Inoltre, sono sempre stati effettuati esperimenti di controllo utilizzando le semplici sfere senza cianobatteri al loro interno. Questi controlli sono stati necessari per escludere eventuali variazioni causate dal materiale delle sfere o dall'ambiente esterno, garantendo che i cambiamenti osservati nei parametri misurati fossero veramente dovuti alla presenza e all'attività della spirulina e non ad altri fattori.

### 8.1 Effetto dell'intensità luminosa

Un'altra variabile analizzata è l'intensità luminosa, un fattore cruciale che influenza il tasso fotosintetico dei cianobatteri [12].



**Figura 25** - fiale contenenti l'indicatore e le palline, poste a diverse distanze dalla sorgente luminosa [11].

#### 8.1.1 Scopo

L'obiettivo dell'esperimento è valutare l'effetto dell'intensità luminosa sull'attività fotosintetica dei cianobatteri, analizzando come la variazione della distanza dalla sorgente luminosa influisca sulla fotosintesi.

## 8.1.2 Materiale

- Sfere di alginato con la spirulina preparate in precedenza
- 10 mL indicatore di bicarbonato
- Acqua deionizzata
- Colorimetro
- Lampada

## 8.1.3 Procedimento

Per determinare l'influenza della distanza dalla fonte luminosa, e di conseguenza anche dell'intensità luminosa sulla fotosintesi, sono state utilizzate delle fiale contenenti la soluzione con l'indicatore di bicarbonato e una quantità equivalente sfere algali; entrambi preparati in precedenza. Sono stati utilizzati 10 mL dell'indicatore e sono stati diluiti fino ad un volume totale di 250 mL con acqua deionizzata.

Le fiale sono state posizionate a distanze diverse da una sorgente luminosa in una stanza buia (Figura 25).

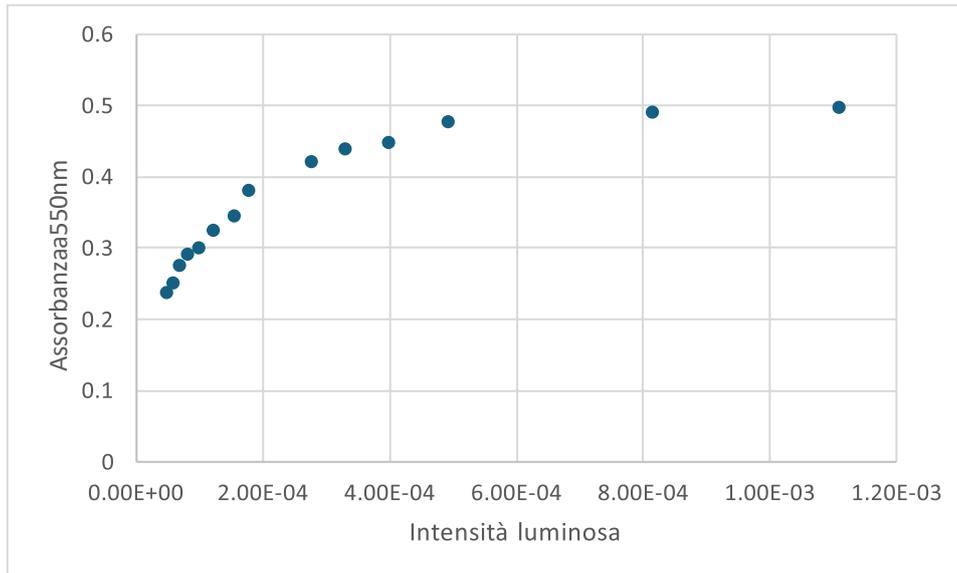
La loro posizione ha permesso la creazione di condizioni con diverse intensità luminose. Le fiale sono state lasciate per un'ora, per permettere all'indicatore di reagire e cambiare colore a causa della fotosintesi. Le misure sono state effettuate con un colorimetro ed è stata misurata l'assorbanza a 550 nanometri. L'indicatore è stato rimosso dalle fiale e posto in una cuvetta dopo 60 minuti. Dopo aver condotto la misura l'indicatore è stato rimesso nelle fiale.

