



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in
BIOLOGIA MARINA

**Esposizione di microalghe marine a composti fenolici: effetto sulla crescita e
possibile applicazione nella fito-depurazione**

*Exposure of marine microalgae to phenolic compounds: effect on growth and
possible application in phytodepuration*

Tesi di Laurea Magistrale di:

Drigo Filippo

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Norici Alessandra

Correlatore

Marcheggiani Fabio

Sessione Ottobre 2022

Anno Accademico 2021/2022

RINGRAZIAMENTI

Questo traguardo non l'avrei raggiunto senza l'aiuto e il supporto di molti. In primis la mia famiglia, che in questi 5 (lunghi) anni mi ha permesso di intraprendere e portare a termine questo percorso, sostenendomi sempre.

Fondamentale è stato anche il supporto di Nick e Simo, che in tutti questi anni e nonostante la distanza ci sono sempre stati, per i momenti belli e quelli brutti.

Grazie anche agli amici di Domenica in balcone (nominarvi tutti sarebbe lungo), che hanno reso il soggiorno nella ridente città di Ancona molto migliore. Grazie per tutte le giornate passate assieme e spero che ce ne saranno altre in futuro. Ma grazie, soprattutto, per i pranzi grassi!!

Non meno fondamentali l'AlgaeLab e Madda, Giulia ed Alessandro. Grazie a Tere e Simo per la compagnia nelle giornate passate in lab. A Cate, Ste, Ale e Lollo per tutto quello che mi hanno insegnato. Grazie soprattutto alla Prof. per l'opportunità che mi ha dato di intraprendere questo percorso, a volte difficile, ma che ha dato molte soddisfazioni, di quei questo lavoro è solo una parte.

Quindi grazie a tutti, questo risultato è anche merito vostro!

Filippo Drigo

ABSTRACT

Sei specie di microalghe marine (*Dunaliella salina*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Synechococcus* sp., *Nannochloropsis salina*, *Isochrysis galbana* e *Porphyridium purpureum*) sono state coltivate in presenza di composti fenolici (tiroso, acido *p*-cumarico, acido caffeico) tipici di acque di vegetazione (AV) allo scopo di selezionare l'alga ottimale per la fitodepurazione e valorizzazione delle citate acque reflue. *D. salina* è risultata la più idonea ed è stata quindi selezionata perché capace di crescere in presenza di tutti e tre i composti e di tollerare gli stress ossidativi causati da tali molecole (misurati attraverso Comet assay su cellule non acclimatate). Successivamente, *D. salina* è stata acclimatata ad un mezzo di crescita contenente una miscela dei tre composti fenolici (ciascuno alla concentrazione utilizzata per la selezione). L'alga si è dimostrata in grado di crescere. Un aumento significativo dei carboidrati è stato osservato in fase esponenziale rispetto al controllo cresciuto in assenza di composti fenolici. Il rapporto tra la clorofilla *a* e *b* (indice della stabilità delle antenne fotosintetiche) e l'indice di riduzione della biomassa algale (rapporto tra le assorbanze rilevate all'FTIR dei gruppi funzionali saturi e insaturi nella materia organica), diversi dai valori in cellule di controllo, hanno suggerito tuttavia la presenza di stress ossidativo.

Dai dati di concentrazione dei composti fenolici misurati nel mezzo acquoso durante la crescita algale si è notato che *D. salina* non degrada nessuno dei tre composti utilizzati e non modula l'attività antiossidante nel tempo (misurata attraverso il saggio del DPPH).

L'alga è stata successivamente acclimatata e cresciuta in AV diluite al 10 % (v/v) con mezzo di crescita standard ed esposta a due irradiazioni differenti, 100 (LL) e 300 (HL) $\mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nella condizione LL le alghe hanno presentato una riduzione del tasso di crescita pari al 70 % del tasso di cellule

cresciute in solo mezzo standard, mentre la condizione HL non ha influenzato significativamente la crescita algale rispetto al controllo. Nuovamente, un aumento significativo di carboidrati è stato osservato nella biomassa algale cresciuta ad HL, mentre le quantità di pigmenti rimangono invariate. Tramite il Comet assay (su cellule non acclimatate ad AV) si è osservato che dopo 8 giorni di esposizione alle AV, i danni ossidativi al materiale genetico di *D. salina* sono notevolmente ridotti rispetto a quanto osservato dopo 1 giorno di esposizione, suggerendo una efficace difesa dagli stress ossidativi causati dalle AV. Nonostante la risposta osservata, *D. salina* non è stata in grado di inibire o modificare significativamente l'attività ossidante dei composti fenolici contenuti nelle AV durante l'acclimatazione (misurata tramite il saggio del DPPH).

Vista la promettente risposta cellulare mostrata da *D. salina* in questa tesi, studi mirati a favorire la rimozione dei composti fenolici da parte di questa specie microalgale (tramite evoluzione adattativa in laboratorio/ALE, per esempio) potrebbero permettere lo sfruttamento di quest'alga per valorizzare le AV come mezzo di crescita e contemporaneamente degradare i composti fenolici presenti, infine ottenere biomassa pregiata in maniera sostenibile.

Indice delle abbreviazioni

RI = indice di riduzione

DPPH = 2,2-difenil-1-picriidrazil

PI = Percentuale di inibizione

Mix = miscela dei tre composti fenolici

AV = acque di vegetazione

LL = 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

HL = 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

AV LL = acque di vegetazione diluite a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

AV HL = acque di vegetazione diluite a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1. Le acque reflue e il loro impatto ambientale	1
1.2. Le acque reflue di frantoio e i composti fenolici	3
1.2.1. <i>Caratteristiche generali delle acque di vegetazione</i>	4
1.2.2. <i>I composti fenolici</i>	6
1.3. Blue growth & biotechnologies	7
1.3.1. <i>Le microalghe</i>	9
1.3.2. <i>Molecole e composti delle microalghe</i>	10
1.4. Economia circolare	12
1.5. Possibili applicazioni della biomassa algale	13
1.6. Le problematiche dell'utilizzo delle microalghe per la fito-depurazione di acque di vegetazione	17
1.7. Stato dell'arte sulle tecniche di coltivazione di microalghe	18
1.7.1. <i>Open systems</i>	19
1.7.2. <i>Closed systems</i>	21
1.8. Scopo della tesi	23
MATERIALI E METODI	24
2.1. Specie microalgali utilizzate, quali e perché	24
2.1.1. <i>Dunaliella salina</i>	24
2.1.2. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	24
2.1.3. <i>Synechococcus</i> sp.....	25
2.1.4. <i>Nannochloropsis salina</i>	25
2.1.5. <i>Isochrysis galbana</i>	26
2.1.6. <i>Porphyridium purpureum</i>	26
2.2. Condizioni di coltura per la selezione della specie ottimale	26
2.2.1. <i>Composti fenolici utilizzati per la selezione della specie</i>	28
2.3. Pre-trattamento del refluo e condizioni di coltura della microalga selezionata per la fito-depurazione	30
2.4. Crescita delle specie microalgali	30
2.5. Quantificazione dei composti fenolici	32
2.5.1. <i>Meccanica di reazione</i>	33
2.6. Contenuto cellulare dei pigmenti fotosintetici	33
2.7. Contenuto cellulare delle proteine	35
2.7.1 <i>Meccanica di reazione</i>	37
2.8. Composizione macromolecolare della biomassa microalgale	37
2.9. Indice di riduzione della biomassa microalgale	41

2.10. Attività antiossidante nella microalga selezionata	42
2.11. Valutazione dei danni al DNA	44
2.12. Analisi statistica	47
RISULTATI	49
3.1. Selezione della specie algale	49
3.1.1. Tasso di crescita, tempo di duplicazione, densità massima	49
3.1.2. Variazione del contenuto in composti fenolici nel mezzo di crescita	54
3.2. Esposizione simultanea di <i>D. salina</i> ai 3 composti fenolici ed esposta a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	56
3.2.1. Tasso di crescita, tempo di duplicazione, densità massima	56
3.2.2. Variazione del contenuto in composti fenolici nel mezzo di crescita	60
3.2.3. Quantificazione dei pigmenti	61
3.2.4. Quantificazione delle proteine	64
3.2.5. Composizione macromolecolare	64
3.2.6. Indice di riduzione	67
3.3. Esposizione di <i>D. salina</i> alle AV diluite e due condizioni di illuminazione differenti	69
3.3.1. Tasso di crescita, tempo di duplicazione, densità massima	69
3.3.2. Variazione del contenuto in polifenoli nel mezzo esterno	72
3.3.3. Quantificazione dei pigmenti	72
3.3.4. Quantificazione delle proteine	75
3.3.5. Composizione macromolecolare	76
3.3.6. Indice di riduzione	81
3.4. Valutazione degli effetti tossici dei composti fenolici e delle AV diluite su cellule non acclimatate	83
3.4.1. Saggio del DPPH	83
3.4.2. Comet assay	90
DISCUSSIONI	101
4.1. Tossicità dei singoli composti fenolici sulle microalghe	101
4.2. Effetti della miscela di composti fenolici su <i>Dunaliella salina</i>	109
4.3. Effetti delle AV su <i>Dunaliella salina</i>	112
4.4. Possibile applicazione di <i>D. salina</i> nella fito-depurazione	114
CONCLUSIONI	117
MATERIALI SUPPLEMENTARI	118
6.1. Selezione della specie algale per la fito-depurazione	118
6.2. Esposizione simultanea di <i>D. salina</i> ai 3 composti fenolici a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	124
6.3. Esposizione di <i>D. salina</i> alle AV diluite e due condizioni di intensità luminosa	129
6.4. Valutazione degli effetti tossici dei composti fenolici e delle AV diluite su cellule non acclimatate	141
BIBLIOGRAFIA	154

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1. Le acque reflue e il loro impatto ambientale

Le acque reflue sono tutte le tipologie di scarico liquido che derivano da attività umane. Queste sono sia scarichi di impianti urbani, di industrie tessili, di allevamenti, ma anche scarichi da impianti di lavorazione di prodotti agricoli. Se non trattate in maniera adeguata da appositi e specifici impianti di trattamento (WasteWaters Treatment Plants/WWTP), o se non trattate per nulla (Ilyas et al., 2019), queste acque immetterebbero in ambiente composti organici ed inorganici in concentrazioni tali da alterare la salute dell'ecosistema (principalmente acquatico, ma anche terrestre) e con implicazioni per la salute umana, sia dirette che indirette (Akpor et al., 2011).

L'impatto ambientale delle acque reflue dipende da una serie di parametri quali: pH, ossigeno disciolto (*dissolved oxygen*, DO), la richiesta di ossigeno (biologica e chimica, BOD e COD), quantità di azoto presente (e in che forme chimiche, a seconda delle quali varia la disponibilità per gli organismi e anche la tossicità), la quantità di fosfato (variabile a seconda dello stato di ossidazione dell'ambiente), la concentrazione di metalli tossici (per esempio Pb, Hg, Cr) ed essenziali (per esempio Fe, Cu, Zn) (Akpor et al., 2011).

Il pH è un parametro importante per determinare l'impatto delle acque reflue siccome valori sotto il 5 e sopra il 10 (rispettivamente, molto acidi o molto basici) impediscono, nella maggior parte dei casi, la sopravvivenza degli organismi, con ripercussioni molto serie sull'ambiente. Infatti, una variazione del pH può modificare la solubilità e il comportamento di elementi e molecole dell'ecosistema, come una maggiore o minore bio-disponibilità e/o tossicità degli stessi.

La presenza di metalli tossici, invece, è rilevante per le conseguenze che essi hanno una volta rilasciati in ambiente, che può dipendere dalla loro concentrazione e dalle caratteristiche ambientali del luogo di rilascio.

Gli altri parametri (BOD, COD, quantità di azoto e fosforo, metalli essenziali) sono indicatori degli effetti trofici che possono avere le acque reflue. Elevati livelli di BOD e COD, infatti, indicano un alto contenuto in carbonio organico, quindi disponibile alla mineralizzazione da parte di microorganismi, con il conseguente consumo di ossigeno. Questo può portare all'insorgenza di anossia e morte dei livelli trofici superiori. La mineralizzazione della materia organica può essere anche anaerobia, con rilascio di prodotti tossici quali ad esempio l'acido solfidrico.

Altri elementi nutritivi come azoto, fosforo e metalli essenziali hanno generalmente disponibilità limitata, tuttavia, se la loro concentrazione aumenta, come ad esempio durante il rilascio di acque ricche in tali composti, si verifica il fenomeno dell'eutrofizzazione, con un aumento considerevole dei produttori primari. Di per sé, questo fenomeno porta a un aumento della produttività del sistema (Smith et al., 1999), ma nel lungo periodo, la biomassa che si genera dall'aumento di produttività (per esempio tramite una fioritura microalgale), porta a un'elevata richiesta di ossigeno per la sua degradazione, con conseguente anossia del sistema e semplificazione della rete trofica (quindi riduzione della produttività e danno all'ecosistema).

Un'altra problematica legata all'eutrofizzazione può essere la fioritura di microalghe tossiche. Il loro impatto è molto maggiore negli ecosistemi marini rispetto a quelli dulcicoli, in quanto la presenza di specie tossiche è maggiore e per la possibile contaminazione di organismi animali dal valore commerciale (Smith et al., 1999).

Quindi, è evidente che il trattamento delle acque reflue prima del rilascio in ambiente è necessario per salvaguardare gli ecosistemi. I sistemi attuali permettono un certo grado di depurazione delle varie tipologie di scarico, ma sia l'impossibilità di determinare l'impatto ecologico delle singole sostanze inquinanti e delle loro miscele (contenute nei reflui), che la presenza di contaminanti emergenti (sostanze di nuova generazione i cui effetti ecotossicologici sono poco conosciuti rispetto agli inquinanti tradizionali), rendono difficile una depurazione completa ed efficace. Risulta quindi necessario continuare la ricerca per sviluppare sistemi di depurazione più efficienti.

1.2. Le acque reflue di frantoio e i composti fenolici

I paesi mediterranei sono i maggiori produttori di olio d'oliva, contribuendo fino al 97% della produzione mondiale. Tra questi, i maggiori sono Spagna, Italia, Grecia e Turchia (Paraskeva & Diamadopoulos, 2006).

Tra i prodotti di scarto dell'olio di oliva, la frazione acquosa è rappresentata dalle acque reflue di frantoio, dette anche acque di vegetazione (AV) o, in inglese, *Olive Mill Waters* (OMWs). Le caratteristiche fisico-chimiche di questo refluo dipendono dal metodo di estrazione, dalla maturità dell'oliva, dalla regione d'origine e dalle condizioni climatiche in cui l'oliva è maturata. In ogni caso, le AV sono altamente inquinanti e, insieme al fatto che la loro produzione è discontinua e spesso a conduzione familiare, mancano legislazioni adeguate al loro rilascio in ambiente (Doula et al., 2017).

Per tentare di risolvere questo problema, nel 2009 la Commissione Europea ha finanziato un progetto LIFE, denominato "Strategie per migliorare e proteggere la qualità del suolo dal rilascio di acque reflue di frantoio nella regione mediterranea" (PROSODOL). Tale progetto ha dimostrato che il rilascio non

regolamentato di AV porta a danni chimico-fisici, anche permanenti, nei suoli in cui vengono rilasciate. Grazie allo sviluppo di indicatori più accurati sulla qualità del suolo e dei relativi valori soglia, il progetto ha anche permesso lo sviluppo di un sistema di monitoraggio dei corpi d'acqua e metodologie innovative per l'analisi delle AV.

L'impatto sugli ecosistemi acquatici è stato dimostrato chiaramente da Pavlidou et al. (2014). In questo lavoro viene dimostrata la correlazione tra scarico di AV e degradazione degli ambienti fluviali e costieri riceventi, il cui stato ecologico non torna a livelli ottimali prima di 5 mesi dal rilascio del refluo.

1.2.1. Caratteristiche generali delle acque di vegetazione

Le AV sono un refluo altamente inquinante, soprattutto per i valori elevati di COD, BOD, solidi in sospensione (SS), basso valore di pH e la presenza di lignina, tannini e altri composti fenolici, che determinano il caratteristico colore scuro (Danellakis et al., 2011; Paraskeva & Diamadopoulos, 2006). I parametri e le sostanze contenute nelle AV sono riassunti nelle tabelle 1.A e 1.B.

Molti dei composti presenti sono in grado di provocare alterazioni fisiologiche del biota, sia a livello dell'organismo che cellulare, come dimostrato da Danellakis et al., 2011 in *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Probabilmente, i principali responsabili di questi effetti sono gli acidi grassi liberi a catena lunga (de Sousa Andrade et al., 2005; Kamaya et al., 2003; Maia et al., 2010; Schönfeld & Reiser 2021) e i composti fenolici, tossici sia per i microrganismi che per le piante (Danellakis et al., 2011; Romero et al., 2007; Paraskeva & Diamadopoulos, 2006). La presenza di metalli incrementa ulteriormente il danno che le AV portano all'ambiente, sia che vengano usate nell'irrigazione dei suoli, sia che vengano rilasciate nei fiumi (Pavlidou et al., 2014).

Parametro	Valore (media \pm SD)
t-COD (g L ⁻¹)	188.66 \pm 12.99
d-COD (g L ⁻¹)	88.40 \pm 1.60
BOD (g L ⁻¹)	21.90 \pm 1.41
TSS (g L ⁻¹)	64.68 \pm 1.03
VSS (g L ⁻¹)	62.18 \pm 1.55
Fenoli totali (g L ⁻¹) ^a	11 \pm 1
Azoto totale (g L ⁻¹)	0.71 \pm 0.02
Fosforo totale (mg L ⁻¹)	328.30 \pm 8.63
Ortofosfati (mg L ⁻¹)	291.33 \pm 1.8
Zuccheri totali (g L ⁻¹)	41.65 \pm 0.07
pH	5.62 \pm 0.2

Tabella 1. A. Parametri fisico-chimici delle AV. t-COD e d-COD corrispondono a COD totale e disciolta. TSS e VSS corrispondono a solidi in sospensione totali e volatili.

^aCalcolati usando come riferimento l'acido sirigico. Modificata da Danellakis et al., 2011.

Metalli	mg L⁻¹ (media \pm SD)
Cu	2.96 \pm 0.018
Cd	0.01 \pm 0.001
Zn	4.98 \pm 0.020
Fe	8.88 \pm 0.222
Mg	113.6 \pm 0.78
Pb	0.10 \pm 0.001
Cr	1.95 \pm 0.059
Ca	294 \pm 1.39
K	730.1 \pm 3.53
Na	151.8 \pm 1.59

Tabella 1. B. Metalli contenuti nelle AV. Modificata da Donellakis et al., 2011.

1.2.2. I composti fenolici

I composti fenolici sono una famiglia di molecole caratterizzate dalla presenza di gruppi fenolici, i quali possono essere associati in strutture più o meno complesse. La variabilità dei sostituenti del gruppo fenolico fa sì che questa famiglia sia estremamente ampia, comprendendo molecole sia a basso che ad alto peso molecolare. Pertanto, ogni molecola presenta caratteristiche peculiari, che la distinguono dagli altri composti, sia in termini di solubilità che di interazioni con il biota. La loro grande variabilità rende complicato lo studio di queste molecole e i loro effetti sono ancora poco compresi e, in alcuni casi, ancora ignoti (Scalbert et al., 2005)

Queste molecole sono principalmente sintetizzate dagli organismi vegetali (anche microalghe) (Scaranya et al., 2014; Widowati et al 2017), dove agiscono soprattutto come antiossidanti (come si può vedere in Fig. 1) e le cui concentrazioni variano in base alla specie, alla localizzazione nell'organismo e ai fattori ambientali (Abbas et al., 2016, Aboul-Enein et al., 2007). Un altro ruolo che i composti fenolici hanno negli organismi vegetali è quello di regolare i fitormoni (soprattutto citochine ed auxine), controllando la crescita e l'insorgenza di tumori della pianta (Rasouli et al., 2016). Queste funzioni possono essere svolte in quanto i composti fenolici presentano anche effetti pro-ossidativi, inducendo il blocco della crescita cellulare e l'apoptosi (Abbas et al., 2016; Scalbert et al., 2005).

Questi composti sono anche coinvolti nel funzionamento del sistema immunitario della pianta, fungendo da composti antimicrobici e antifungini (Rasouli et al., 2016).

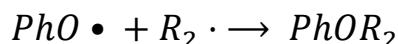
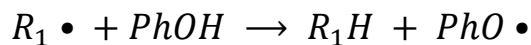


Figura 1 Schema dell'attività antiossidante dei composti fenolici (Ph). R rappresenta il radicale, PhO• rappresenta il radicale fenolico (più stabile).

1.3. Blue growth & biotechnologies

Con la crisi climatica attuale è sempre più importante investire in tecnologie che permettono di ridurre al minimo l'inquinamento. Per esempio, negli ultimi anni, la depurazione di AV non è solo affidata a metodi chimico fisici, ma può anche essere effettuata attraverso metodi biotecnologici che prevedono l'utilizzo di microrganismi, o parti di essi, all'interno di un processo industriale. Le biotecnologie sono parte integrante della *Blue growth* (crescita blu), strategia a lungo termine della Commissione Europea che ha come obiettivo la valorizzazione di mari, oceani e coste europee e quindi l'uso ottimale delle risorse, tenendo in considerazione la salute degli ecosistemi. Infatti, la *Blue growth* vede nei mari e negli oceani una potenziale fonte di innovazione e crescita per l'Unione Europea da sfruttare in maniera illuminata, sempre considerando la sostenibilità sociale, economica e ambientale delle attività antropiche.

Ci sono 5 settori chiave che possono favorire una *Blue growth* sostenibile e che richiedono nuove ricerche:

- Acquacoltura;
- Biotecnologie blu;
- Turismo costiero e marittimo;
- Energie rinnovabili marine;
- Risorse minerali marine.

Le biotecnologie blu sono un recente campo di ricerca e presentano un grande potenziale in termini di tecniche utilizzabili su e prodotti innovativi derivanti

da organismi marini. Le biotecnologie blu sono, infatti, l'applicazione di scienza e tecnologia agli organismi acquatici per la creazione di conoscenza, beni e servizi (OECD, 2016).

Nell'ottica della lotta ai cambiamenti climatici, della riduzione dell'impatto antropico sull'ambientale e della crescente domanda di cibo (conseguente alla crescita demografica mondiale), le biotecnologie blu rappresentano un'alternativa sostenibile alle attuali pratiche e filiere di produzione.

L'aumento demografico e la migrazione di buona parte della popolazione verso le città (Rérat, 2011), localizzate spesso in prossimità di fiumi o mari, rappresentano una grande fonte di stress per gli ecosistemi acquatici e gli organismi che vi abitano (Buttaert & De Bièvre, 2012). Questo fattore, insieme alle pressioni ambientali generate dal cambiamento climatico, rende necessario sviluppare soluzioni sostenibili che riducano lo stress sugli ambienti acquatici, in modo da preservare i servizi ecosistemici che forniscono (come risorse per l'uomo e sequestro di CO₂) e la qualità ambientale, un altro fattore legato alla mitigazione del cambiamento climatico.

Un esempio di applicazione delle biotecnologie blu per un uso più sostenibile delle acque è il risanamento delle acque reflue tramite la coltivazione di microalghe. Questa applicazione permette di ridurre l'impatto ambientale del trattamento delle acque reflue e del loro rilascio, ridurre la richiesta di acqua e nutrienti per la coltivazione di microalghe e, in generale, i costi per la produzione di biomassa microalgale e per il trattamento delle acque reflue (Calijuri et al., 2022; Surkatti & Al-Zuhair, 2018). La fitodepurazione permette quindi di generare biomassa e molecole bioattive, utilizzabili come ingredienti e integratori della alimentazione umana e animale, biofertilizzanti (prodotti contenenti microrganismi vivi o sostanze naturali in grado di migliorare le proprietà chimiche e biologiche del suolo, incrementando la resa dei campi

agricoli) e biostimolanti (prodotti derivanti da materiale organico che, applicati in piccole quantità, stimolano la crescita e lo sviluppo delle coltivazioni agricole), biocarburanti (Calijuri et al., 2022; Ronga et al., 2019).

Le microalghe sono una vantaggiosa fonte di prodotti sostenibili poiché, essendo organismi unicellulari, il loro tasso di crescita è alto, possono sopravvivere anche in condizioni ambientali sfavorevoli e la loro coltivazione richiede solamente luce, acqua, anidride carbonica e nutrienti inorganici (Calijuri et al., 2022; Tang et al., 2020). Purtroppo, ad oggi è ancora difficile ottenere biomasse molto elevate e a prezzi accessibili a tutti, soprattutto nel campo dei biocarburanti (Calijuri et al., 2022; Tang et al., 2020); nel paragrafo 3.6. verranno analizzati le attuali tecniche di coltivazione, i vantaggi e i svantaggi.

1.3.1. Le microalghe

Il termine alghe non ha valore filogenetico in quanto non è un raggruppamento monofiletico. Infatti, sono inclusi sia organismi procarioti, i cianobatteri, ma anche gli organismi eucarioti appartenenti a vari taxa (Borowitzka, 2018):

- Archaeplastida (Glaucophyta, Rhodophyceae, Chloroplastida);
- Chromalveolata (Cryptophyceae, Haptophyta, Stramenopili, Alveolata);
- Rhizaria (Chloroarachniophyta);
- Excavata (Euglenozoa).

Le microalghe sono organismi di dimensioni comprese tra 0.5 e 200 μm (Borowitzka, 2018) capaci di compiere la fotosintesi ossigenica, un insieme di reazioni innescate dall'energia luminosa che portano alla sintesi di carbonio organico a partire da carbonio inorganico (CO_2) e al rilascio di ossigeno.

Le microalghe marine sono fondamentali per la salute degli ecosistemi marini in quanto sono i principali produttori primari a livello globale (costituiscono

per esempio il fitoplankton), contribuendo in maniera significativa al sequestro di anidride carbonica negli oceani e, di conseguenza, al ciclo biogeochimico del carbonio (Borowitzka, 2018).

Oltre a permettere l'organizzazione del carbonio, le microalghe hanno un ruolo molto importante anche nel ciclo dell'azoto, in particolar modo nella fissazione dell'azoto atmosferico (azoto molecolare N_2). La fissazione dell'azoto è un insieme di reazioni molto complesse, ancora non del tutto chiarite e che richiedono grandi quantità di energia. Fra le microalghe, il processo è svolto dai cianobatteri. Due esempi sono il genere *Anabaena* e il genere *Trichodesmium*, il cui ruolo nella fissazione è stato per anni sottostimato, ma in aree tropicali e sub-tropicali, sembra essere maggioritario nel favorire la biodisponibilità di azoto.

1.3.2. Molecole e composti delle microalghe

Essendo produttori primari, le microalghe sono alla base della nutrizione di molti organismi e sono fonte di molecole fondamentali che ritroviamo nei livelli trofici superiori, come gli acidi grassi a catena lunga (PUFA), gli acidi grassi neutri (triacilgliceroli, TAG), pigmenti come clorofille, ficobiliproteine (come la ficocianina) e carotenoidi (β -carotene, l'astaxantina, luteina, licopene). Contengono anche importanti vitamine, come la vitamina A, C, D, E e K (Borowitzka, 2018). Nella Tab. 2 sono riportati altri esempi di molecole e le specie che ad oggi rappresentano la fonte principale di queste sostanze, con le relative applicazioni.

La maggior parte delle specie di microalghe è inoltre dotata di parete cellulare, un involucro esterno alla membrana cellulare che fornisce ulteriore protezione alla cellula, sia da predatori, ma anche da stress osmotici e può modulare

l'interazione con l'ambiente esterno. La composizione di tale involucro è estremamente varia:

- Peptidoglicano nei cianobatteri;
- Cellulosa e altri polisaccaridi;
- Silicio nelle diatomee, a formare il frustolo;
- Peptidi.

Ci possono essere anche altri involucri costituiti per esempio da carbonato di calcio nei coccoliti delle Coccolithophyceae o da strutture proteinacee. come, per esempio, nella pellicola delle Euglenophyceae.

Quindi, vista la varietà di composti che si possono ottenere dalle microalghe, il loro utilizzo nelle biotecnologie blu ha grandi prospettive di crescita futura e molti possibili campi di applicazione.

Specie	Molecola	Applicazione
<i>Chlorella</i> sp.	Luteina, b-carotene	Farmaceutica, nutrizione
<i>Cryptocodinium conhi</i>	Acido decosaesanoico (DHA)	Farmaceutica, nutrizione
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoidi, β -carotene	Cibo, integratori, mangimi
<i>Haematochoccus pluvialis</i>	Carotenoidi, astaxantina, luteina	Cibo, farmaceutica, integratore per mangimi
<i>Isochrysis galbana</i>	Acidi grassi, carotenoidi, fucoxantina	Farmaceutica, nutrizione, mangimi
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Acido ecosapentanoico (EPA)	Farmaceutica nutrizione
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	Lipidi, acidi grassi, acido ecosapentanoico (EPA)	Nutrizione, produzione biodiesel
<i>Porphyridium cruentum</i>	Acido arachidonico, polisaccaridi	Farmaceutica, cosmesi, nutrizione
<i>Arthrospira platensis</i>	Ficocianina, acido α -linolenico, biomassa	Nutrizione, cosmesi

Tabella 2. Esempi di specie e i prodotti da loro sintetizzati e il loro campo d'applicazione. Modificata da Santhosh et al., 2016.

1.4. Economia circolare

Il sistema economico attuale si basa su un modello lineare, ovvero si prelevano le risorse dalla Terra (*take*), si creano prodotti da queste risorse (*make*) e infine i prodotti vengono scartati (*waste*). Risulta evidente l'insostenibilità nel lungo termine di questo sistema, anche solo considerando che l'*Earth overshoot day*, ovvero il giorno in cui le risorse disponibili per l'anno solare vengono esaurite (quindi viene consumato più di quello che il sistema Terra è in grado di rigenerare in un anno) è ogni anno più precoce. Un modello di sviluppo alternativo è quello ad economia circolare.

Con economia circolare si intende un modello economico che prevede una serie di comportamenti volti alla riduzione dell'inquinamento e dell'impatto ambientale generando nuovo valore attraverso il riciclo e la riduzione dei rifiuti, e il riutilizzo a fine vita dei prodotti. Attraverso anche l'utilizzo di fonti energetiche rinnovabili, l'economia circolare si basa su 3 principi fondamentali:

- Riduzione di scarti e inquinamento;
- Riciclo di prodotti e materiali (al loro più alto valore possibile);
- Preservazione e ripristino degli ecosistemi.

Pertanto, il modello ad economia circolare favorisce l'applicazione di metodologie e di soluzioni che vanno ad affrontare problematiche globali, come: cambiamento climatico, perdita di biodiversità, produzione eccessiva di scarti e inquinamento (come raffigurato in Fig. 2).

Il riutilizzo di acque reflue (sia da scarichi urbani che industriali) tramite microalghe entra a pieno titolo in questo modello di sviluppo. Permette di utilizzare come risorsa uno scarto, limitando il suo impatto ambientale, e permette di produrre biomassa microalgale che ha svariate applicazioni in vari campi industriali, permettendo anche di sequestrare anidride carbonica

dall'atmosfera, grazie al processo fotosintetico. Sempre nell'ottica di un'economia circolare, è possibile sfruttare gas di scarico industriali contenenti CO₂ e immetterli nell'impianto di crescita per stimolare la crescita algale e ridurre la quantità del gas serra emesso in atmosfera. Non bisogna però dimenticare anche la sostenibilità economica e sociale di queste pratiche che, se non rispettata, diventa un ostacolo alla loro diffusione e applicazione.

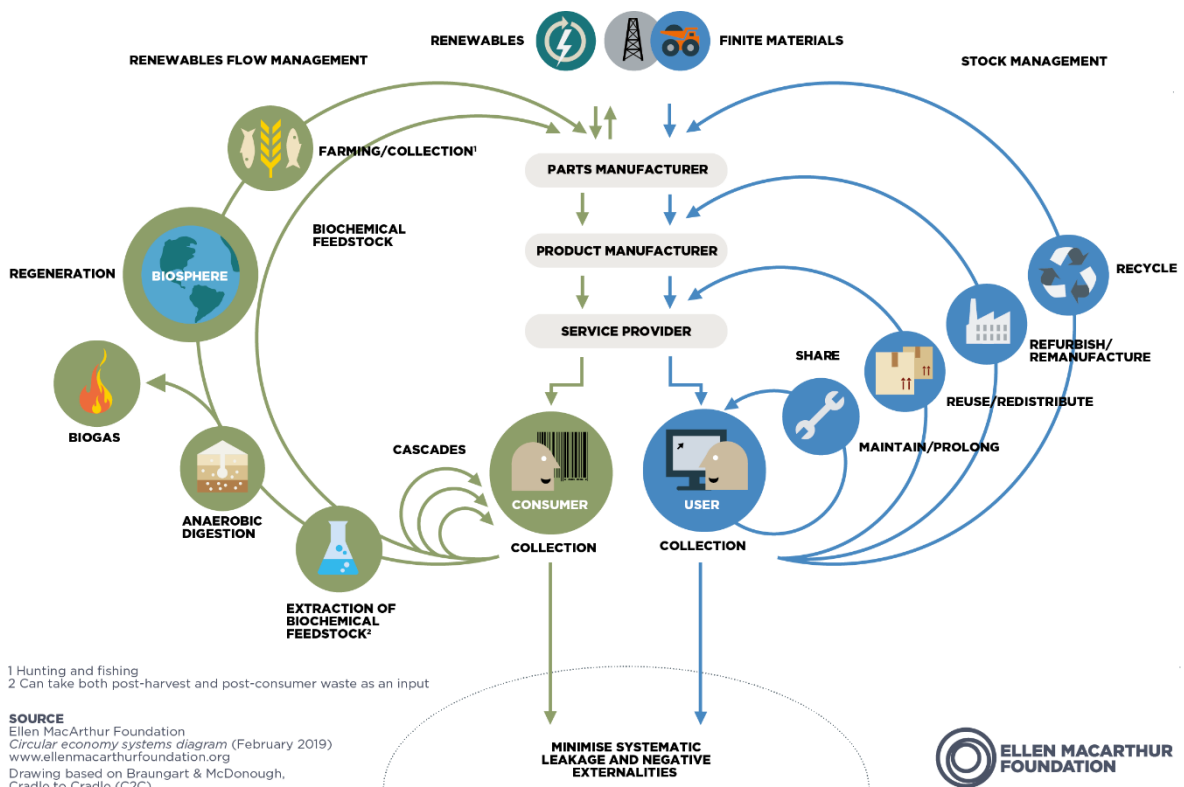


Figura 2. Diagramma a farfalla che rappresenta il modello di sviluppo ad economia circolare (Ellen MacArthur Foundation Circular economy systems diagram (February 2019), www.ellenmacarthurfoundation.org)
 Disegno basato su Braungart & McDonough, Cradle to Cradle

1.5. Possibili applicazioni della biomassa algale

I prodotti derivanti dalle microalghe sono molti, e altrettante possono essere le loro applicazioni.

TAG e PUFA hanno due applicazioni principali. Per esempio, i TAG sono una fonte sostenibile di bio-carburanti, necessari per la transizione ecologica verso fonti di energia rinnovabile in seguito all'aumento della popolazione mondiale e alla crescente richiesta energetica (Liang et al., 2018). Infatti, dalla reazione tra TAG e metanolo si generano esteri metilici di acidi grassi (FAME, fatty acids methyl ester), il biodiesel, e si ottiene come prodotto di scarto il glicerolo (Katiyar et al., 2017; Liang et al., 2018).

I PUFA hanno applicazioni importanti nella nutraceutica, settore che ricerca e propone principi attivi presenti negli alimenti con effetti positivi per la salute umana (Mobin et al., 2019; Tang et al., 2020). Alcuni esempi di PUFA sono gli ω -3, come l'acido docosaesanoico (DHA), l'acido ecosapentanoico (EPA) e l'acido α -linolenico (ALA), ma anche gli ω -6 come l'acido arachidonico. EPA e DHA possono essere usati nel trattamento di malattie cardiovascolari, cancro, diabete (Calijari et al., 2022; Liang et al., 2018).

I carotenoidi possono essere usati come coloranti naturali da destinare all'industria alimentare o tessile, per favorire una colorazione più intensa nei pesci ornamentali e commerciali (quando inclusi nella dieta). L'astaxantina è uno dei più potenti antiossidanti conosciuti ed esibisce anche attività antinfiammatoria ed anti-apoptotica (Calijuri et al., 2022; Tang et al., 2020).

Il β -carotene, precursore della vitamina A, presenta proprietà di immunomodulazione, prevenzione di tumori e malattie cardiovascolari (Tang et al., 2020).

Il licopene è un pigmento appartenente al gruppo dei carotenoidi. Pertanto, presenta attività antiossidante, anticancerogeno e anti-aterogeno (previene la formazione di placche arteriosclerotiche) (Bhalamurugan et al., 2018). Ad oggi, la fonte principale è rappresentata dai pomodori, ma recenti ricerche hanno mostrato che *Chlorella marina* è in grado di sintetizzare licopene con maggior

potere antiossidante di quello derivante dai pomodori (Bhalamurugan et al., 2018).

Le ficobiliproteine dei cianobatteri e delle alghe rosse (ficocianina, alloficocianina, ficoeritrina e ficoeritrocianina) possono essere usate come coloranti naturali, ma anche come antiossidanti, antinfiammatori, agenti epato e neuro protettivi (Bhalamurugan et al., 2018).

Il paramylon è un polimero del glucosio con legami β -1,3 ed è sintetizzato da specie del genere *Euglena* come polisaccaride di riserva. Viene prodotto a fini commerciali in Giappone (Borowitzka, 2018).

Insieme alla formulazione di integratori con i principi attivi appena esposti, la biomassa algale contribuisce alla produzione di alimenti proteici vegetali nell'industria alimentare di oggi e del futuro (Borowitzka, 2018).

La parete di silicio delle diatomee, il frustulo, presenta interessanti applicazioni per le sue proprietà strutturali. I frustuli sono, infatti, promettenti trasportatori di farmaci in posizioni specifiche dell'organismo, grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e struttura porosa. Tale struttura permette anche di usare i frustuli come strutture filtranti (Wang et al., 2012).

I polidrossialcanoati (PHA) sono polimeri sintetizzati dai batteri. I cianobatteri, in particolare, sono in grado di sintetizzare il poli-idrossi-butirato (PHB) in condizioni di chemiotrofia e fotoautotrofia, usando come substrato carbonioso glucosio, acetato e maltosio, singolarmente o in combinazione. Questi polimeri presentano caratteristiche comparabili a quelle della plastica convenzionale, pertanto potrebbero fungere da alternative biodegradabili, la cui produzione non richiede petrolio, ma solamente la coltivazione microalgale (Calijuri et al., 2022; Karan et al., 2019; Singh et al., 2017). Altri derivati delle microalghe che sono usati per sintetizzare bio-plastiche sono amido e proteine, ottenibili anche

da eucarioti come *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella variabilis* (Calijuri et al., 2022).

I polisaccaridi della parete, in particolare i polisaccaridi solforati, sono un altro prodotto ottenibile dalla coltivazione microalgale. Permettono di ottenere vari composti bioattivi con proprietà antitrombotiche, anticoagulanti, antinfiammatorie, immuno-modulatorie, antimicrobiche e antivirali (Mobin et al., 2019). Le alghe sono anche una fonte di idrogeno molecolare (H_2), un'alternativa ai combustibili fossili. Come per altri processi di sintesi di H_2 , i costi di produzione sono ancora elevati e non mancano dubbi sulla sostenibilità ambientale. Dal punto di vista economico, la sintesi microalgale di idrogeno può essere compensata usando acque reflue come mezzo di crescita algale. Dal punto di vista ambientale però, la produzione porta a un consumo considerevole di energia elettrica (75% derivante da combustibili fossili) (Calijuri et al., 2022). Inoltre, la coltivazione in acque reflue per la sintesi di idrogeno molecolare può portare alla formazione di composti potenzialmente inquinanti, come carbone, anidride carbonica (CO_2), monossido di carbonio (CO), metano (CH_4) e altre sostanze (Calijuri et al., 2022).

Le microalghe attraverso il metabolismo secondario producono anche composti fenolici, in quanto sono sintetizzati come metaboliti coinvolti nella difesa cellulare contro stress biotici ed abiotici (Mobin et al., 2019).

La biomassa algale ottenuta è anche usata come supplemento per la dieta degli animali da allevamento, come bovini, pollame e pesci (Chen et al., 2021). Questa pratica permette di migliorare la salute degli animali e la qualità dei prodotti ottenuti, trasferendoli così, indirettamente, ai consumatori finali (Altomonte et al., 2018; Fraeye et al., 2012; Mobin et al., 2019; Świątkiewicz et al., 2015). In questo modo si riesce a ridurre l'impatto ambientale (come le emissioni generate per l'allevamento dei bovini) e introdurre nella dieta

prodotti difficilmente accettati nel mercato occidentale, come sono quelli a base di microalghe (Villarò et al., 2021).

Quindi, vista la varietà di prodotti ottenibili e commercializzabili, la coltivazione di microalghe a partire da acque reflue viene favorita dalla possibilità di ottenere prodotti ad alto valore commerciale, che permettono di bilanciare i costi di produzione, tendenzialmente elevati e che rappresentano ancora una sfida per una più ampia applicazione in campo industriale di questi microrganismi (Fig. 3).

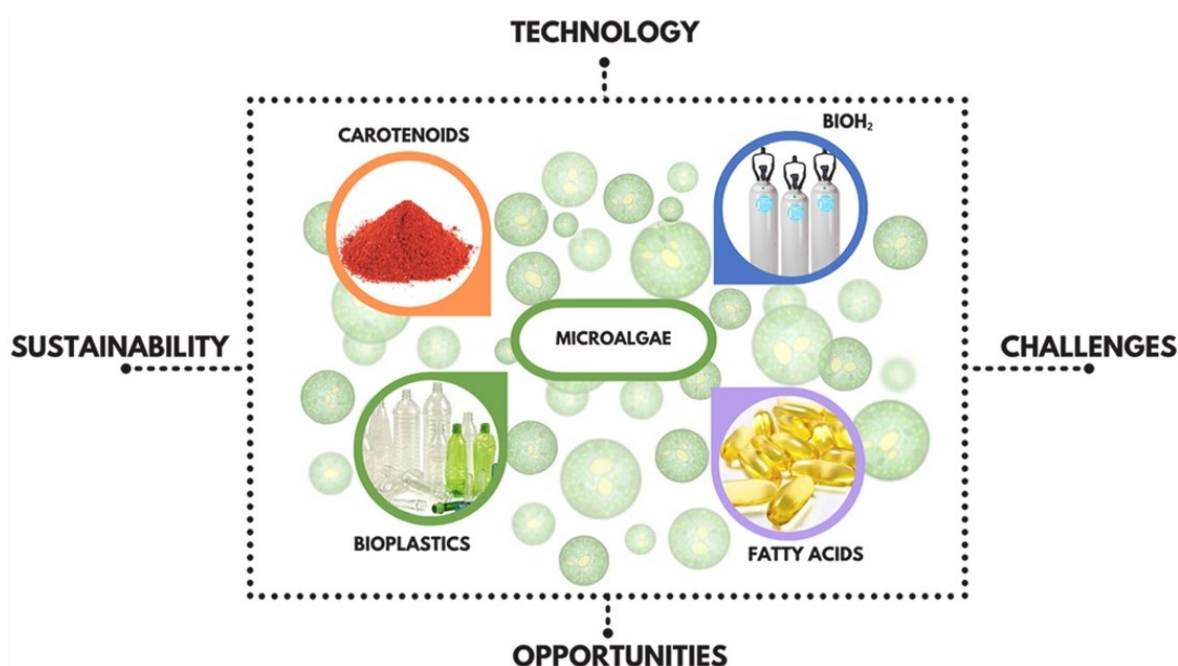


Figura 3. Microalghe e loro derivati (da Calijuri et al., 2022).

1.6. Le problematiche dell'utilizzo delle microalghe per la fito-depurazione di acque di vegetazione

Utilizzare AV come mezzo di crescita delle microalghe ha potenziali applicazioni nel settore alimentare. Infatti, dalla biomassa risultante è possibile ottenere i composti descritti nel paragrafo 1.5.; inoltre, poiché le AV sono un sottoprodotto della produzione di olio d'oliva e quindi contengono ancora metaboliti persi nei passaggi di produzione dell'olio, la biomassa algale

potrebbe arricchirsi in questi ultimi. Però, come abbiamo visto nel paragrafo 1.2., le acque di vegetazione non favoriscono la crescita di organismi fotosintetici, sia per il contenuto organico che per il basso valore di pH e la presenza di composti fenolici a concentrazioni tali da essere tossici.

Un'altra problematica è dovuta al colore di questo refluo, molto scuro, tale da ridurre la quantità di luce penetrante, riducendo l'intensità luminosa che raggiunge le microalghe, ma non in maniera tale da impedire la fotosintesi. Pertanto, anche la richiesta di energia luminosa sarà maggiore di quella richiesta in assenza di AV e ciò potrebbe complicarne ulteriormente la fitodepurazione tramite microalghe.

Inoltre, l'utilizzo di biomassa algale per la nutrizione umana o animale è regolamentato. A livello europeo le microalghe approvate per tali tipologie di consumo sono poche, per esempio: *Arthrospira platensis* (ex *Spirulina*), *Chlorella* sp., *Porphyridium* sp., *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella salina*, *Isochrysis* sp., *Haematochoccus pluvialis*, *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum* sp., *Tetradismus* sp.

Se la biomassa algale prodotta da acque reflue non deriva da una delle specie approvate dall'autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), tale biomassa non può essere utilizzata per la nutrizione umana, ma può comunque essere in altri ambiti.

1.7. Stato dell'arte sulle tecniche di coltivazione di microalghe

Come abbiamo visto, le microalghe presentano molte caratteristiche interessanti per la coltivazione a livello industriale: un alto tasso di crescita rispetto al tasso delle coltivazioni convenzionali, metabolismo autotrofo, basso rapporto cellulare tra superficie e volume, che favorisce gli scambi delle risorse con l'ambiente esterno, e un accumulo maggiore di sostanze per singola cellula.

Nonostante ciò, negli attuali sistemi di coltivazione l'efficienza di conversione dell'energia luminosa in materia organica è ancora molto bassa, ciò si traduce in poca biomassa ad un elevato prezzo (Faried et al., 2017).

Ci sono due tipologie principali di coltivazione, la coltivazione in sistemi aperti (*open systems*) e la coltivazione in sistemi chiusi (*closed systems*).

1.7.1. Open systems

Alcuni esempi sono *circular ponds*, *raceway ponds*, ma anche pozze naturali (*natural ponds*). Generalmente, queste tipologie di impianto hanno struttura semplice e bassi costi di costruzione, quindi potenzialmente applicabili in vari contesti fra cui i paesi in via di sviluppo.

Le problematiche principali legate ai sistemi aperti sono varie. La principale è l'impossibilità di controllare le condizioni di crescita, come la temperatura, l'intensità luminosa a cui sono esposte e il tempo di esposizione, tutti fattori che dipendono dalle condizioni ambientali del luogo. Pertanto, è necessario valutare bene l'area di coltivazione prima di costruire tali impianti (Faried et al., 2017).

Un secondo problema è quello delle contaminazioni. Essendo sistemi aperti è impossibile avere colture pure/sterili, le colture possono contaminarsi con batteri, predatori di alghe o altre alghe competitive. Le contaminazioni batteriche non sono però sempre uno svantaggio. Possono infatti instaurarsi dei consorzi alga-batterio che favoriscono la crescita dell'alga e ne stimolano la produzione dei composti d'interesse (Liu et al., 2020). Però, se lo scopo finale è alimentare, le contaminazioni devono essere ridotte il più possibile.

Esistono tuttavia strategie per limitare il livello di contaminazione o per favorire il più possibile la crescita dell'alga d'interesse. Ad esempio, è auspicabile la costruzione dell'impianto in condizioni ambientali che

favoriscano tassi elevati di crescita nell'alga selezionata, oppure l'utilizzo di mezzi di crescita selettivi, come alta salinità (per esempio per *Dunaliella salina*) o alto pH (per esempio per *Arthrospira platensis*). Sicuramente l'utilizzo di inoculi voluminosi, ottenuti da colture sterili di specie algali con tassi molto elevati di crescita, agevola l'alga d'interesse nella competizione per i nutrienti (Enzing et al., 2014).

Uno dei sistemi aperti più utilizzati è quello delle *raceway ponds* (Fig. 4), un canale circolare chiuso su sé stesso alle estremità, che permette al mezzo di circolare in continuo grazie alla presenza di una ruota a pale (*paddle wheel*).

In questi sistemi la produzione è limitata principalmente dal volume delle vasche di coltivazione. Infatti, la profondità massima di questi sistemi è di circa 30 cm poiché a profondità maggiori la luce incidente non raggiunge il fondo della vasca, limitando così la crescita delle microalghe. Questo è dovuto all'effetto assorbente e di diffusione dell'acqua stessa ma anche della biomassa algale che occupa gli strati superficiali della vasca. Di conseguenza, la profondità massima in una *raceway pond* va da 18 a 30 cm. Quindi, per aumentare la produttività si aumenta la superficie della vasca; se la superficie è troppo estesa i sistemi di agitazione del mezzo (generalmente una ruota a pale) si dimostrerebbero inefficienti o troppo grandi e i costi di costruzione e gestione aumenterebbero eccessivamente (Faried et al., 2017). Il sistema di mescolamento serve non solo per evitare la sedimentazione delle cellule negli strati meno illuminati della vasca, ma anche per evitare la formazione di gradienti di temperatura e nutrienti.

Per favorire la crescita algale è possibile installare un sistema di gorgogliamento con CO₂, che aumenta la disponibilità di carbonio inorganico per le alghe e contribuisce a mantenere il pH costante. Essendo però un sistema aperto, una parte della CO₂ immessa viene persa per diffusione in atmosfera.

In questi sistemi di coltivazione, la raccolta della biomassa può essere giornaliera e a piccole quantità, con contemporanea aggiunta di mezzo fresco nell'impianto, mantenendo così la coltura in una fase esponenziale di crescita continua (tipologia di coltivazione definita "coltura continua"). La seconda possibilità è quella di raccogliere tutto il volume coltivato e partire poi con un nuovo inoculo (definita "coltura a batch").

Quindi, i sistemi aperti sono un'alternativa economica che permette anche a paesi in via di sviluppo di entrare nel mercato delle microalghe, un mercato in forte crescita e con buone prospettive future. Questi sono anche i sistemi maggiormente utilizzati per la fitodepurazione di acque reflue tramite microalghe.

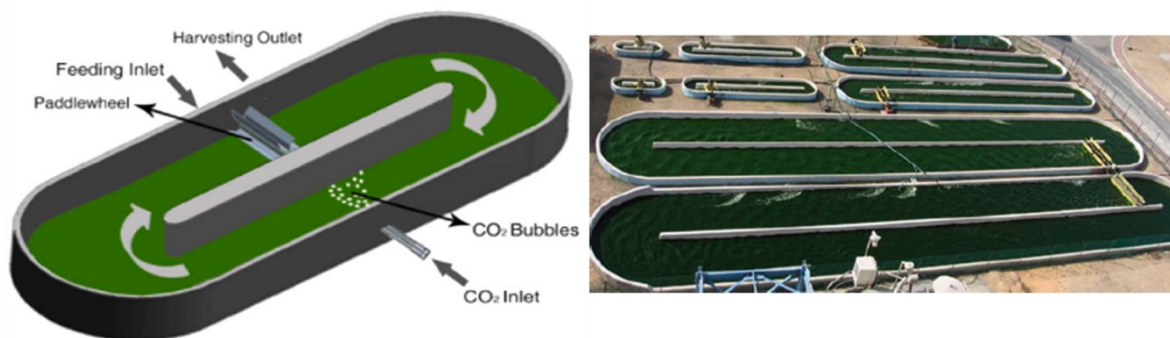


Figura 4. Esempio di raceway ponds (da Faried et al., 2017 e Koller et al., 2015).

1.7.2. Closed systems

Sono genericamente chiamati fotobioreattori (*photobioreactors*, PBR) e sono sistemi più complessi rispetto a quelli aperti, quindi più costosi. Il costo è il principale svantaggio dei PBR, soprattutto nel caso la produzione abbia come scopo la sintesi di biocarburanti, ma di minore rilevanza qualora il prodotto finale sia destinato al mercato della nutraceutica o della cosmesi.

Il principale vantaggio di queste tecnologie è l'elevata riduzione del rischio di contaminazione rispetto ai sistemi aperti. Inoltre, le condizioni di crescita sono controllabili e dipendono in minima parte da quelle ambientali, permettendo

così di raggiungere biomasse elevate, come per esempio $1-3 \text{ g L}^{-1}$ nei fotobioreattori a piastra piana (flat plate photobioreactor, Fig. 5) (Faried et al., 2017). Un'altra tipologia è quella dei fotobioreattori tubulari (tubular photobioreactor, Fig. 6).

Per quanto riguarda l'illuminazione, questi sistemi non hanno il problema della presenza di zone buie come nelle *raceway ponds*. Sia nei singoli tubi dei reattori tubulari che nelle singole piastre dei PBR a piastra piana, il percorso che la luce compie nel mezzo acquoso è ridotto, permettendo un'illuminazione omogenea. Essendo però sistemi chiusi, gli elevati tassi di fotosintesi che si raggiungono con la buona illuminazione e l'eventuale gorgogliamento di CO_2 rappresentano un possibile pericolo a causa del contemporaneo rilascio di ossigeno (O_2), che a concentrazioni elevate è tossico (Assuncao & Malcata 2020). La tossicità è dovuta alla grande reattività di questa molecola, che può portare a una concentrazione eccessiva di radicali liberi e compete con la molecola di CO_2 per il sito attivo dell'enzima Rubisco, l'enzima che permette la fissazione del carbonio inorganico in materia organica. Pertanto, nei fotobioreattori sono necessarie sonde per monitorare la concentrazione di ossigeno e sistemi di degassificazione (Assuncao & Malcata 2020).

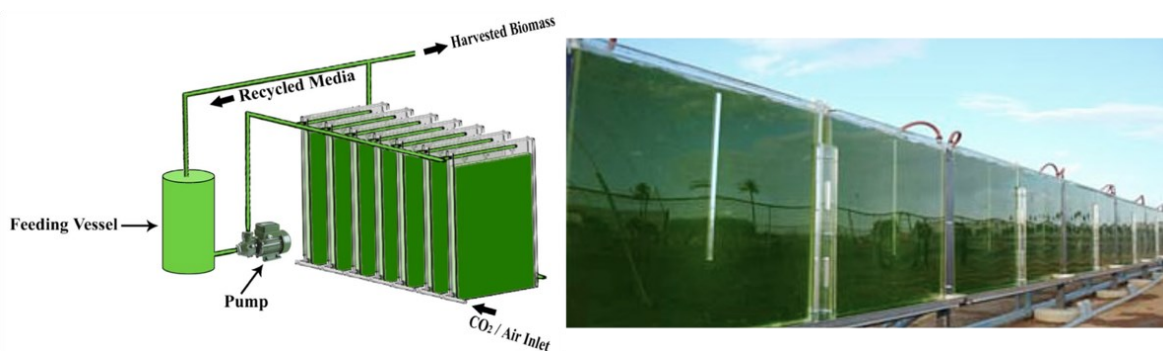


Figura 5. Esempio di fotobioreattore a piastre piane (da Faried et al., 2017).

Entrambe le tipologie di sistemi di coltivazione sono valide e la scelta di un sistema o dell'altro dipende principalmente dagli obiettivi che si vogliono raggiungere.



Figura 6. Esempio di fotobioreattore tubulare, tipologia orizzontale e verticale.

1.8. Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi vuole selezionare la microalga marina capace di tollerare i composti fenolici e crescere in acque reflue di frantoio tra 6 specie identificate in letteratura come possibili candidate, testarne le capacità fitodepuratrici e verificare la possibilità di ottenerne biomassa pregiata, con possibili applicazioni in ambito industriale, farmaceutico e alimentare.

Capitolo secondo

MATERIALI E METODI

2.1. Specie microalgali utilizzate, quali e perché

6 specie di microalghe marine sono state selezionate in quanto utilizzate nell'ambito delle biotecnologie blu. Le specie sono: *Dunaliella salina* (phylum Chlorophyta, classe Chlorophyceae) ceppo isolato dalle saline di Margherita di Savoia (Puglia, Italia), *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898) (phylum Bacillariophyta, famiglia Phaeodactylaceae) UTEX 646, *Synechococcus* sp. (phylum Cyanobacteria, classe Cyanophyceae) ceppo UTEX LB 2380 *Nannochloropsis salina* (Hibberd, 1981) (phylum Ochrophyta, classe Eustigmatophyceae) ceppo CCAP 849/3, *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) (phylum Haptophyta, classe Coccolitophyceae) ceppo Roscoff RC 1353, *Porphyridium purpureum* (Drew & Ross, 1965) (phylum Rhodophyta, classe Porphyridiophyceae) ceppo CCAP 1380/3.

2.1.1. Dunaliella salina

Il principale composto d'interesse che questa specie sintetizza è il β -carotene (Çelebi et al., 2021; Hosseini Tafreshi & Shariati, 2008) insieme a quantità significative di glicerolo, a scopo di riserva carboniosa, ma anche PUFA (Çelebi et al., 2021; Hosseini Tafreshi & Shariati, 2008), in particolare l' ω -3 EPA (Bhosale et al., 2010). La biomassa ottenuta può essere utilizzata come integratore alimentare e nella mangimistica.

2.1.2. Phaeodactylum tricornutum

Un carotenoide d'interesse sintetizzato da *P. tricornutum* è la fucoxantina. La principale forma di riserva energetica è l'acido grasso, in particolare PUFA,

come l'ω-3 EPA (Duarte et al., 2021). Accumulano anche quantità rilevanti di triacilgliceroli (TAG), con un alto potere nutritivo e utilizzabili come mangimi nell'acquacoltura e per la produzione di bio-carburanti (Duarte et al., 2021). Anche il contenuto proteico è ottimale e permette l'applicazione della biomassa in acquacoltura (Branco-Vieira et al., 2020).

Il frustolo prodotto da *P. tricornutum* e da altre diatomee ha applicazioni industriale e farmaceutiche.

2.1.3. *Synechococcus* sp.

Synechococcus sp. è in grado di sintetizzare significative quantità di poli-idrossi-alcanoati, variabili a seconda della trofia dell'ambiente di crescita (quantità di azoto e fosforo disponibili), delle condizioni di illuminazione e della disponibilità di fonti secondarie di carbonio (come il saccarosio) (Mendhulkar & Sheyte, 2017). Essendo un cianobatterio, il corredo pigmentario è composto dalle ficobiliproteine, il cui contenuto può arrivare fino al 10% del peso secco (Pagels et al., 2019).

De Farias Silva e coautori (2020) dimostrano come questo genere è in grado di depurare i reflui urbani, con tassi di rimozione di COD, azoto e fosforo maggiori dell'80% e produzione di una biomassa ricca in carboidrati (fino al 60% del peso secco).

2.1.4. *Nannochloropsis salina*

Le specie del genere *Nannochloropsis* sono ad alto interesse industriale in quanto alghe oleaginose, ovvero sintetizzano grandi quantità di acidi grassi, con un contenuto abbondante di PUFA, come l'EPA, e possono essere utilizzate come fonte di cibo in acquacoltura e negli allevamenti animali tradizionali (Al-Hoqani et al., 2016).

Inoltre, Pandeirada e coautori (2016) mostrano che la frazione idrosolubile dei polisaccaridi stimola il sistema immunitario umano, suggerendo nuove applicazioni in ambito medico e farmaceutico.

2.1.5. *Isochrysis galbana*

Questa alga è stata utilizzata spesso come additivo per i mangimi dei pesci allevati in acquacoltura. L'utilizzo viene consigliato in quanto contiene carotenoidi (Di Lena et al., 2019; Shekarabi et al., 2019). Questa specie è anche in grado di sintetizzare il (1 → 3, 1 → 6)-β-D-glucano, un polisaccaride con attività anti-tumorale (Sadovskaya et al., 2014).

2.1.6. *Porphyridium purpureum*

P. purpureum è un'alga rossa e il corredo pigmentario è composto, oltre che dalla clorofilla *a*, anche da ficobiliproteine (Sosa-Hernandez et al., 2019). Rappresenta anche una fonte di acidi grassi come l'EPA (Guihéneuf & Stengel, 2015).

Anche gli esopolisaccaridi (EPS) prodotti dall'alga hanno interesse biotecnologico in quanto contengono gruppi metilici e solfato (Medina-Cabrera et al., 2021).

2.2. *Condizioni di coltura per la selezione della specie ottimale*

La fase di selezione della specie per il bio-risanamento prevede la crescita delle 6 specie nel mezzo di crescita artificiale marino AMCONA (*Artificial Multipurpose COmplement for the nutrition of Algae*, Tab. 3.A e 3.B), per la condizione di controllo, e AMCONA con l'aggiunta, singolarmente, di 3 composti fenolici per le 3 condizioni sperimentali.

Sali	Concentrazione dello	Concentrazione	Volumi di stock da aggiungere per litro di mezzo di crescita
	stock	finale	
NaCl		363 mM	21.20 g
Na ₂ SO ₄	1.00 M	1 M	25.00 mL
KCl	1.60 M	1.6 M	5.00 mL
NaHCO ₃	0.41 M	0.41 M	5.00 mL
KBr	3.63 M	3.63 M	200.00 µL
H ₃ BO ₃	0.37 M	372 µM	1.00 mL
NaF	0.33 M	65.7 µM	200.00 µL
MgCl ₂	1.65 M	41.20 mM	25.00 mL
CaCl ₂	1.83 M	9.14 mM	5.00 mL
SrCl ₂	0.41 M	82.0 µM	200.00 µL
NaNO ₃	2.74 M	549 µM	200.00 µL
NaH ₂ PO ₄	100.00 mM	21.0 µM	210.00 µL
Na ₂ SiO ₃	205.00 mM	205 µM	1.00 mL
CuSO ₄	40.00 µM	40.0 nM	1.00 mL
Stock metallico I	6.50 mM	-	1.00 mL
Stock metallico II	-	-	1.00 mL
Vitamine	-	-	1.00 mL
TRIS-HCl, pH 8.1	1.00 M	10.0 mM	10.00 mL

Tabella 3. A. Ricetta per il mezzo di crescita AMCONA (da Fanesi et al., 2014).

Stock metallico I (ferro)		Stock metallico II (metalli in traccia)	
Sali	Concentrazione (g L ⁻¹)	Sali	Concentrazione (g L ⁻¹)
FeCl ₃ * 6H ₂ O	1.77	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.073
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	3.09	CoSO ₄ * 7H ₂ O	0.016
		MnSO ₄ * 4H ₂ O	0.54
		Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1.49*10 ⁻³
		Na ₂ SeO ₃	1.73*10 ⁻⁴
		NiCl ₂ * 6H ₂ O	1.49*10 ⁻³
		Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	2.44

Vitamine	
Vitamina	Concentrazione (g L ⁻¹)
Tiamina HCl	0.1
Biotina	0.002
B12	0.001

Tabella 3. B. Tabella con le ricette per gli stock aggiuntivi per il mezzo AMCONA (da Fanesi et al., 2014).

Abbiamo cresciuto le microalghe in camere di coltura con un'intensità luminosa pari a $100 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un fotoperiodo di 24h e a una temperatura di 20°C . Per la selezione si utilizzano piastre da 6 pozzetti sterili, in ognuno dei quali è stato eseguito un inoculo di 10^5cell mL^{-1} in un volume finale di 10 mL per pozzetto. Per ogni condizione sono effettuate tre repliche biologiche.

La specie selezionata perché capace di tollerare i singoli fenoli è stata poi esposta e acclimatata a una soluzione contenente contemporaneamente i tre composti fenolici (aggiunti alle stesse concentrazioni finali dell'esperimento di selezione). L'esperimento è stato eseguito in beute sterili da 250 mL, esponendo le colture a $100 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un fotoperiodo di 24h e a una temperatura di 20°C .

2.2.1. Composti fenolici utilizzati per la selezione della specie

I composti fenolici utilizzati sono tirosolo, acido *p*-cumarico e l'acido caffeico (Fig. 7), scelti per l'elevata concentrazione riscontrata nelle AV (Tab. 4). I composti fenolici sono acquistati presso la *Sigma-Aldrich Corporation*: tirosolo ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$), MW (*Molecular Weight*) $138.16 \text{ g mol}^{-1}$, purezza 98% (HPLC); acido *p*-cumarico ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$), MW $164.05 \text{ g mol}^{-1}$, purezza $\geq 98\%$ (HPLC); acido caffeico ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$), MW $180.16 \text{ g mol}^{-1}$, purezza $\geq 98\%$ (HPLC). Per la realizzazione di stock ad elevata concentrazione da usare nella sperimentazione, i solventi utilizzati sono acqua di grado 1 per il tirosolo e alcol etilico puro ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) per l'acido *p*-cumarico e l'acido caffeico, vista la loro scarsa solubilità in acqua.

Le concentrazioni finali dei composti fenolici aggiunti al mezzo di crescita corrispondono a 1/5 delle concentrazioni rilevate nelle AV studiate da Deeb et

al. (2014) (Tab. 4): 42.12 mg L⁻¹ di tirosolo; 23.42 mg L⁻¹ di acido *p*-cumarico; 28.08 mg L⁻¹ di acido caffeico.

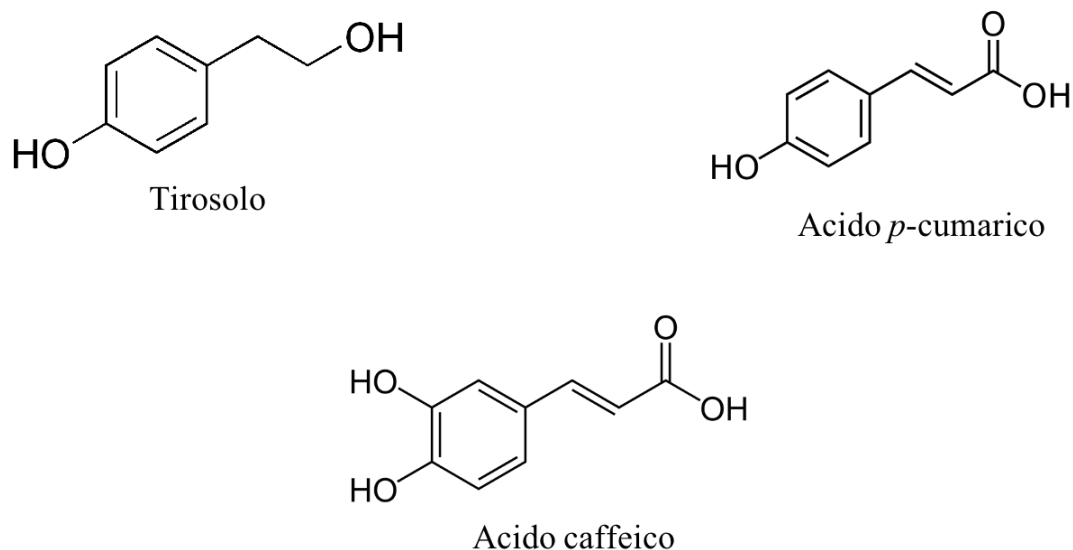


Figura 7. Struttura molecolare dei 3 composti fenolici selezionati.

Composto	Concentrazione nelle AV (mg L ⁻¹)
Acido <i>trans</i> -cinnamico	105.3
Tirosolo	210.6
Acido vanillico	128.7
Idrossitirosolo	315.9
Acido <i>p</i> -cumarico	117.0
Acido ferulico	93.6
Acido caffeico	140.4

Tabella 4. Concentrazione dei composti fenolici contenuti nelle AV, determinata attraverso cromatografia a colonne di silicio (da Deeb et al., 2012).

2.3. Pre-trattamento del refluo e condizioni di coltura della microalga selezionata per la fito-depurazione

Non è possibile utilizzare le AV per la crescita microalgale senza pretrattarle, sia per la quantità di solidi e materia organica in sospensione, ma anche per la carica microbica e fungina che presentano. Per rendere le AV idonee alla crescita microalgale sono filtrate con filtri in nitrocellulosa fino a una maglia di 0.45 μm . Questo permette di trattenere il particolato in sospensione e di ridurre la presenza batterica e fungina.

Le AV non trattate e le AV trattate con filtrazione sono conservate a -20°C prima di essere utilizzate per la crescita microalgale.

La condizione sperimentale di crescita prevede la diluizione al 10% delle AV in AMCONA, un fotoperiodo di 24h e due condizioni di intensità luminosa (100 e 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). Per la coltivazione sono state utilizzate *Tissue Culture Flasks* sterili (TCF-011-250, JET BIOFIL®) in cui viene eseguito un inculo di 10^5 cell mL^{-1} in un volume finale di 50 mL.

2.4. Crescita delle specie microalgali

La crescita è monitorata a giorni alterni per 16 giorni (15 giorni post-inoculo) durante la fase sperimentale di selezione, giornalmente nella fase sperimentale di crescita di cellule acclimatate alla soluzione contenente i 3 composti fenolici (singoli e in miscela) e alle AV diluite. Lo strumento utilizzato per monitorare la crescita è un contatore automatico di cellule (*Casy TT, Innovatis AG, Reutlingen, Germania*). Il contatore automatico è capace di contare il numero di cellule con una frequenza di un milione di misurazioni al secondo, nel *range* dimensionale che va da 0.7 μm a 120 μm (il limite inferiore può essere modificato dall'operatore a seconda della specie analizzata). 80 μL di campione da analizzare vengono aggiunti a 8 mL di una soluzione elettrolita specifica

chiamata CasyTon© (*Innovatis, AG, Reutlingen, Germania*). Il contatore fornisce il numero di cellule nel campione al di sopra del *range* dimensionale selezionato, il diametro medio e il volume medio delle cellule nel campione nel range. Inoltre, permette di discriminare fra cellule vive e cellule morte, grazie all'applicazione di un campo elettrico a basso voltaggio.

Grazie al numero medio di cellule ottenuto dalle tre repliche biologiche e al giorno post-inoculo corrispondente è possibile costruire un grafico, denominato curva di crescita, da cui calcolare il tasso specifico di crescita μ (giorni^{-1} , g^{-1}) di ogni condizione sperimentale.

Per determinare il tasso di crescita μ vengono considerati i punti corrispondenti alla fase di crescita esponenziale, sui quali viene applicato il logaritmo in base e (logaritmo naturale, \ln) per ottenere una retta di regressione. Viene poi estrapolato il coefficiente angolare della retta di regressione, il quale corrisponde al tasso di crescita (per ogni replica biologica).

Un altro parametro che si può ottenere è il tempo di duplicazione T_d (giorni, g), ovvero il tempo in cui il numero di cellule nella cultura raddoppia. Viene calcolato usando il tasso di crescita, pertanto corrisponde al tempo di duplicazione in fase esponenziale. Anche questo parametro viene calcolato per ogni replica biologica.

$$T_d (g) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Infine, viene considerata anche la densità massima ($n^\circ \text{ cell mL}^{-1}$, D_{\max}) che la coltura ha raggiunto nel periodo di crescita.

2.5. Quantificazione dei composti fenolici

Per ogni condizione di crescita, i composti fenolici sono stati quantificati a giorni alterni al fine di confrontare la crescita con la concentrazione dei composti fenolici nel tempo. In aggiunta, i singoli polifenoli aggiunti ad AMCONA standard senza microalghe sono stati analizzati con la stessa modalità, al fine di valutare un'eventuale degradazione dei composti ad opera della luce con intensità di $100 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La quantificazione viene effettuata attraverso il saggio di Folin-Ciocalteu.

La preparazione del campione da analizzare consiste nel prelevare almeno $150 \mu\text{L}$ di coltura e centrifugare a 13000 rpm per 10 minuti ($16074g$, Heraeus, Biofuge *fresco*), in modo da far sedimentare le cellule. Il surnatante viene poi analizzato tramite il saggio di Folin-Ciocalteu; è possibile conservarlo a -20°C e al buio se non si compie l'analisi immediatamente.

Per la quantificazione sono necessari il reattivo di Folin e una soluzione di H_2CO_3 al 5.6% .

Al momento dell'analisi di un campione, vengono prelevati $125 \mu\text{L}$ di surnatante e diluiti in $500 \mu\text{L}$ di acqua grado 1, a cui vengono aggiunti $125 \mu\text{L}$ di reattivo di Folin-Ciocalteu, immediatamente agitato e messo al buio per 6 minuti.

Successivamente vengono aggiunti 2.25 mL di soluzione di H_2CO_3 , agitato e spostato al buio per 90 minuti.

Trascorsi i 90 minuti, viene eseguita l'analisi allo spettrofotometro (UV-1900i, SHIMADZU CORP.) per determinare l'assorbanza a 760 nm .

Per quantificare i composti fenolici, è necessario una retta di taratura in cui l'acido gallico viene usato come standard. I risultati vengono espressi in mg L^{-1} equivalenti di acido gallico ($\text{mg L}^{-1} \text{ GAeq}$) oppure come $\%$ rispetto al giorno 0.

2.5.1. Meccanica di reazione

La preparazione del reattivo di Folin-Ciocalteu prevede l'utilizzo di tungstato di sodio diidrato ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodio molibdeno ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), solfato di litio tetra idrato ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), acido cloridrico (HCl) e acido fosforico (H_3PO_4). Vista la complessità dei reagenti, la natura chimica del reattivo di Folin-Ciocalteu è ancora ignota (Sánchez-Rangel et al., 2013).

I molibdati sono ridotti più facilmente rispetto ai tungstati, quindi si pensa che costituiscano loro la componente che si riduce durante il saggio, portando al viraggio di colore da giallo intenso (colore del reattivo di Folin-Ciocalteu) al blu.

L'aggiunta della soluzione di acido carbonico fa sì che l'ambiente di reazione raggiunga un pH di circa 10, condizione che permette la formazione di uno ione fenolato, il quale è in grado di ridurre il reattivo di Folin-Ciocalteu (Sánchez-Rangel et al., 2013).

Dagli studi di Blainski et al. (2013) sappiamo che la cinetica di reazione tra il reattivo di Folin-Ciocalteu e i composti fenolici rispetta la relazione tra strutture e attività (una misura della cinetica di reazione) delle molecole. Nel caso dei composti fenolici, l'attività della reazione è proporzionale alla disponibilità dei gruppi idrossile dell'anello benzenico, ed è anche influenzata da altri sostituenti che possono stimolare o ridurre il potenziale riduttivo della molecola.

2.6. Contenuto cellulare dei pigmenti fotosintetici

La valutazione del contenuto cellulare in pigmenti fotosintetici è stata eseguita durante la fase esponenziale di crescita e all'inizio della fase stazionaria ed è divisa in una fase di estrazione dei pigmenti fotosintetici e una fase di analisi.

Nella fase di estrazione vengono prelevati due campioni da 1.5 mL di coltura dopo agitazione, così da avere due repliche strumentali per ogni replica biologica.

Dopo il prelievo, i campioni vengono centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti (16074g, Heraeus, Biofuge *fresco*), si scarta il surnatante e si aggiunge un ugual volume di formiato di ammonio 0.5 M (NH_4HCO_2), risospendendo bene il pellet. Questo permette di “lavare” le cellule, eliminando eventuali sostanze contenute nel mezzo di crescita adese alla superficie cellulare.

Si ripete la centrifugazione, si scarta il surnatante e si risospende il pellet in un ugual volume di acetone (CH_3COCH_3 al 90%). L’acetone in quanto solvente organico permette l’estrazione dei pigmenti fotosintetici e la loro separazione dal pellet cellulare.

I campioni vengono poi conservati al buio a -20°C fin quando il pellet non risulti bianco, in modo da permettere l’estrazione completa dei pigmenti fotosintetici.

Prima di analizzare i pigmenti estratti nell’acetone, i campioni vengono nuovamente centrifugati (con gli stessi parametri della fase di estrazione), così da evitare la presenza di particolato nel surnatante al momento dell’analisi spettrofotometrica.

Per quantificare il contenuto in pigmenti è stato utilizzato uno spettrofotometro (UV-1900i, *SHIMADZU CORP.*) e cuvette in quarzo.

Per quantificare il contenuto in pigmenti fotosintetici viene usato il parametro dell’assorbanza (Abs, A) a una specifica lunghezza d’onda (λ). Per una valutazione più accurata del contenuto cellulare in pigmenti fotosintetici, è stata effettuata la scansione dell’assorbanza di ogni campione nell’intervallo 750 – 350 nm con un passo di 5 nm, ottenendo uno spettro di assorbimento.

Infine, per calcolare il contenuto di pigmenti fotosintetici in $\mu\text{g mL}^{-1}$ sono state utilizzate le seguenti formule (Sigh et al., 2019):

$$\begin{aligned} \text{Chl } a &= (11.24 * A_{660}) - (2.04 * A_{645}) \\ \text{Chl } b &= (20.13 * A_{645}) - (4.19 * A_{660}) \\ \text{Carotenoidi} &= \frac{(1000 * A_{470}) - (1.90 * \text{Chl } a) - (63.14 * \text{Chl } b)}{214} \end{aligned}$$

Ottenuto questo valore, è possibile calcolare il contenuto cellulare in pigmenti fotosintetici (pg cellula^{-1}) dividendo i $\mu\text{g mL}^{-1}$ di pigmenti per il valore di cellule mL^{-1} nella coltura al giorno del prelievo.

2.7. Contenuto cellulare delle proteine

L'estrazione della biomassa algale per la valutazione del contenuto cellulare delle proteine viene eseguita a metà della fase esponenziale e all'inizio della fase stazionaria di crescita ed è divisa in una fase di estrazione della biomassa algale e una di analisi. Le procedure di estrazione e di analisi seguono il protocollo sviluppato da Lowry et al., (1951) e modificato successivamente da Peterson (1977).

Nella fase di estrazione viene prelevato 1.5 mL di coltura dopo agitazione. Per ogni replica biologica sono eseguite due repliche strumentali.

I campioni sono poi centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti (16074g, Heraeus, Biofuge *fresco*), si scarta il surnatante e si aggiunge un ugual volume di formiato di ammonio 0.5 M (NH_4HCO_2), risospendendo bene il pellet.

I campioni vengono nuovamente centrifugati (con gli stessi parametri), si scarta il surnatante e, se non è possibile eseguire la fase di analisi successivamente alla fase di estrazione, il pellet ottenuto può essere conservato al buio a -20°C .

Per poter analizzare il contenuto proteico del pellet, questo viene risospeso in 500 μL di una soluzione all'1% (massa/volume) di SDS e di NaOH 0.1 M. La sospensione viene poi agitata per rompere le cellule e sospendere le proteine. Ad ogni campione vengono poi aggiunti 500 μL di reagente A (Tab. 5) e lasciati riposare per 10 minuti. Dopo questo intervallo di tempo vengono aggiunti 250 μL di reagente B (Tab. 5), agitato e lasciato riposare al buio per 30 minuti. Il contenuto in proteine viene poi quantificato misurando l'assorbanza del campione a 750 nm tramite spettrofotometro (UV-1900i, SHIMADZU CORP.). La quantificazione in μg è possibile attraverso una retta di taratura costruita utilizzando albumina di siero bovino (BSA) come standard in quantità note e comprese tra 10 e 100 μg . Ottenuto il valore in μg , è possibile convertirlo in $\mu\text{g mL}^{-1}$ di coltura dividendo per 1.5 (ovvero il volume prelevato) e successivamente in pg cell^{-1} dividendo per il valore di cellule mL^{-1} al giorno dell'estrazione.

Reagente A	
	Cu-Tartrato-Carbonato (CTC)
1 mL	CuSO ₄ * 5H ₂ O 0.1%
	NaK tartrato 0.2%
	Na ₂ CO ₃ 10%
1 mL	NaOH 0.8 M
1 mL	SDS 10%
1 mL	H ₂ O milliQ
Reagente B	
1 mL	Reattivo di Folin-Ciocalteu
4 mL	H ₂ O milliQ

Tabella 5. Composizione dei reagenti A e B per il saggio di Folin-Ciocalteu.

2.7.1 Meccanica di reazione

La soluzione SDS-NaOH ha lo scopo di denaturare le membrane cellulari, in modo da liberare il contenuto interno delle cellule, grazie alla presenza del detergente SDS. Questa sostanza permette anche di limitare la possibile interferenza con il saggio di lipidi e detergenti non ionici e cationici. Così facendo, tutte le proteine contenute nel campione vengono rese disponibili per reagire con il reagente A (Deepachandi et al., 2020, Peterson, 1977).

La presenza dell'idrossido di sodio permette di rendere basico l'ambiente di reazione, fattore fondamentale al momento dell'aggiunta del reagente A. In queste condizioni, le proteine possono reagire con il rame (Cu), contenuto nel reagente A, liberando lo ione rameoso (Cu^+) (Deepachandi et al., 2020).

All'aggiunta del reagente B, il quale contiene il reattivo di Folin-Ciocalteu, lo ione rameoso è in grado di ridurlo, portando al viraggio del colore, dal giallo al blu, che è indice della presenza di proteine e l'intensità aumenta all'aumentare del contenuto proteico (Deepachandi et al., 2020).

2.8. Composizione macromolecolare della biomassa microalgale

La composizione macromolecolare della biomassa algale è stata determinata tramite spettroscopia ad infrarossi con trasformata di Fourier (*FTIR, Fourier-Transform InfraRed spectroscopy*), la quale permette di ottenere un rapporto fra le principali macromolecole (ad esempio lipidi/proteine, carboidrati/proteine, lipidi/carboidrati). Se noto il contenuto proteico (quantificato attraverso il protocollo di Lowry) è possibile semi-quantificare le singole macromolecole (lipidi e carboidrati).

L'analisi è stata eseguita durante la fase esponenziale e all'inizio della fase stazionaria di crescita ed è divisa in una fase di estrazione e preparazione della biomassa algale e una di analisi.

Nella fase di estrazione vengono prelevati 5 mL di coltura dopo agitazione, per ogni replica biologica. I campioni vengono centrifugati a 3300 rpm per 10 minuti (*Centrifuge MPW 351e*), viene scartato il surnatante (facendo attenzione a non risospendere il pellet) e si aggiunge un ugual volume di formiato di ammonio 0.5 M (NH_4HCO_2), risospendendo bene il pellet. Questi passaggi vengono ripetuti almeno una seconda volta per rimuovere in modo adeguato tutti i residui del mezzo di crescita.

Dopo l'ultima centrifuga, si risospende il pellet ottenuto in 110 μL di formiato di ammonio. Per ogni replica biologica vengono preparate due repliche strumentali.

Un volume pari a 50 μL di campione viene distribuito su un dischetto in silice (trasparente all'infrarosso). I dischetti sono poi trasferiti in stufa a 80 °C fino a seccare e rimuovere tutta l'umidità dai campioni (in quanto la molecola d'acqua genera interferenza nella risposta all'infrarosso). Vengono preparati anche due dischetti con 50 μL di formiato di ammonio, usati come bianco per lo strumento di analisi, un *Tensor 27 FTIR spectrometer* (Bruker Optics, Ettlingen, Germany).

La tecnica FTIR permette di determinare la composizione macromolecolare della biomassa algale basandosi sull'assorbanza nell'infrarosso ($\lambda = 780 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$) dei gruppi funzionali delle molecole (Jabsen et al., 2012; Movasaghi et al., 2008; Pelusi et al., 2016). In particolare, l'assorbimento della radiazione infrarossa stimola moti vibrazionali nelle molecole. Il cambiamento di questi moti genera bande nello spettro vibrazionale, caratterizzate da una specifica frequenza e ampiezza a seconda della classe molecolare di appartenenza (Sacksteder & Barry, 2001). Dopo l'esposizione del campione alla radiazione infrarossa si ottiene un interferogramma, al quale viene applicata la trasformata

di Fourier, così da poter esprimere il segnale in funzione della frequenza nell'infrarosso, espressa in numero d'onda (cm^{-1}) (Sacksteder & Barry, 2001). Ad ogni analisi si acquisisce anche lo spettro di assorbimento del solvente (formiato di ammonio) utilizzato per sospendere il campione, in modo da ottenere l'assorbimento di fondo, il *background*. Così facendo, dopo altre manipolazioni matematiche, si ottiene lo spettro di assorbimento nell'infrarosso del campione, come si può vedere in Fig. 8. Molte delle bande di assorbimento di interesse biologico ricadono nell'intervallo $4000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ e l'assegnazione di una banda specifica, o intervallo di bande, alla classe macromolecolare rispetta quanto riportato da Giordano et al (2001) (Tab. 6).