## 8.1.4 Risultati

A livello qualitativo, è stato osservato che l'indicatore nelle fiale meno distanti dalla luce presentava un colore viola scuro; mentre in quelle più lontane era tendente al rosso scuro. Questi risultati sono stati quindi quantificati misurando l'assorbanza a 550 nanometri. I risultati dell'esperimento sono illustrati nella seguente tabella (Tabella 3) e nel seguente grafico (Figura 26).

distanza dalla luce (cm)	intensità luminosa $1/D^2$	assorbanza a 550 nm	intervallo di tempo (min)
30	1.11E-03	0.497	60
35	8.16E-04	0.490	60
45	4.94E-04	0.476	60
50	4.00E-04	0.447	60
55	3.31E-04	0.439	60
60	2.78E-04	0.420	60
75	1.78E-04	0.380	60
80	1.56E-04	0.345	60
90	1.23E-04	0.325	60
100	1.00E-04	0.301	60
110	8.26E-05	0.290	60
120	6.94E-05	0.275	60
130	5.92E-05	0.250	60
145	4.76E-05	0.237	60

**Tabella 3-** risultati ottenuti.



**Figura 26-** relazione tra assorbanza a 550 nm e intensità luminosa.

### 8.1.5 Conclusioni

L'intensità della luce determina la quantità di energia disponibile per la fotosintesi, influenzando quindi l'assorbimento del CO<sub>2</sub>.

All'aumentare della distanza dei cianobatteri dalla fonte luminosa, l'intensità luminosa diminuisce secondo la seguente relazione:

$$\text{Intensità luminosa} = 1 / \text{distanza}^2 \quad [10]$$

Il grafico mostra la relazione tra l'assorbanza a 550 nanometri e l'intensità luminosa, calcolata grazie alla formula  $I = 1/d^2$ . All'aumentare dell'intensità luminosa aumenta anche l'assorbanza e, di conseguenza, il pH della soluzione. Questo comportamento dimostra un aumento del tasso di fotosintesi all'aumentare dell'intensità luminosa, dato che i cianobatteri utilizzano una maggiore quantità di diossido di carbonio. L'aumento dell'assorbanza segue un andamento non lineare.

L'esperimento suggerisce che l'aumento dell'intensità luminosa porta a un incremento dell'assorbanza, il che implica una maggiore attività fotosintetica da parte dei cianobatteri nella soluzione. Questo effetto si riflette in una variazione del pH, poiché con l'incremento del tasso fotosintetico diminuisce la concentrazione di diossido di carbonio nella soluzione. Tuttavia, l'andamento non lineare del grafico suggerisce che ad alte intensità luminose il tasso fotosintetico non aumenta ulteriormente. Sembra quindi esserci un fattore limitante, che potrebbe essere legato alla saturazione della fotosintesi o ad altri fattori ambientali, come al numero di cianobatteri e al quantitativo di diossido di carbonio presente. Un altro possibile fattore limitante è lo stress luminoso, causato dall'eccessiva esposizione alla luce che potrebbe danneggiare i batteri. La saturazione fotosintetica è causata dal raggiungimento della massima efficienza da parte di enzimi responsabili della fissazione del carbonio come il rubisco, che non possono elaborare una maggiore quantità di CO<sub>2</sub>, nonostante l'aumento dell'intensità luminosa.

## 8.2 Quantità di spirulina nelle sfere

### 8.2.1 Scopo

Un'altra variabile studiata è stata la concentrazione delle sfere, rappresentata dalla quantità di spirulina al loro interno. Lo scopo dell'esperimento è stato quello di valutare l'effetto della concentrazione di cianobatteri nelle palline di alginato di calcio sul tasso di fotosintesi.

### 8.2.2 Materiale

- 80 mL coltura spirulina
- Necessario per preparare le palline
- 10 mL di indicatore
- Acqua deionizzata
- Colorimetro
- Lampada

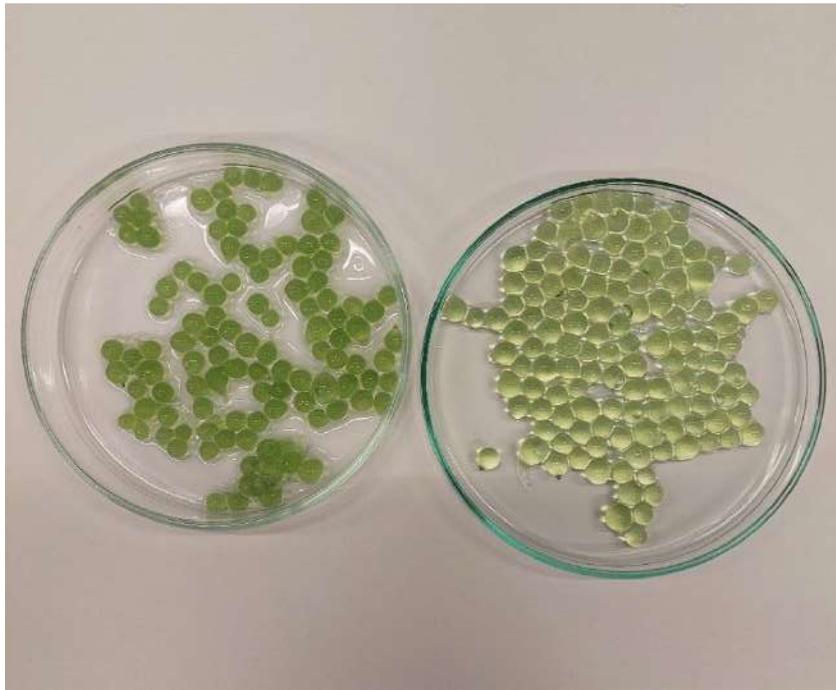
### 8.2.3 Procedimento

Per studiare questo parametro, sono state create delle sfere con due concentrazioni diverse di cianobatteri (Figura 27).

Le palline con una maggiore concentrazione di cianobatteri sono state ottenute direttamente dalla coltura di spirulina iniziale. Mentre per la creazione delle sfere meno concentrate 10 mL della coltura iniziale sono stati diluiti con acqua distillata fino a un volume totale di 200 mL. È stato importante preparare le sfere di alginato di calcio contenenti la spirulina nello stesso momento, in quanto le condizioni della coltura possono variare a dipendenza di molti fattori.

Le sfere sono state poi poste in quattro fialette contenenti lo stesso volume di indicatore alla stessa concentrazione e poste vicino a una sorgente luminosa in una stanza buia. Due fialette contenevano le sfere meno concentrate e le altre due quelle più concentrate. Come in precedenza, sono stati utilizzati 10 mL dell'indicatore e portati ad un volume totale di 250 mL con acqua deionizzata, per diminuire il numero di variabili.

Come indicatore quantitativo del tasso di fotosintesi è stata misurata l'assorbanza a 550 nanometri, dopo diversi intervalli di tempo: dopo 15, 30, 45 e 60 minuti. Per ogni misura effettuata l'indicatore è stato rimosso dalle fiale e posto in una cuvetta, dopodiché, al termine della misura è stato riposto nella fialetta.