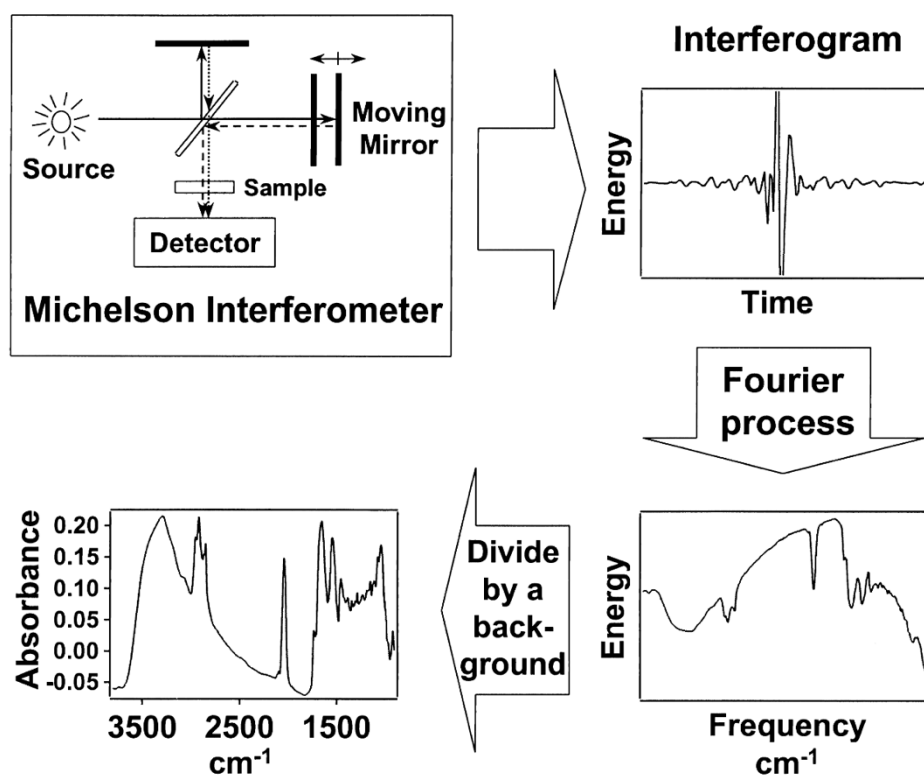


Figura 8. Rappresentazione schematica dell'elaborazione del segnale ottenuto dall'esposizione ai raggi infrarossi (da Sacksteder & Barry, 2001).

Numero d'onda (cm ⁻¹)	Gruppo funzionale associato	Note
3025-3006	=C-H	Legami C=C
2953	-C-H dei gruppi CH ₃	Legami C-C
2924	-C-H dei gruppi CH ₂	Legami C-C
1730 ± 5	C=O dei gruppi estere	Trigliceridi
1650 ± 10	C=O delle amidi associate alle proteine	Banda I amidi
1540 ± 10	N-H delle amide associate alle proteine	Banda II amidi
1240 ± 5	P=O dei fosfodiesteri	Principalmente acidi nucleici
1200 - 900	C-O-C dei gruppi etere dei carboidrati	Principalmente carboidrati
1075	SiO dei silicati	Frustuli silicei delle diatomee

Tabella 6. Tabella di assegnazione del numero d'onda al gruppo funzionale (da Giordano et al., 2001).

Per l'elaborazione dello spettro acquisito viene usato il software OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany), necessario anche per ottenere i rapporti relativi tra le singole classi macromolecolari.

Per fare ciò è necessario compiere una deconvoluzione dello spettro nell'intervallo 1800 – 900 cm⁻¹ con la funzione “*curve fit*” del software (Palmucci et al., 2011). La deconvoluzione è effettuata identificando per ogni spettro i picchi negativi della derivata seconda.

Lo studio delle caratteristiche biochimiche della biomassa algale attraverso l'FTIR è relativamente recente, in quanto i primi studi risalgono a Giordano e coautori, 2001. Questa tecnica, sebbene richieda molti passaggi di analisi, alcuni dei quali complessi (come la deconvoluzione dello spettro), risulta comunque più rapida e affidabile rispetto alle metodologie chimiche precedentemente applicate (Giordano et al., 2001).

La semi-quantificazione viene effettuata moltiplicando i valori di concentrazione delle proteine per i valori dei rapporti ottenuti in seguito alla

deconvoluzione. I lipidi e i carboidrati sono quindi espressi in Unità Arbitrarie in quanto la semi-quantificazione non permette di ottenere un valore assoluto della molecola in esame all'interno della cellula, ma solo una sua stima in relazione al contenuto proteico.

$$\frac{\text{Carboidrati}}{\text{proteine}} * \text{Proteine (pg cell}^{-1}\text{)} = \text{Carboidrati (UA cell}^{-1}\text{)}$$

2.9. Indice di riduzione della biomassa microalgale

L'indice di riduzione (*reduction index, RI*) della biomassa algale viene determinato tramite FTIR ed è stato quantificato solo per la specie selezionata. Per poter comparare diverse condizioni sperimentali, viene eseguito il rapporto tra l'indice ottenuto dalla condizione sperimentale e il rispettivo controllo.

Le fasi di crescita in cui viene prelevata la biomassa algale, le fasi di estrazione e preparazione del campione e la fase di analisi sono le stesse utilizzate per valutare la composizione macromolecolare della biomassa algale (paragrafo 2.8.).

La differenza tra le due analisi consiste nell'intervallo su cui si applica la deconvoluzione, che per questa analisi è $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, intervallo di assorbimento dei gruppi -CH, -CH₂ e -CH₃. Pertanto, l'indice di riduzione e la composizione macromolecolare possono essere determinati nello stesso campione, variando solo l'intervallo di deconvoluzione.

Applicando la seguente formula, è possibile determinare il valore dell'indice di riduzione (Palmucci et al., 2011):

$$\text{Indice di riduzione (RI)} = \frac{\text{AbsCH}_2 + \text{AbsCH}_3}{\text{AbsCH}}$$

Il valore ottenuto non è equivalente a un livello assoluto di riduzione, bensì indica un cambiamento nella proporzione relativa dei tre diversi gruppi funzionali rispetto a un controllo (Palmucci et al., 2011). In particolare, al numeratore vengono considerati i gruppi più saturi (ridotti), mentre al denominatore i gruppi più insaturi (ossidati).

2.10. Attività antiossidante nella microalga selezionata

Per valutare la capacità antiossidante della microalga selezionata, viene applicato il saggio del DPPH (2,2-difenil-1-picridrazil), un radicale stabile. Questa sua caratteristica viene sfruttata per valutare la presenza di radicali liberi (R•) o la presenza di molecole antiossidanti (AH) in un campione, in quanto l'elettrone spaiato del DPPH• permette di reagire con essi (Fig. 9).

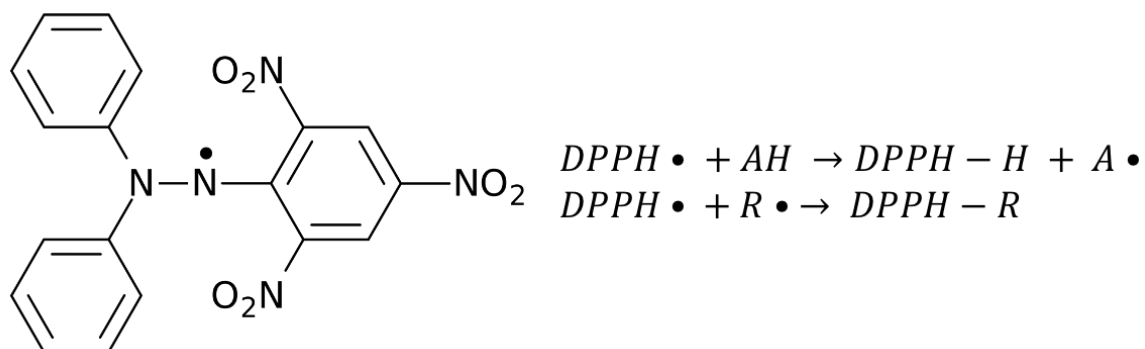


Figura 9. Rappresentazione della molecola di DPPH• e delle reazioni che può compiere con una molecola antiossidante radicale (AH) e un radicale (R).

La raccolta della biomassa per eseguire l'analisi viene eseguita a 2 e 7 giorni dall'inoculo di colture in fase di acclimatazione ai composti fenolici (singolarmente e nella miscela di composti fenolici) e 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotoperiodo 24h) e alle AV diluite e 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotoperiodo 24h), così da valutare la risposta microalgale nel breve periodo. Per la crescita

si utilizzano tubi sterili con un volume finale di 20 mL. Il saggio è eseguito anche sul mezzo di crescita in concomitanza al prelievo della biomassa.

Da ciascun campione viene prelevato un volume di coltura tale per cui l'estratto cellulare finale ha una concentrazione di 0.5 mg mL⁻¹.

Il campione è centrifugato a 3260g per 15 minuti in una centrifuga termostata a 4° C, in modo da rallentare il più possibile il metabolismo cellulare.

Successivamente si preleva il surnatante e la biomassa viene risospesa in un volume di etanolo (CH₃CH₂OH), in modo che raggiunga la concentrazione voluta. Si procede poi alla rottura delle cellule mediante pestello, così da liberare il contenuto cellulare.

L'estratto e il surnatante sono quindi conservati al buio in congelatore, fino al momento dell'analisi.

Per eseguire il saggio è necessario preparare una soluzione di DPPH• 0.06 mM in metanolo (di colore viola intenso), che viene conservata in frigo.

Successivamente, a 900 µL di soluzione di DPPH• 0.06 mM si aggiungono 100 µL di estratto cellulare in etanolo (per analizzare la biomassa) o si aggiungono 100 µL di etanolo e 50 µL di surnatante (per analizzare il mezzo di crescita) e si attendono 15 minuti per la reazione.

Trascorso quest'intervallo di tempo, viene letta l'assorbanza del campione a 515 nm, tramite lo spettrofotometro UV-1900i, *SHIMADZU CORP*. Per il bianco dello strumento viene utilizzata acqua di grado 1.

Per valutare la conversione del DPPH• in DPPH-H o DPPH-R, si usa la Percentuale di Inibizione (PI) (Assuncao et al., 2016):

$$PI = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{sample})}{Abs_{DPPH}} * 100$$

Dove Abs_{DPPH} corrisponde all'assorbanza dopo 15 minuti di 900 μL di DPPH• 0.06 mM a cui sono stati aggiunti 100 μL di etanolo.

Se l'alga analizzata presenta un elevato contenuto in carotenoidi, i quali interferiscono con l'assorbanza del DPPH a 515 nm, viene misurata anche l'assorbanza di 100 μL di estratto in etanolo in 900 μL di metanolo, sottraendola poi all' Abs_{sample} corrispondente.

Nella misurazione della PI del mezzo di crescita si sottrae anche il contributo del mezzo di crescita standard.

2.11. Valutazione dei danni al DNA

Per valutare i danni al materiale genetico viene eseguito il *Comet assay* a 1 giorno (24h) e 8 giorni (192h) dall'inoculo di colture non acclimatate ai tre composti fenolici (singolarmente e nella miscela di essi), ed esposte a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e nelle AV diluite esposte a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con i relativi controlli. Tutte le condizioni di crescita hanno un fotoperiodo di 24h e si utilizzano tubi sterili con un volume finale di 20 mL. Questa tecnica prevede anche la preparazione di controlli positivi a danni al DNA attraverso l'esposizione a soluzioni a diversa concentrazione di perossido di idrogeno (H_2O_2).

Dalle colture sperimentali viene prelevato un volume corrispondente a circa $8 \cdot 10^3$ cellule, poi centrifugate a 600g per 15 minuti in una centrifuga termostata a 4° C, per rallentare il metabolismo cellulare.

I campioni usati come controlli positivi vengono esposti alle soluzioni di acqua ossigenata per 15 minuti e poi centrifugati a 600g per 15 minuti.

Sia i controlli positivi che tutti gli altri campioni, dopo la centrifuga e dopo aver scartato il surnatante, sono lavati con PBS (tampone fosfato salino, 0.5 M) e

centrifugati nuovamente, così da eliminare sali e altri composti derivanti dal mezzo di crescita.

Terminata la centrifuga si scarta il surnatante e i campioni vengono risospesi in 100 μ L di *Low Melting Agarose* (LMA) 1% mantenuto a 37° C. Rapidamente, vengono prelevati 35 μ L di sospensione cellulare (circa $2.8 \cdot 10^3$ cellule) e distribuiti su un pozzetto del vetrino di analisi (Fig. 10) (mantenuto da almeno 20 minuti al freddo usando ghiaccio). L'agarosio viene distribuito con movimenti circolari formando una "cupola" di agarosio che riempie il pozzetto delimitato dalla barriera siliconica (idrofobica), quindi è importante che i vetrini siano a livello.

I vetrini vanno lasciati raffreddare per altri 15 minuti al buio, in modo che l'agarosio si solidifichi completamente.

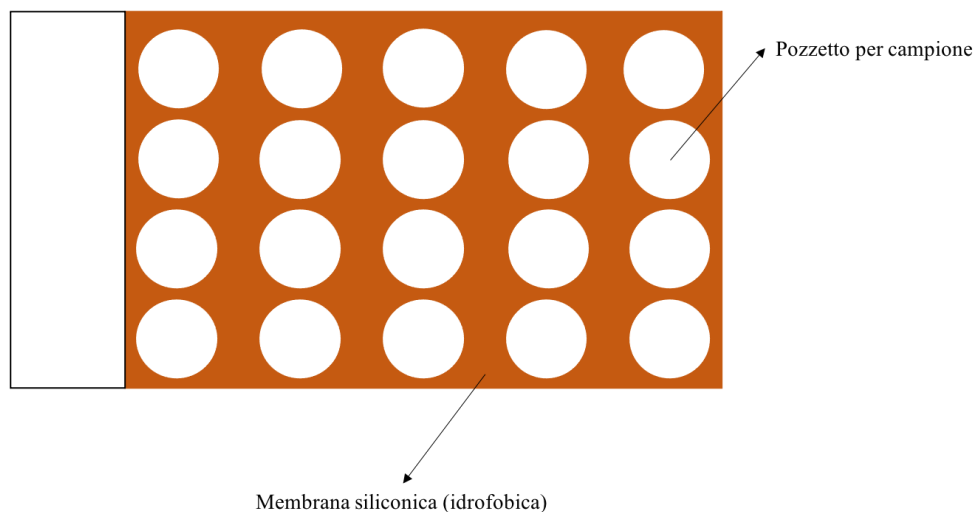


Figura 10. Rappresentazione del vetrino porta campione per il saggio del Comet assay.

Successivamente, i vetrini vanno immersi in una soluzione di lisi (50 mL DMSO, 5 mL Triton X e portare a 500 mL con soluzione salina, composta da 146.1 g L⁻¹ NaCl, 1.21 g L⁻¹ Tris-HCl, 41.22 g L⁻¹ Na₂EDTA * 2H₂O e portata

a pH 10 con NaOH 60%) fredda e lasciati per 1h a 4° C, in modo che la lisi delle membrane avvenga completamente.

Nel frattempo, preparare la vasca elettroforetica per l'analisi (*CometAssay® Electrophoresis System II*). Dopo che i vetrini sono inseriti nella vasca elettroforetica, aggiungere il tampone elettroforetico (10 mL di Na₂EDTA 0.2 M in 2 L di H₂O pura; portare a pH 13 con NaOH 60%) ai lati della vasca. Questo passaggio va eseguito lentamente in modo da non perturbare eccessivamente le cupole.

I vetrini vanno lasciati 20 minuti nel tampone elettroforetico in modo che avvenga la denaturazione del materiale genetico (fase di denaturazione). Al termine di questa fase si esegue la corsa elettroforetica a 20 V per 20 minuti.

Terminata la corsa, i vetrini sono immersi in un tampone di neutralizzazione (48.46 g L⁻¹ Tris-HCl; portare a pH 7.5 con NaOH) freddo per 5 minuti, poi in acqua fredda per 5 secondi e, infine, disidratati in metanolo (CH₃OH) al 70% per 10 secondi.

I vetrini vengono disidratati completamente ponendoli in stufa a 60° C o sopra una piastra riscaldante (tramite supporti per evitare il contatto diretto del vetrino) al buio fino a scomparsa della cupola di agarosio. Sono poi conservati al buio fino al momento della colorazione e analisi.

La colorazione viene eseguita con 25 µL di una soluzione di Syber Gold, diluito 100x in PBS, per pozzetto.

Dopo aver distribuito delicatamente il colorante nei pozzetti, questi vengono coperti con vetrini copri oggetto (50x24 mm) e le immagini sono acquisite tramite un microscopio a fluorescenza, catturando 12 immagini per pozzetto.

Attraverso uno specifico software di analisi per immagini, è possibile distinguere le comete dallo sfondo delle immagini ed estrapolare i 4 indici maggiormente utilizzati per valutare i danni al DNA: *Tail Length* (lunghezza

della coda, TL), *Tail Intensity* (intensità della coda, TI), *Tail Moment* (momento della coda, TM) e *Tail migration* (migrazione della coda, Tmig) (Tiano et al., 2005). La TL è un parametro più sensibile a danni minori al DNA, mentre la TI è più sensibile a danni maggiori. Il TM è invece un parametro che combina TL e TI. La Fig. 11 riporta come vengono visualizzate le comete tramite il software per l'elaborazione, a sinistra una cellula non danneggiata, a destra una cellula danneggiata (cometa con parte del materiale genetico che ha migrato dopo elettroforesi). Il software è in grado di distinguere le comete dallo sfondo, ma è comunque necessario un controllo da parte dell'operatore. Sia per verificare che siano state selezionate cellule, ma anche per verificare che gli assi di riferimento (barre verdi verticali in Fig. 11) siano posizionate correttamente.

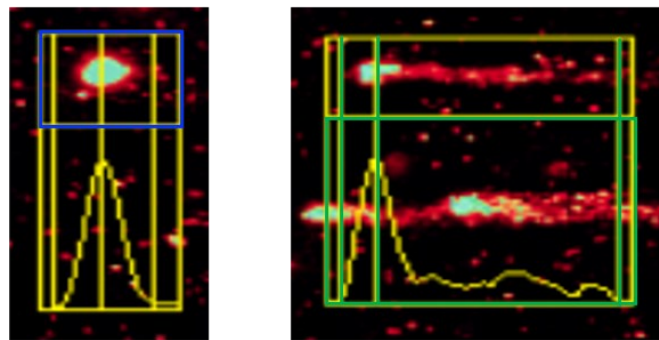


Figura 11. Rappresenta la fase di elaborazione delle comete. Il riquadro blu rappresenta l'area che viene indicata dall'operatore. Quando si seleziona quest'area, compare il riquadro e le linee verdi. Le linee esterne servono per delimitare la porzione che il software deve considerare, mentre quella centrale deve essere posizionata a livello della testa. In questo modo riesce a calcolare correttamente i 4 parametri considerati.

2.12. *Analisi statistica*

Tutte le misurazioni sono espresse come media \pm DS (Deviazione Standard) dei valori ottenuti da tre repliche "biologiche", intese come colture cellulari cresciute nelle stesse condizioni derivanti da un inoculo di uguali dimensioni dalla stessa coltura madre (per esempio, tre differenti colture). Per le

misurazioni derivate dall'FTIR, *Comet assay* e saggi spettrofotometrici sono state misurate due repliche strumentali per ciascuna replica biologica.

La significatività delle differenze tra le medie (t-test, *one-way ANOVA*, *two-way ANOVA* e post hoc test delle comparazioni multiple di Tukey) è stata determinata attraverso GraphPad Prism 9.1.1. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Il livello di significatività delle analisi è sempre stato del 95%. Tutti i valori relativi alle analisi *ANOVA* sono riportati nei materiali supplementari.

Capitolo terzo

RISULTATI

3.1. Selezione della specie algale

Per selezionare la specie ottimale per la fitodepurazione di AV tra le 6 considerate sono stati valutati 4 parametri: il tasso di crescita (μ), il tempo di duplicazione (T_d), la densità massima (D_{max}) e la variazione del contenuto in polifenoli nel mezzo esterno.

3.1.1. Tasso di crescita, tempo di duplicazione, densità massima

Come si può vedere dalla Fig. 12, *D. salina* è stata l'unica specie in grado di crescere in presenza dei composti fenolici aggiunti singolarmente al mezzo di crescita, mentre *P.tricornutum* è stata, oltre a *D. salina*, l'unica in grado di crescere in presenza dell'acido *p*-cumarico, in modo paragonabile rispetto all'esposizione al tirosolo.

Tutte e 6 le specie sono cresciute in presenza di tirosolo e la curva di crescita che ne risulta è risultata simile a quella ottenuta dalla condizione di controllo, tranne nel caso di *P. purpureum*.

Nella Tab. 7 e nelle Fig. 13 A, B, C sono riportati i valori di μ , T_d e D_{max} della crescita di ogni specie alle diverse condizioni. Viene inoltre riportata anche la normalizzazione del tasso di crescita nei tre singoli polifenoli rispetto alla condizione di controllo, ovvero il rapporto tra il tasso del singolo composto fenolico e il tasso del controllo. Questo permette di stimare la variazione della crescita microalgale in presenza dei composti fenolici rispetto alla crescita in assenza di essi.

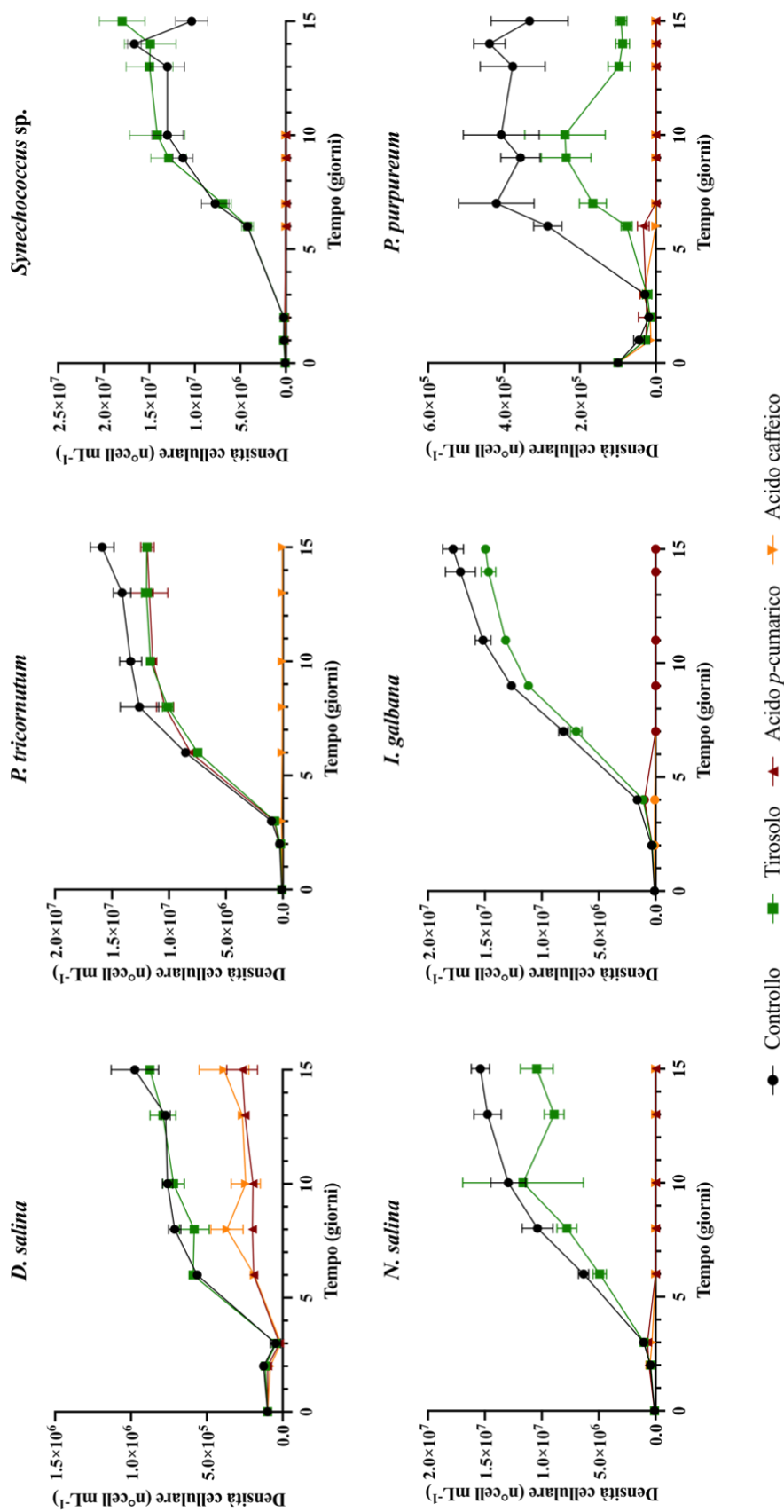


Figura 12. Curve di crescita delle 6 specie di microalghe esposte singolarmente ai tre composti fenolici. Le barre di errore indicano la deviazione standard dal valore medio ottenute da tre repliche biologiche.

A

Tasso di crescita (μ) e densità massima (D_{max})											
Specie	<i>D. salina</i>			<i>P. tricornutum</i>			<i>Synechococcus sp.</i>				
	μ (g^{-1})	μ_N	D_{max} (n°cell mL $^{-1}$)	μ (g^{-1})	μ_N	D_{max} (n°cell mL $^{-1}$)	μ (g^{-1})	μ_N	D_{max} (n°cell mL $^{-1}$)		
Controllo	0.189 ± 0.011 ^a	1	9.76*10 ⁵ ± 1.56*10 ⁵ ^a	0.760 ± 0.005 ^a	1	1.59*10 ⁷ ± 1.03*10 ⁶ ^a	0.573 ± 0.015 ^a	1	1.67*10 ⁷ ± 7.46*10 ⁵ ^a		
Tirosolo	0.185 ± 0.006 ^a	0.98	8.86*10 ⁵ ± 1.20*10 ⁴ ^a	0.746 ± 0.011 ^a	0.98	1.22*10 ⁷ ± 3.05*10 ⁵ ^b	0.569 ± 0.021 ^a	0.99	1.80*10 ⁷ ± 2.50*10 ⁶ ^a		
Acido <i>p</i> -cumarico	0.109 ± 0.026 ^b	0.58	2.88*10 ⁵ ± 8.53*10 ⁴ ^b	0.752 ± 0.003 ^a	0.99	1.24*10 ⁷ ± 1.11*10 ⁶ ^b	0 ± 0	0	0 ± 0 ^b		
Acido caffeico	0.140 ± 0.012 ^b	0.74	4.56*10 ⁵ ± 1.39*10 ⁵ ^b	0 ± 0 ^b	0	0 ± 0 ^c	0 ± 0	0	0 ± 0 ^b		

Specie	<i>N. salina</i>			<i>I. galbana</i>			<i>P. purpureum</i>		
	μ (g^{-1})	μ_N	D_{max} (n°cell mL $^{-1}$)	μ (g^{-1})	μ_N	D_{max} (n°cell mL $^{-1}$)	μ (g^{-1})	μ_N	D_{max} (n°cell mL $^{-1}$)
Controllo	0.362 ± 0.037 ^a	1	1.56*10 ⁷ ± 8.47*10 ⁵ ^a	0.322 ± 0.018 ^a	1	1.79*10 ⁷ ± 9.01*10 ⁵ ^a	0.703 ± 0.111 ^a	1	4.39*10 ⁵ ± 4.19*10 ⁴ ^a
Tirosolo	0.340 ± 0.037 ^a	0.94	1.32*10 ⁷ ± 4.13*10 ⁶ ^a	0.358 ± 0.004 ^b	1.11	1.50*10 ⁷ ± 3.88*10 ⁵ ^b	0.454 ± 0.055 ^b	0.65	2.89*10 ⁵ ± 1.02*10 ⁵ ^b
Acido <i>p</i> -cumarico	0 ± 0 ^b	0	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c	0	0 ± 0 ^c
Acido caffeico	0 ± 0 ^b	0	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c	0	0 ± 0 ^c

Tabella 7 A e B. I valori riportati rappresentano la media ± deviazione standard da tre repliche biologiche del tasso di crescita (μ) e della densità massima (D_{max}) delle specie nelle diverse condizioni. Viene riportata anche la normalizzazione (μ_N) dei tassi di crescita delle condizioni sperimentali (Tirosolo, Acido *p*-cumarico, Acido caffeico) rispetto alla condizione di controllo. Diverse lettere indicano una differenza statisticamente significativa dopo l'analisi statistica dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) con confidenza del 95%.

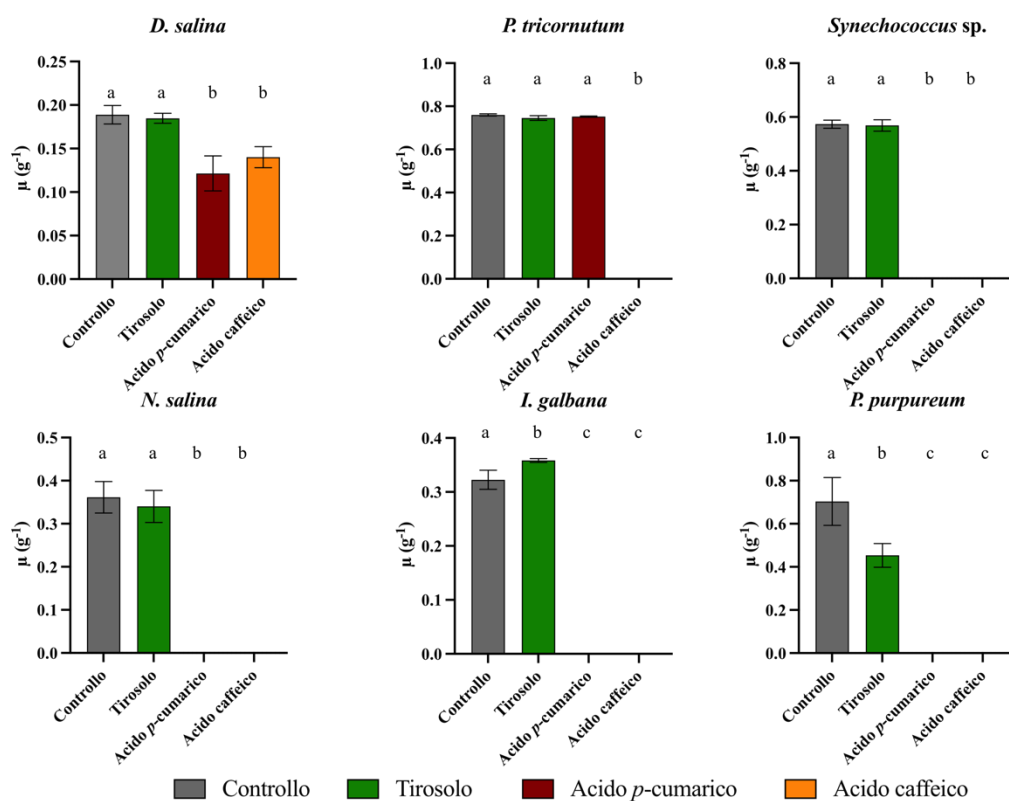


Figura 13.A. Tasso di crescita (μ) delle specie nelle diverse condizioni di coltura. Diverse lettere indicano una differenza statisticamente significativa dopo l'analisi statistica dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) con confidenza del 95%. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

Come si può vedere dalla Fig. 13.A, *D. salina* ha un tasso di crescita paragonabile tra la condizione di controllo e quella di esposizione al tirosolo, mentre i tassi di crescita in seguito ad esposizione all'acido *p*-cumarico e all'acido caffeico sono risultati paragonabili e inferiori rispetto al tirosolo.

P. tricornutum presenta invece tassi di crescita non statisticamente diversi dal controllo quando viene esposta al tirosolo e all'acido *p*-cumarico.

Synechococcus sp. e *N. salina* presentano tassi di crescita paragonabili tra la condizione di controllo e quella di esposizione al tirosolo.

I. galbana e *P. purpureum* hanno tassi di crescita statisticamente diversi tra la condizione di controllo e quella in presenza di tirosolo, rispettivamente

maggiore e minore. Nella Fig. 13.B vengono riportati i tempi di divisione, che essendo determinato dal tasso di crescita (vedi paragrafo 2.4), mantengono le stesse differenze viste per il tasso di crescita.

Considerando la densità massima raggiunta nelle diverse condizioni sperimentali (Fig. 13.C), *D. salina* non presenta differenze significative tra il controllo e l'esposizione al tirosolo, mentre la condizione con l'acido *p*-cumarico e l'acido caffeico presentano densità massime statisticamente uguali e inferiori rispetto al tirosolo, in linea con quanto visto per il tasso di crescita.

P. tricornutum, invece, raggiunge una densità massima paragonabile quando esposta a tirosolo e all'acido *p*-cumarico, ma inferiore alla condizione di controllo, diversamente da quanto visto con il tasso di crescita, dove appartengono allo stesso gruppo statistico.

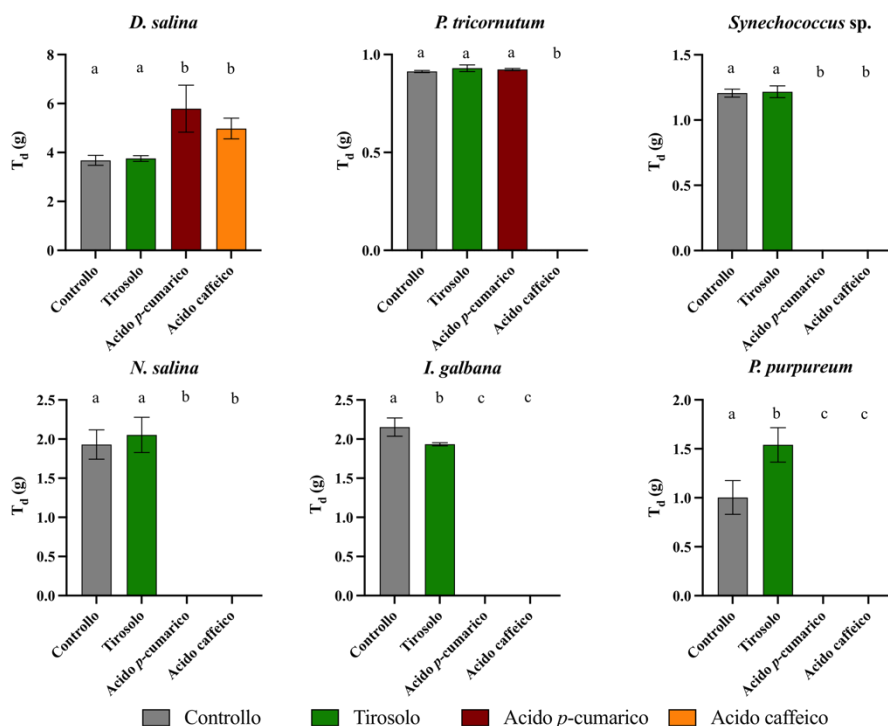


Figura 13. B. Tempo di duplicazione (T_d) delle specie nelle diverse condizioni di coltura. Diverse lettere indicano una differenza statisticamente significativa dopo l'analisi statistica dell'ANOVA a una via (one-way ANOVA) con confidenza del 95%. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

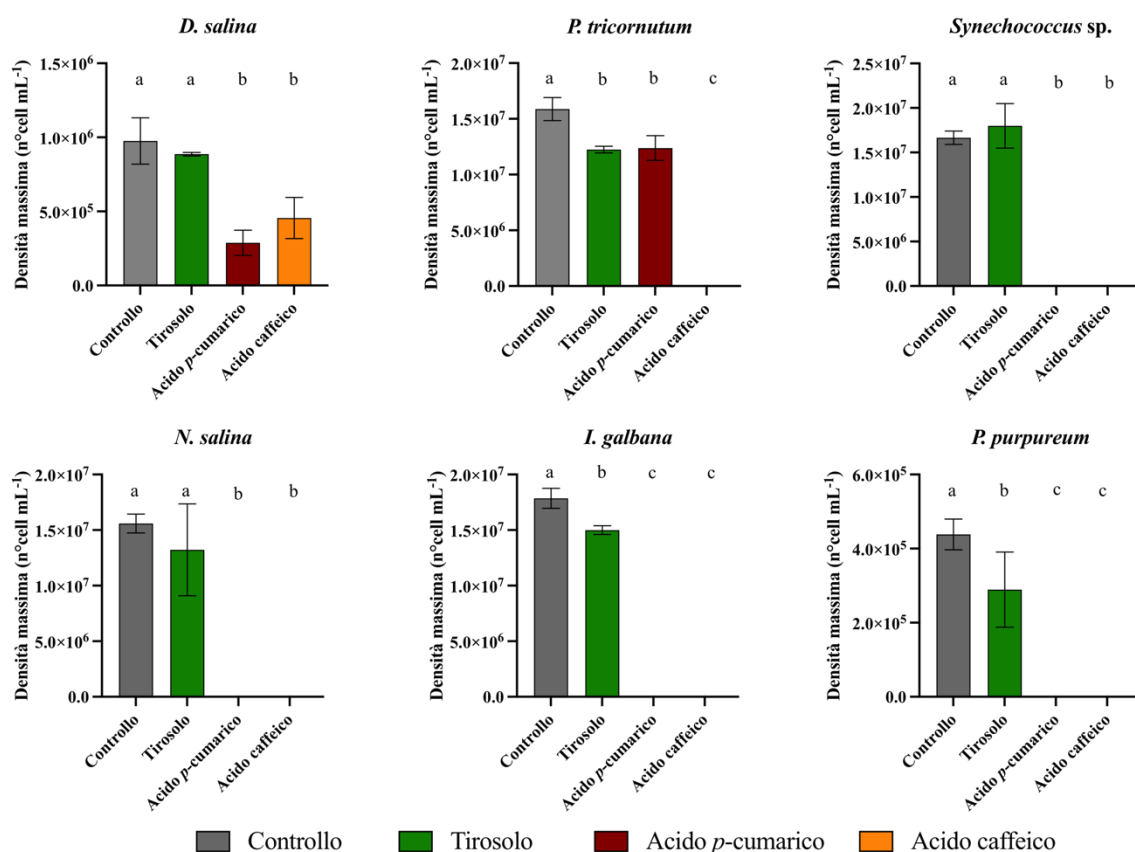


Figura 13. C. Densità massima (D_{max}) delle specie nelle diverse condizioni di coltura. Diverse lettere indicano una differenza statisticamente significativa dopo l'analisi statistica dell'ANOVA a una via (one-way ANOVA) con confidenza del 95%. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

Nei casi di *Synechococcus sp.* e *N. salina*, si vede come non ci siano differenze significative tra il controllo e la crescita in esposizione a tirosole.

I. galbana raggiunge densità maggiori nel controllo rispetto al tirosole, nonostante il tasso di crescita risulta minore rispetto al tirosole.

Infine, *P. purpureum* presenta una densità massima del controllo maggiore rispetto al tirosole, in linea con la differenza riscontrata nel tasso di crescita.

3.1.2. Variazione del contenuto in composti fenolici nel mezzo di crescita

La Fig. 14 riporta la percentuale (%), rispetto al giorno 0, del contenuto in composti fenolici nel mezzo di crescita, per tutte le specie e per il controllo

eseguito senza l'inoculo di microalghe (solo con aggiunta dei composti fenolici al mezzo AMCONA).

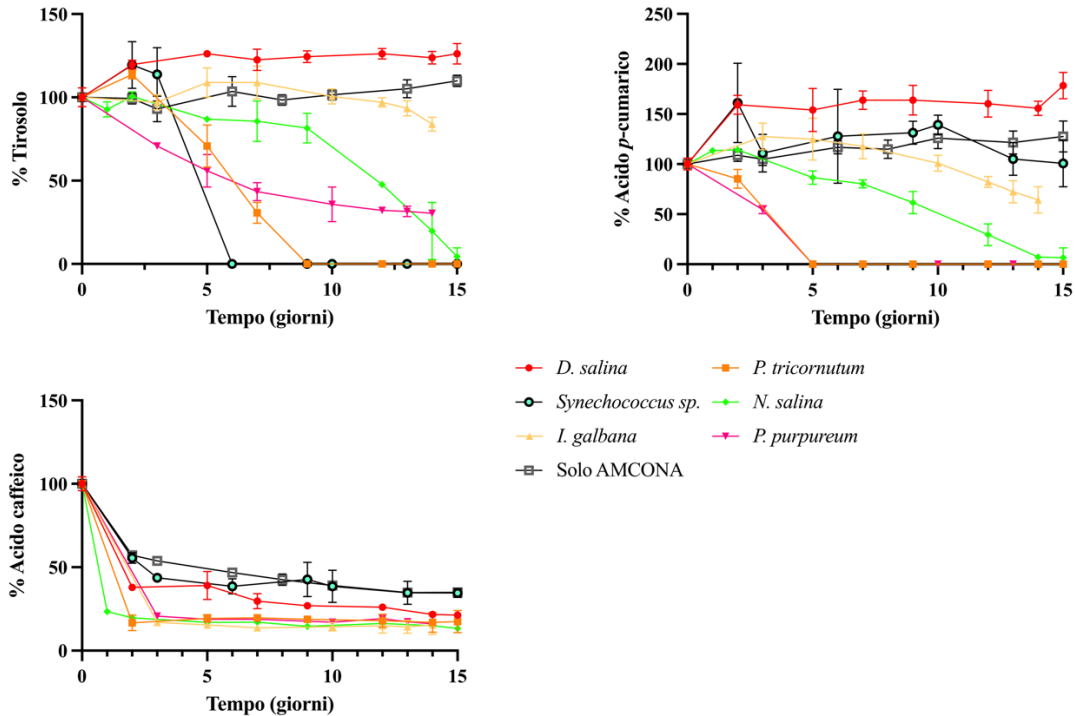


Figura 14. Variazione della concentrazione dei 3 composti fenolici nel mezzo di crescita. Le barre di errore indicano la deviazione standard dal valore medio ottenute da tre repliche biologiche.

Si osserva una concentrazione del tirosolo più o meno costante nella condizione sperimentale in assenza di microalghe. In presenza di *D. salina* si osserva un incremento della percentuale, mentre nel caso di *I. galbana* la concentrazione rimane costante, calando solo verso il 15° giorno. Per tutte le altre specie si osserva un calo della concentrazione più o meno marcato.

Nel caso dell'acido *p*-cumarico, la condizione in assenza di microalghe mostra un leggero incremento rispetto al giorno 0.

Nella condizione di crescita con *D. salina* si osserva un incremento che raggiunge il massimo al 5° giorno e la concentrazione rimane poi costante.

Nel caso di *Synechococcus* sp., dopo un'iniziale incremento rispetto al giorno 0, si osserva un ritorno al valore iniziale al termine dei 16 giorni sperimentali. Nel caso di *N. salina* e *I. galbana* si osserva un aumento della concentrazione nei primi giorni, maggiore nel caso di *I. galbana*. In entrambi i casi si osserva successivamente un calo della concentrazione, fino a quasi il 50 % della concentrazione iniziale con *I. galbana* e con valori prossimi allo 0 % per *N. salina*. La condizione sperimentale con *P. tricornutum* e *P. purpureum* mostra invece un calo fino allo 0 % già nei primi 5 giorni di crescita.

Considerando l'andamento dell'acido caffeico, si osserva come tutte le curve ottenute presentino lo stesso andamento, ovvero, con una riduzione della concentrazione nei primi giorni post-inoculo e nei giorni successivi il valore raggiunto si mantiene costante. Si osserva una variabilità nel tasso di riduzione e nel valore raggiunto tra le specie e nella condizione solo AMCONA.

3.2. Esposizione simultanea di D. salina ai 3 composti fenolici ed esposta a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

3.2.1. Tasso di crescita, tempo di duplicazione, densità massima

Nella Fig. 15 è rappresentata la curva di crescita di *D. salina* in mezzo contenente tirosolo (42.12 mg L^{-1}), acido *p*-cumarico (23.42 mg L^{-1}) e acido caffeico (28.08 mg L^{-1}). Si nota subito come l'andamento della crescita sia diverso dalla condizione di controllo, in cui è possibile distinguere una fase esponenziale di crescita (tra il 4° e il 10° giorno), mentre nella condizione sperimentale l'andamento è stato lo stesso per tutti i giorni di crescita considerati. Nella Tab. 8 e nelle Fig. 16 A, B e C sono riportati i valori di μ , T_d e D_{max} della crescita di *D. salina* esposta ai tre composti fenolici simultaneamente (denominata come "Mix"). Questi valori sono confrontati sia

con la condizione di controllo che con le condizioni dei 3 singoli composti fenolici.

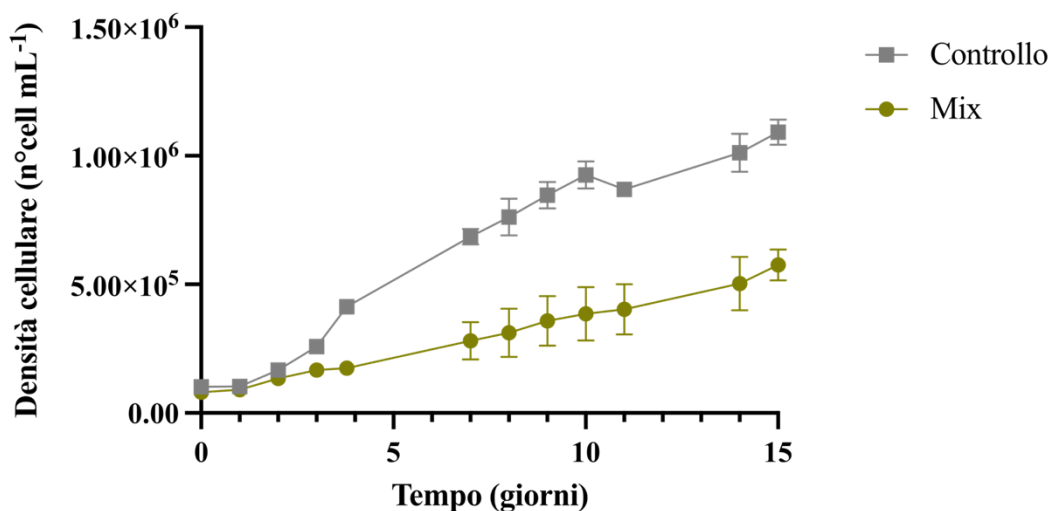


Figura 15. Curva di crescita di *D. salina* esposta ai tre composti fenolici simultaneamente (Mix). Le barre di errore indicano la deviazione standard dal valore medio ottenute da tre repliche biologiche.

A					
Tasso di crescita (μ) e densità massima (D_{max})					
Specie	<i>D. salina</i>				
	μ (g ⁻¹)	t-test	μ_N	D_{max} (n°cell mL ⁻¹)	t-test
Controllo	0.166 ± 0.002	*	0.765	1.09*10 ⁶ ± 4.56*10 ⁴	*
Mix	0.127 ± 0.018			5.75*10 ⁵ ± 6.04*10 ⁴	

B					
Confronto con i singoli polifenoli					
Specie	<i>D. salina</i>				
	μ (g ⁻¹)				μ_N
Mix	0.127 ± 0.018	a			1
Tirosolo	0.185 ± 0.006	b			1.46
Cumarico	0.109 ± 0.026	a			0.86
Caffeico	0.140 ± 0.012	a			1.10

Tabella 8 A e B. Tabella 8 A e B. Tasso di crescita μ e densità massima D_{max} (media e deviazione standard) della condizione sperimentale di *D. salina* esposta ai 3 composti fenolici simultaneamente e confronto con i tassi di crescita quando esposta ai tre singoli composti fenolici (in questo caso i tassi di crescita sono stati calcolati considerando tutto i giorni sperimentali). Viene riportata anche la normalizzazione (μ_N) del tasso di crescita della

condizione sperimentale Mix rispetto alla condizione di controllo e anche la normalizzazione dei tassi di crescita ottenuti dai tre singoli polifenoli rispetto al Mix.

Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione Controllo e Mix, con un intervallo di confidenza del 95%, l'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05).

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo l'analisi statistica dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) con confidenza del 95%.

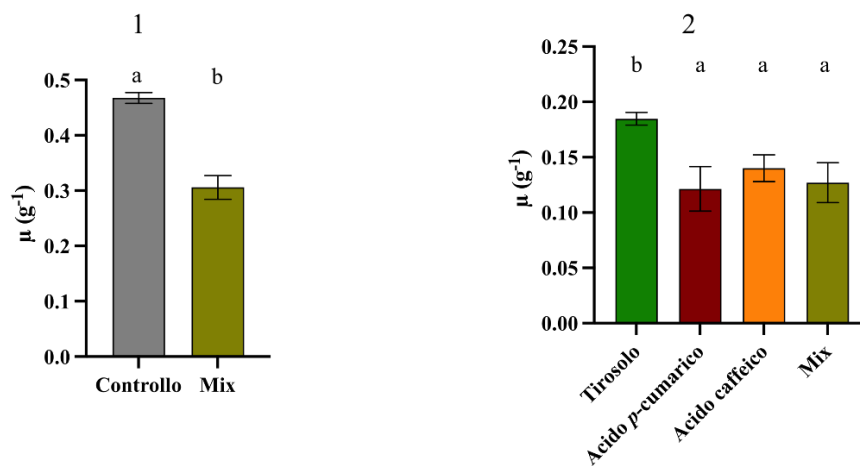


Figura 16. A. (1) Tasso di crescita μ di *D. salina* esposta ai 3 composti fenolici simultaneamente. (2) Confronto con i tassi di crescita quando esposta ai tre singoli composti fenolici (in questo caso il tasso di crescita della condizione Mix è calcolato considerando tutti i giorni della crescita cellulare, in quanto anche i tassi di crescita con i 3 singoli composti fenolici sono calcolati nello stesso modo).

Le lettere (a, b) nel grafico 1 indicando i gruppi statistici determinati dopo t-test con confidenza al 95% (p-value < 0.05).

Nel grafico 2 indicano i gruppi statistici determinati dopo l'analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) con confidenza del 95%.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

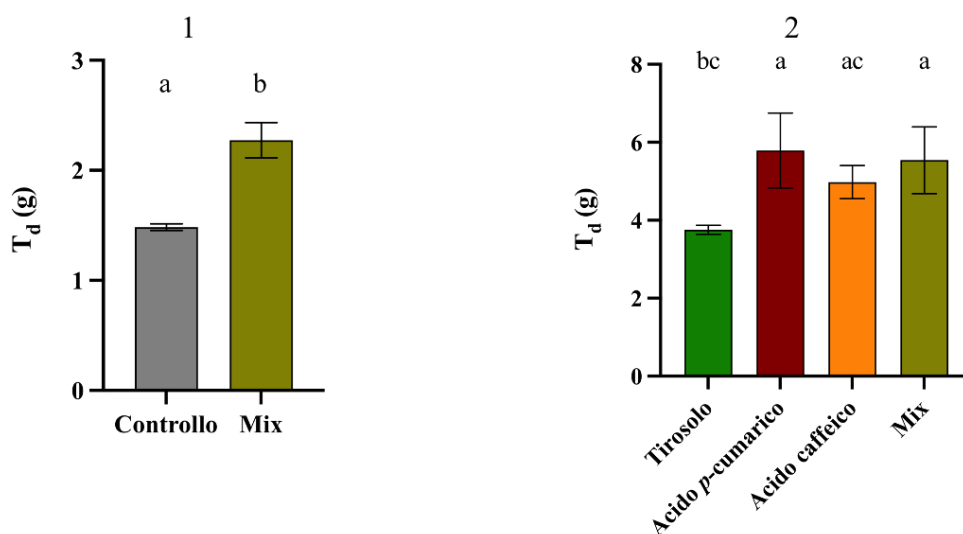


Figura 16. B. (1) Tempo di duplicazione T_d di *D. salina* esposta ai 3 composti fenolici simultaneamente. (2) Confronto con il T_d quando esposta ai tre singoli composti fenolici (in questo caso il T_d della condizione Mix è calcolato considerando tutti i giorni della crescita cellulare, in quanto anche il T_d con i 3 singoli composti fenolici è calcolato nello stesso modo).

Le lettere (a, b) nel grafico 1 indicando i gruppi statistici determinati dopo t-test con confidenza al 95% (p-value < 0.05).

Nel grafico 2 indicano i gruppi statistici determinati dopo l'analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) con confidenza del 95%.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

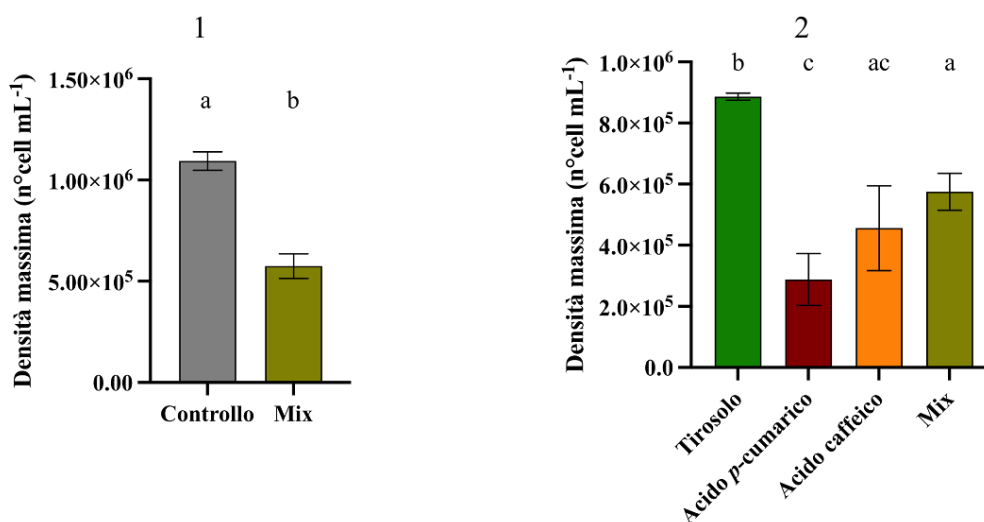


Figura 16. C. (1) Densità massima della condizione sperimentale di *D. salina* esposta ai 3 composti fenolici simultaneamente. (2) Confronto con la D_{max} quando esposta ai tre singoli composti fenolici.

Le lettere (a, b) nel grafico 1 indicando i gruppi statistici determinati dopo t-test con confidenza al 95% (p-value < 0.05).

Nel grafico 2 indicano i gruppi statistici determinati dopo l'analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) con confidenza del 95%.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

Si nota come la condizione nel Mix di composti fenolici presenta, per tutti e tre i parametri, valori significativamente diversi rispetto alla condizione di controllo e indicano una limitazione della crescita. Comparando il tasso di crescita del Mix con la condizione di controllo, infatti, è risultata pari a 0.76 volte il tasso di crescita del controllo.

Confrontando i parametri della crescita cellulare nel Mix con i parametri ottenuti dalla crescita nei singoli composti fenolici, si vede che c'è una netta differenza con la condizione di esposizione al tirosolo per tutti e tre i parametri considerati, in cui la crescita è stata maggiore (il tasso di crescita è 1.46 volte maggiore rispetto al tasso del Mix). Rispetto alle condizioni di esposizione all'acido *p*-cumarico e all'acido caffeico, la crescita nel Mix non ha presentato differenze significative per μ , T_d e D_{max} , tranne nel caso della D_{max} rispetto all'acido *p*-cumarico, che risulta inferiore rispetto al Mix.

3.2.2. Variazione del contenuto in composti fenolici nel mezzo di crescita

La Fig. 17 illustra la variazione in composti fenolici durante la crescita microalgale e mette a confronto la variazione della concentrazione in composti fenolici nel Mix con i tre singoli composti fenolici. Si nota come non ci sia una significativa variazione nel contenuto in composti fenolici durante la crescita microalgale nel Mix. Invece, nella condizione di crescita con i tre singoli composti fenolici, il tirosolo e l'acido *p*-cumarico sono aumentati significativamente, mentre l'acido caffeico si è ridotto considerevolmente.

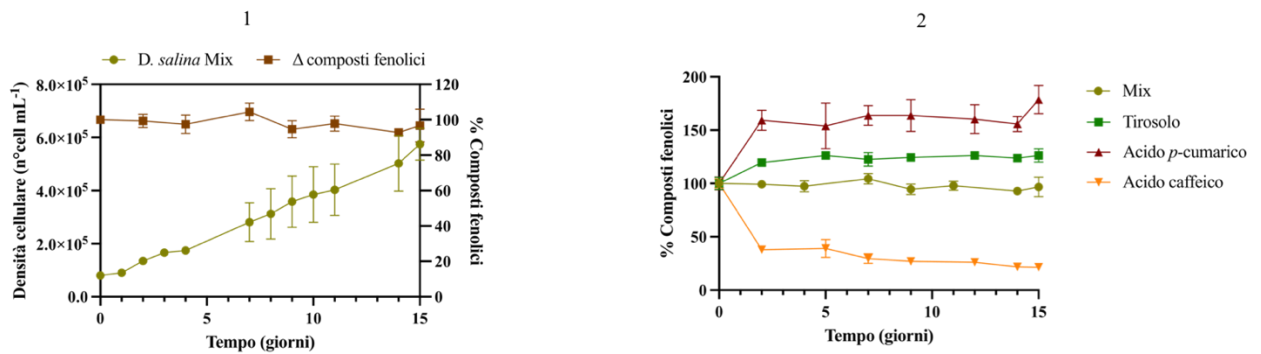


Figura 17. (1) Variazione in % rispetto al giorno 0 dei composti fenolici nel Mix (asse y destro) in relazione alla crescita microalgale (asse y sinistro). (2) Variazione in % rispetto al giorno 0 dei composti fenolici nel Mix e dei 3 singoli composti fenolici durante la crescita di *D. salina*. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

3.2.3. Quantificazione dei pigmenti

Considerando il contenuto in pigmenti fotosintetici, misurato in pg cell⁻¹, la condizione di crescita nel Mix di composti fenolici presenta un contenuto significativamente inferiore di clorofilla *a* e carotenoidi, mentre la clorofilla *b* non presenta differenze. Misurando il rapporto tra clorofille *a* e *b*, risulta che questo sia significativamente minore rispetto alla condizione di controllo.

Quanto detto vale sia per la fase esponenziale di crescita che per la fase stazionaria. Le Fig. 18.A, 18.B e la Tab. 9 riportano i dati ottenuti. Prendendo in considerazione la variazione tra fase esponenziale e stazionaria di crescita (Fig. 18.C), la chl *a* è calata significativamente sia nel controllo che nella condizione sperimentale, mantenendo la differenza che c'è stata in fase esponenziale. Anche la chl *b* cala rispetto alla fase esponenziale e rimane uguale tra controllo e trattato. Considerando i carotenoidi, invece, nel controllo si osserva un aumento, mentre la quantità rilevata nel Mix è rimasta uguale al valore in esponenziale. Lo stesso accade per il rapporto tra le clorofille.

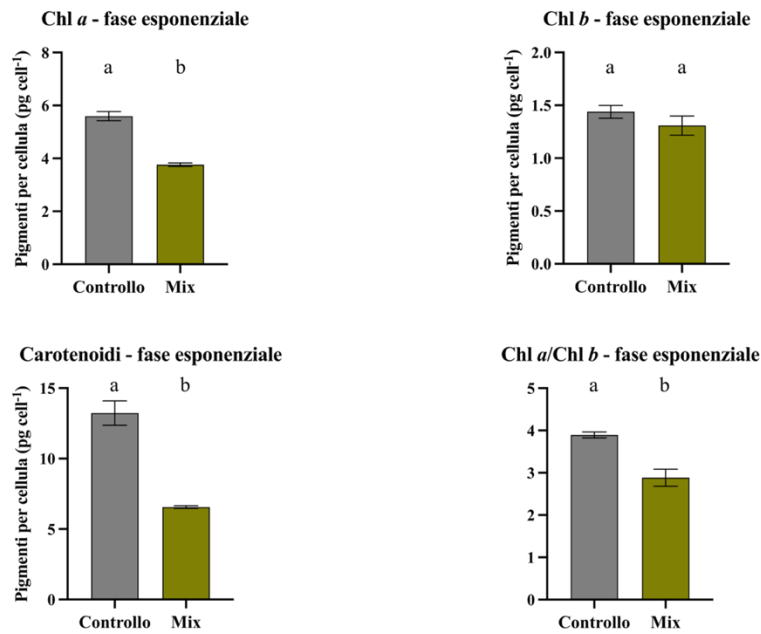


Figura 18. A. pg per cellula delle diverse classi di pigmenti e rapporto tra clorofilla *a* e clorofilla *b* nella fase esponenziale di crescita. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo t-test con confidenza al 95%, i p-value sono riportati in Tab. 9. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

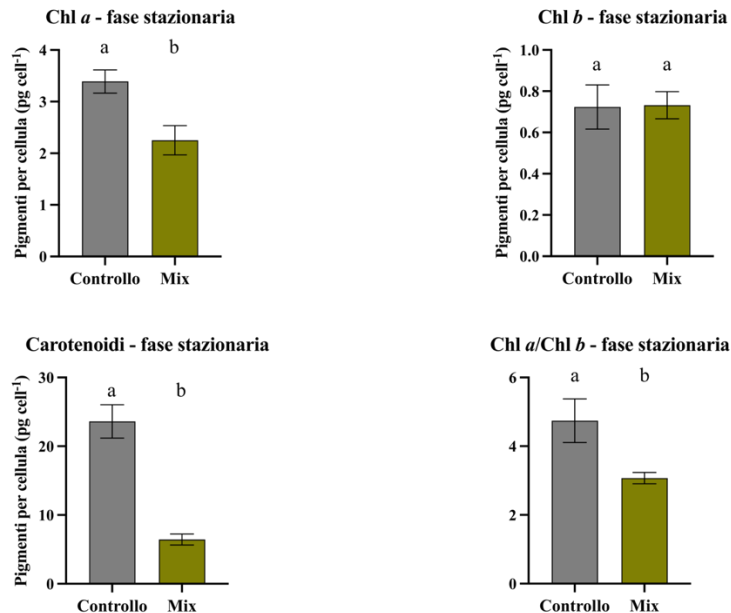


Figura 18. B. pg per cellula delle diverse classi di pigmenti e rapporto tra clorofilla *a* e clorofilla *b* nella fase stazionaria di crescita. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo t-test con confidenza al 95%, i p-value sono riportati in Tab. 9. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

A Pigmenti fotosintetici per cellula (pg cell⁻¹) – fase esponenziale				
	Controllo		Mix	p-value
Chl <i>a</i>	5.599 ± 0.174		3.764 ± 0.067 *	<0.0001
Chl <i>b</i>	1.439 ± 0.061		1.309 ± 0.090 NS	0.1087
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	3.893 ± 0.072		2.884 ± 0.202 *	0.0002
Carotenoidi	13.231 ± 0.857		6.562 ± 0.092 *	0.0012

B Pigmenti fotosintetici per cellula (pg cell⁻¹) – fase stazionaria				
	Controllo		Mix	p-value
Chl <i>a</i>	3.391 ± 0.224		2.253 ± 0.284 *	0.0055
Chl <i>b</i>	0.724 ± 0.107		0.732 ± 0.065 NS	0.9140
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	4.742 ± 0.634		3.073 ± 0.164 *	0.0003
Carotenoidi	23.612 ± 2.422		6.427 ± 0.798 *	0.0116

Tabella 9 A e B. Contenuto cellulare delle varie tipologie di pigmenti fotosintetici (media ± deviazione standard) in fase esponenziale e stazionaria. L'analisi statistica è stata eseguita tramite t-test tra la condizione sperimentale e quella di controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

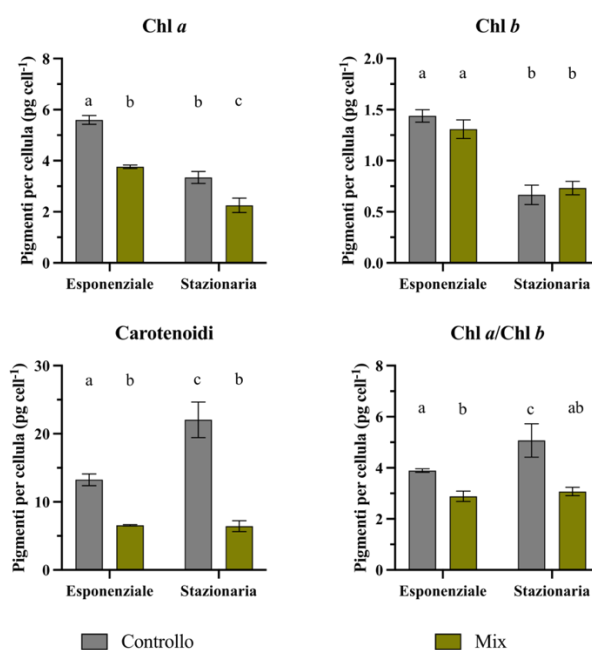


Figura 18. C. pg cellula delle diverse classi di pigmenti e del rapporto tra le clorofille in fase esponenziale e stazionaria a confronto. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *fase di crescita* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%.

I valori riportati rappresentano media ± deviazione standard su tre repliche biologiche.

3.2.4. Quantificazione delle proteine

Nella Tab. 10 sono riportati i valori di proteine in pg cell⁻¹ ottenuti attraverso il saggio di Lowry. Non risulta nessuna differenza significativa tra la condizione di controllo e nel Mix, ma si osserva un netto calo della quantità tra fase esponenziale e stazionaria di crescita, per entrambe le condizioni.

Proteine (pg cell ⁻¹)						
	Controllo		Mix		t-test	p-value
Esponenziale	169.7	± 29.0	197.4	± 68.4	NS	0.5536
Stazionaria	43.4	± 11.6	40.7	± 9.7	NS	0.8042

Tabella 10. Contenuto cellulare di proteine (media ± deviazione standard) della coltura cresciuta in presenza del mix di composti fenolici e del suo controllo. Il t-test è stato eseguito con un intervallo di confidenza del 95% e NS indica che non c'è differenza statisticamente significativa (p-value > 0.05).

3.2.5. Composizione macromolecolare

In Tab. 11.A sono riportati i rapporti dei valori delle assorbanze derivanti dall'FTIR eseguito sulla biomassa microalgale. Si vede che, rispetto al controllo in fase esponenziale, nel Mix la quantità di carboidrati rispetto alle proteine aumenta, mentre la quantità di lipidi rispetto alle proteine diminuisce. Nella fase stazionaria, invece, i carboidrati rispetto alle proteine diminuiscono, mentre i lipidi/proteine sono sempre minori rispetto al controllo.

In Tab. 11.B sono invece riportate le abbondanze molecolari (UA cell⁻¹) dei carboidrati e dei lipidi, determinati moltiplicando il rapporto ottenuto dall'FTIR per i pg cell⁻¹ di proteine misurati attraverso il saggio di Lowry. Si vede come la coltura cresciuta nel Mix presenta una quantità significativamente maggiore di carboidrati per cellula rispetto al controllo (in fase esponenziale, in fase stazionaria non si osservano differenze), mentre la quantità di lipidi per cellula non presenta differenze significative con il controllo in entrambe le fasi di crescita.

Rapporti FTIR					
Fase di crescita	Rapporto	Controllo	Mix	t-test	p-value
Esponenziale	Carboidrati/ proteine	1.125 ± 0.006	2.076 ± 0.018	*	0.0049
	Lipidi/ proteine	0.153 ± 0.006	0.114 ± 0.018	*	0.0229
	Lipidi/ carboidrati	0.136 ± 0.006	0.057 ± 0.011	*	0.0004
Stazionaria	Carboidrati/ proteine	4.427 ± 0.008	3.049 ± 0.016	*	0.0086
	Lipidi/ proteine	0.261 ± 0.008	0.204 ± 0.016	*	0.0052
	Lipidi/ carboidrati	0.059 ± 0.005	0.068 ± 0.016	NS	0.4137

Tabella 11. A. Riporta il valore dei rapporti (media ± deviazione standard) dei picchi di assorbanza rilevati all'FTIR delle 3 classi macromolecolari analizzate. Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il controllo con un intervallo di confidenza del 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05) tra i valori.

Abbondanze molecolari (UA cell ⁻¹)					
Fase di crescita	Classe molecolare	Controllo	Mix	t-test	p-value
Esponenziale	Carboidrati	190.5 ± 30.3	403.3 ± 126.3	*	0.0470
	Lipidi	25.9 ± 3.5	21.8 ± 4.5	NS	0.2852
Stazionaria	Carboidrati	194.0 ± 61.2	133.9 ± 30.6	NS	0.3024
	Lipidi	11.3 ± 2.7	7.9 ± 1.6	NS	0.2215

Tabella 11. B. Riporta le unità arbitrarie (media ± deviazione standard) calcolate partendo dai rapporti ottenuti mediante FTIR e dal valore in pg cell⁻¹ delle proteine. Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale e il suo controllo con un intervallo di confidenza del 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

Considerando i rapporti delle singole classi molecolari rispetto al controllo (Tab. 11.C), vediamo che, nonostante una deviazione standard elevata, ci sia un aumento significativo dei carboidrati rispetto ai lipidi, comparabili in quantità al controllo.

La Fig. 19 riporta i valori dei rapporti tra Mix e controllo delle diverse classi molecolari. Si nota come, in fase stazionaria, l'aumento significativo in carboidrati rispetto al controllo non è più visibile. Tutte e tre le classi molecolari sono presenti in quantità paragonabili al controllo.

Mix/Controllo		
Fase di crescita	Classe molecolare	Mix/Ctr
Esponenziale	Proteine	1.163 ± 0.403 ^{ab}
	Carboidrati	2.117 ± 0.66 ^b
	Lipidi	0.844 ± 0.17 ^a
Stazionaria	Proteine	0.937 ± 0.224 ^a
	Carboidrati	0.690 ± 0.16 ^a
	Lipidi	0.700 ± 0.14 ^a

Tabella 11. C. Riporta il rapporto (media ± deviazione standard) tra le classi molecolari del Mix rispetto al controllo. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *fase di crescita* e *classe molecolare* con confidenza del 95%.

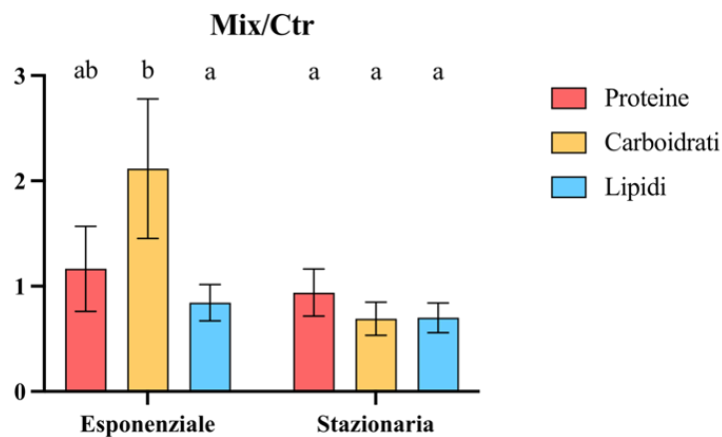


Figura 19. $\mu\text{g cell}^{-1}$ di proteine e $\mu\text{g cell}^{-1}$ di carboidrati e lipidi nella fase esponenziale e stazionaria di crescita. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo t-test tra controllo e condizione sperimentale con un intervallo di confidenza al 95%. I relativi p-value sono riportati in Tabella 10 e 11.B.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

3.2.6. *Indice di riduzione*

L'indice di riduzione della biomassa algale derivante dal Mix è risultato, sia nella fase esponenziale che stazionaria, significativamente diverso e inferiore rispetto al controllo (Tab. 12). Dalla Fig. 20 si nota anche che la differenza tra controllo e condizione sperimentale è aumentata nella fase stazionaria rispetto alla fase esponenziale. Tramite il parametro RI_N , che corrisponde al rapporto tra l'indice di riduzione del controllo e del Mix, si vede chiaramente questa riduzione. Infatti, nella fase esponenziale l'indice di riduzione della biomassa nel Mix è risultato pari a circa 0.83 volte l'indice del controllo, mentre nella fase stazionaria è stato quasi la metà del controllo, indicando una maggiore insaturazione, quindi ossidazione, della biomassa.

Indice di riduzione - RI				
	Controllo	Mix	t-test	RI _N
Esponenziale	5.72 ± 0.21	4.76 ± 0.23	*	0.833 ± 0.040
Stazionaria	5.99 ± 0.25	3.14 ± 0.15	*	0.523 ± 0.024

Tabella 12. Indice di riduzione (media ± deviazione standard) della biomassa algale. Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza del 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05) con p-value rispettivamente di 0.0061 e <0.0001.

Viene riportata anche la media ± deviazione standard del rapporto tra il valore dell'indice nella condizione sperimentale e il valore della condizione di controllo (RI_N).

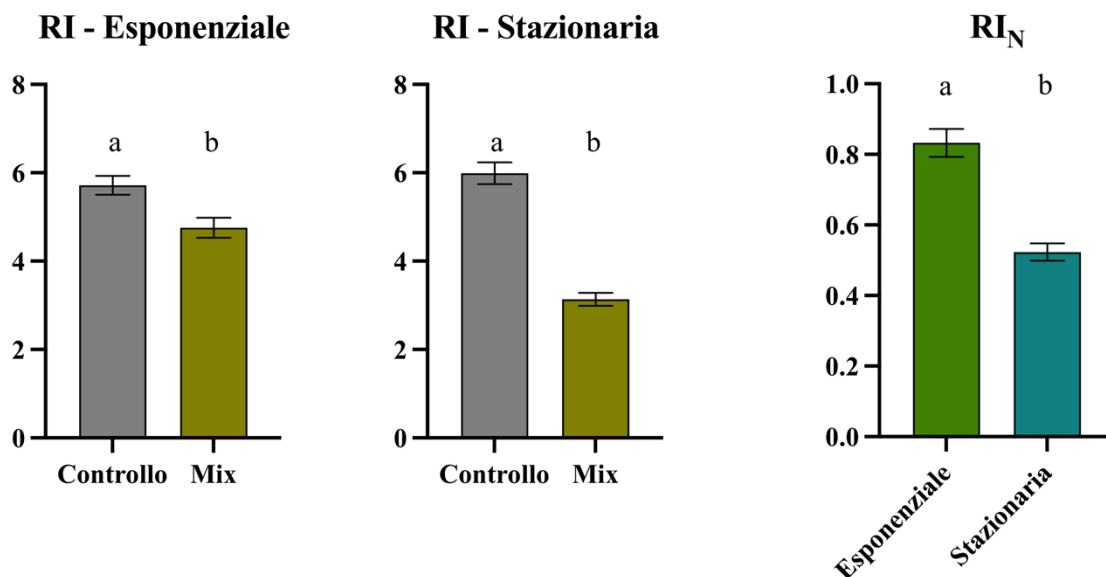


Figura 20. Indice di riduzione nelle diverse fasi di crescita cellulare. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo t-test tra la condizione di controllo e Mix (nei primi due grafici) e tra fase esponenziale e stazionaria nell'ultimo grafico. L'intervallo di confidenza è del 95% e i p-value sono riportati in Tab. 12.

I valori riportati rappresentano media ± deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

3.3. Esposizione di *D. salina* alle AV diluite e due condizioni di illuminazione differenti

3.3.1. Tasso di crescita, tempo di duplicazione, densità massima

In Fig. 21.A e 21.B sono rappresentate le curve di crescita di *D. salina* in AV diluite a 100 e 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Si nota come la condizione a luce minore (AV LL) presenti una curva nettamente differente dal controllo, mentre la condizione a luce maggiore (AV HL) ha un andamento paragonabile. Per quanto riguarda la condizione AV HL, a causa di una contaminazione fungina della coltura sperimentale l'esperimento è stato interrotto al 7° giorno di crescita, non è stato quindi possibile caratterizzare la biomassa algale in fase stazionaria.

Nella condizione a luce minore il tasso di crescita di AV LL è stato significativamente minore del controllo, come anche la densità massima raggiunta. Il tempo di duplicazione è stato significativamente maggiore.

Nella condizione a luce maggiore, invece, il tasso di crescita e il tempo di duplicazione non presentano differenze significative, mentre la densità massima raggiunta risulta minore in modo significativo. La Fig. 22 e la Tab. 13 riportano i valori del tasso di crescita nelle 4 condizioni di crescita su quali è eseguita l'analisi dell'ANOVA a due vie per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*. Dall'analisi risulta che i tassi di crescita del controllo LL, controllo HL e AV HL non presentano differenze significative, mentre il tasso di crescita di AV LL è significativamente minore (Suppl. 27).

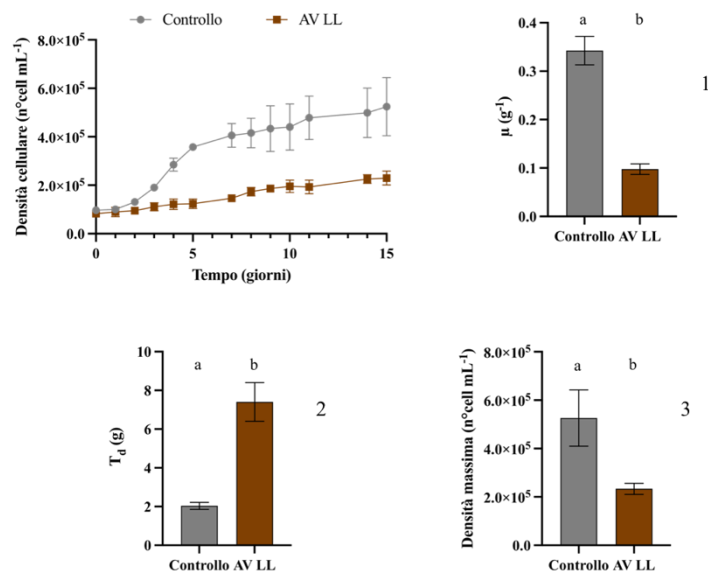


Figura 21.A. Curva di crescita di *D. salina* in AV diluite a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vengono riportati anche il tasso di crescita μ (1), il Tempo di duplicazione (T_d) (2) e la densità massima (3).

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$) determinata tramite t-test con confidenza del 95%. (1) $p\text{-value} = 0.0002$ (2) $p\text{-value} = 0.0008$ (3) $p\text{-value} = 0.0129$.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

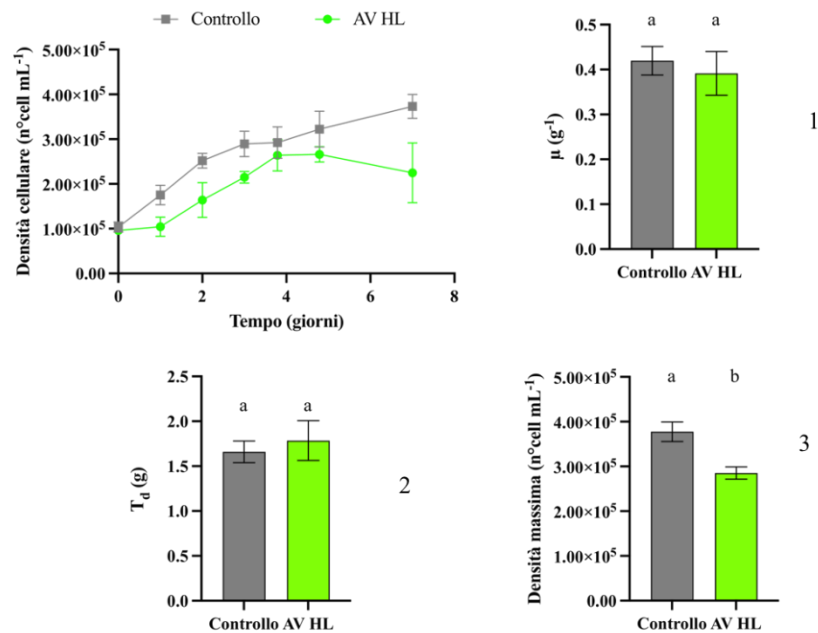


Figura 21.B. Curva di crescita di *D. salina* in AV diluite a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Vengono riportati anche il tasso di crescita μ , il Tempo di duplicazione (T_d) e la densità

massima. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) determinata tramite t-test con confidenza del 95%. (1) p -value = 0.4782 (2) p -value = 0.4600 (3) p -value = 0.0034.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard calcolate su tre repliche biologiche.

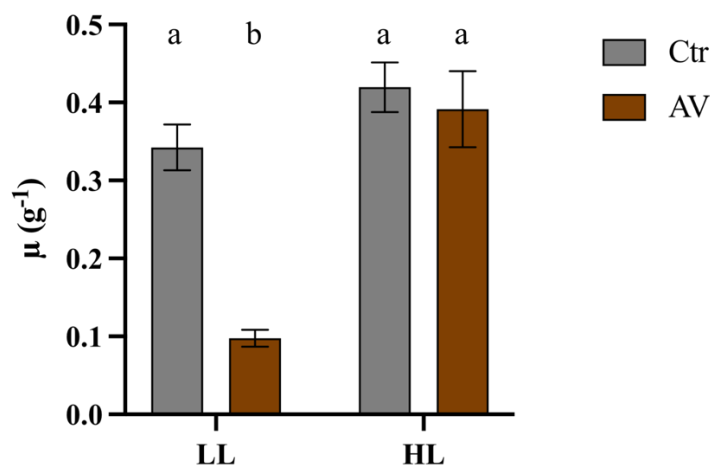


Figura 22. Tasso di crescita di *D. salina* nelle AV diluite alle due differenti condizioni di luce. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo l'analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*. L'intervallo di confidenza considerato è del 95%.

Tasso di crescita μ (g^{-1})						
	Controllo		AV			
LL	0.343	\pm 0.029	a	0.095	\pm 0.014	b
HL	0.420	\pm 0.032	a	0.391	\pm 0.049	a

Tabella 13. Tasso di crescita μ (media \pm deviazione standard) di *D. salina* nelle AV diluite a 100 (LL) e 300 (HL) μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo l'analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*. L'intervallo di confidenza considerato è del 95%.

3.3.2. Variazione del contenuto in polifenoli nel mezzo esterno

Considerando invece la variazione dei composti fenolici (Fig. 23) in seguito alla crescita algale, si vede come nella condizione a luce minore la quantità rilevata rimane pressoché invariata. Nella condizione a luce maggiore, invece, i pochi giorni in cui è stato possibile monitorare la crescita non mostrano alcuna variazione significativa.

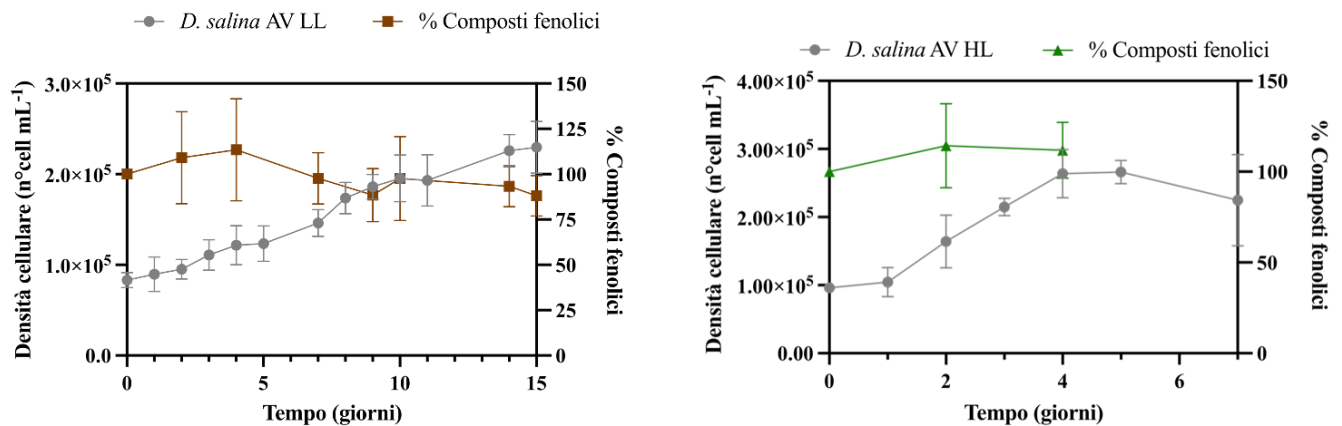


Figura 23. Variazione della % di composti fenolici nelle AV diluite durante la crescita di *D. salina* a 100 e 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Le barre di errore indicano la deviazione standard dal valore medio ottenuto da tre repliche biologiche.