**Figura 27-** *palline con diversa concentrazione di cianobatteri.*

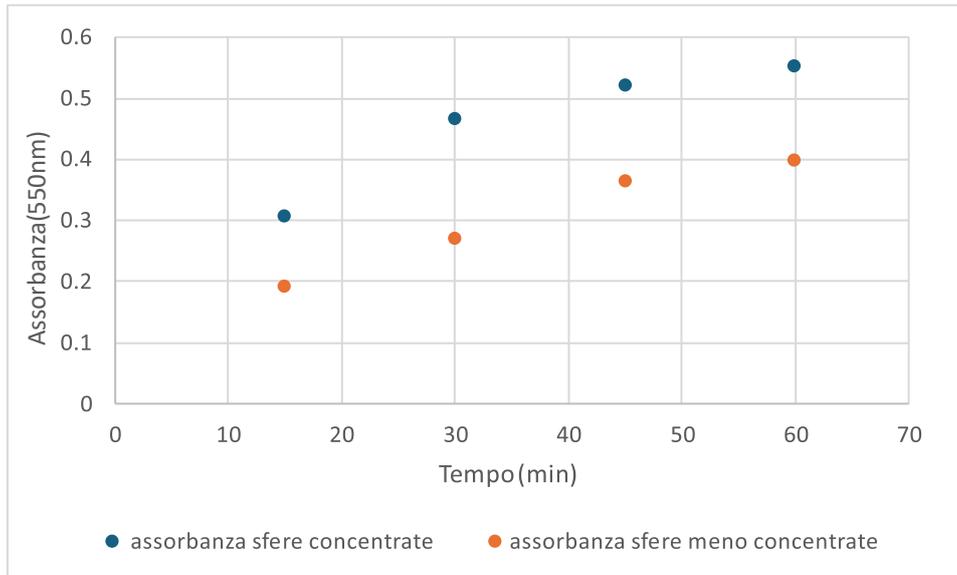
#### 8.2.4 Risultati

A livello qualitativo, è stata osservata una variazione di colore che tendeva al viola con il passare del tempo in tutte le fialette, quelle contenenti le sfere più concentrate mostravano una colorazione più scura.

La (Tabella 4) e la (Figura 28) mostrano i risultati ottenuti

tempo (min)	assorbanza sfere concentrate	assorbanza sfere meno concentrate
15	0.307	0.193
30	0.466	0.271
45	0.522	0.365
60	0.553	0.398

**Tabella 4-** *assorbanza delle sfere in relazione al tempo.*



**Figura 28-** *assorbanza a 550 nanometri della soluzione contenente le sfere in relazione al tempo.*

Il grafico mostra chiaramente che all'aumentare del tempo l'assorbanza a 550 nanometri aumenta progressivamente. Inoltre, come previsto, l'indicatore nella fialetta contenente palline di alginato meno concentrate mostra un'assorbanza inferiore a parità di tempo trascorso.

## 8.2.5 Conclusioni

L'aumento dell'assorbanza indica una diminuzione nella concentrazione di  $\text{CO}_2$  nella soluzione. Poiché la fotosintesi avviene in modo continuo nel tempo, una maggiore durata dell'esposizione alla luce consente ai cianobatteri di consumare una quantità maggiore di  $\text{CO}_2$ , portando così a un incremento dell'assorbanza.

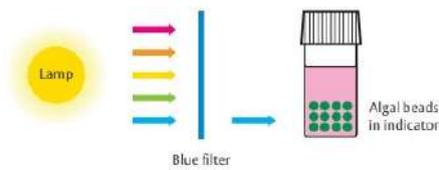
L'indicatore con le sfere meno concentrate mostra un'assorbanza minore, poiché una minore concentrazione di palline implica una riduzione del numero di cianobatteri presenti e una minor quantità di  $\text{CO}_2$  che viene consumata durante la fotosintesi. Di conseguenza, l'assorbanza inferiore riflette un'attività fotosintetica meno intensa rispetto alle fialette con palline più concentrate.

## 8.3 Lunghezza d'onda

### 8.3.1 Scopo

L'ultimo esperimento svolto si è concentrato sull'analisi della lunghezza d'onda della luce e la sua influenza sul tasso fotosintetico. È importante tenere in considerazione che la lunghezza d'onda dipende dal tipo di lampada utilizzato negli esperimenti.

L'esperimento condotto per studiare questo parametro aveva l'obiettivo di stabilire la relazione tra la fotosintesi e la lunghezza d'onda della luce, determinando quindi quale colore fosse più efficace per il tasso fotosintetico.

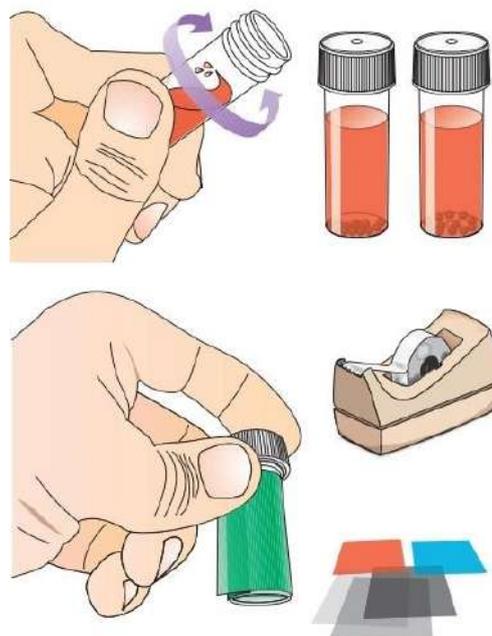


**Figura 29- Filtri che trasmettono solo un colore [11].**

### 8.3.2 Materiale

- Filtri di plastica
- Palline preparate in precedenza
- 10 mL di indicatore
- Acqua deionizzata
- Colorimetro