3.3.3. Quantificazione dei pigmenti

Per quanto riguarda il contenuto per cellula dei pigmenti fotosintetici nella fase esponenziale, il contenuto in chl *a* è stato significativamente minore nelle colture nelle AV rispetto ai controlli, mentre il controllo HL è stato significativamente minore del controllo LL (Fig. 24). Lo stesso schema si ripropone con la chl *b*, l'unica differenza è che le AV LL e il controllo HL risultano avere un contenuto simile (Tab. 14).

Considerando il contenuto in carotenoidi, il contenuto per cellula nelle AV diluite LL è stato minore rispetto al controllo LL, mentre la condizione di AV diluite HL non ha presentato differenza statisticamente significative rispetto al

suo controllo. Il rapporto tra le due clorofille cala solo nelle AV diluite LL (Fig. 24).

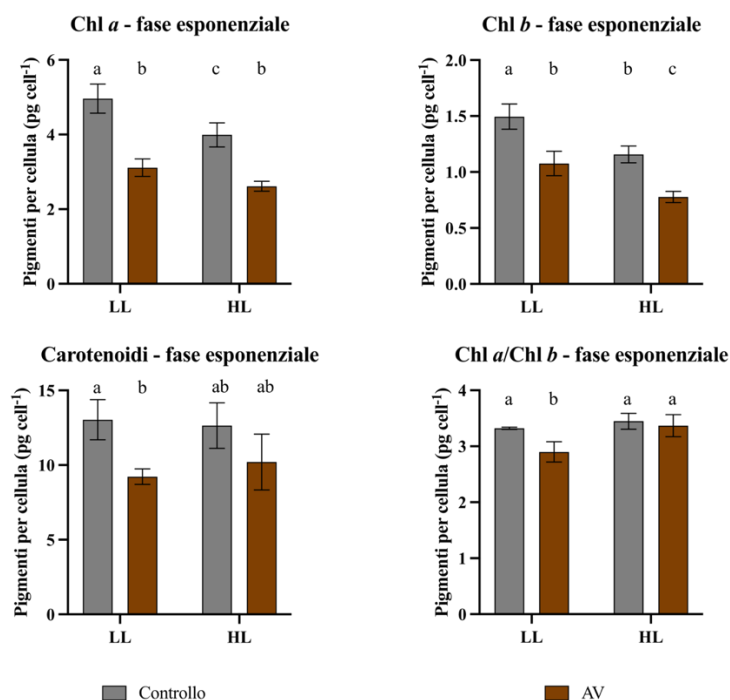


Figura 24. pg per cellula delle diverse classi di pigmenti e rapporto tra clorofilla *a* e clorofilla *b* nella fase esponenziale di crescita. Diverse lettere indicando differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%. I valori riportati rappresentano media ± deviazione standard su tre repliche biologiche.

A	Chl a (pg cell ⁻¹) – fase esponenziale		B	Chl b (pg cell ⁻¹) – fase esponenziale	
	Controllo	AV		Controllo	AV
LL	4.964 ± 0.388 ^a	3.112 ± 0.236 ^b	LL	1.495 ± 0.113 ^a	1.077 ± 0.109 ^b
HL	3.992 ± 0.322 ^c	2.615 ± 0.134 ^b	HL	1.158 ± 0.075 ^b	0.777 ± 0.049 ^c

C	Carotenoidi (pg cell ⁻¹) – fase esponenziale		D	Chl a/Chl b – fase esponenziale	
	Controllo	AV		Controllo	AV
LL	13.035 ± 1.347 ^a	9.223 ± 0.520 ^b	LL	3.320 ± 0.020 ^a	2.899 ± 0.182 ^b
HL	12.642 ± 1.528 ^{ab}	10.205 ± 1.869 ^{ab}	HL	3.447 ± 0.141 ^a	3.369 ± 0.197 ^a

Tabella 14 A, B, C e D. Valori dei pigmenti fotosintetici (media ± deviazione standard) per cellula durante la fase esponenziale di crescita. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita* per singola classe di pigmenti, con confidenza al 95%.

La Fig. 25 e la Tab. 15 riportano i valori di pigmenti per cellula in fase stazionaria delle colture esposte a $100 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

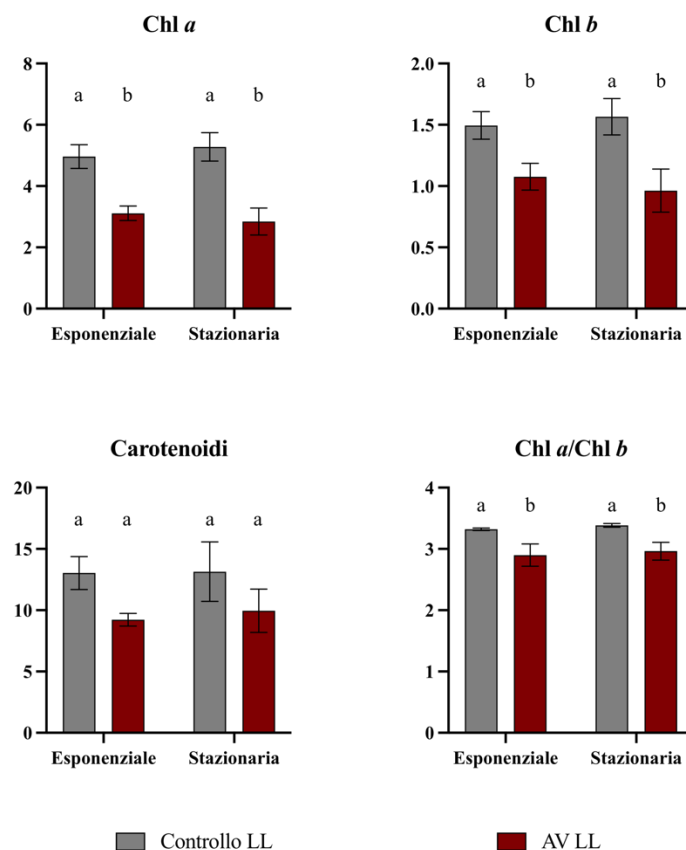


Figura 25. pg per cellula delle diverse classi di pigmenti e rapporto tra clorofilla *a* e clorofilla *b* nella fase stazionaria di crescita. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo t-test tra la condizione di controllo e il trattato con intervallo di confidenza al 95%. I relativi p-value sono riportati in Tab. 15.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

Rispetto al controllo, si riscontrano differenze per la chl *a*, chl *b* e nel rapporto tra le due clorofille, in tutti e tre i casi minore. Invece, il contenuto in carotenoidi è stato paragonabile.

Considerando la variazione tra esponenziale e stazionaria nella coltura esposta ad AV LL, in Fig. 25 si vede che le quantità per cellula non è cambiata in nessuna delle tre classi considerate, nemmeno nel controllo. Le differenze che ci sono state in fase esponenziale si riscontrano anche in fase stazionaria.

Pigmenti fotosintetici per cellula (pg cell⁻¹) – fase stazionaria						
	Controllo		AV LL		t-test	p-value
Chl <i>a</i>	5.279	± 0.462	2.843	± 0.438	*	0.0093
Chl <i>b</i>	1.249	± 0.559	0.963	± 0.175	*	0.0288
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	3.385	± 0.029	2.965	± 0.145	*	0.0079
Carotenoidi	13.149	± 2.426	9.958	± 1.746	NS	0.1391

Tabella 15. Riporta i pg cellula delle varie classi pigmentarie analizzate, espressi come media ± deviazione standard da tre repliche biologiche. Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

3.3.4. Quantificazione delle proteine

Il contenuto in proteine per cellula (Tab. 16.A), durante la fase esponenziale, è risultato maggiore in *D. salina* esposta alle AV diluite e a luce minore rispetto a tutte le altre condizioni di crescita, le quali, invece, non hanno mostrato differenze significative.

Nella fase stazionaria di crescita (Tab. 16.B) si rileva ancora differenza significativa tra la coltura esposta alle AV diluite a luce minore e il suo controllo. Considerando il controllo LL, non si osserva un calo significativo rispetto alla fase esponenziale, come invece avviene per la coltura cresciuta in AV diluite.

A				
Proteine (pg cell ⁻¹) – fase esponenziale				
	Controllo		AV	
LL	123.4 ± 3.3	a	350.0 ± 52.4	b
HL	162.2 ± 98.2	a	166.016 ± 33.9	a

B				
Proteine (pg cell ⁻¹) – fase stazionaria				
	Controllo	AV	t-test	p-value
LL	131.3 ± 35.6	242.9 ± 37.0	*	0.0359

Tabella 16 A e B. Riporta i pg cellula di proteine, espressi come media ± deviazione standard da tre repliche biologiche. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%.

Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

3.3.5. *Composizione macromolecolare*

La composizione in macromolecole misurata attraverso FTIR mostra come, in fase esponenziale, per il rapporto tra carboidrati e proteine, non ci sono state differenze significative tra il controllo LL, il controllo HL e l'alga esposta ad AV LL. L'alga esposta ad AV HL mostra invece un rapporto maggiore, indicando un minor contenuto proteico a parità di carboidrati, o un maggior contenuto in carboidrati a parità di proteine (Tab. 17).

Invece, il rapporto tra lipidi e proteine presenta differenze significative solo tra il controllo LL e l'alga esposta ad AV HL. In quest'ultima condizione il rapporto è risultato inferiore, quindi, a parità di proteine, i lipidi sono diminuiti rispetto al controllo LL.

Nella fase stazionaria, tra controllo LL e nelle AV LL non si osservano differenze significative tra i rapporti.

A		Rapporti FTIR					
		Carboidrati/proteine		Lipidi/proteine		Lipidi/carboidrati	
		Ctr	AV	Ctr	AV	Ctr	AV
Esponenziale	LL	2.106 ± 0.289 ^a	2.182 ± 0.161 ^a	0.259 ± 0.014 ^a	0.236 ± 0.014 ^{ab}	0.124 ± 0.015 ^a	0.108 ± 0.004 ^a
	HL	1.780 ± 0.043 ^a	3.707 ± 0.090 ^b	0.226 ± 0.009 ^{ab}	0.219 ± 0.016 ^b	0.127 ± 0.008 ^a	0.059 ± 0.005 ^b

B		Rapporti FTIR			
		Controllo	AV LL	t-test	p-value
Stazionaria	Carboidrati/ proteine	4.509 ± 1.891	3.128 ± 0.695	NS	0.3009
	Lipidi/ proteine	0.311 ± 0.121	0.260 ± 0.081	NS	0.5806
	Lipidi/ carboidrati	0.071 ± 0.010	0.083 ± 0.010	NS	0.2230

Tabella 17 A e B. Riporta il valore dei rapporti (media ± deviazione standard) dei picchi di assorbimento rilevati all'FTIR delle 3 classi macromolecolari analizzate. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%.

Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

Considerando le abbondanze molecolari in fase esponenziale di crescita (Tab. 18 e Fig. 26. A), risulta un valore comparabile nei controlli, mentre nella crescita in AV diluite, sia a luce minore che maggiore, il contenuto è stato maggiore. Tra le due condizioni il valore non presenta differenze significative. Il contenuto in lipidi espresso in Unità Arbitrarie risulta significativamente maggiore in *D. salina* esposta ad AV diluite LL, mentre le altre tre condizioni di crescita non presentano differenze significative.

Nella fase stazionaria di crescita, invece, non si rilevano differenze significative tra la condizione sperimentale e il controllo, per entrambe le classi molecolari.

A		Abbondanze molecolari (UA cell ⁻¹)					
		Carboidrati			Lipidi		
Fase di crescita		Ctr	AV	Ctr	AV		
Esponenziale	LL	259.5 ± 33.1 ^a	759.9 ± 82.2 ^b	31.9 ± 0.8 ^a	82.6 ± 12.1 ^b		
	HL	298.8 ± 173.4 ^a	617.4 ± 141.5 ^b	38.6 ± 23.9 ^a	36.0 ± 4.7 ^a		

B		Abbondanze molecolari (UA cell ⁻¹)					
Fase di crescita	Classe molecolare	Controllo	AV LL	t-test	p-value		
Stazionaria	Carboidrati	548.5 ± 236.6	758.1 ± 179.9	NS	0.3354		
	Lipidi	40.5 ± 13.6	63.5 ± 21.2	NS	0.2776		

Tabella 18 A e B. Riporta il valore delle UA cell⁻¹ (media ± deviazione standard) di carboidrati e lipidi, determinate moltiplicando il rapporto ottenuto dall'FTIR per le proteine in pg cell⁻¹. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%.

Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

In Tab. 19 sono riportati i valori dei rapporti tra la condizione di esposizione ad AV diluite e il rispettivo controllo del contenuto per cellula di proteine, carboidrati e lipidi, per entrambe le fasi di crescita.

A luce minore, i tre rapporti sono comparabili e indicano un aumento di quasi 3 volte rispetto al controllo. A luce maggiore (HL), invece, solo nel caso dei carboidrati si osserva un aumento di quasi 2 volte, mentre per i lipidi e le proteine il valore del rapporto è stato comparabile, indicando che il valore è stato pressoché identico al controllo HL.

Nella fase stazionaria di crescita, il valore dei rapporti è stato minore rispetto alla fase stazionaria e non risultano differenze significative tra le tre classi

molecolari. Però, si rileva comunque un aumento di circa 1.5 volte rispetto al controllo (Fig. 26. A).

A		Differenza rispetto al controllo		
		Proteine	Carboidrati	Lipidi
Fase di crescita		AV/Controllo	AV/Controllo	AV/Controllo
Esponenziale	LL	2.838 ± 0.425 ^a	2.928 ± 0.317 ^a	2.591 ± 0.380 ^a
	HL	0.987 ± 0.201 ^b	2.066 ± 0.474 ^a	0.932 ± 0.121 ^b

B		Differenza rispetto al controllo	
		Classe molecolare	AV/Controllo
Stazionaria	Proteine		1.850 ± 0.282 ^a
	Carboidrati		1.382 ± 0.328 ^a
	Lipidi		1.568 ± 0.524 ^a

Tabella 19 A e B. Riporta il valore del rapporto tra le UA cell⁻¹ delle colture cresciute in AV diluite nelle due condizioni di intensità luminosa, sul valore del rispettivo controllo. La tabella B riporta i valori della fase stazionaria a luce minore. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *classe molecolare*, con confidenza al 95%.

Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

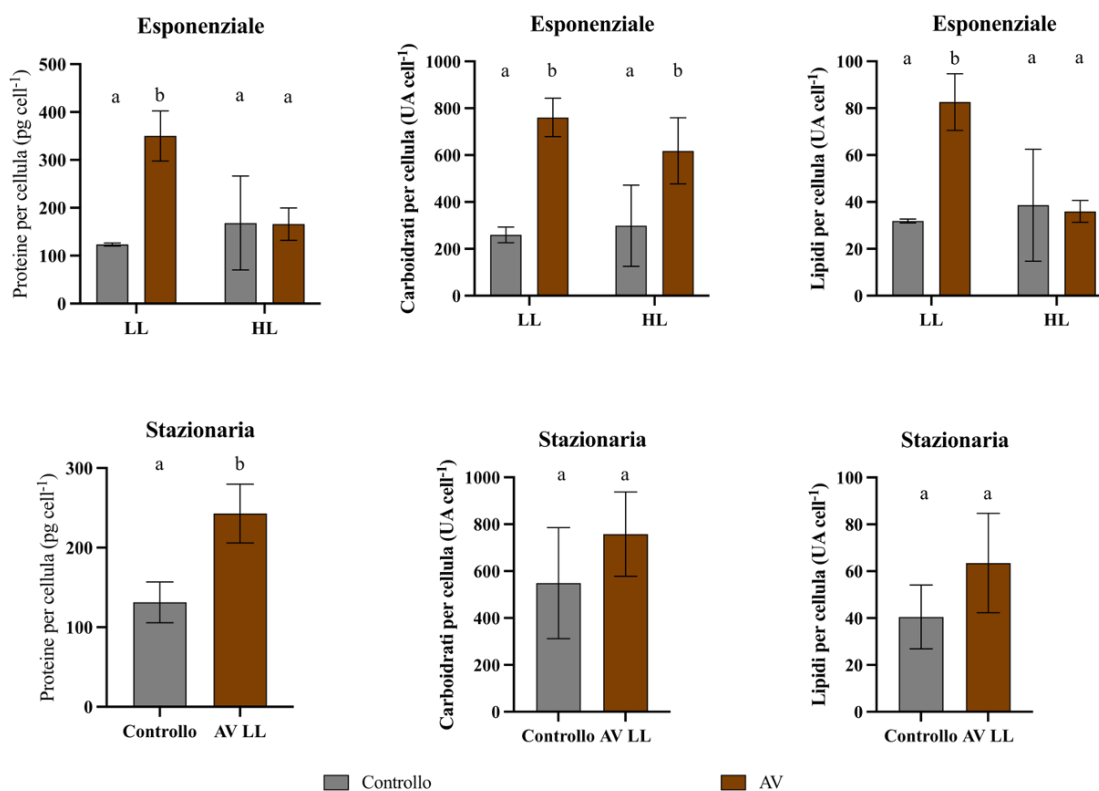


Figura 26. A. pg cell⁻¹ di proteine e UA cell⁻¹ di carboidrati e lipidi nella fase esponenziale e stazionaria di crescita. Nei tre grafici superiori diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%.

Nei tre grafici inferiori, invece, diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo t-test tra controllo e condizione sperimentale con un intervallo di confidenza al 95%. I relativi p-value sono riportati in Tabella 16 e 18.

I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

In Fig. 26. B si vede la variazione nei valori delle classi molecolari, rispetto al controllo, tra fase esponenziale e stazionaria. Si riscontra una differenza significativa nel rapporto in fase stazionaria di carboidrati e lipidi, minore rispetto a quanto riscontrato in fase esponenziale. Quindi, c'è stata una riduzione nella differenza in contenuto tra controllo e trattato al procedere della crescita cellulare.

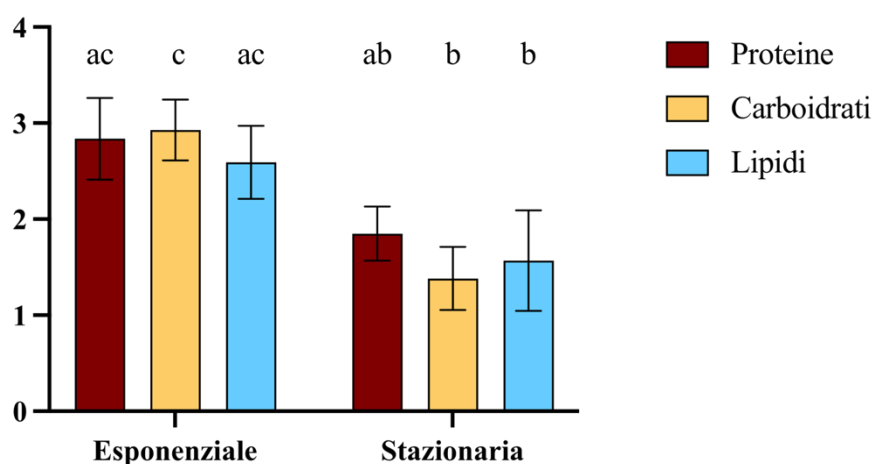


Figura 26. B. Riporta il rapporto tra il valore delle classi molecolari considerate della condizione AV LL e Controllo LL in fase esponenziale e stazionaria. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *classe molecolare* e *fase di crescita*, con confidenza al 95%. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

3.3.6. Indice di riduzione

L'indice di riduzione mostra una differenza significativa, nella fase esponenziale, tra controllo LL e in *D. salina* esposta ad AV diluite LL. In particolare, l'indice di riduzione del controllo LL è risultato maggiore, indicando un grado di insaturazione più alto nella biomassa algale esposta ad AV LL, quindi più ossidata. L'alga esposta ad AV HL mostra invece un indice di riduzione maggiore rispetto ad AV LL, indicando una biomassa più satura, quindi ridotta. Rispetto ai due controlli, però non presenta differenze significative (Fig. 27). In Tab. 20. B è riportato anche il valore del rapporto tra l'alga esposta alle AV diluite nelle due condizioni di intensità luminosa e il rispettivo controllo. Nonostante tra i valori assoluti c'è differenza significativa, quando vengono rapportati al rispettivo controllo, le due condizioni di illuminazione non presentano una differenza significativa. Nella fase stazionaria, l'indice di riduzione del controllo e della condizione sperimentale

(AV LL) sono diversi significativamente, ma la differenza tra i valori (RI_N) è minore rispetto alla fase esponenziale.

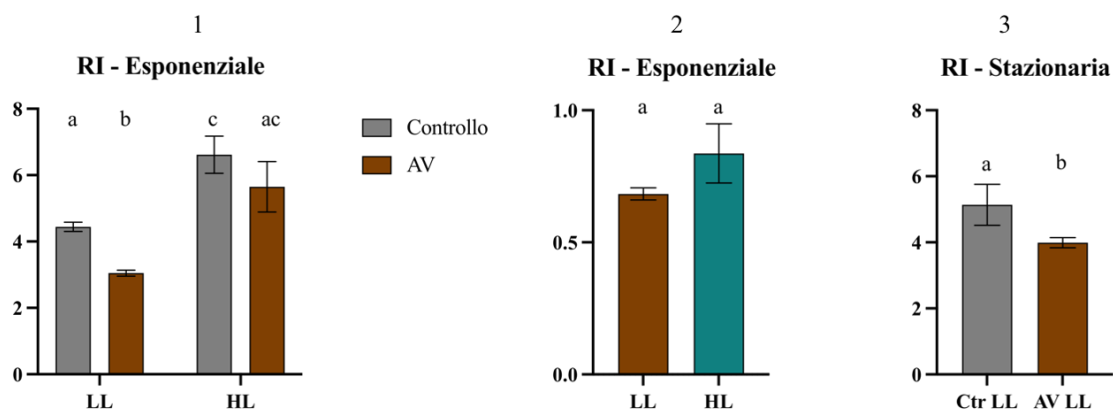


Figura 27. (1) Valori dell'indice di riduzione (media \pm deviazione standard) nella fase esponenziale di crescita. (2) Riporta i valori (media \pm deviazione standard) del rapporto tra l'indice della condizione sperimentale e il rispettivo controllo. (3) Riporta i valori (media \pm deviazione standard) dell'indice di riduzione nella fase stazionaria della crescita a bassa luce (LL).

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo (1) analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita* con confidenza al 95%; (2,3) t-test con un intervallo di confidenza al 95%. I relativi p-value sono riportati in Tab. 20.

A					
Indice di riduzione RI – fase esponenziale					
	Ctr		AV		
LL	4.442	\pm 0.142	a	3.041	\pm 0.088 b
HL	6.733	\pm 0.748	c	5.642	\pm 0.762 ac

B				
Differenza rispetto al controllo RI – fase esponenziale				
	AV/Controllo	t-test	p-value	
LL	0.68	\pm 0.02	NS	0.0816
HL	0.84	\pm 0.11		

C						
Indice di riduzione RI – fase stazionaria						
	Controllo	AV LL	t-test	p-value	RI_N	
Stazionaria	5.138	\pm 0.621				
		3.991	\pm 0.152	*	0.0360	0.78 \pm 0.03

Tabella 20 A, B e C. (A) Riporta il valore degli indici di riduzione (media \pm deviazione standard) nella fase esponenziale di crescita. (B) Riporta il valore del rapporto (media \pm deviazione standard) tra l'indice di riduzione della condizione sperimentale e quello della

rispettiva condizione di controllo. (C) Riporta il valore dell'indice di riduzione (media \pm deviazione standard) nella fase stazionaria di crescita per la condizione LL.

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a due vie (*two-way ANOVA*) per i parametri *luce* e *mezzo di crescita*, con confidenza al 95%.

Il t-test è stato eseguito confrontando la condizione sperimentale con il relativo controllo con un intervallo di confidenza al 95%. L'asterisco indica differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05), NS indica che non c'è differenza significativa (p-value > 0.05).

3.4. Valutazione degli effetti tossici dei composti fenolici e delle AV diluite su cellule non acclimatate

3.4.1. Saggio del DPPH

La Fig. 28 riporta i risultati ottenuti per il saggio del DPPH eseguito su biomassa algale di cellule non acclimatate ai composti fenolici (singolarmente e in miscela) e alle AV diluite a 2 giorni e 7 giorni dall'esposizione. Al 2° giorno, l'unica condizione che presenta valori significativamente diversi dalla condizione di controllo è stata la biomassa derivante dalle AV diluite HL. Invece, tutte le altre condizioni di crescita non inducono differenze significative nella percentuale di inibizione (PI) del DPPH rispetto al controllo.

Al 7° giorno, invece, la biomassa derivante da cellule esposte ad acido *p*-cumarico, acido caffeico e nel Mix, presenta valori significativamente inferiori rispetto al controllo. La biomassa derivante da cellule esposte a tirosolo e alle AV diluite HL non presenta invece differenze significative rispetto al controllo.

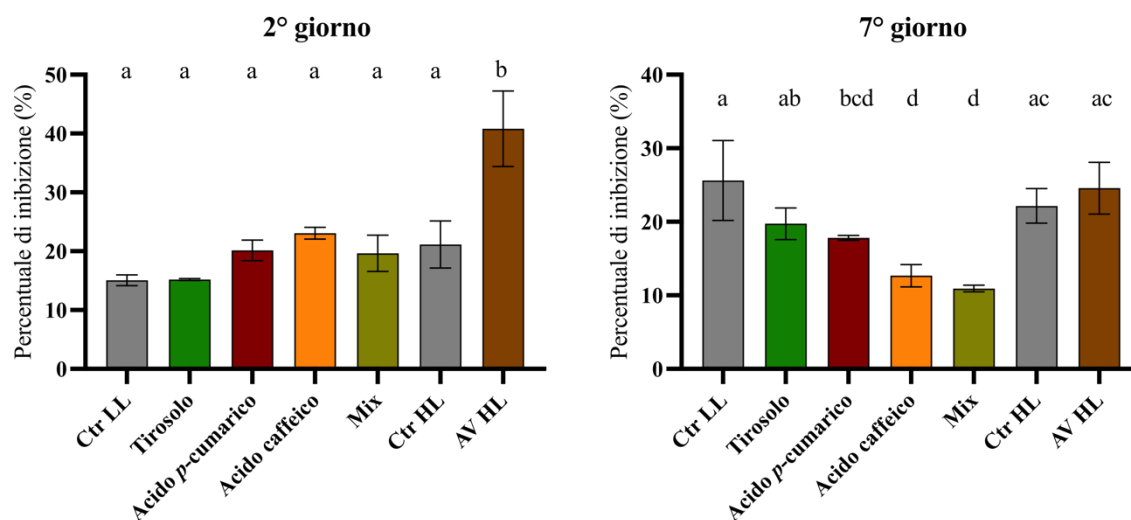


Figura 28. Percentuale di inibizione del DPPH da parte della biomassa microalgale al 2° e 7° giorno di crescita. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa rilevata dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*), con confidenza del 95%.

La Fig. 29 riporta il confronto dei valori della percentuale di inibizione della biomassa tra i due giorni di analisi per condizione di crescita. Nelle due condizioni di controllo non viene rilevata differenza significativa tra 2° e 7° giorno nella percentuale di inibizione della biomassa, situazione analoga per la coltura algale esposta all'acido *p*-cumarico. La biomassa algale esposta al tirosolo presenta invece un significativo aumento della PI tra 2° e 7° giorno. Nelle restanti condizioni di crescita (acido caffeico, Mix e AV diluite HL) si osserva invece una significativa diminuzione della percentuale di inibizione del DPPH al 7° giorno rispetto al 2°. La significatività dei test eseguiti è riportata in Tab. 21.

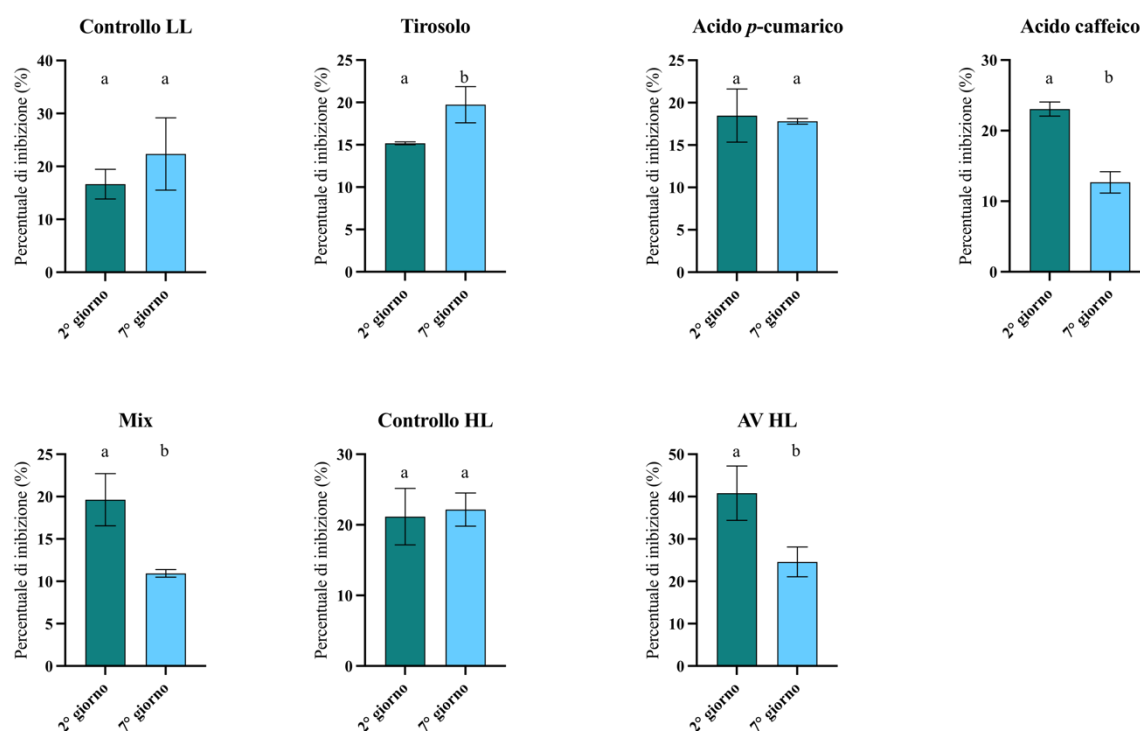


Figura 29. Confronto della percentuale di inibizione del DPPH della biomassa microalgale tra 2° e 7° giorno delle diverse condizioni di crescita. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) rilevata dopo t-test tra il valore del 2° e del 7° giorno di esposizione, con confidenza al 95%. I relativi p -value sono riportati in Tab. 21.

t-test – DPPH della biomassa microalgale	
Condizione	p-value
Controllo LL	0.2525
Tirosole	0.0212
Acido <i>p</i> -cumarico	0.7330
Acido caffeico	0.0006
Mix	0.0134
Controllo HL	0.7381
AV HL	0.0183

Tabella 21. p -value risultati da t-test relativi alla Fig. 29.

Considerando invece la percentuale di inibizione indotta dal mezzo di crescita in cui sono presenti le microalghe (Fig. 30), risulta che, al 2° giorno, le AV diluite HL presentano un'elevata capacità di inibire il DPPH, mentre i composti fenolici singoli e in miscela presentano percentuali di inibizione comparabili tra di loro e significativamente inferiori rispetto alle AV diluite HL.

Al 7° giorno le AV diluite HL presentano ancora un'elevata percentuale di inibizione e significativamente maggiore rispetto ai composti fenolici, che anche in questo caso non presentano differenze significative tra di loro.

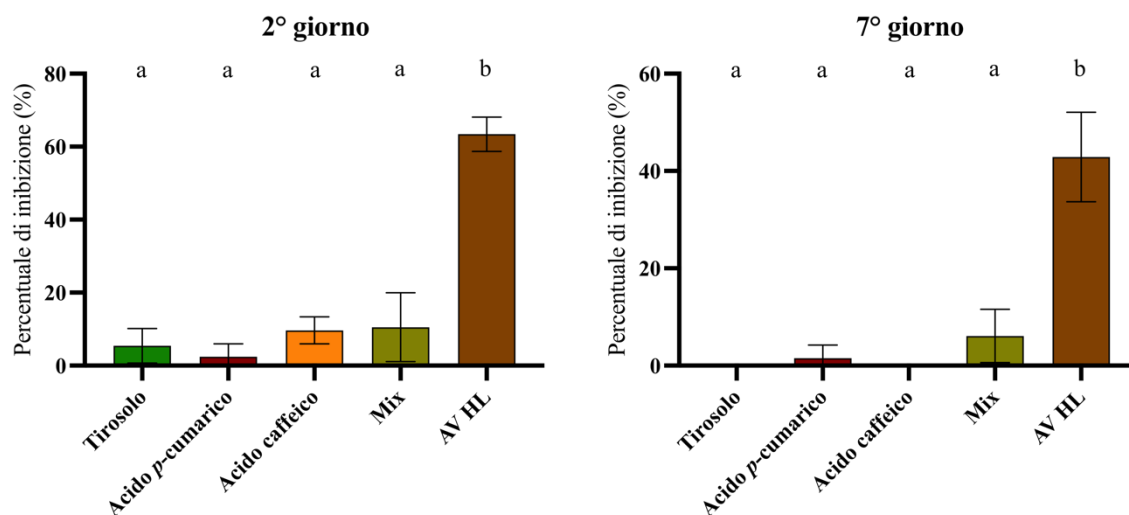


Figura 30. Percentuale di inibizione del DPPH da parete del mezzo di crescita al 2° e 7° giorno. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa rilevata dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*), con confidenza del 95%.

Considerando la variazione della percentuale di inibizione tra 2° e 7° giorno nelle diverse condizioni (Fig. 31), solo le AV diluite HL e l'acido caffeico presentano una differenza significativa tra 2° e 7° giorno, in particolare la percentuale di inibizione al 7° giorno è inferiore a quella del 2° giorno. La Tab. 22 riporta la significatività dei test eseguiti.

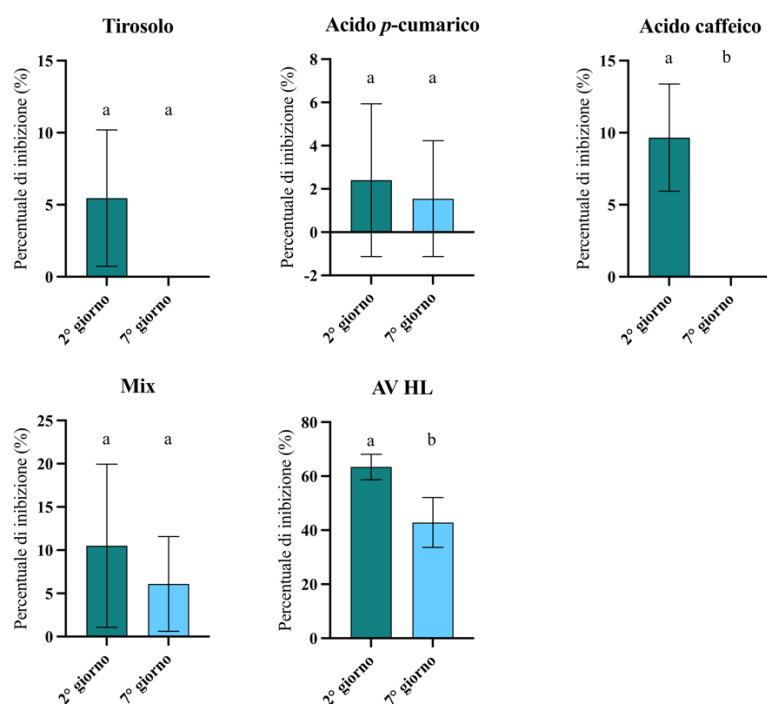


Figura 31. Confronto della percentuale di inibizione del DPPH del mezzo di crescita tra 2° e 7° giorno delle diverse condizioni di crescita. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche.

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) rilevata dopo t-test tra il valore del 2° e del 7° giorno di esposizione, con confidenza al 95%. I relativi p -value sono riportati in Tab. 22.

t-test – DPPH del mezzo di crescita	
Condizione	p-value
Tirosolo	0.1164
Acido <i>p</i> -cumarico	0.7551
Acido caffeico	0.0108
Mix	0.5222
AV HL	0.0262

Tabella 22. p -value risultati da t-test relativi alla Fig. 31.

In Fig. 32 è illustrata la variazione della percentuale di inibizione del mezzo di crescita contenente i composti fenolici (singolarmente e in miscela) e delle AV

diluite dal momento dell'aggiunta dei composti fino a 1 giorno dopo, senza inoculo algale. Al momento dell'aggiunta dei composti, le AV presentano una percentuale significativamente maggiore rispetto agli altri composti, differenza che si mantiene anche a 1 h e 24 h dall'aggiunta al mezzo di crescita.

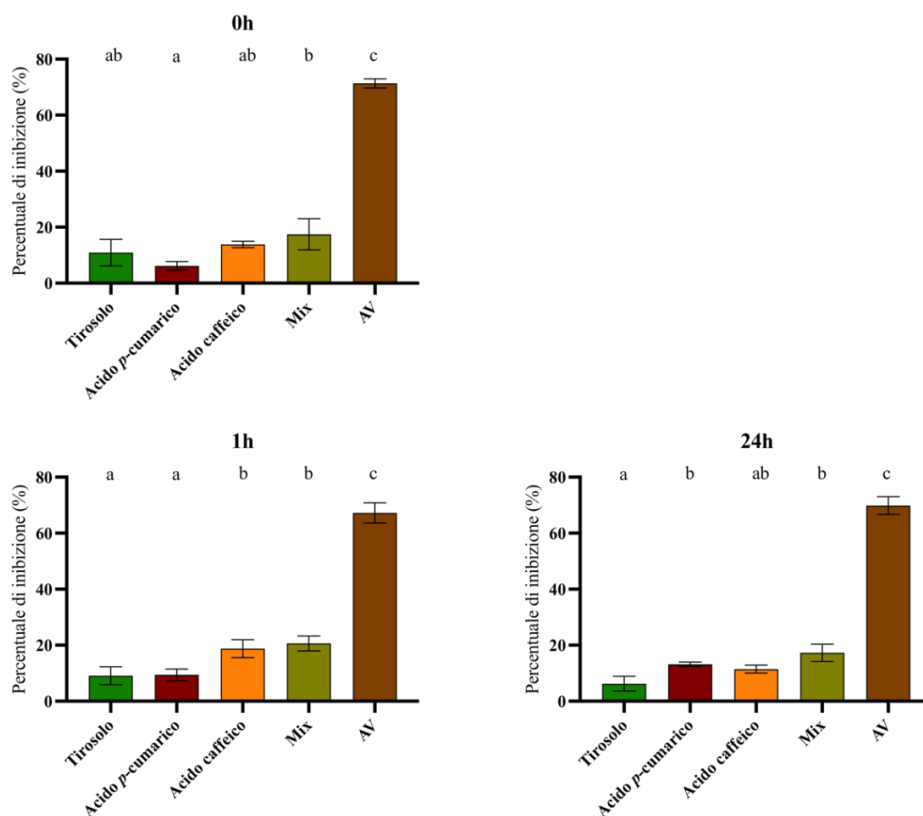


Figura 32. Percentuale di inibizione del DPPH da parte del mezzo di crescita senza inoculo algale a 0h, 1h e 24h dall'aggiunta dei composti fenolici e delle AV. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa rilevata dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*), con confidenza del 95%.

Considerando i composti fenolici singoli e il Mix, al momento dell'aggiunta nel mezzo di crescita, risultano tutti comparabili tra di loro, tranne che nel caso dell'acido *p*-cumarico che presenta una differenza significativa con la miscela di composti fenolici.

Dopo 1 h dall'aggiunta, tirosolo e acido *p*-cumarico hanno valori di PI comparabili tra di loro, ma significativamente diversi dall'acido caffeico e dal Mix, comparabili a loro volta. Dopo 24 h dall'aggiunta, invece, le percentuali di inibizione dei composti fenolici e della miscela non presentano differenze significative, tranne il tirosolo che presenta una percentuale di inibizione significativamente diversa dalla PI del Mix.

Valutando la variazione del valore di PI nel corso delle 24 h per singolo composto (Fig. 33), non si osservano differenze statisticamente significative nei tre punti considerati per il mezzo di crescita contenente tirosolo, acido caffeico, la miscela di composti fenolici e nelle AV. Nel caso dell'acido *p*-cumarico si osserva una differenza significativa tra 0h e 24h, in particolare si osserva un aumento della PI.

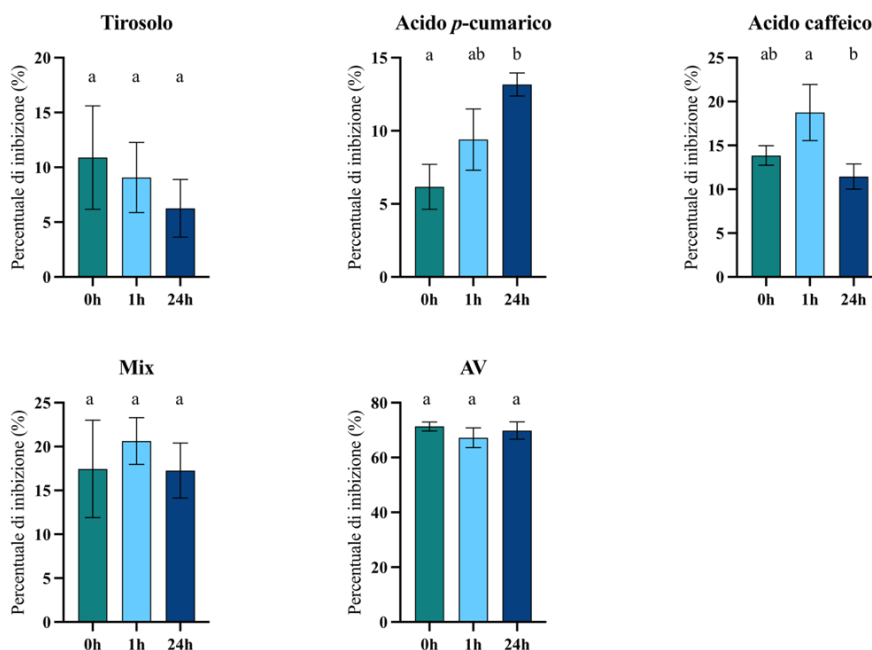


Figura 33. Confronto della percentuale di inibizione del DPPH da parte del mezzo di crescita senza inoculo algale a 0h, 1h e 24h ore dall'aggiunta dei composti fenolici e delle AV. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su tre repliche biologiche. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa rilevata dopo ANOVA a una via (*one-way ANOVA*), con confidenza al 95%.

3.4.2. Comet assay

In Fig. 34 e 35 sono riportati i risultati ottenuti dal comet assay a 1 giorno e 8 giorni di esposizione ai composti fenolici (singolarmente e in miscela) e alle AV diluite HL, rispettivamente. Sono stati considerati i parametri di *tail length* (TL), *tail intensity* (TI), *tail moment* (TM), *tail migration* (Tmig).

Considerando la TL, le alghe esposte al tirosolo, all'acido caffeico e alle AV diluite HL differiscono significativamente dal controllo negativo e dalla coltura esposta alla miscela di composti fenolici. Le alghe coltivate in presenza di acido *p*-cumarico e nel controllo HL non hanno mostrato differenze significative con nessuna delle altre condizioni analizzate.

Per quanto riguarda la TI, anche in questo caso il tirosolo ha mostrato una differenza significativa rispetto al controllo negativo e al Mix di composti fenolici. Invece, l'acido *p*-cumarico, l'acido caffeico e il controllo HL non hanno differenze significative con il controllo negativo e il tirosolo. Le alghe esposte alle AV diluite HL hanno un valore di TI statisticamente diverso da tutte le altre condizioni eccetto per il tirosolo, con il quale non c'è stata differenza significativa.

Simili risultati si ottengono per la TM, tranne per il fatto che la condizione con tirosolo e AV diluite HL, in questo caso, sono state statisticamente diverse.

Nel caso della Tmig, le alghe esposte al tirosolo hanno mostrato un valore statisticamente diverso dal controllo negativo e dalla miscela di composti fenolici, mentre tutte le altre condizioni analizzate (acido *p*-cumarico, acido caffeico, controllo HL e AV diluite HL) non sono risultate statisticamente diverse dalle altre condizioni.

Dopo 8 giorni (Fig. 35), invece, non si osservano differenze tra le condizioni di crescita per i parametri TL e Tmig. La TI delle alghe esposte alle AV diluite HL ha mostrato nuovamente una differenza significativa con tutte le altre

condizioni di crescita, tranne che rispetto al controllo HL, il quale, però, non presenta differenze con gli altri casi sperimentali. I singoli composti fenolici e il Mix non mostrano alcuna differenza significativa tra di loro e con il controllo negativo. La stessa situazione della TI si ripete con il TM.

La Fig. 36 riporta la variazione tra il 1° (24h) e l'8° (192h) giorno nella TL per condizione di crescita. In tutte le condizioni si è osservata una significativa diminuzione nella *tail length* tra 24h e 192h di esposizione. I relativi p-value sono riportati in Tab. 23.

Allo stesso modo, in tutte le condizioni, tranne che per l'acido caffeico, c'è stata una diminuzione significativa tra 1° (24h) e 8° (192h) dall'esposizione, sia nei trattati che nei controlli per il parametro TI (Fig. 37). In Tab. 24 sono riportati i p-value dei relativi t-test.

Anche la variazione tra il 1° e l'8° giorno nella TM per condizione di crescita, come illustrato in Fig. 38, mostra una diminuzione significativa per tutte le condizioni all'8° giorno. La Tab. 25 mostra i p-value dei t-test eseguiti.

Considerando invece la Tmig (Fig. 39), si osserva che nel controllo negativo non c'è stata una differenza significativa tra 24h e 192h dall'esposizione. In tutte le altre condizioni c'è una diminuzione significativa della *tail migration*. In Tab. 26 sono illustrati i p-value dei test statistici eseguiti.

24h (1 giorno)

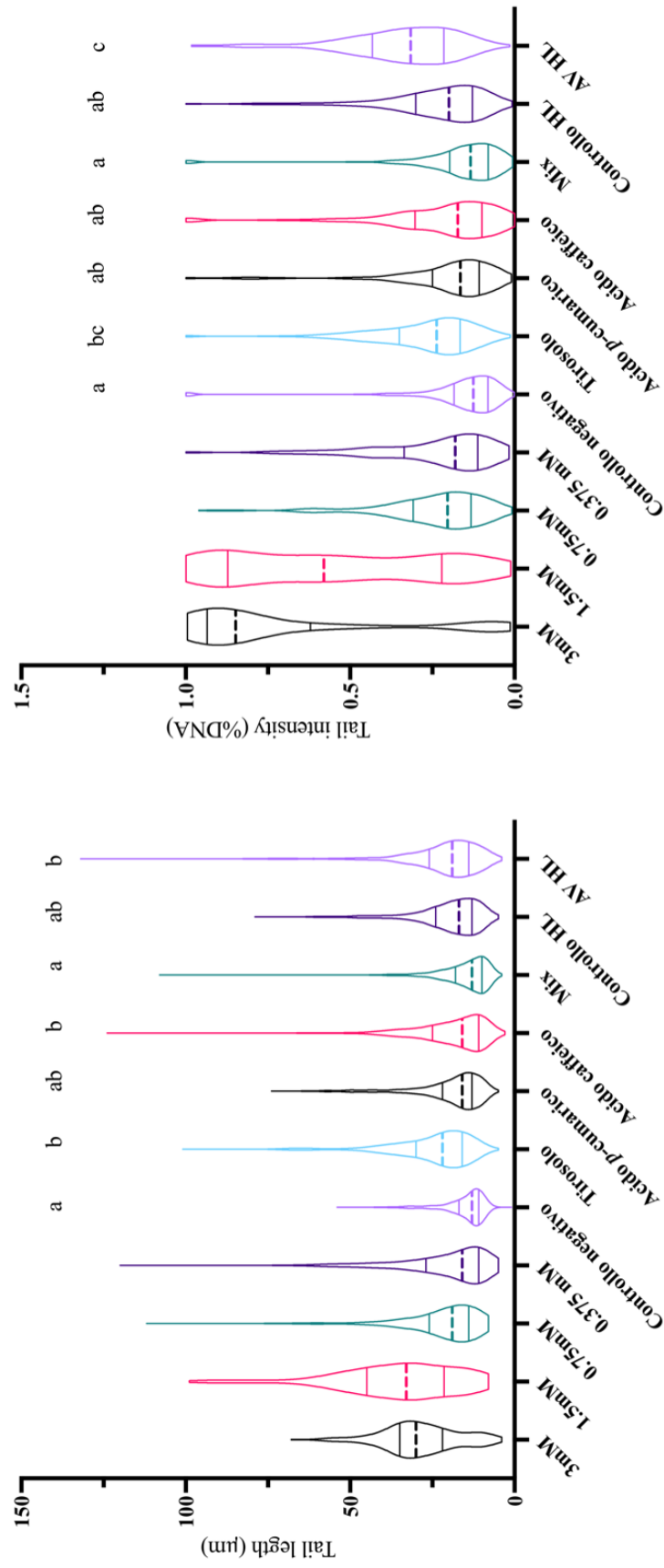


Figura 34.A. Valori di *Tail length* e *Tail intensity* derivati dal Comet assay eseguito a 1 giorno dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I diagrammi a violino rappresentano la distribuzione delle comete analizzate. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) considerando, per ogni condizione, le mediane di ogni replica strumentale eseguita, per un totale di 6 valori per condizione (2 repliche strumentali per replica biologica).

24h (1 giorno)

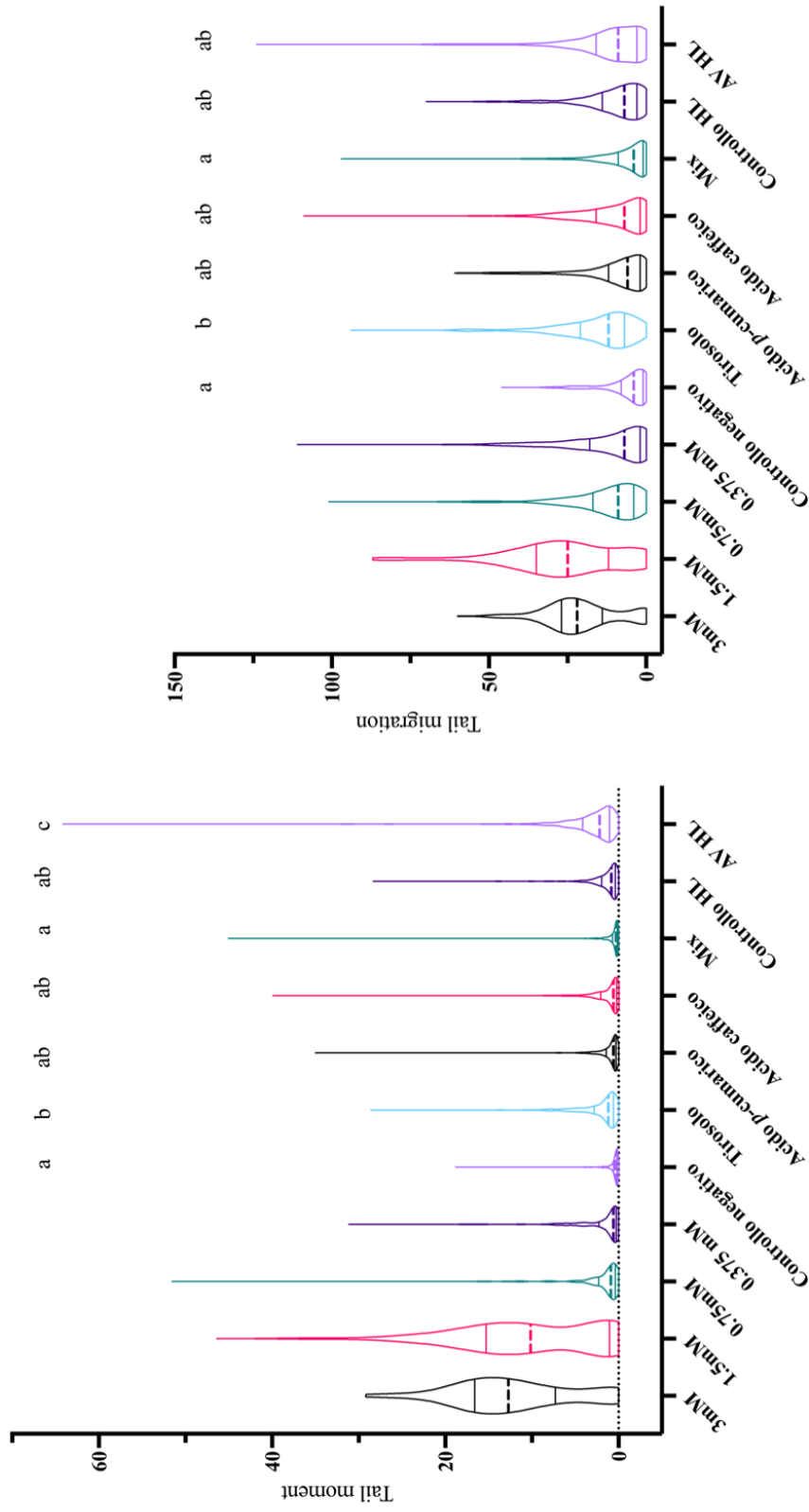


Figura 34. B. Valori di *Tail moment* e *Tail migration* derivati dal Comet assay eseguito a 1 giorno dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I diagrammi a violino rappresentano la distribuzione delle comete analizzate. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) considerando, per ogni condizione, le mediane di ogni replica strumentale eseguita, per un totale di 6 valori per condizione (2 repliche strumentali per replica biologica).

192h (8 giorni)

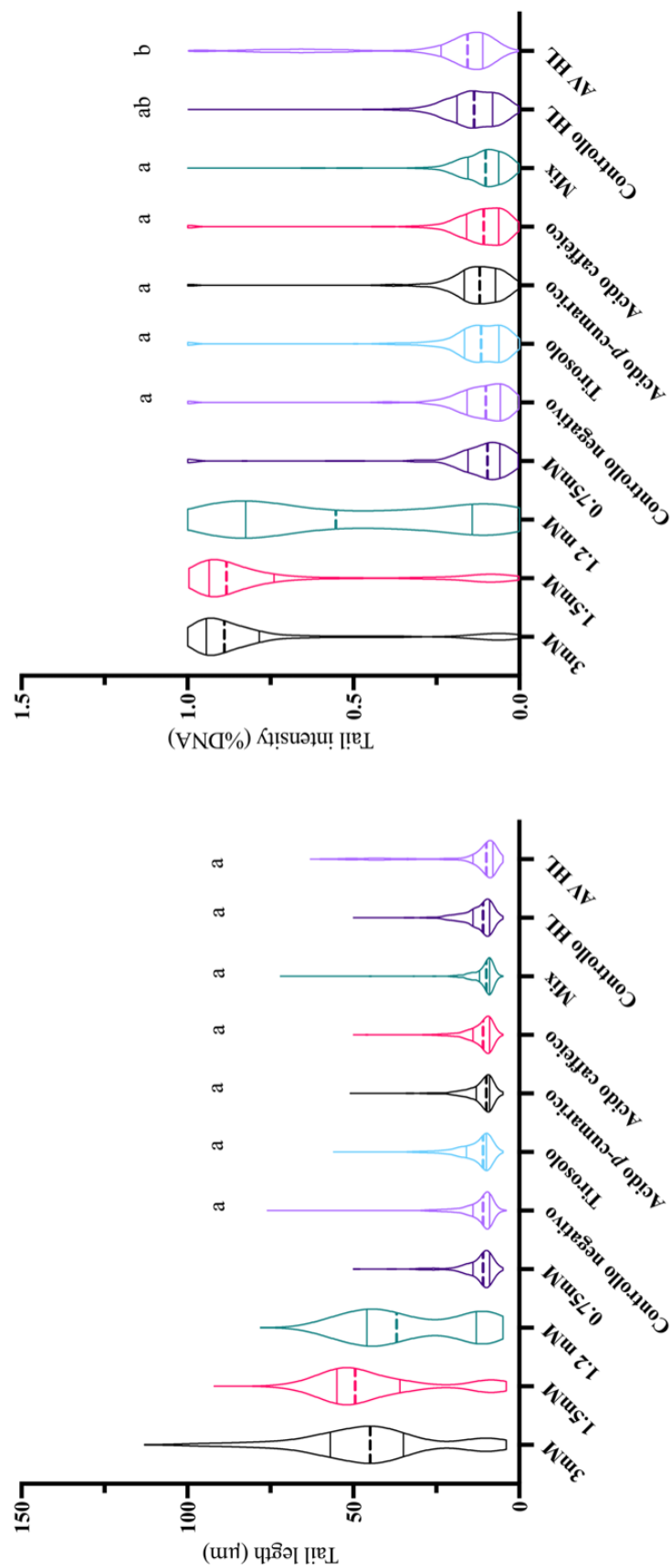


Figura 35. A. Valori di *Tail lenght* e *Tail intensity* derivati dal Comet assay eseguito a 8 giorni dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I diagrammi a violino rappresentano la distribuzione delle comete analizzate. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) considerando, per ogni condizione, le mediane di ogni replica strumentale eseguita, per un totale di 6 valori per condizione (2 repliche strumentali per replica biologica).

192h (8 giorni)

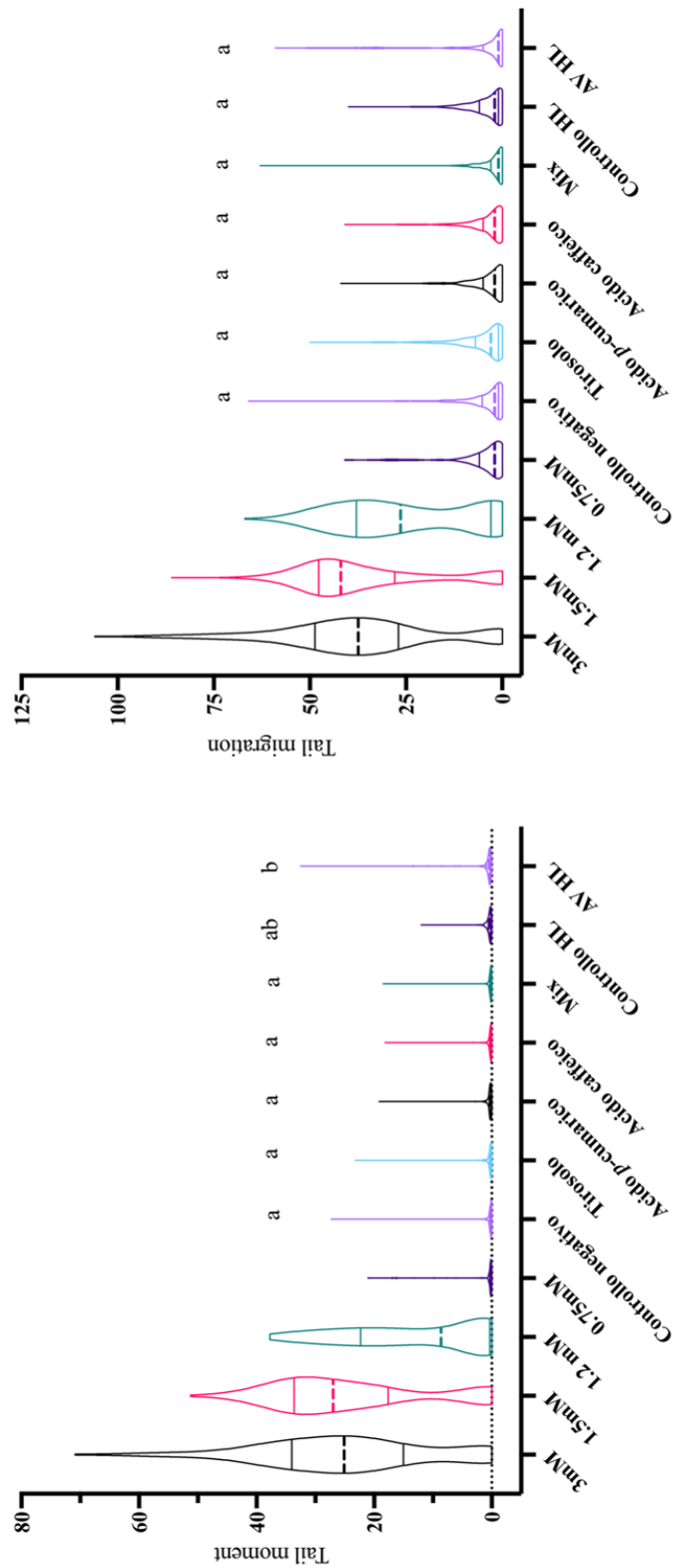


Figura 35. B. Valori di *Tail moment* e *Tail migration* derivati dal Comet assay eseguito a 8 giorni dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I diagrammi a violino rappresentano la distribuzione delle comete analizzate. Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa dopo analisi dell'ANOVA a una via (*one-way ANOVA*) considerando, per ogni condizione, le mediane di ogni replica strumentale eseguita, per un totale di 6 valori per condizione (2 repliche strumentali per replica biologica). Un ingrandimento del grafico del *tail moment* è riportato in Fig. 35. C.

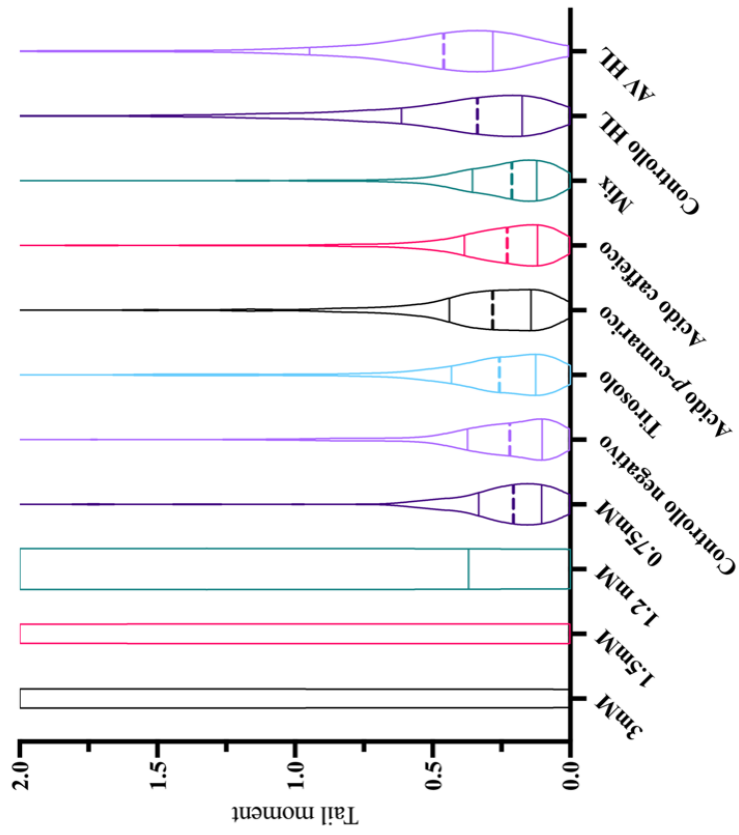


Figura 35. C. Ingrandimento della *Tail moment* della figura 35. B per poter discriminare i campioni meno danneggiati.

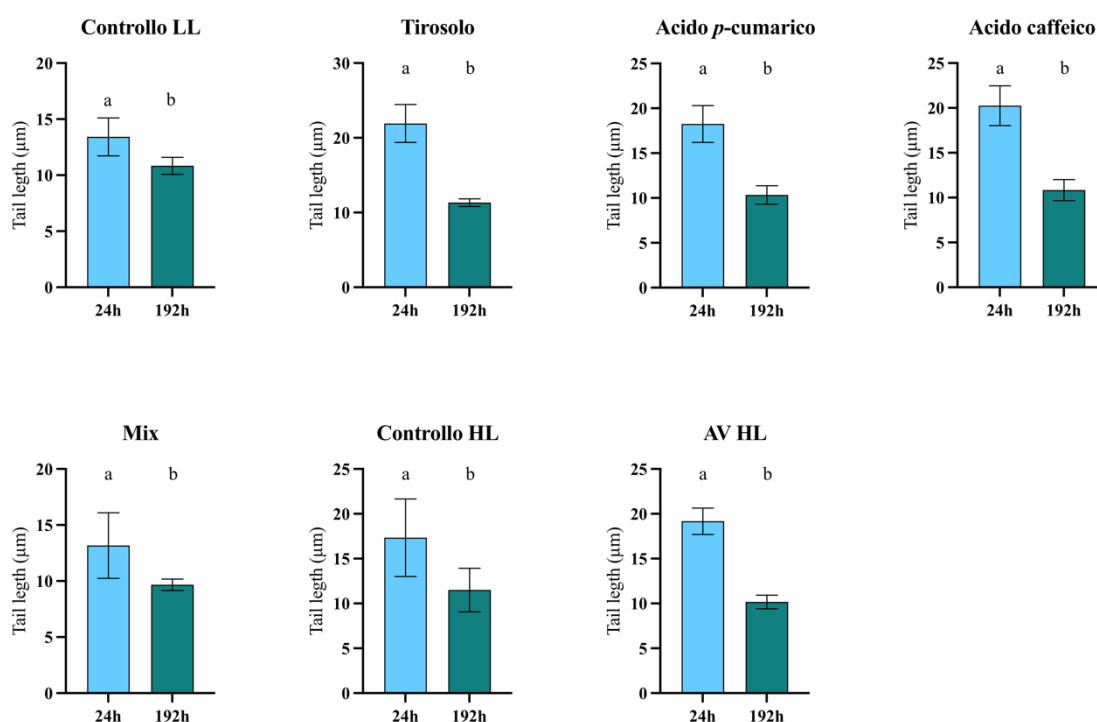


Figura 36. Confronto della variazione nel valore di *tail length* tra 24h e 192h dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su 6 valori (due repliche strumentali per replica biologica per condizione). Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) rilevata dopo t-test tra il valore a 24h e 192h dall'esposizione, con confidenza al 95%. I relativi p -value sono riportati in Tab. 23.

t-test – tail length	
Condizione	p-value
Controllo LL	0.0065
Tirosolo	<0.0001
Acido <i>p</i> -cumarico	<0.0001
Acido caffeico	<0.0001
Mix	0.0163
Controllo HL	0.0163
AV HL	<0.0001

Tabella 23. p -value risultati da t-test relativi alla Fig. 36.

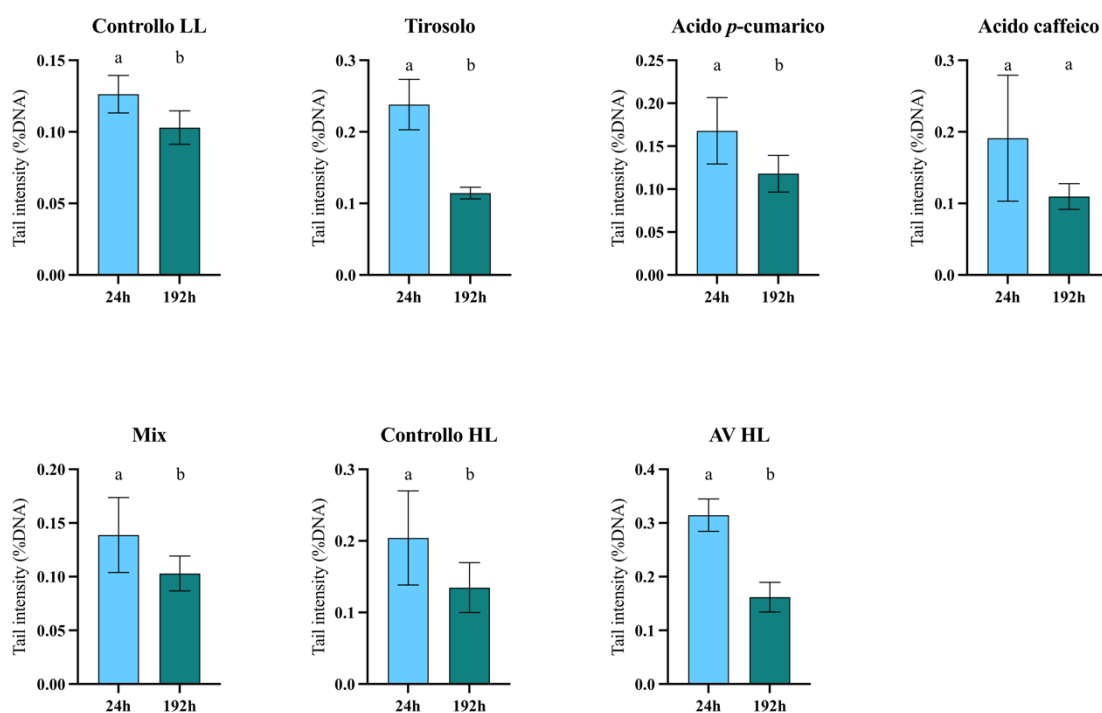


Figura 37. Confronto della variazione nel valore di *tail intensity* tra 24h e 192h dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su 6 valori (due repliche strumentali per replica biologica per condizione).

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) rilevata dopo t-test tra il valore a 24h e 192h dall'esposizione, con confidenza al 95%. I relativi p -value sono riportati in Tab. 24.

t-test – <i>tail intensity</i>	
Condizione	p-value
Controllo LL	0.0087
Tirosolo	<0.0001
Acido <i>p</i> -cumarico	0.0200
Acido caffeico	0.0504
Mix	0.0460
Controllo HL	0.0451
AV HL	<0.0001

Tabella 24. p -value risultati da t-test relativi alla Fig. 37.

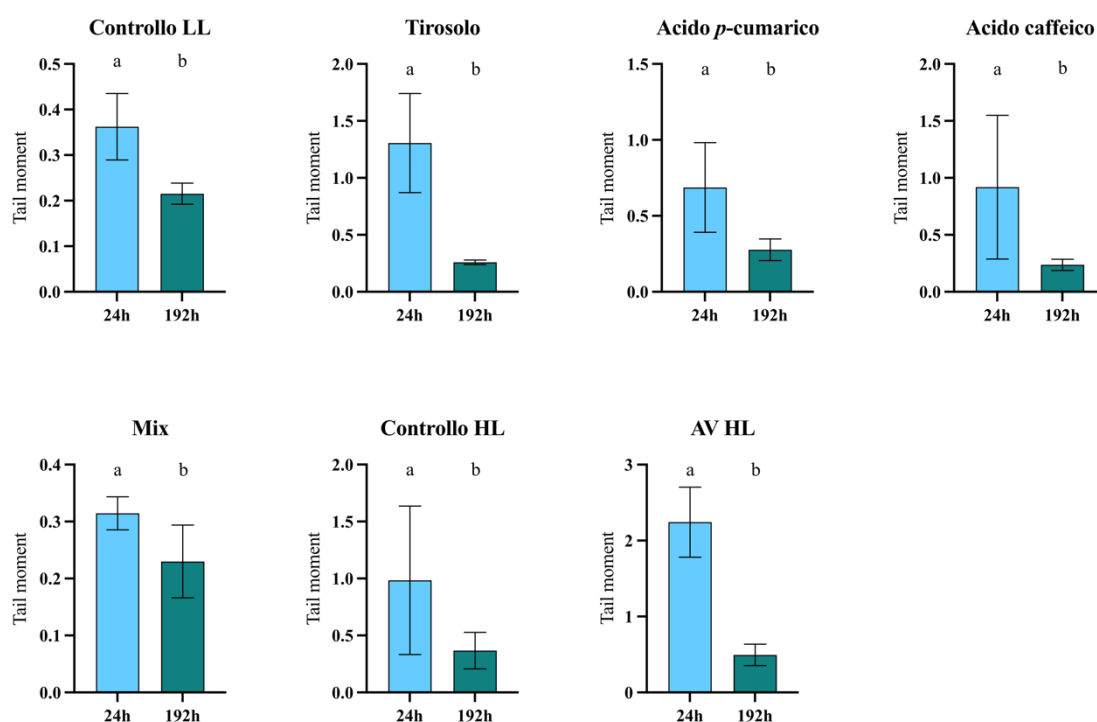


Figura 38. Confronto della variazione nel valore di *tail moment* tra 24h e 192h dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su 6 valori (due repliche strumentali per replica biologica per condizione).

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) rilevata dopo t-test tra il valore a 24h e 192h dall'esposizione, con confidenza al 95%. I relativi p -value sono riportati in Tab. 25.

t-test – tail moment	
Condizione	p-value
Controllo LL	0.0008
Tirosolo	0.0002
Acido <i>p</i> -cumarico	0.0080
Acido caffeico	0.0250
Mix	0.0239
Controllo HL	0.0481
AV HL	<0.0001

Tabella 25. p -value risultati da t-test relativi alla Fig. 38.

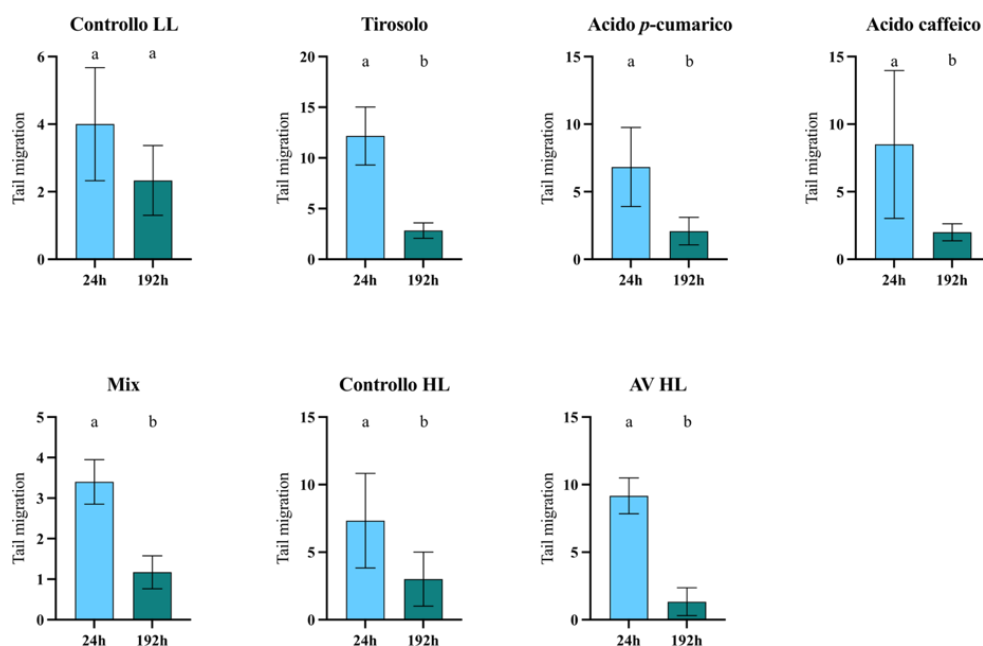


Figura 39. Confronto della variazione nel valore di *tail migration* tra 24h e 192h dall'esposizione ai composti fenolici e alle AV. I valori riportati rappresentano media \pm deviazione standard su 6 valori (due repliche strumentali per replica biologica per condizione).

Diverse lettere indicano differenza statisticamente significativa (p -value < 0.05) rilevata dopo t-test tra il valore a 24h e 192h dall'esposizione, con confidenza al 95%. I relativi p -value sono riportati in Tab. 26.

t-test – <i>tail migration</i>	
Condizione	p-value
Controllo LL	0.0646
Tirolo	<0.0001
Acido <i>p</i> -cumarico	0.0038
Acido caffeico	0.0160
Mix	<0.0001
Controllo HL	0.0251
AV HL	<0.0001

Tabella 26. p -value risultati da t-test relativi alla Fig. 39.

Capitolo quarto

DISCUSSIONI

4.1. Tossicità dei singoli composti fenolici sulle microalghe

I composti fenolici sono noti per le loro capacità antiossidanti (Safafar et al., 2015), ma possono comportarsi anche da pro-ossidanti, caratteristica che dipende soprattutto dalla concentrazione, dall'ambiente di reazione, dall'organismo su cui agiscono e dai sostituenti legati all'anello benzenico (Suriyarti & Al-Zuhair, 2018).

Infatti, è stato possibile osservare una variabilità nella risposta algale ai diversi composti fenolici. Il tirosolo, composto fenolico con una catena alcolica in posizione *para*, non causa effetti negativi sulla crescita di tutte le specie analizzate, benché sia il composto a maggior concentrazione testato.

L'acido *p*-cumarico, invece, presenta una catena carboniosa terminante con un gruppo carbossilico (da cui il nome acido) in posizione *para* e la sua presenza nel mezzo di crescita porta alla morte di 4 su 6 specie microalgali.

L'acido caffeico, oltre a una catena carboniosa terminante con un gruppo carbossilico in posizione *para* come l'acido *p*-cumarico, presenta anche un gruppo alcolico in posizione *orto*, ed è risultato il composto fenolico con la tossicità maggiore nei confronti delle alghe utilizzate, inibendo la crescita di tutte le specie tranne quella di *D. salina*.

Queste differenze strutturali possono essere state la causa della diversa tossicità, come si osserva in questa tesi, ma non solo. Cho e coautori (2016) affermano che la tossicità dei composti fenolici dipende da molti fattori, come la presenza o assenza di una parete cellulare (*D. salina* è l'unica specie utilizzata nel disegno sperimentale che ne è priva), il rapporto

superficie/volume delle cellule e la capacità della microalga di rispondere agli stress ossidativi.

Anche studi precedenti (Lovell et al., 2002) riportano una variabilità nella risposta ai composti fenolici. Lovell e coautori (2002) hanno esposto la diatomea marina *Thalassiosira* sp. a tre composti fenolici (fenolo, acido benzoico e catecolo) a concentrazione variabile. In presenza di catecolo (fenolo con un gruppo ossidrilico in posizione *orto*) non si osserva nessuna crescita, quando esposta all'acido benzoico (gruppo fenolico caratterizzato da un gruppo carbossilico al posto del gruppo ossidrilico) non si osserva nessuna inibizione, mentre in presenza di fenolo si osserva crescita solo quando la concentrazione è bassa (0.3 mM; 31.37 mg L⁻¹), con un tasso di crescita pari al 40 % del tasso nel controllo.

Le concentrazioni da noi utilizzate sono: 0.3 mM (42.12 mg L⁻¹) di tirosolo, 0.14 mM (23.42 mg L⁻¹) di acido *p*-cumarico e 0.16 mM (28.08 mg L⁻¹) di acido caffeico. Quindi, il tirosolo, che è il composto testato a maggiore concentrazione e caratterizzato da un gruppo ossidrilico come il catecolo, non induce inibizione della crescita, mentre l'acido *p*-cumarico e l'acido caffeico (caratterizzati da un gruppo carbossilico come l'acido benzoico) inibiscono fortemente la proliferazione algale.

La variabilità riscontrata nella risposta delle diverse specie ai vari composti suggerisce che la loro tossicità dipenda dai sostituenti dell'anello benzenico, mentre la concentrazione sembra avere un ruolo secondario.

Inoltre, da notare che *Thalassiosira* sp. è stata in grado di sopravvivere, senza aumentare in numero, a concentrazioni elevate di fenolo (1mM o 94.11 mg L⁻¹). Questa resistenza potrebbe dipendere dal rapporto superficie/volume relativamente basso che caratterizza questa specie (diametro di 20 µm; Belcher & Swale, 1977) e *D. salina* che ha un diametro di circa 12 µm (Norici et al.,

2002). Il ridotto rapporto comporta un assorbimento più lento dei composti fenolici rispetto a rapporti maggiori (cellule più piccole), quindi una minore tossicità (Duan et al., 2017). La presenza o assenza di una parete cellulare non sembra essere un fattore rilevante nella resistenza ai composti fenolici (Cho et al., 2016).

Come riscontrato da Chen e coautori (2007) per altri composti fenolici, un altro fattore che determina la tossicità di tali composti è la permeabilità alla membrana cellulare. Il tirosolo è solubile in acqua, indicando una bassa apolarità, mentre l'acido *p*-cumarico e l'acido caffeico sono solubili in etanolo, quindi hanno una più spiccata apolarità. Purtroppo, però, in letteratura non sono presenti dati sulla permeabilità della membrana cellulare rispetto ai composti fenolici in esame, non è stato quindi possibile definire il meccanismo di entrata di questi 3 specifici composti fenolici.

L'azione tossica dei composti fenolici è determinata dalla loro tendenza a deprotonarsi, ovvero liberare un atomo di idrogeno H^+ (Perron & Brumaghim, 2009), caratteristica che dipende dalla struttura chimica e dal pH dell'ambiente di reazione. L'acido *p*-cumarico e l'acido caffeico tendono più facilmente a perdere lo ione H^+ del gruppo carbossilico rispetto al gruppo ossidrilico del tirosolo, soprattutto in un ambiente leggermente alcalino come è l'AMCONA (pH di circa 8.1). La possibilità di perdere un protone fa sì che queste molecole possano ridurre più ioni metallici (Perron & Brumaghim, 2009). Questa capacità di reagire con i metalli, in particolare ferro (Fe) e rame (Cu), scatena la loro tossicità, soprattutto perché, a cascata, si generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Eghbaliferiz & Iranshahi, 2016, Perron & Brumaghim, 2009).

In Fig. 40 sono riassunte le reazioni che portano alla formazione di ROS a partire dalla reazione tra composti fenolici e ioni metallici.

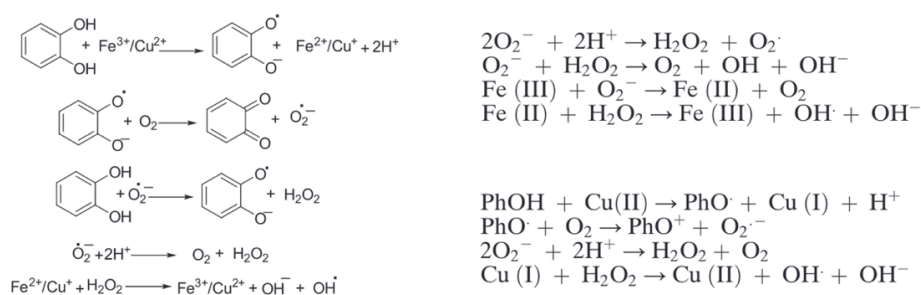


Figura 40. Schemi riassuntivi delle reazioni pro-ossidative scatenate da composti fenolici (Ph) e metalli (Fe e Cu).

Tuttavia, i valori della *tail intensity* ottenuti al 1° giorno di esposizione dell'alga *D. salina* ai composti fenolici (Fig. 34. A) mostrano che i danni maggiori alla struttura del DNA sono presenti quando l'alga viene esposta al tirosolo, mentre il valore della TI risultante dall'esposizione agli altri due composti fenolici non presenta differenze significative rispetto al controllo e al tirosolo (lo stesso per TL e TM). Questa differenza tra crescita e danni osservati ci permette di ipotizzare che, nel caso dell'acido *p*-cumarico e dell'acido caffeico, le concentrazioni dei composti fenolici sono talmente tossiche che sono state rilevate solamente le popolazioni di cellule resistenti allo stress, quindi con meno danno. Invece, nel caso del tirosolo, la concentrazione non è tale da indurre la stessa mortalità degli altri due composti fenolici; pertanto, individuiamo anche le popolazioni meno resistenti e che quindi presentano danni maggiori. Questo potrebbe spiegare anche le differenze riscontrate nelle densità massime rilevate (Fig. 16).