Per stabilire la relazione tra il tasso fotosintetico e la lunghezza d'onda della luce, sono stati utilizzati dei filtri colorati, ricavati ritagliandoli da delle cartelline di plastica (Figura 30). I filtri tendono ad assorbire tutte le lunghezze d'onda nel visibile e a trasmettere solamente la luce con la lunghezza d'onda corrispondente al colore del filtro (Figura 29). Ad esempio, un filtro verde trasmette solo il verde, che è quindi l'unico colore che la spirulina può utilizzare per svolgere il processo fotosintetico. Quindi, se un filtro non trasmette alcuna luce utilizzabile per svolgere la fotosintesi il processo si ferma, e avviene solo la respirazione cellulare. In questo caso, la concentrazione di CO<sub>2</sub> aumenterebbe e il valore dell'assorbanza a 550 nanometri diminuirebbe, poiché il colore dell'indicatore tenderebbe all'arancione a causa della diminuzione del pH.



**Figura 30- Filtri colorati.**

### 8.3.3 Procedimento

I filtri sono stati attaccati con il nastro adesivo a delle fialette contenenti l'indicatore di bicarbonato al 4% e delle sfere di alginato di calcio in cui era immobilizzata la spirulina. Ogni fialetta conteneva la stessa quantità di sfere e di indicatore, per ridurre al minimo le variabili. Inoltre, le sfere sono state realizzate nello stesso momento e con la medesima concentrazione di cianobatteri al loro interno, per lo stesso motivo.

Sono stati preparati filtri di quattro diversi colori: giallo, verde, blu, viola; e attaccati ad otto fialette, due per ciascun colore. Inoltre, due fialette sono state preparata senza l'aggiunta del filtro, per valutare anche l'effetto della lunghezza d'onda della luce della sorgente. Tutte le fialette sono state poste alla stessa distanza da una sorgente luminosa in una stanza buia. Dopo diversi intervalli di tempo è l'indicatore è stato prelevato da ciascuna cuvetta ed è stata misurata l'assorbanza a 550 nanometri con un colorimetro.

### 8.3.4 Risultati

Colore	Assorbanza a 550 nanometri	Intervallo di tempo (minuti)
Blu	0.229	30
Blu	0.338	45
Verde	0.237	30
Verde	0.324	45
Giallo	0.327	30
Giallo	0.419	45
Viola	0.397	30
Viola	0.417	45
senza filtro	0.319	30
senza filtro	0.421	45

**Tabella 5-** assorbanza a 550 nm in relazione al colore.

La (Tabella 5) mostra che con il trascorrere del tempo, il valore dell'assorbanza aumenta in ciascuna fialetta. Inoltre, mostra che i colori che hanno il valore maggiore per l'assorbanza sono il viola e il giallo. Mentre la luce verde, come previsto, è la meno efficace. Le due fialette senza filtro sono quelle che hanno presentato un'assorbanza maggiore dopo quarantacinque minuti. È interessante notare che, sebbene la luce viola mostri un'assorbanza più alta dopo trenta minuti rispetto alla luce bianca, dopo quarantacinque minuti il valore dell'assorbanza nella luce bianca supera quello della luce viola.

### 8.3.5 Conclusioni

Il valore dell'assorbanza cresce in funzione al tempo, poiché i cianobatteri hanno svolto la fotosintesi più a lungo. Il valore dell'assorbanza in aumento riflette la crescita del pH e quindi del tasso fotosintetico, poiché la concentrazione di CO<sub>2</sub> della soluzione diminuisce.