Osservando i valori della TI all'8° giorno di esposizione (Fig. 35. A), si vede come i danni al materiale genetico non sono più significativamente diversi dal controllo, indicando che *D. salina* è stata in grado di rispondere allo stress ossidativo scatenato dai composti fenolici. Le immagini del Comet assay al 1° e 8° giorno sono riportate in Fig. 41 e 42 e si vede chiaramente la riduzione delle comete.

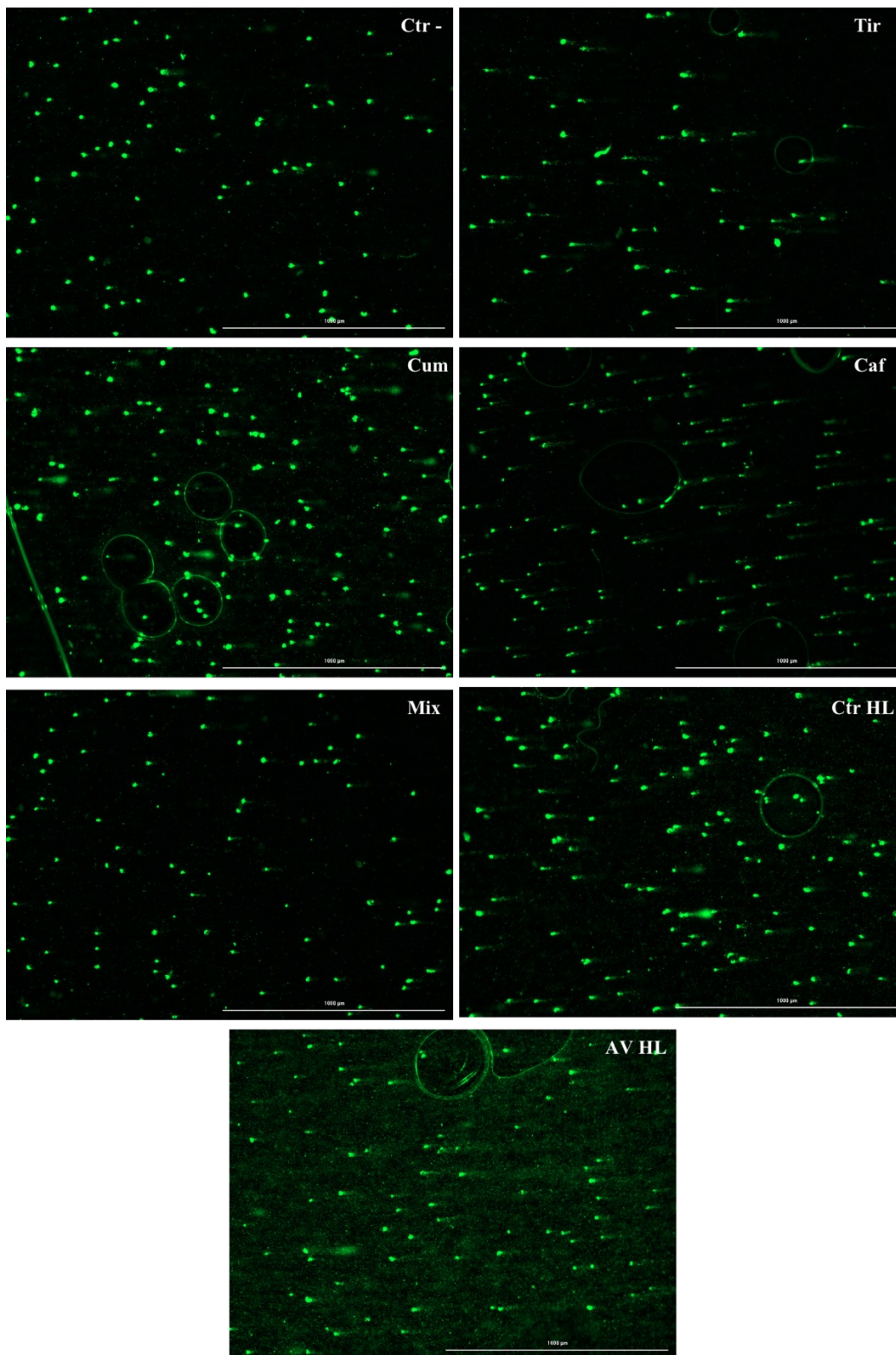


Figura 41. Immagini di microscopia a fluorescenza di *D. salina* pre il saggio del Comet assay al 1° giorno di esposizione. Ctr -, controllo negativo; Tir, tirosolo; Cum, acido *p*-cumarico; Caf, acido caffeico; Mix, miscela di composti fenolici; Ctr HL, controllo a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; AV HL, AV diluite a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

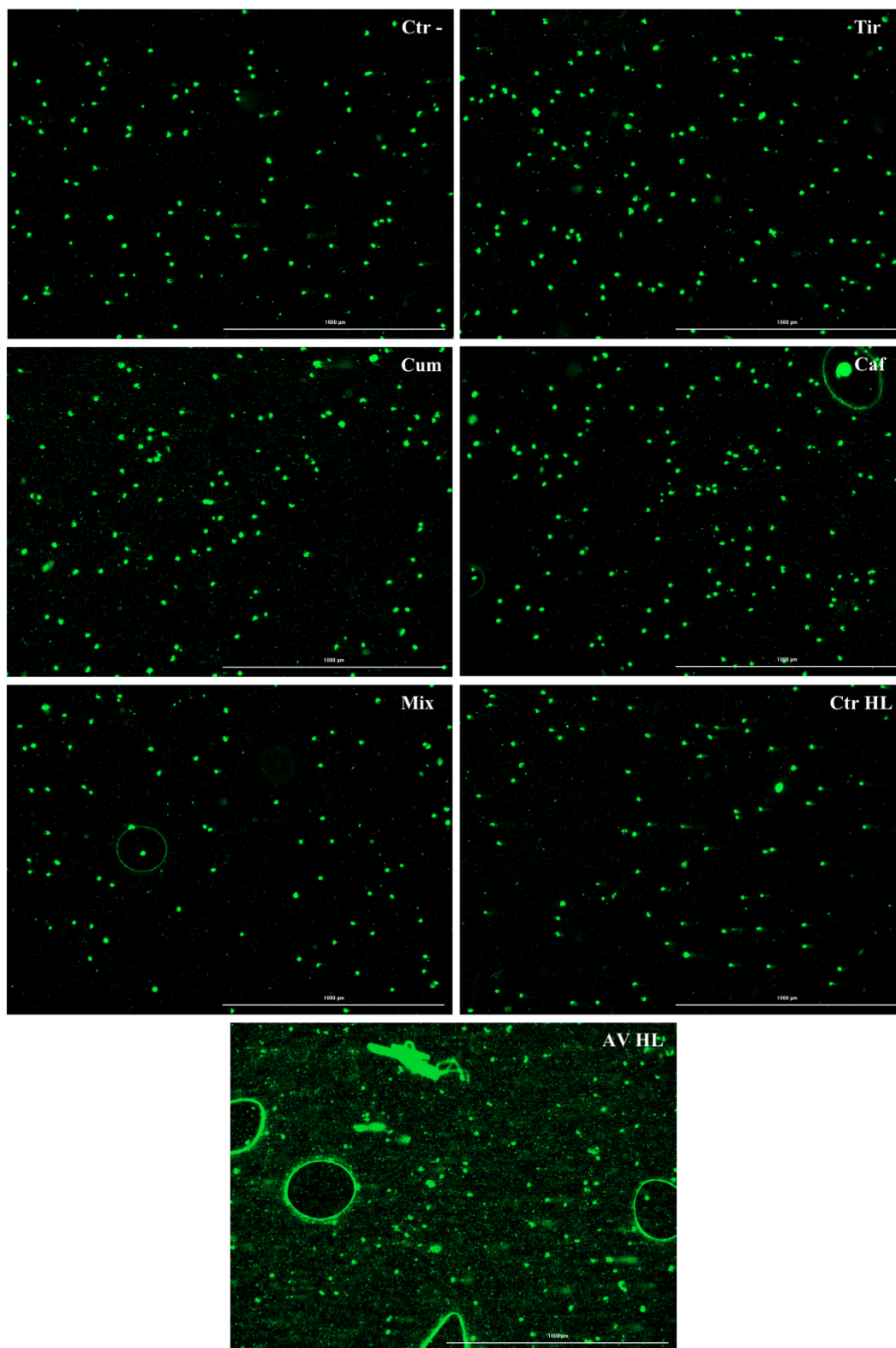


Figura 42. Immagini di microscopia a fluorescenza di *D. salina* pre il saggio del Comet assay all'8° giorno di esposizione. Ctr -, controllo negativo; Tir, tirosolo; Cum, acido *p*-cumarico; Caf, acido caffeico; Mix, miscela di composti fenolici; Ctr HL, controllo a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; AV HL, AV diluite a 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Duan e coautori (2017) mostrano immagini al microscopio elettronico a trasmissione (*Transmission Electron Microscope, TEM*) di *D. salina* in assenza e presenza di fenoli a 96h dall'esposizione (Fig. 43). La presenza di fenoli induce un nucleolo meno elettron-denso (quindi la cellula presenta un'attività di trascrizione del DNA ridotta), un vacuolo disgregato, un aumento di gocce lipidiche e anche danni alla struttura dei cloroplasti. Tutte queste modifiche nella struttura cellulare possono risultare nella morte cellulare programmata (*Programmed Cell Deth, PCD*) (Duan et al., 2017) ed essere la causa della formazione di comete al saggio del Comet assay effettuato in questa tesi.

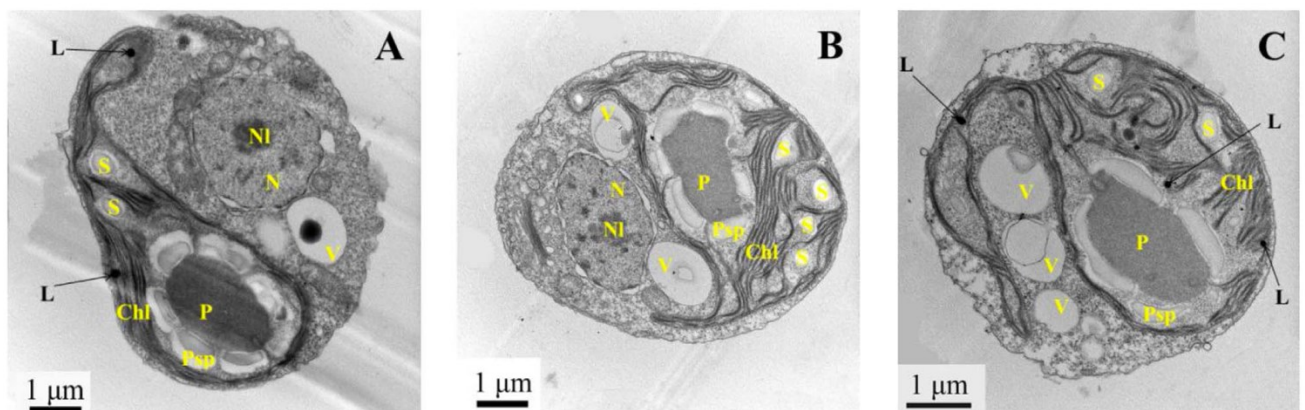


Figura 43. Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di *D. salina* in assenza (A) e presenza (B, C) di fenolo a concentrazione di 36.15 mg L^{-1} . N, nucleo; NI, nucleolo; Chl, cloroplasto; V, vacuolo; S, grani di amido; P, pirenoide; PsP, placca di amido del pirenoide; L, gocce lipidiche; M, mitocondrio (da Duan et al., 2017).

I dati ottenuti dal saggio del DPPH all'inizio del processo di acclimatazione mostrano che non c'è stata una risposta antiossidante significativamente diversa rispetto al controllo nelle colture esposte ai singoli composti fenolici. Questo dato corrisponde a quanto rilevato da Duan e coautori (2017) esponendo *D. salina* a concentrazioni paragonabili di fenolo. Non riscontrano infatti differenze significative nei livelli di ROS a due giorni dall'esposizione dell'alga al fenolo. Possiamo ipotizzare che *D. salina*, nonostante la condizione

stressogena a cui è esposta, non è ancora in grado di attivare difese efficaci dopo 48h dall'esposizione.

Tuttavia, Mofeed & Abdel-Aal (2015) hanno rilevato un significativo aumento nell'attività enzimatica antiossidante di *D. salina* a 24 h, 48 h e 96 h dall'esposizione a fenoli. In particolare, gli antiossidanti catalasi (CAT), glutatione S-transferasi (GST) e superossido dismutasi. La discordanza tra questi risultati e il saggio del DPPH può essere spiegata dal fatto che CAT e SOD reagiscono con i ROS, ed essendo enzimi sono altamente specifici per il substrato. Lo stesso può essere vero per la GST, la quale, probabilmente, non riesce a reagire con la molecola di DPPH per ingombro sterico.

La non reazione del DPPH con questi antiossidanti può anche essere spiegata dal fatto che il DPPH, per essere neutralizzato, necessita la riduzione da parte di un antiossidante attraverso la donazione di un atomo di idrogeno, caratteristica che CAT, SOD e GST non presentano (Dawidowicz et al., 2012). La percentuale di inibizione del DPPH misurata al 7° giorno mostra, invece, una bassa risposta antiossidante della biomassa algale rispetto al controllo, soprattutto nelle alghe esposte all'acido *p*-cumarico e all'acido caffeico (Fig. 28). Tuttavia, la percentuale di inibizione della biomassa algale cresciuta in presenza di tirosolo aumenta al 7° giorno, quella dell'acido *p*-cumarico non varia, mentre l'unica a risultare inferiore è quella della biomassa algale esposta all'acido caffeico (Fig. 29). Non si evidenzia quindi un chiaro trend tra riduzione dei danni (Comet assay) e risposta antiossidante (saggio del DPPH). Considerando quanto detto riguardo alla reattività del DPPH con alcune difese antiossidanti, possiamo ipotizzare che, al 2° giorno la risposta antiossidante dell'alga, specifica contro i composti fenolici, non sia ancora pronta e che quindi sia presente un insieme più generale di difese antiossidanti (e rilevabili dal saggio del DPPH). Al 7° giorno, invece, l'insieme di difese che l'alga ha

sintetizzato contro i composti fenolici è probabilmente composto da molecole che non sono rilevabili dal saggio del DPPH (per la maggior parte), ma che spiegano la riduzione dei danni osservati al Comet assay all'8° giorno.

Questo mostra l'elevata resistenza che *D. salina* presenta nei confronti di composti di natura fenolica, come viene riportato anche da Cho e coautori (2016), i quali rilevano un EC_{50} (*Half maximal Effective Concentration*) di riduzione del tasso di crescita pari a 155 mg L^{-1} di fenoli.

Infine, per quanto riguarda le capacità di *D. salina* di degradare i composti fenolici, con il saggio di Folin-Ciocalteu non c'è stata una degradazione indotta dall'alga. Considerando sempre i singoli composti fenolici, non è stata evidenziata nemmeno una riduzione dalla percentuale di inibizione del DPPH risultante dal saggio in cui al posto dell'estratto algale si aggiunge mezzo di crescita (Fig. 32 e 33), tranne che nel caso dell'acido caffeico. Pertanto, *D. salina* non è stata in grado né di degradare i composti fenolici singoli, né di biotrasformarli in composti a tossicità inferiore o nulla; al tempo stesso *D. salina* è risultata in grado di tollerarne l'eventuale azione ossidativa.

Nonostante i test statistici non abbiano rilevato una differenza significativa, dai grafici si nota che la deviazione standard, in alcuni casi, è molto elevata. Questa elevata variabilità può essere dovuta all'influenza del mezzo di crescita, in quanto contiene ioni metallici (come Fe e Cu), che possono rallentare la cinetica di reazione, interferendo con la riuscita del saggio (Dawidowicz et al., 2012, Mishra et al., 2012).

4.2. Effetti della miscela di composti fenolici su Dunaliella salina

La crescita di cellule acclimatate alla presenza contemporanea dei tre composti fenolici nel mezzo di crescita, con una concentrazione di fenoli totale pari a 93.62 mg L^{-1} , induce una riduzione del tasso di crescita di circa il 15 % rispetto

al controllo. Poiché, il tasso di crescita non è comunque risultato diverso da quello di cellule non acclimatate all'acido *p*-cumarico e all'acido caffeico (Fig. 16. A), sembra non sommarsi l'effetto dei singoli composti fenolici quando questi sono presenti nello stesso mezzo di crescita.

Nuovamente la microalga non è stata in grado di degradare i composti fenolici in miscela, considerando il saggio di Folin-Ciocalteu (Fig. 17) in cui la concentrazione nel mezzo di crescita non varia al variare della crescita algale, e il saggio del DPPH su cellule non acclimatate, in cui non viene rilevata nessuna variazione dell'attività ossidante del mezzo di crescita contenente i composti in esame (come detto al paragrafo 4.1) (Fig. 30).

Abbiamo visto come le cellule cresciute nella miscela di composti fenolici presentano un rapporto tra chl *a* e chl *b* inferiore rispetto alla condizione di controllo, sia in fase esponenziale che stazionaria (Fig. 18. C). Questo indica che c'è stata una riduzione nei complessi che catturano la luce nei cloroplasti, i *Light Harvesting Complexes* (LHC), ed è considerata una risposta adattativa alla presenza di radicali (Cho et al., 2016). Il fatto che il rapporto risulta inferiore rispetto al controllo anche nella fase stazionaria di crescita, indica che è ancora presente uno stress ossidativo, probabilmente dovuto alla persistenza dei composti fenolici e della loro attività pro-ossidante.

Da precedenti esperimenti di esposizione a fenoli (C_6H_6O) su *D. salina* non acclimatata (Cho et al., 2016, Duan et al., 2017), risulta che ci sia un aumento nella concentrazione di lipidi rispetto al controllo. Invece, i dati da noi ottenuti mostrano come, in fase esponenziale, la quantità di lipidi e proteine non sia diversa, mentre aumenta considerevolmente la quantità di carboidrati, soprattutto in fase esponenziale (Tab. 11. C). La differenza con i dati precedentemente citati può essere giustificata dal fatto che le alghe da noi utilizzate sono acclimatate alla miscela di composti fenolici o ai differenti

composti a cui l'alga è stata esposta, ce inducono una diversa risposta metabolica.

Un aumento nella quantità di lipidi è, però, indice della presenza di uno stress (Jiang et al., 2012) e potrebbe essere legato a sistemi di detossificazione dai composti fenolici, come l'inclusione in gocce lipidiche (Duan et al., 2017). L'assenza di un aumento significativo nella quantità di lipidi e la presenza di un rapporto chl *a*/chl *b* minore rispetto al controllo sembrano dati in contrasto tra di loro, ma è possibile che la risposta ai composti fenolici di questo ceppo di *D. salina* coinvolga altri sistemi di difesa, diversi dall'inclusione in gocce lipidiche. Nonostante non ci sia un aumento nella quantità di lipidi, l'aumento in carboidrati è anch'esso un indice di stress. Può essere causato da una mancanza di nutrienti, ma più probabilmente dall'impossibilità di acquisirli dall'ambiente esterno (Markou et al., 2012). L'aumento di carboidrati potrebbe essere una conseguenza della risposta acclimatatoria di *D. salina*. Studi più approfonditi sono perciò necessari.

L'indice di riduzione della biomassa algale, in entrambe le fasi di crescita analizzate, è stato inferiore rispetto al controllo e, in fase stazionaria, la differenza aumenta (Fig. 20). Perciò, la biomassa è sempre più insatura (quindi più ossidata) al procedere della crescita.

Possiamo quindi dedurre che lo stress ossidativo indotto dalla presenza dei composti fenolici nel mezzo di crescita sia continuo e persistente nel tempo. Tuttavia, l'alga è stata in grado di tollerarlo e proliferare. I valori di *tail intensity* ottenuti da cellule non acclimate (Fig. 34, 35), infatti, indicano la quasi assenza di danni al materiale genetico dopo esposizione alla miscela di composti fenolici, sia a 24 h che a 192 h. L'assenza di danni rilevabili al DNA dopo 24 h di esposizione alla miscela di composti fenolici è in netto contrasto rispetto alla riduzione del tasso di crescita osservata. Questa differenza può

dipendere da effetti antagonisti dei tre composti fenolici quando presenti in miscela o, come osservato nel paragrafo 4.1, la concentrazione dei composti tossici è stata tale da aver permesso la sopravvivenza solo della popolazione resistente.

4.3. Effetti delle AV su *Dunaliella salina*

La crescita di cellule acclimatate in AV diluite a differenti condizioni di illuminazione mostra come la crescita a luce maggiore abbia un tasso di crescita comparabile ai due controlli, mentre la crescita in AV diluite LL presenta un tasso nettamente inferiore. Infatti, come si può vedere dai risultati dell'ANOVA a due vie (Suppl. 27), sia il mezzo di crescita che la condizione di illuminazione inducono variazione, ed è significativa l'interazione tra i due parametri nel condizionare il tasso di crescita. Questo indica che l'utilizzo di luce più intensa (HL) permette di raggiungere tassi di crescita comparabili al controllo.

Sia a 100 che 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ non si osserva una variazione nella concentrazione di composti fenolici nelle AV durante la crescita algale, concordemente con quanto ottenuto dagli esperimenti precedenti. Considerando però i risultati del saggio del DPPH, sia nella biomassa che nel mezzo di crescita di alghe in fase di acclimatazione, si osserva una riduzione significativa nella PI tra 2° e 7° giorno (Fig. 29 e 31). Questo indica che la crescita algale fa sì che gli effetti ossidanti delle AV diminuiscano (passando dal 60 % al 40 %) e di conseguenza si riduce la risposta antiossidante delle cellule e i danni alla struttura cellulare.

Il contenuto in pigmenti fotosintetici, per tutte e due le condizioni di crescita considerate, è diminuito significativamente rispetto ai controlli, sia a luce minore che maggiore. I risultati dell'ANOVA a due vie (Suppl. 28, 29, 30) indicano infatti che è il mezzo di crescita il fattore che determina il contenuto

in pigmenti, ma non la luce o un'interazione tra i due. Questo è probabilmente dovuto all'attivazione del metabolismo mixotrofo di *D. salina*, l'alga è stata in grado di sfruttare parte del carbonio organico presente nelle AV per il suo metabolismo riducendo il tasso fotosintetico, quindi i pigmenti.

Il rapporto tra chl *a* e chl *b* (Suppl. 31) in fase esponenziale è risultato inferiore solo nella condizione di AV diluite LL, seguendo l'andamento del tasso di crescita. Questo indica che c'è stato uno squilibrio dei sistemi fotosintetici nelle alghe cresciute in AV diluite a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ rispetto al controllo, ma aumentando l'intensità luminosa la condizione delle antenne fotosintetiche è paragonabile al controllo.

Considerando le abbondanze molecolari, risulta che in fase esponenziale, la crescita in AV induce un aumento nel contenuto in carboidrati rispetto al controllo (Fig. 26. A). Questo incremento potrebbe essere stimolato dalla presenza di carbonio organico nelle AV, quindi l'incremento in carboidrati potrebbe essere legato a un metabolismo mixotrofo più attivo. Tuttavia, studi più specifici sono necessari.

Anche l'indice di riduzione segnala una maggiore ossidazione della biomassa cresciuta in AV diluite LL rispetto al controllo e rispetto alla condizione a luce maggiore. Considerando però il rapporto tra l'indice di riduzione delle alghe esposte alle AV diluite e i rispettivi controlli, vediamo che non c'è stata una differenza significativa tra le due condizioni di crescita. Questo indica che, in entrambe le condizioni di illuminazione, le alghe cresciute nelle AV diluite sono più ossidate rispetto alle rispettive condizioni di controllo e il grado di ossidazione rispetto ad esso è stato paragonabile.

In fase stazionaria, la coltura a luce minore presenta ancora un indice di riduzione più basso, in linea con quanto risulta dal rapporto tra le clorofille. Pertanto, a luce minore, l'alga sembra non essere in grado di inattivare

completamente l'effetto ossidante delle AV. La maggiore ossidazione della biomassa algale può essere anche un risultato dei meccanismi di difesa dell'alga, la risposta acclimatoria di *D. salina*, ma con i dati ottenuti in questo lavoro di tesi non è possibile stabilire la causa del minore indice di riduzione. Il valore di TI sulle alghe non acclimate alle AV è risultato essere significativamente maggiore rispetto a tutte le altre condizioni di esposizione, soprattutto al giorno 1 (Fig. 34). La condizione ad alta luce, introdotta visti i risultati positivi in termini di tasso di crescita (Fig. 21. B), non ha però comportato un aumento significativo dei danni al DNA, vista la similarità riscontrata con il controllo a luce minore, sebbene la distribuzione dei valori tenda di più verso valori maggiori di TI rispetto al controllo a luce minore (Fig. 34. A). Pertanto, una irradianza a $300 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induce danni al DNA, ma non tali da essere significativi al Comet assay. Quindi, i danni rilevati nelle cellule esposte alle AV dopo 24 h sono causati, per la quasi totalità, dal refluo stesso.

Il fatto che, anche dopo 8 giorni di crescita, ci sia una differenza significativa con il controllo negativo, ma non con il controllo esposto alla stessa intensità luminosa (controllo HL), indica che l'alga è stata in grado di tollerare lo stress ossidativo causato dalle AV (vista la significativa riduzione dei 4 parametri considerati, Fig. 36-39), ma c'è stata ancora una quota di danno rilevabile, probabilmente indotta dalla luce maggiore.

4.4. Possibile applicazione di *D. salina* nella fito-depurazione

D. salina risulta in grado di crescere in AV diluite, in particolare quando esposta a intensità luminose di $300 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e ne risulta una biomassa arricchita in carboidrati, la quale può avere molte applicazioni, come

la sintesi di bioetanolo, biobutanolo, tramite fermentazione (Markou et al., 2012).

Tuttavia, il fatto che non ci sia una degradazione dei composti fenolici da parte dell'alga in nessuna delle condizioni analizzate, e che la capacità ossidante di tali composti non si azzeri, fa sì che la sua applicazione nella fitodepurazione necessiti di ulteriori studi.

Comunque, strategie di evoluzione adattativa in laboratorio (*Adaptive Laboratory Evolution, ALE*) sono state utilizzate per migliorare la capacità di degradazione dei composti fenolici di *I. galbana* (Li et al., 2021).

Ad esempio, un'esposizione prolungata a concentrazioni non letali e crescenti di composti fenolici permetterebbe di stimolare i meccanismi di difesa delle microalga, che possono essere rappresentati dalla fenolo-idrossilasi (*phenol hydroxylase, PH*) e dalla catecolo 2-3 diossigenasi (Li et al., 2021; Mofeed & Abdel-Aal, 2015) portando alla selezione di ceppi algali sempre più in grado di degradare questi contaminanti.

Una volta a disposizione il ceppo algale più adeguato, è cruciale scegliere la giusta tecnologia di coltivazione. L'utilizzo del *thin-layer bioreactor*, caratterizzato da uno strato sottile di mezzo di coltura in continuo movimento e distribuito su una superficie leggermente inclinata, può risultare la strategia vincente. Infatti, sulla base della miglior crescita algale ad alta luce, questa strategia permetterebbe di risolvere il problema del colore del mezzo (rosso-nero) che in strutture cilindriche o in *raceway ponds* impedirebbe alla luce di penetrare già nei primi centimetri (Cicci et al., 2013).

Risulta possibile prevedere allora l'utilizzo di altre acque reflue insieme alle AV, così da ridurre i volumi necessari per la coltivazione, ma anche ottimizzare le quantità di micronutrienti che sono altrimenti carenti nelle AV (Dermache et

al., 2013; Hodaifa et al., 2013). Chiaramente, studi sulla tossicità della miscela di più reflui sono necessari.

Capitolo quinto

CONCLUSIONI

In conclusione, *D. salina*, nonostante i dati evidenzino danni genetici in fase iniziale di acclimatazione alle AV, risulta in grado di tollerare e ridurre notevolmente i danni. Inoltre, dopo una fase di acclimatazione si osservano tassi di crescita e rapporti tra clorofille paragonabili alla condizione di controllo.

Si osserva una maggiore insaturazione della biomassa algale, caratteristica probabilmente indotta dall'azione pro-ossidante dei composti fenolici nelle AV, ma può anche rappresentare un meccanismo di acclimatazione ai composti fenolici attuato dall'alga.

La presenza di AV nel mezzo di crescita altera la composizione organica della biomassa algale, arricchendola in carboidrati. L'alga selezionata non risulta però in grado di degradare i composti fenolici contenuti nelle AV o ridurre l'attività ossidante in modo significativo, non permettendo quindi di ridurre l'impatto ambientale.

Ulteriori studi, che possono anche prevedere strategie come *ALE* e la coltivazione in due tipologie di refluo, rappresentano possibili vie per applicazioni future di *Dunaliella salina* in strategie di valorizzazione e fitodepurazione di acque di vegetazione in maniera sostenibile.

Capitolo sesto

MATERIALI SUPPLEMENTARI

6.1. Selezione della specie algale per la fito-depurazione

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	0,004100	-0,02804 to 0,03624	No	ns	0,9728
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,06742	0,03149 to 0,1033	Yes	**	0,0019
Controllo vs. Acido caffeico	0,04893	0,01680 to 0,08107	Yes	**	0,0063
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,06332	0,02739 to 0,09924	Yes	**	0,0027
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,04483	0,01270 to 0,07697	Yes	*	0,0101
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-0,01848	-0,05441 to 0,01744	No	ns	0,3889

Suppl. 1. ANOVA a una via del μ di *D. salina* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-0,07600	-1,281 to 1,129	No	ns	0,9965
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-2,109	-3,456 to -0,7624	Yes	**	0,0054
Controllo vs. Acido caffeico	-1,300	-2,505 to -0,09524	Yes	*	0,0358
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-2,033	-3,380 to -0,6864	Yes	**	0,0066
Tirosolo vs. Acido caffeico	-1,224	-2,429 to -0,01924	Yes	*	0,0467
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,8093	-0,5376 to 2,156	No	ns	0,2770

Suppl. 2. ANOVA a una via del T_d di *D. salina* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	89333	-205830 to 384497	No	ns	0,7701
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	687653	392490 to 982817	Yes	***	0,0003
Controllo vs. Acido caffeico	519767	224603 to 814930	Yes	**	0,0022
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	598320	303156 to 893484	Yes	***	0,0009
Tirosolo vs. Acido caffeico	430433	135270 to 725597	Yes	**	0,0070
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-167887	-463050 to 127277	No	ns	0,3309

Suppl. 3. ANOVA a una via della D_{\max} di *D. salina* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	0,01433	-0,002218 to 0,03089	No	ns	0,0916
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,008100	-0,008452 to 0,02465	No	ns	0,4461
Controllo vs. Acido caffeico	0,7600	0,7435 to 0,7766	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,006233	-0,02279 to 0,01032	No	ns	0,6403
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,7457	0,7291 to 0,7623	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,7519	0,7354 to 0,7685	Yes	****	<0,0001

Suppl. 4. ANOVA a una via del μ di *P. tricornutum* controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-0,01667	-0,04170 to 0,008367	No	ns	0,2221
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,01000	-0,03503 to 0,01503	No	ns	0,5993
Controllo vs. Acido caffeico	0,9133	0,8883 to 0,9384	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,006667	-0,01837 to 0,03170	No	ns	0,8283
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,9300	0,9050 to 0,9550	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,9233	0,8983 to 0,9484	Yes	****	<0,0001

Suppl. 5. ANOVA a una via del T_d di *P. tricornutum* controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	3630000	1612900 to 5647100	Yes	**	0,0019
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	3490000	1472900 to 5507100	Yes	**	0,0024
Controllo vs. Acido caffeico	15870000	13852900 to 17887100	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-140000	-2157100 to 1877100	No	ns	0,9958
Tirosolo vs. Acido caffeico	12240000	10222900 to 14257100	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	12380000	10362900 to 14397100	Yes	****	<0,0001

Suppl. 6. ANOVA a una via della D_{\max} di *P. tricornutum* controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	0,2496	0,08761 to 0,4117	Yes	**	0,0050
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,7032	0,5412 to 0,8652	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	0,7032	0,5412 to 0,8652	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,4536	0,2915 to 0,6156	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,4536	0,2915 to 0,6156	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,1620 to 0,1620	No	ns	>0,9999

Suppl. 7. ANOVA a una via del μ di *P. purpureum* controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-0,5367	-0,8583 to -0,2150	Yes	**	0,0031
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,003	0,6817 to 1,325	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	1,003	0,6817 to 1,325	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,540	1,218 to 1,862	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	1,540	1,218 to 1,862	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,3217 to 0,3217	No	ns	>0,9999

Suppl. 8. ANOVA a una via del T_d di *P. purpureum* controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	149000	5550 to 292450	Yes	*	0,0420
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	438333	294883 to 581783	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	438333	294883 to 581783	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	289333	145883 to 432783	Yes	***	0,0009
Tirosolo vs. Acido caffeico	289333	145883 to 432783	Yes	***	0,0009
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-143450 to 143450	No	ns	>0,9999

Suppl. 9. ANOVA a una via della D_{\max} di *P. purpureum* controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-0,03617	-0,05971 to -0,01263	Yes	**	0,0051
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,3222	0,2987 to 0,3457	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	0,3222	0,2987 to 0,3457	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,3584	0,3348 to 0,3819	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,3584	0,3348 to 0,3819	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,02354 to 0,02354	No	ns	>0,9999

Suppl. 10. ANOVA a una via del μ di *I. galbana* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	0,2200	0,06605 to 0,3739	Yes	**	0,0078
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	2,153	1,999 to 2,307	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	2,153	1,999 to 2,307	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,933	1,779 to 2,087	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	1,933	1,779 to 2,087	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,1539 to 0,1539	No	ns	>0,9999

Suppl. 11. ANOVA a una via del T_d di *I. galbana* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	2866667	1583548 to 4149785	Yes	***	0,0004
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	17863333	16580215 to 19146452	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	17863333	16580215 to 19146452	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	14996667	13713548 to 16279785	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	14996667	13713548 to 16279785	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-1283118 to 1283118	No	ns	>0,9999

Suppl. 12. ANOVA a una via della D_{max} di *I. galbana* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	0,02120	-0,04704 to 0,08944	No	ns	0,7566
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,3615	0,2933 to 0,4297	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	0,3615	0,2933 to 0,4297	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,3403	0,2721 to 0,4085	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,3403	0,2721 to 0,4085	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,06824 to 0,06824	No	ns	>0,9999

Suppl. 13. ANOVA a una via del μ di *N. salina* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-0,1233	-0,5057 to 0,2590	No	ns	0,7361
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,930	1,548 to 2,312	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	1,930	1,548 to 2,312	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	2,053	1,671 to 2,436	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	2,053	1,671 to 2,436	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,3824 to 0,3824	No	ns	>0,9999

Suppl. 14. ANOVA a una via del T_d di *N. salina* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	2370667	-3144562 to 7885895	No	ns	0,5456
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	15588000	10072772 to 21103228	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	15588000	10072772 to 21103228	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	13217333	7702105 to 18732562	Yes	***	0,0003
Tirosolo vs. Acido caffeico	13217333	7702105 to 18732562	Yes	***	0,0003
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-5515228 to 5515228	No	ns	>0,9999

Suppl. 15. ANOVA a una via della D_{max} di *N. salina* controllo ed esposta a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	0,004700	-0,02962 to 0,03902	No	ns	0,9700
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,5733	0,5390 to 0,6076	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	0,5733	0,5390 to 0,6076	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,5686	0,5343 to 0,6029	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,5686	0,5343 to 0,6029	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,03432 to 0,03432	No	ns	>0,9999

Suppl. 16. ANOVA a una via del μ di *Synechococcus* sp. controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-0,01000	-0,08121 to 0,06121	No	ns	0,9678
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,207	1,135 to 1,278	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	1,207	1,135 to 1,278	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,217	1,145 to 1,288	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	1,217	1,145 to 1,288	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-0,07121 to 0,07121	No	ns	>0,9999

Suppl. 17. ANOVA a una via del T_d di *Synechococcus* sp. controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo vs. Tirosolo	-1336000	-4742053 to 2070053	No	ns	0,6122
Controllo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	16658667	13252614 to 20064720	Yes	****	<0,0001
Controllo vs. Acido caffeico	16658667	13252614 to 20064720	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	17994667	14588614 to 21400720	Yes	****	<0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	17994667	14588614 to 21400720	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,000	-3406053 to 3406053	No	ns	>0,9999

Suppl. 18. ANOVA a una via della D_{max} di *Synechococcus* sp. controllo ed esposto a tirosolo, acido *p*-cumarico e acido caffeico.

6.2. Esposizione simultanea di *D. salina* ai 3 composti fenolici a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,06332	0,02032 to 0,1063	Yes	**	0,0076
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,04483	0,006378 to 0,08329	Yes	*	0,0250
Tirosolo vs. Mix	0,05773	0,01928 to 0,09619	Yes	**	0,0068
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-0,01848	-0,06148 to 0,02451	No	ns	0,5249
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	-0,005583	-0,04858 to 0,03741	No	ns	0,9714
Acido caffeico vs. Mix	0,01290	-0,02556 to 0,05136	No	ns	0,6951

Suppl. 19. ANOVA a una via del μ di *D. salina* esposta ai singoli composti fenolici e al Mix.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Mix vs. Tirosolo	1,786	0,08358 to 3,489	Yes	*	0,0406
Mix vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,2470	-2,151 to 1,657	No	ns	0,9715
Mix vs. Acido caffeico	0,5623	-1,140 to 2,265	No	ns	0,7045
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-2,033	-3,937 to -0,1296	Yes	*	0,0375
Tirosolo vs. Acido caffeico	-1,224	-2,927 to 0,4787	No	ns	0,1688
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,8093	-1,094 to 2,713	No	ns	0,5332

Suppl. 20. ANOVA a una via del T_d di *D. salina* esposta ai singoli composti fenolici e al Mix.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Mix vs. Tirosolo	-310967	-538576 to -83357	Yes	*	0,0102
Mix vs. Acido <i>p</i> -cumarico	287353	59744 to 514963	Yes	*	0,0157
Mix vs. Acido caffeico	119467	-108143 to 347076	No	ns	0,3918
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	598320	370710 to 825930	Yes	***	0,0001
Tirosolo vs. Acido caffeico	430433	202824 to 658043	Yes	**	0,0014
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-167887	-395496 to 59723	No	ns	0,1627

Suppl. 21. ANOVA a una via della D_{max} di *D. salina* esposta ai singoli composti fenolici e al Mix.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	2,347	0,0137	*	Yes
Growth phase	59,79	<0,0001	****	Yes
Media	35,96	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo vs. Esponenziale:Mix	1,835	1,297 to 2,372	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Controllo	2,258	1,720 to 2,795	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Mix	3,346	2,808 to 3,883	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Controllo	0,4230	-0,1147 to 0,9607	No	ns	0,1308
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Mix	1,511	0,9733 to 2,049	Yes	****	<0,0001
Stazionaria:Controllo vs. Stazionaria:Mix	1,088	0,5503 to 1,626	Yes	***	0,0009

Suppl. 22. ANOVA a due vie della chl *a* nel Mix e nel controllo in fase esponenziale e stazionaria per i parametri *classe molecolare* e *mezzo di crescita*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	1,979	0,0655	ns	No
Growth phase	94,33	<0,0001	****	Yes
Media	0,2124	0,5045	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo vs. Esponenziale:Mix	0,1297	-0,07772 to 0,3371	No	ns	0,2633
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Controllo	0,7720	0,5646 to 0,9794	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Mix	0,7063	0,4989 to 0,9137	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Controllo	0,6423	0,4349 to 0,8497	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Mix	0,5767	0,3693 to 0,7841	Yes	****	<0,0001
Stazionaria:Controllo vs. Stazionaria:Mix	-0,06567	-0,2731 to 0,1417	No	ns	0,7464

Suppl. 23. ANOVA a due vie della chl *b* nel Mix e nel controllo in fase esponenziale e stazionaria per i parametri *classe molecolare* e *mezzo di crescita*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	11,86	0,0006	***	Yes
Growth phase	11,15	0,0008	***	Yes
Media	73,74	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo vs. Esponenziale:Mix	6,669	2,927 to 10,41	Yes	**	0,0020
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Controllo	-8,794	-12,54 to -5,052	Yes	***	0,0003
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Mix	6,805	3,062 to 10,55	Yes	**	0,0018
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Controllo	-15,46	-19,21 to -11,72	Yes	****	<0,0001
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Mix	0,1353	-3,607 to 3,878	No	ns	0,9994
Stazionaria:Controllo vs. Stazionaria:Mix	15,60	11,86 to 19,34	Yes	****	<0,0001

Suppl. 24. ANOVA a due vie dei carotenoidi nel Mix e nel controllo in fase esponenziale e stazionaria per i parametri *classe molecolare* e *mezzo di crescita*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	7,388	0,0421	*	Yes
Growth phase	14,10	0,0103	*	Yes
Media	68,39	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo vs. Esponenziale:Mix	1,009	0,08283 to 1,935	Yes	*	0,0335
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Controllo	-1,176	-2,102 to -0,2502	Yes	*	0,0152
Esponenziale:Controllo vs. Stazionaria:Mix	0,8203	-0,1055 to 1,746	No	ns	0,0837
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Controllo	-2,185	-3,111 to -1,259	Yes	***	0,0003
Esponenziale:Mix vs. Stazionaria:Mix	-0,1883	-1,114 to 0,7375	No	ns	0,9121
Stazionaria:Controllo vs. Stazionaria:Mix	1,996	1,070 to 2,922	Yes	***	0,0006

Suppl. 25. ANOVA a due vie del rapporto tra chl *a* e chl *b* nel Mix e nel controllo in fase esponenziale e stazionaria per i parametri *classe molecolare* e *mezzo di crescita*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	6,070	0,0628	ns	No
Light	70,26	<0,0001	****	Yes
Molecule	13,31	0,0070	**	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Proteine vs. Esponenziale:Carboidrati	-0,9537	-2,080 to 0,1728	No	ns	0,1088
Esponenziale:Proteine vs. Esponenziale:Lipidi	0,3187	-0,8078 to 1,445	No	ns	0,9051
Esponenziale:Proteine vs. Stazionaria:Proteine	0,2260	-1,033 to 1,485	No	ns	0,9848
Esponenziale:Proteine vs. Stazionaria:Carboidrati	0,4725	-0,7870 to 1,732	No	ns	0,7622
Esponenziale:Proteine vs. Stazionaria:Lipidi	0,4625	-0,7970 to 1,722	No	ns	0,7766
Esponenziale:Carboidrati vs. Esponenziale:Lipidi	1,272	0,1458 to 2,399	Yes	*	0,0260
Esponenziale:Carboidrati vs. Stazionaria:Proteine	1,180	-0,07978 to 2,439	No	ns	0,0690
Esponenziale:Carboidrati vs. Stazionaria:Carboidrati	1,426	0,1667 to 2,686	Yes	*	0,0257
Esponenziale:Carboidrati vs. Stazionaria:Lipidi	1,416	0,1567 to 2,676	Yes	*	0,0267
Esponenziale:Lipidi vs. Stazionaria:Proteine	-0,09267	-1,352 to 1,167	No	ns	0,9998
Esponenziale:Lipidi vs. Stazionaria:Carboidrati	0,1538	-1,106 to 1,413	No	ns	0,9974
Esponenziale:Lipidi vs. Stazionaria:Lipidi	0,1438	-1,116 to 1,403	No	ns	0,9981
Stazionaria:Proteine vs. Stazionaria:Carboidrati	0,2465	-1,133 to 1,626	No	ns	0,9851
Stazionaria:Proteine vs. Stazionaria:Lipidi	0,2365	-1,143 to 1,616	No	ns	0,9876
Stazionaria:Carboidrati vs. Stazionaria:Lipidi	-0,01000	-1,390 to 1,370	No	ns	>0,9999

Suppl. 26. ANOVA a due vie dei rapporti delle classi molecolari del Mix rispetto al controllo in fase esponenziale e stazionaria per i parametri *classe molecolare* e *mezzo di crescita*.