È importante sottolineare che il giallo non è solitamente la lunghezza d'onda ottimale per la fotosintesi, nonostante sia uno dei colori con l'assorbanza più alta. Ciò può essere dovuto al fatto che il filtro potrebbe trasmettere anche le parti rosse o blu dello spettro visibile, incrementando così l'attività fotosintetica.

La luce verde è la meno efficace per la fotosintesi, in quanto viene riflessa da molti pigmenti fotosintetici, come la clorofilla.

È importante considerare che il fatto che i filtri non sono selettivi e che trasmettono quindi un po' anche altri colori oltre al loro analogo, poiché non erano perfettamente opachi. Ciò spiega il fatto che la fotosintesi avviene anche in presenza del filtro verde, anche se teoricamente dovrebbe bloccare tutte le lunghezze d'onda utilizzabili per la fotosintesi.

I valori dell'assorbanza delle fiale senza filtro mostrano che la luce della sorgente è la più efficace per la fotosintesi. Questo perché la luce bianca comprende l'intero spettro delle lunghezze d'onda visibili, incluse quelle del rosso e del blu, ottimali per la fotosintesi.

Il fatto che l'assorbanza della luce bianca superi quella della luce viola dopo 45 minuti, suggerisce che l'efficienza fotosintetica della luce bianca è più sostenuta nel tempo, probabilmente grazie alla combinazione di lunghezze d'onda.

Inoltre, la luce blu non mostra il tasso più alto di assorbanza. Questo può essere spiegato dal fatto che la spirulina possiede la ficocianina, un pigmento blu che assorbe principalmente nel rosso e nell'arancione dello spettro, riflettendo la luce blu. [15]

## 9 Conclusioni finali

Il lavoro si proponeva di valutare l'efficacia dell'immobilizzazione della spirulina in palline di alginato. I risultati ottenuti hanno permesso di verificare l'efficacia del metodo impiegato. L'immobilizzazione dei cianobatteri in sfere di alginato consente dunque un'analisi sufficientemente accurata dell'attività fotosintetica della spirulina. In effetti, la costruzione delle palline, permette la realizzazione di un ambiente, nel quale la spirulina sopravvive e continua il processo fotosintetico. Le sfere hanno approssimativamente lo stesso volume e contengono la medesima quantità di cianobatteri. Ciò permette di creare un sistema monitorato, in cui la variazione di concentrazione di CO<sub>2</sub> in soluzione è attribuibile ad una sola variabile. Le palline consentono la realizzazione di esperimenti semi-quantitativi sull'attività fotosintetica.

L'indicatore è risultato estremamente sensibile alla variazione della concentrazione di CO<sub>2</sub> in soluzione, qualità che lo rende particolarmente adatto allo studio della fotosintesi. Tra pH e assorbanza intorno a 550 nanometri sembra infatti esserci una relazione di proporzionalità diretta, come suggerisce l'esperienza sulle soluzioni tampone. L'indicatore non misura direttamente l'attività fotosintetica della spirulina, ma il bilancio netto tra di essa e la respirazione cellulare.

Grazie al sistema costituito dalle palline e dall'indicatore, è stato possibile analizzare l'influenza di specifiche variabili sul tasso di fotosintesi della spirulina. Queste variabili sono state studiate una per volta, mantenendo costanti tutti gli altri fattori del sistema. L'esperimento sulla distanza dalla sorgente luminosa ha mostrato che l'aumento dell'intensità luminosa provoca un incremento dell'assorbanza a 550 nanometri, e quindi un aumento dell'attività fotosintetica dei cianobatteri. Il secondo esperimento mostra l'aumento dell'assorbanza e dell'attività fotosintetica all'aumentare della concentrazione di spirulina nelle sfere. Mentre l'esperimento sulla lunghezza d'onda ha permesso di individuare le lunghezze d'onda più efficaci per l'attività fotosintetica della spirulina. La luce della sorgente si è naturalmente dimostrata quella più efficace, seguita da quella viola e quella gialla. È opportuno ricordare che la luce gialla non è solitamente ottimale per la fotosintesi, questa discrepanza è probabilmente dovuta al fatto che i filtri non erano completamente opachi e dunque non del tutto adeguati a questo tipo di indagine.

Ciò nonostante, i risultati degli esperimenti hanno permesso di rilevare che l'immobilizzazione dei cianobatteri in sfere è uno strumento valido per un'analisi semi-quantitativa della fotosintesi. Il "semi" è dovuto all'impossibilità di creare delle sfere con esattamente lo stesso volume e contenenti precisamente la medesima quantità di cianobatteri. A causa di queste approssimazioni, gli esperimenti, pur essendo svolti con precisione, possono dare risultati talvolta imprecisi. Nel corso dello studio sono comunque stati eseguiti degli esperimenti di controllo per garantire l'affidabilità dei risultati. Per escludere l'influenza di fattori esterni sono state utilizzate prive di spirulina. L'assenza di variazioni significative del colore dell'indicatore ha confermato che i cambiamenti osservati sono attribuibili all'attività della spirulina.

L'affinazione della metodologia sperimentale utilizzata in questo lavoro potrebbe essere oggetto di studi futuri sulla sua affinazione. Sarebbe interessante utilizzare la medesima metodologia per studiare altre variabili come la temperatura e il volume delle sfere, verificando la sua efficacia. Inoltre, si potrebbe condurre l'esperimento con altri cianobatteri oppure delle alghe.

## 10 Bibliografia

- [1] Campbell, Reece, Taylor, Simon, e Dickey, *Immagini della Biologia*, vol. AB. Linx, 2010.
- [2] D. E. Sadava, A c. di, *Life - the Science of Biology*, Internat. ed., 9. ed. Sunderland: Sinauer, 2011.
- [3] «Cyanobacteria - Definition and Examples - Biology Online Dictionary», Biology Articles, Tutorials & Dictionary Online. Consultato: 14 ottobre 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.biologyonline.com/dictionary/cyanobacteria>
- [4] «Spettro elettromagnetico», *Wikipedia*. 1° ottobre 2024. Consultato: 17 ottobre 2024. [Online]. Disponibile su: [https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Spettro\\_elettromagnetico&oldid=141358685](https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Spettro_elettromagnetico&oldid=141358685)
- [5] ScienzaMagia, «Acchiappare la luce: La fotosintesi.» Consultato: 12 ottobre 2024. [Online]. Disponibile su: <https://scienzamagia.eu/scienza-tecnologia/acchiappare-la-luce/>
- [6] M. P. Johnson, «Photosynthesis», *Essays Biochem.*, vol. 60, fasc. 3, pp. 255–273, ott. 2016, doi: 10.1042/EBC20160016.
- [7] D. Nelson e M. Cox, *I principi di biochimica di Lehninger*, 8° ed. Zanichelli, 2022.
- [8] G. D. Muro, «Ciclo di Calvin: 5 cose da ripassare per il Test di Medicina», UniD Formazione. Consultato: 11 ottobre 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.unidformazione.com/ciclo-di-calvin/>
- [9] A. Marburger, «Alginate und Carrageenane – Eigenschaften, Gewinnung und Anwendungen in Schule und Hochschule».
- [10] «“Algal balls” - Photosynthesis using algae wrapped in jelly balls», Science & Plants for Schools. Consultato: 12 giugno 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.saps.org.uk/teaching-resources/resources/235/algal-balls-photosynthesisusing-algae-wrapped-in-jelly-balls/>
- [11] D. Eldridge, «A novel approach to photosynthesis practicals», 2019.
- [12] «Investigating Photosynthesis with the SAPS / NCBE Photosynthesis Kit», Science & Plants for Schools. Consultato: 2 ottobre 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.saps.org.uk/teaching-resources/resources/123/investigating-photosynthesiswith-the-saps-ncbe-photosynthesis-kit/>
- [13] Vermaas «Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria»
- [14] Neil.A Campbell, Jane B. Reece «Biologia»
- [15] Shabana Kouser Ali, Arabi Mohammed Saleh « Spirulina an overview»

## Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuta durante la realizzazione di questo lavoro. Un ringraziamento particolare va al professor Lubini, per la costante disponibilità, il supporto, i consigli e la guida durante tutte le fasi del progetto.

Infine, vorrei ringraziare i miei genitori per avermi sempre incoraggiata negli studi e motivata in ogni momento del mio percorso scolastico.