6.3. Esposizione di *D. salina* alle AV diluite e due condizioni di intensità luminosa

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	16,13	0,0006	***	Yes
Light	47,31	<0,0001	****	Yes
Media	25,64	0,0001	***	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Ctr vs. LL:AV	0,2448	0,1635 to 0,3261	Yes	****	<0,0001
LL:Ctr vs. HL:Ctr	-0,07717	-0,1585 to 0,004121	No	ns	0,0622
LL:Ctr vs. HL:AV	-0,04893	-0,1398 to 0,04195	No	ns	0,3549
LL:AV vs. HL:Ctr	-0,3219	-0,4032 to -0,2406	Yes	****	<0,0001
LL:AV vs. HL:AV	-0,2937	-0,3846 to -0,2028	Yes	****	<0,0001
HL:Ctr vs. HL:AV	0,02823	-0,06265 to 0,1191	No	ns	0,7395

Suppl. 27. ANOVA a due vie dei μ delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce* (*light*) e *mezzo di crescita* (*media*).

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	1,649	0,1891	ns	No
Light	15,76	0,0022	**	Yes
Media	76,19	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	1,852	1,103 to 2,601	Yes	***	0,0002
LL:Controllo vs. HL:Controllo	0,9717	0,2222 to 1,721	Yes	*	0,0136
LL:Controllo vs. HL:AV	2,349	1,599 to 3,098	Yes	****	<0,0001
LL:AV vs. HL:Controllo	-0,8803	-1,630 to -0,1309	Yes	*	0,0230
LL:AV vs. HL:AV	0,4967	-0,2528 to 1,246	No	ns	0,2250
HL:Controllo vs. HL:AV	1,377	0,6276 to 2,126	Yes	**	0,0017

Suppl. 28. ANOVA a due vie della chl *a* per cellula delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce* (*light*) e *mezzo di crescita* (*media*) in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,1298	0,7238	ns	No
Light	35,75	0,0003	***	Yes
Media	56,37	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	0,4187	0,1816 to 0,6558	Yes	**	0,0021
LL:Controllo vs. HL:Controllo	0,3373	0,1002 to 0,5744	Yes	**	0,0080
LL:Controllo vs. HL:AV	0,7177	0,4806 to 0,9548	Yes	****	<0,0001
LL:AV vs. HL:Controllo	-0,08133	-0,3184 to 0,1558	No	ns	0,7003
LL:AV vs. HL:AV	0,2990	0,06189 to 0,5361	Yes	*	0,0158
HL:Controllo vs. HL:AV	0,3803	0,1432 to 0,6174	Yes	**	0,0039

Suppl. 29. ANOVA a due vie della chl *b* per cellula delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	3,030	0,4218	ns	No
Light	0,5586	0,7256	ns	No
Media	62,59	0,0049	**	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	3,812	0,1347 to 7,489	Yes	*	0,0424
LL:Controllo vs. HL:Controllo	0,3923	-3,285 to 4,070	No	ns	0,9853
LL:Controllo vs. HL:AV	2,829	-0,8480 to 6,507	No	ns	0,1413
LL:AV vs. HL:Controllo	-3,420	-7,097 to 0,2577	No	ns	0,0686
LL:AV vs. HL:AV	-0,9827	-4,660 to 2,695	No	ns	0,8269
HL:Controllo vs. HL:AV	2,437	-1,240 to 6,114	No	ns	0,2250

Suppl. 30. ANOVA a due vie dei carotenoidi per cellula delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	12,17	0,0860	ns	No
Light	36,67	0,0094	**	Yes
Media	25,74	0,0216	*	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	0,4213	0,02413 to 0,8185	Yes	*	0,0381
LL:Controllo vs. HL:Controllo	-0,1263	-0,5235 to 0,2709	No	ns	0,7439
LL:Controllo vs. HL:AV	-0,04833	-0,4455 to 0,3489	No	ns	0,9785
LL:AV vs. HL:Controllo	-0,5477	-0,9449 to -0,1505	Yes	**	0,0096
LL:AV vs. HL:AV	-0,4697	-0,8669 to -0,07246	Yes	*	0,0222
HL:Controllo vs. HL:AV	0,07800	-0,3192 to 0,4752	No	ns	0,9199

Suppl. 31. ANOVA a due vie del rapporto chl *a*/chl *b* delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	1,697	0,2495	ns	No
Growth phase	0,01067	0,9235	ns	No
Media	91,42	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo LL vs. Esponenziale:AV LL	1,852	0,8251 to 2,879	Yes	**	0,0024
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-0,3153	-1,463 to 0,8328	No	ns	0,8010
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	2,121	1,094 to 3,148	Yes	**	0,0011
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-2,167	-3,315 to -1,019	Yes	**	0,0018
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:AV LL	0,2690	-0,7579 to 1,296	No	ns	0,8215
Stazionaria:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	2,436	1,288 to 3,584	Yes	***	0,0009

Suppl. 32. ANOVA a due vie della chl *a* delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *fase di crescita (growth phase)* e *mezzo di crescita (media)*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	2,663	0,3114	ns	No
Growth phase	0,1405	0,8094	ns	No
Media	81,81	0,0005	***	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo LL vs. Esponenziale:AV LL	0,4187	0,04579 to 0,7915	Yes	*	0,0298
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-0,07100	-0,4879 to 0,3459	No	ns	0,9398
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	0,5320	0,1591 to 0,9049	Yes	**	0,0090
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-0,4897	-0,9066 to -0,07278	Yes	*	0,0241
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:AV LL	0,1133	-0,2595 to 0,4862	No	ns	0,7513
Stazionaria:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	0,6030	0,1861 to 1,020	Yes	**	0,0083

Suppl. 33. ANOVA a due vie della chl *b* delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *fase di crescita (growth phase)* e *mezzo di crescita (media)*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,4828	0,7552	ns	No
Growth phase	0,9071	0,6699	ns	No
Media	61,54	0,0066	**	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo LL vs. Esponenziale:AV LL	3,812	-0,5401 to 8,164	No	ns	0,0876
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-0,1150	-4,467 to 4,237	No	ns	0,9998
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	3,077	-1,275 to 7,429	No	ns	0,1860
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-3,927	-8,279 to 0,4251	No	ns	0,0777
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:AV LL	-0,7353	-5,087 to 3,617	No	ns	0,9464
Stazionaria:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	3,192	-1,160 to 7,544	No	ns	0,1657

Suppl. 34. ANOVA a due vie dei carotenoidi delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *fase di crescita (growth phase)* e *mezzo di crescita (media)*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,0002038	0,9924	ns	No
Growth phase	1,938	0,3664	ns	No
Media	81,15	0,0003	***	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Controllo LL vs. Esponenziale:AV LL	0,4213	0,1139 to 0,7288	Yes	**	0,0100
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-0,06433	-0,3718 to 0,2431	No	ns	0,9055
Esponenziale:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	0,3557	0,04819 to 0,6631	Yes	*	0,0249
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:Controllo LL	-0,4857	-0,7931 to -0,1782	Yes	**	0,0043
Esponenziale:AV LL vs. Stazionaria:AV LL	-0,06567	-0,3731 to 0,2418	No	ns	0,9004
Stazionaria:Controllo LL vs. Stazionaria:AV LL	0,4200	0,1125 to 0,7275	Yes	*	0,0102

Suppl. 35. ANOVA a due vie del rapporto tra chl *a* e chl *b* delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *fase di crescita (growth phase)* e *mezzo di crescita (media)*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	33,10	0,0093	**	Yes
Light	12,24	0,0721	ns	No
Media	31,85	0,0102	*	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	-226,7	-378,8 to -74,56	Yes	**	0,0061
LL:Controllo vs. HL:Controllo	-44,86	-197,0 to 107,3	No	ns	0,7829
LL:Controllo vs. HL:AV	-42,67	-194,8 to 109,5	No	ns	0,8063
LL:AV vs. HL:Controllo	181,8	29,69 to 333,9	Yes	*	0,0210
LL:AV vs. HL:AV	184,0	31,89 to 336,1	Yes	*	0,0197
HL:Controllo vs. HL:AV	2,196	-149,9 to 154,3	No	ns	>0,9999

Suppl. 36. ANOVA a due vie delle proteine per cellula delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	37,29	<0,0001	****	Yes
Light	15,62	0,0003	***	Yes
Media	43,63	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	-0,07567	-0,5272 to 0,3758	No	ns	0,9476
LL:Controllo vs. HL:Controllo	0,3267	-0,1248 to 0,7782	No	ns	0,1731
LL:Controllo vs. HL:AV	-1,601	-2,052 to -1,149	Yes	****	<0,0001
LL:AV vs. HL:Controllo	0,4023	-0,04918 to 0,8538	No	ns	0,0818
LL:AV vs. HL:AV	-1,525	-1,977 to -1,073	Yes	****	<0,0001
HL:Controllo vs. HL:AV	-1,927	-2,379 to -1,476	Yes	****	<0,0001

Suppl. 37. ANOVA a due vie del rapporto carboidrati/proteine delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	4,133	0,3634	ns	No
Light	44,10	0,0136	*	Yes
Media	16,17	0,0931	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	0,02233	-0,01291 to 0,05758	No	ns	0,2542
LL:Controllo vs. HL:Controllo	0,03200	-0,003242 to 0,06724	No	ns	0,0758
LL:Controllo vs. HL:AV	0,03933	0,004091 to 0,07458	Yes	*	0,0298
LL:AV vs. HL:Controllo	0,009667	-0,02558 to 0,04491	No	ns	0,8160
LL:AV vs. HL:AV	0,01700	-0,01824 to 0,05224	No	ns	0,4573
HL:Controllo vs. HL:AV	0,007333	-0,02791 to 0,04258	No	ns	0,9068

Suppl. 38. ANOVA a due vie del rapporto lipidi/proteine delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	21,16	0,0014	**	Yes
Light	17,04	0,0027	**	Yes
Media	54,35	<0,0001	****	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	0,01567	-0,009035 to 0,04037	No	ns	0,2536
LL:Controllo vs. HL:Controllo	-0,002667	-0,02737 to 0,02204	No	ns	0,9848
LL:Controllo vs. HL:AV	0,06500	0,04030 to 0,08970	Yes	***	0,0001
LL:AV vs. HL:Controllo	-0,01833	-0,04304 to 0,006368	No	ns	0,1594
LL:AV vs. HL:AV	0,04933	0,02463 to 0,07404	Yes	***	0,0010
HL:Controllo vs. HL:AV	0,06767	0,04296 to 0,09237	Yes	***	0,0001

Suppl. 39. ANOVA a due vie del rapporto lipidi/carboidrati delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	3,804	0,2272	ns	No
Light	1,225	0,4791	ns	No
Media	77,19	0,0004	***	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	-500,4	-815,1 to -185,6	Yes	**	0,0041
LL:Controllo vs. HL:Controllo	-39,31	-354,0 to 275,4	No	ns	0,9769
LL:Controllo vs. HL:AV	-357,9	-672,6 to -43,16	Yes	*	0,0271
LL:AV vs. HL:Controllo	461,0	146,3 to 775,8	Yes	**	0,0068
LL:AV vs. HL:AV	142,5	-172,2 to 457,2	No	ns	0,5063
HL:Controllo vs. HL:AV	-318,6	-633,3 to -3,843	Yes	*	0,0473

Suppl. 40. ANOVA a due vie dei carboidrati (UA cell⁻¹) delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	32,59	0,0094	**	Yes
Light	18,26	0,0347	*	Yes
Media	26,53	0,0155	*	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	-50,73	-86,31 to -15,15	Yes	**	0,0079
LL:Controllo vs. HL:Controllo	-6,709	-42,29 to 28,87	No	ns	0,9280
LL:Controllo vs. HL:AV	-4,100	-39,68 to 31,48	No	ns	0,9816
LL:AV vs. HL:Controllo	44,02	8,442 to 79,60	Yes	*	0,0175
LL:AV vs. HL:AV	46,63	11,05 to 82,21	Yes	*	0,0128
HL:Controllo vs. HL:AV	2,609	-32,97 to 38,19	No	ns	0,9951

Suppl. 41. ANOVA a due vie dei lipidi (UA cell⁻¹) delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	6,070	0,0628	ns	No
Light	70,26	<0,0001	****	Yes
Molecole	13,31	0,0070	**	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Proteine vs. LL:Carboidrati	-0,09033	-1,030 to 0,8493	No	ns	0,9994
LL:Proteine vs. LL:Lipidi	0,2460	-0,6936 to 1,186	No	ns	0,9445
LL:Proteine vs. HL:Proteine	1,851	0,9110 to 2,790	Yes	***	0,0003
LL:Proteine vs. HL:Carboidrati	0,7713	-0,1683 to 1,711	No	ns	0,1336
LL:Proteine vs. HL:Lipidi	1,905	0,9657 to 2,845	Yes	***	0,0002
LL:Carboidrati vs. LL:Lipidi	0,3363	-0,6033 to 1,276	No	ns	0,8278
LL:Carboidrati vs. HL:Proteine	1,941	1,001 to 2,881	Yes	***	0,0002
LL:Carboidrati vs. HL:Carboidrati	0,8617	-0,07795 to 1,801	No	ns	0,0794
LL:Carboidrati vs. HL:Lipidi	1,996	1,056 to 2,935	Yes	***	0,0001
LL:Lipidi vs. HL:Proteine	1,605	0,6650 to 2,544	Yes	**	0,0010
LL:Lipidi vs. HL:Carboidrati	0,5253	-0,4143 to 1,465	No	ns	0,4579
LL:Lipidi vs. HL:Lipidi	1,659	0,7197 to 2,599	Yes	***	0,0008
HL:Proteine vs. HL:Carboidrati	-1,079	-2,019 to -0,1397	Yes	*	0,0215
HL:Proteine vs. HL:Lipidi	0,05467	-0,8850 to 0,9943	No	ns	>0,9999
HL:Carboidrati vs. HL:Lipidi	1,134	0,1944 to 2,074	Yes	*	0,0155

Suppl. 42. ANOVA a due vie del rapporto rispetto al controllo delle tre classi molecolari considerato delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *molecola (molecole)* in fase esponenziale.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Proteine vs. Carboidrati	0,4677	-0,5154 to 1,451	No	ns	0,3724
Proteine vs. Lipidi	0,2823	-0,7007 to 1,265	No	ns	0,6707
Carboidrati vs. Lipidi	-0,1853	-1,168 to 0,7977	No	ns	0,8362

Suppl. 43. ANOVA a una via del rapporto rispetto al controllo delle tre classi molecolari considerato delle colture esposte ad AV diluite in fase stazionaria.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	3,394	0,4002	ns	No
Growth phase	73,44	<0,0001	****	Yes
Molecole	2,579	0,4926	ns	No

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Esponenziale:Proteine vs. Esponenziale:Carboidrati	-0,09033	-1,145 to 0,9640	No	ns	0,9997
Esponenziale:Proteine vs. Esponenziale:Lipidi	0,2460	-0,8083 to 1,300	No	ns	0,9652
Esponenziale:Proteine vs. Stazionaria:Proteine	0,9877	-0,06666 to 2,042	No	ns	0,0712
Esponenziale:Proteine vs. Stazionaria:Carboidrati	1,455	0,4010 to 2,510	Yes	**	0,0059
Esponenziale:Proteine vs. Stazionaria:Lipidi	1,270	0,2157 to 2,324	Yes	*	0,0157
Esponenziale:Carboidrati vs. Esponenziale:Lipidi	0,3363	-0,7180 to 1,391	No	ns	0,8835
Esponenziale:Carboidrati vs. Stazionaria:Proteine	1,078	0,02367 to 2,132	Yes	*	0,0441
Esponenziale:Carboidrati vs. Stazionaria:Carboidrati	1,546	0,4913 to 2,600	Yes	**	0,0037
Esponenziale:Carboidrati vs. Stazionaria:Lipidi	1,360	0,3060 to 2,415	Yes	**	0,0097
Esponenziale:Lipidi vs. Stazionaria:Proteine	0,7417	-0,3127 to 1,796	No	ns	0,2427
Esponenziale:Lipidi vs. Stazionaria:Carboidrati	1,209	0,1550 to 2,264	Yes	*	0,0217
Esponenziale:Lipidi vs. Stazionaria:Lipidi	1,024	-0,03033 to 2,078	No	ns	0,0588
Stazionaria:Proteine vs. Stazionaria:Carboidrati	0,4677	-0,5867 to 1,522	No	ns	0,6765
Stazionaria:Proteine vs. Stazionaria:Lipidi	0,2823	-0,7720 to 1,337	No	ns	0,9394
Stazionaria:Carboidrati vs. Stazionaria:Lipidi	-0,1853	-1,240 to 0,8690	No	ns	0,9898

Suppl. 44. ANOVA a due vie del rapporto rispetto al controllo delle tre classi molecolari considerato delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *fase di crescita (growth phase)* e *molecola (molecule)*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,5833	0,4641	ns	No
Light	73,36	<0,0001	****	Yes
Media	18,17	0,0027	**	Yes

Tukey's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
LL:Controllo vs. LL:AV	1,402	0,1469 to 2,656	Yes	*	0,0296
LL:Controllo vs. HL:Controllo	-2,176	-3,430 to -0,9209	Yes	**	0,0024
LL:Controllo vs. HL:AV	-1,200	-2,455 to 0,05475	No	ns	0,0609
LL:AV vs. HL:Controllo	-3,577	-4,832 to -2,323	Yes	****	<0,0001
LL:AV vs. HL:AV	-2,602	-3,856 to -1,347	Yes	***	0,0007
HL:Controllo vs. HL:AV	0,9757	-0,2791 to 2,230	No	ns	0,1363

Suppl. 45. ANOVA a due vie dell'indice di riduzione delle colture esposte ad AV diluite per i parametri *luce (light)* e *mezzo di crescita (media)* in fase esponenziale.

6.4. Valutazione degli effetti tossici dei composti fenolici e delle AV diluite su cellule non acclimatate

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Ctr LL vs. Tirosole	-0,1183	-11,26 to 11,02	No	ns	>0,9999
Ctr LL vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-5,075	-17,27 to 7,125	No	ns	0,7360
Ctr LL vs. Acido caffeico	-7,998	-19,14 to 3,138	No	ns	0,2209
Ctr LL vs. Mix	-4,570	-16,77 to 7,630	No	ns	0,8116
Ctr LL vs. Ctr HL	-6,090	-18,29 to 6,110	No	ns	0,5703
Ctr LL vs. AV HL	-25,75	-36,89 to -14,61	Yes	***	0,0001
Tirosole vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-4,957	-16,09 to 6,180	No	ns	0,6790
Tirosole vs. Acido caffeico	-7,880	-17,84 to 2,081	No	ns	0,1526
Tirosole vs. Mix	-4,452	-15,59 to 6,685	No	ns	0,7667
Tirosole vs. Ctr HL	-5,972	-17,11 to 5,165	No	ns	0,4978
Tirosole vs. AV HL	-25,63	-35,59 to -15,67	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-2,923	-14,06 to 8,213	No	ns	0,9542
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,5050	-11,69 to 12,70	No	ns	>0,9999
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Ctr HL	-1,015	-13,21 to 11,18	No	ns	>0,9999
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-20,67	-31,81 to -9,537	Yes	***	0,0007
Acido caffeico vs. Mix	3,428	-7,708 to 14,57	No	ns	0,9095
Acido caffeico vs. Ctr HL	1,908	-9,228 to 13,05	No	ns	0,9944
Acido caffeico vs. AV HL	-17,75	-27,71 to -7,789	Yes	***	0,0010
Mix vs. Ctr HL	-1,520	-13,72 to 10,68	No	ns	0,9990
Mix vs. AV HL	-21,18	-32,32 to -10,04	Yes	***	0,0006
Ctr HL vs. AV HL	-19,66	-30,80 to -8,522	Yes	**	0,0010

Suppl. 46. ANOVA a una via delle PI della biomassa algale dopo saggio del DPPH nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 2° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Ctr LL vs. Tirosolo	5,878	-1,924 to 13,68	No	ns	0,2019
Ctr LL vs. Acido <i>p</i> -cumarico	7,808	0,005904 to 15,61	Yes	*	0,0498
Ctr LL vs. Acido caffeico	12,94	5,136 to 20,74	Yes	**	0,0010
Ctr LL vs. Mix	14,68	6,879 to 22,48	Yes	***	0,0003
Ctr LL vs. Ctr HL	3,455	-4,347 to 11,26	No	ns	0,7245
Ctr LL vs. AV HL	1,038	-6,764 to 8,841	No	ns	0,9990
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,930	-5,049 to 8,909	No	ns	0,9554
Tirosolo vs. Acido caffeico	7,060	0,08129 to 14,04	Yes	*	0,0467
Tirosolo vs. Mix	8,803	1,825 to 15,78	Yes	*	0,0104
Tirosolo vs. Ctr HL	-2,423	-9,402 to 4,555	No	ns	0,8825
Tirosolo vs. AV HL	-4,840	-11,82 to 2,139	No	ns	0,2736
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	5,130	-1,849 to 12,11	No	ns	0,2220
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	6,873	-0,1054 to 13,85	No	ns	0,0547
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Ctr HL	-4,353	-11,33 to 2,625	No	ns	0,3789
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-6,770	-13,75 to 0,2087	No	ns	0,0597
Acido caffeico vs. Mix	1,743	-5,235 to 8,722	No	ns	0,9723
Acido caffeico vs. Ctr HL	-9,483	-16,46 to -2,505	Yes	**	0,0058
Acido caffeico vs. AV HL	-11,90	-18,88 to -4,921	Yes	***	0,0008
Mix vs. Ctr HL	-11,23	-18,21 to -4,248	Yes	**	0,0014
Mix vs. AV HL	-13,64	-20,62 to -6,665	Yes	***	0,0002
Ctr HL vs. AV HL	-2,417	-9,395 to 4,562	No	ns	0,8838

Suppl. 47. ANOVA a una via delle PI della biomassa algale dopo saggio del DPPH nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 7° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	3,053	-12,14 to 18,25	No	ns	0,9605
Tirosolo vs. Acido caffeico	-4,203	-19,40 to 10,99	No	ns	0,8866
Tirosolo vs. Mix	-5,053	-20,25 to 10,14	No	ns	0,8057
Tirosolo vs. AV HL	-57,96	-73,15 to -42,76	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-7,257	-22,45 to 7,941	No	ns	0,5446
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	-8,107	-23,30 to 7,091	No	ns	0,4462
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-61,01	-76,21 to -45,81	Yes	****	<0,0001
Acido caffeico vs. Mix	-0,8500	-16,05 to 14,35	No	ns	0,9997
Acido caffeico vs. AV HL	-53,75	-68,95 to -38,56	Yes	****	<0,0001
Mix vs. AV HL	-52,90	-68,10 to -37,71	Yes	****	<0,0001

Suppl. 48. ANOVA a una via delle PI del mezzo di crescita dopo saggio del DPPH nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 2° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-1,548	-14,82 to 11,72	No	ns	0,9946
Tirosolo vs. Acido caffeico	0,000	-13,27 to 13,27	No	ns	>0,9999
Tirosolo vs. Mix	-6,096	-19,37 to 7,177	No	ns	0,5781
Tirosolo vs. AV HL	-42,86	-56,14 to -29,59	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	1,548	-11,72 to 14,82	No	ns	0,9946
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	-4,548	-17,82 to 8,725	No	ns	0,7892
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-41,32	-54,59 to -28,04	Yes	****	<0,0001
Acido caffeico vs. Mix	-6,096	-19,37 to 7,177	No	ns	0,5781
Acido caffeico vs. AV HL	-42,86	-56,14 to -29,59	Yes	****	<0,0001
Mix vs. AV HL	-36,77	-50,04 to -23,50	Yes	****	<0,0001

Suppl. 49. ANOVA a una via delle PI del mezzo di crescita dopo saggio del DPPH nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 7° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	4,730	-4,529 to 13,99	No	ns	0,4849
Tirosolo vs. Acido caffeico	-2,957	-12,22 to 6,302	No	ns	0,8265
Tirosolo vs. Mix	-6,557	-15,82 to 2,702	No	ns	0,2122
Tirosolo vs. AV	-60,45	-69,71 to -51,19	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-7,687	-16,95 to 1,572	No	ns	0,1179
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	-11,29	-20,55 to -2,028	Yes	*	0,0164
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV	-65,18	-74,44 to -55,92	Yes	****	<0,0001
Acido caffeico vs. Mix	-3,600	-12,86 to 5,659	No	ns	0,7085
Acido caffeico vs. AV	-57,50	-66,76 to -48,24	Yes	****	<0,0001
Mix vs. AV	-53,90	-63,16 to -44,64	Yes	****	<0,0001

Suppl. 50. ANOVA a una via delle PI del mezzo di crescita dopo saggio del DPPH nella prova senza alghe a 0h.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,3233	-8,367 to 7,720	No	ns	>0,9999
Tirosolo vs. Acido caffeico	-9,680	-17,72 to -1,636	Yes	*	0,0177
Tirosolo vs. Mix	-11,56	-19,61 to -3,520	Yes	**	0,0056
Tirosolo vs. AV	-58,15	-66,20 to -50,11	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-9,357	-17,40 to -1,313	Yes	*	0,0217
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	-11,24	-19,28 to -3,196	Yes	**	0,0068
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV	-57,83	-65,87 to -49,79	Yes	****	<0,0001
Acido caffeico vs. Mix	-1,883	-9,927 to 6,160	No	ns	0,9335
Acido caffeico vs. AV	-48,47	-56,52 to -40,43	Yes	****	<0,0001
Mix vs. AV	-46,59	-54,63 to -38,55	Yes	****	<0,0001

Suppl. 51. ANOVA a una via delle PI del mezzo di crescita dopo saggio del DPPH nella prova senza alghe a 1h.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Tirosolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-6,907	-13,42 to -0,3896	Yes	*	0,0368
Tirosolo vs. Acido caffeico	-5,180	-11,70 to 1,337	No	ns	0,1403
Tirosolo vs. Mix	-11,00	-17,52 to -4,486	Yes	**	0,0017
Tirosolo vs. AV	-63,57	-70,09 to -57,06	Yes	****	<0,0001
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	1,727	-4,790 to 8,244	No	ns	0,9008
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	-4,097	-10,61 to 2,420	No	ns	0,3034
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV	-56,67	-63,18 to -50,15	Yes	****	<0,0001
Acido caffeico vs. Mix	-5,823	-12,34 to 0,6937	No	ns	0,0859
Acido caffeico vs. AV	-58,39	-64,91 to -51,88	Yes	****	<0,0001
Mix vs. AV	-52,57	-59,09 to -46,05	Yes	****	<0,0001

Suppl. 52. ANOVA a una via delle PI del mezzo di crescita dopo saggio del DPPH nella prova senza alghe a 24h.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-8,500	-13,35 to -3,646	Yes	****	<0,0001
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-4,833	-10,26 to 0,5941	No	ns	0,1065
Controllo negativo vs. Acido caffeico	-6,833	-12,26 to -1,406	Yes	**	0,0066
Controllo negativo vs. Mix	0,2500	-4,604 to 5,104	No	ns	>0,9999
Controllo negativo vs. Controllo HL	-3,917	-8,771 to 0,9378	No	ns	0,1798
Controllo negativo vs. AV HL	-5,750	-10,60 to -0,8956	Yes	*	0,0121
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	3,667	-1,761 to 9,094	No	ns	0,3622
Tirolo vs. Acido caffeico	1,667	-3,761 to 7,094	No	ns	0,9574
Tirolo vs. Mix	8,750	3,896 to 13,60	Yes	****	<0,0001
Tirolo vs. Controllo HL	4,583	-0,2711 to 9,438	No	ns	0,0742
Tirolo vs. AV HL	2,750	-2,104 to 7,604	No	ns	0,5678
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-2,000	-7,945 to 3,945	No	ns	0,9351
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	5,083	-0,3441 to 10,51	No	ns	0,0782
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	0,9167	-4,511 to 6,344	No	ns	0,9981
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-0,9167	-6,344 to 4,511	No	ns	0,9981
Acido caffeico vs. Mix	7,083	1,656 to 12,51	Yes	**	0,0045
Acido caffeico vs. Controllo HL	2,917	-2,511 to 8,344	No	ns	0,6257
Acido caffeico vs. AV HL	1,083	-4,344 to 6,511	No	ns	0,9953
Mix vs. Controllo HL	-4,167	-9,021 to 0,6878	No	ns	0,1311
Mix vs. AV HL	-6,000	-10,85 to -1,146	Yes	**	0,0080
Controllo HL vs. AV HL	-1,833	-6,688 to 3,021	No	ns	0,8928

Suppl. 53. ANOVA a una via della TL delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 1° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-0,1118	-0,2010 to -0,02264	Yes	**	0,0066
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,04150	-0,1307 to 0,04769	No	ns	0,7687
Controllo negativo vs. Acido caffeico	-0,06483	-0,1540 to 0,02436	No	ns	0,2855
Controllo negativo vs. Mix	-0,01250	-0,1017 to 0,07669	No	ns	0,9994
Controllo negativo vs. Controllo HL	-0,07783	-0,1670 to 0,01136	No	ns	0,1211
Controllo negativo vs. AV HL	-0,1883	-0,2775 to -0,09914	Yes	****	<0,0001
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,07033	-0,01886 to 0,1595	No	ns	0,2032
Tirolo vs. Acido caffeico	0,04700	-0,04219 to 0,1362	No	ns	0,6538
Tirolo vs. Mix	0,09933	0,01014 to 0,1885	Yes	*	0,0209
Tirolo vs. Controllo HL	0,03400	-0,05519 to 0,1232	No	ns	0,8926
Tirolo vs. AV HL	-0,07650	-0,1657 to 0,01269	No	ns	0,1333
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-0,02333	-0,1125 to 0,06586	No	ns	0,9815
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,02900	-0,06019 to 0,1182	No	ns	0,9467
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-0,03633	-0,1255 to 0,05286	No	ns	0,8592
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-0,1468	-0,2360 to -0,05764	Yes	***	0,0002
Acido caffeico vs. Mix	0,05233	-0,03686 to 0,1415	No	ns	0,5351
Acido caffeico vs. Controllo HL	-0,01300	-0,1022 to 0,07619	No	ns	0,9992
Acido caffeico vs. AV HL	-0,1235	-0,2127 to -0,03431	Yes	**	0,0021
Mix vs. Controllo HL	-0,06533	-0,1545 to 0,02386	No	ns	0,2772
Mix vs. AV HL	-0,1758	-0,2650 to -0,08664	Yes	****	<0,0001
Controllo HL vs. AV HL	-0,1105	-0,1997 to -0,02131	Yes	**	0,0075

Suppl. 54. ANOVA a una via della TI delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 1° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-0,9438	-1,740 to -0,1478	Yes	*	0,0117
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,3247	-1,121 to 0,4714	No	ns	0,8575
Controllo negativo vs. Acido caffeico	-0,5560	-1,352 to 0,2401	No	ns	0,3287
Controllo negativo vs. Mix	0,04793	-0,7870 to 0,8829	No	ns	>0,9999
Controllo negativo vs. Controllo HL	-0,6215	-1,418 to 0,1746	No	ns	0,2119
Controllo negativo vs. AV HL	-1,881	-2,677 to -1,085	Yes	****	<0,0001
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,6192	-0,1769 to 1,415	No	ns	0,2154
Tirolo vs. Acido caffeico	0,3878	-0,4082 to 1,184	No	ns	0,7280
Tirolo vs. Mix	0,9918	0,1568 to 1,827	Yes	*	0,0115
Tirolo vs. Controllo HL	0,3223	-0,4737 to 1,118	No	ns	0,8615
Tirolo vs. AV HL	-0,9368	-1,733 to -0,1408	Yes	*	0,0126
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-0,2313	-1,027 to 0,5647	No	ns	0,9684
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,3726	-0,4623 to 1,208	No	ns	0,7993
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-0,2968	-1,093 to 0,4992	No	ns	0,9013
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-1,556	-2,352 to -0,7599	Yes	****	<0,0001
Acido caffeico vs. Mix	0,6039	-0,2310 to 1,439	No	ns	0,2898
Acido caffeico vs. Controllo HL	-0,06550	-0,8616 to 0,7306	No	ns	>0,9999
Acido caffeico vs. AV HL	-1,325	-2,121 to -0,5286	Yes	***	0,0002
Mix vs. Controllo HL	-0,6694	-1,504 to 0,1655	No	ns	0,1874
Mix vs. AV HL	-1,929	-2,764 to -1,094	Yes	****	<0,0001
Controllo HL vs. AV HL	-1,259	-2,055 to -0,4631	Yes	***	0,0004

Suppl. 55. ANOVA a una via del TM delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 1° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-8,167	-13,70 to -2,633	Yes	***	0,0010
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-2,833	-8,367 to 2,700	No	ns	0,6811
Controllo negativo vs. Acido caffeico	-4,500	-10,03 to 1,034	No	ns	0,1751
Controllo negativo vs. Mix	0,6000	-5,204 to 6,404	No	ns	0,9999
Controllo negativo vs. Controllo HL	-3,333	-8,867 to 2,200	No	ns	0,5026
Controllo negativo vs. AV HL	-5,167	-10,70 to 0,3669	No	ns	0,0802
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	5,333	-0,2003 to 10,87	No	ns	0,0649
Tirolo vs. Acido caffeico	3,667	-1,867 to 9,200	No	ns	0,3896
Tirolo vs. Mix	8,767	2,963 to 14,57	Yes	***	0,0007
Tirolo vs. Controllo HL	4,833	-0,7003 to 10,37	No	ns	0,1201
Tirolo vs. AV HL	3,000	-2,534 to 8,534	No	ns	0,6222
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-1,667	-7,200 to 3,867	No	ns	0,9625
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	3,433	-2,370 to 9,237	No	ns	0,5239
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-0,5000	-6,034 to 5,034	No	ns	>0,9999
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-2,333	-7,867 to 3,200	No	ns	0,8377
Acido caffeico vs. Mix	5,100	-0,7037 to 10,90	No	ns	0,1161
Acido caffeico vs. Controllo HL	1,167	-4,367 to 6,700	No	ns	0,9939
Acido caffeico vs. AV HL	-0,6667	-6,200 to 4,867	No	ns	0,9997
Mix vs. Controllo HL	-3,933	-9,737 to 1,870	No	ns	0,3632
Mix vs. AV HL	-5,767	-11,57 to 0,03700	No	ns	0,0524
Controllo HL vs. AV HL	-1,833	-7,367 to 3,700	No	ns	0,9414

Suppl. 56. ANOVA a una via della Tmig delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV al 1° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-0,5000	-2,657 to 1,657	No	ns	0,9901
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,5000	-1,657 to 2,657	No	ns	0,9901
Controllo negativo vs. Acido caffeico	0,000	-2,157 to 2,157	No	ns	>0,9999
Controllo negativo vs. Mix	1,167	-0,9904 to 3,324	No	ns	0,6265
Controllo negativo vs. Controllo HL	-0,6667	-2,824 to 1,490	No	ns	0,9580
Controllo negativo vs. AV HL	0,6667	-1,490 to 2,824	No	ns	0,9580
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	1,000	-1,157 to 3,157	No	ns	0,7716
Tirolo vs. Acido caffeico	0,5000	-1,657 to 2,657	No	ns	0,9901
Tirolo vs. Mix	1,667	-0,4904 to 3,824	No	ns	0,2226
Tirolo vs. Controllo HL	-0,1667	-2,324 to 1,990	No	ns	>0,9999
Tirolo vs. AV HL	1,167	-0,9904 to 3,324	No	ns	0,6265
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	-0,5000	-2,657 to 1,657	No	ns	0,9901
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,6667	-1,490 to 2,824	No	ns	0,9580
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-1,167	-3,324 to 0,9904	No	ns	0,6265
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	0,1667	-1,990 to 2,324	No	ns	>0,9999
Acido caffeico vs. Mix	1,167	-0,9904 to 3,324	No	ns	0,6265
Acido caffeico vs. Controllo HL	-0,6667	-2,824 to 1,490	No	ns	0,9580
Acido caffeico vs. AV HL	0,6667	-1,490 to 2,824	No	ns	0,9580
Mix vs. Controllo HL	-1,833	-3,990 to 0,3238	No	ns	0,1401
Mix vs. AV HL	-0,5000	-2,657 to 1,657	No	ns	0,9901
Controllo HL vs. AV HL	1,333	-0,8238 to 3,490	No	ns	0,4738

Suppl. 57. ANOVA a una via della TL delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimate ai composti fenolici e alle AV all'8° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-0,01150	-0,05026 to 0,02726	No	ns	0,9655
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,01500	-0,05376 to 0,02376	No	ns	0,8857
Controllo negativo vs. Acido caffeico	-0,006667	-0,04543 to 0,03210	No	ns	0,9980
Controllo negativo vs. Mix	0,000	-0,03876 to 0,03876	No	ns	>0,9999
Controllo negativo vs. Controllo HL	-0,03167	-0,07043 to 0,007095	No	ns	0,1718
Controllo negativo vs. AV HL	-0,05883	-0,09760 to -0,02007	Yes	***	0,0006
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,003500	-0,04226 to 0,03526	No	ns	>0,9999
Tirolo vs. Acido caffeico	0,004833	-0,03393 to 0,04360	No	ns	0,9997
Tirolo vs. Mix	0,01150	-0,02726 to 0,05026	No	ns	0,9655
Tirolo vs. Controllo HL	-0,02017	-0,05893 to 0,01860	No	ns	0,6669
Tirolo vs. AV HL	-0,04733	-0,08610 to -0,008571	Yes	**	0,0087
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,008333	-0,03043 to 0,04710	No	ns	0,9934
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,01500	-0,02376 to 0,05376	No	ns	0,8857
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-0,01667	-0,05543 to 0,02210	No	ns	0,8264
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-0,04383	-0,08260 to -0,005071	Yes	*	0,0182
Acido caffeico vs. Mix	0,006667	-0,03210 to 0,04543	No	ns	0,9980
Acido caffeico vs. Controllo HL	-0,02500	-0,06376 to 0,01376	No	ns	0,4231
Acido caffeico vs. AV HL	-0,05217	-0,09093 to -0,01340	Yes	**	0,0030
Mix vs. Controllo HL	-0,03167	-0,07043 to 0,007095	No	ns	0,1718
Mix vs. AV HL	-0,05883	-0,09760 to -0,02007	Yes	***	0,0006
Controllo HL vs. AV HL	-0,02717	-0,06593 to 0,01160	No	ns	0,3260

Suppl. 58. ANOVA a una via della TI delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV all'8° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-0,04433	-0,2090 to 0,1203	No	ns	0,9786
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,06183	-0,2265 to 0,1028	No	ns	0,8992
Controllo negativo vs. Acido caffeico	-0,02167	-0,1863 to 0,1430	No	ns	0,9996
Controllo negativo vs. Mix	-0,01467	-0,1793 to 0,1500	No	ns	>0,9999
Controllo negativo vs. Controllo HL	-0,1520	-0,3167 to 0,01265	No	ns	0,0864
Controllo negativo vs. AV HL	-0,2795	-0,4442 to -0,1148	Yes	***	0,0001
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	-0,01750	-0,1822 to 0,1472	No	ns	0,9999
Tirolo vs. Acido caffeico	0,02267	-0,1420 to 0,1873	No	ns	0,9994
Tirolo vs. Mix	0,02967	-0,1350 to 0,1943	No	ns	0,9975
Tirolo vs. Controllo HL	-0,1077	-0,2723 to 0,05699	No	ns	0,4067
Tirolo vs. AV HL	-0,2352	-0,3998 to -0,07051	Yes	**	0,0014
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,04017	-0,1245 to 0,2048	No	ns	0,9871
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,04717	-0,1175 to 0,2118	No	ns	0,9709
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-0,09017	-0,2548 to 0,07449	No	ns	0,6130
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	-0,2177	-0,3823 to -0,05301	Yes	**	0,0037
Acido caffeico vs. Mix	0,007000	-0,1577 to 0,1717	No	ns	>0,9999
Acido caffeico vs. Controllo HL	-0,1303	-0,2950 to 0,03432	No	ns	0,1997
Acido caffeico vs. AV HL	-0,2578	-0,4225 to -0,09318	Yes	***	0,0004
Mix vs. Controllo HL	-0,1373	-0,3020 to 0,02732	No	ns	0,1547
Mix vs. AV HL	-0,2648	-0,4295 to -0,1002	Yes	***	0,0003
Controllo HL vs. AV HL	-0,1275	-0,2922 to 0,03715	No	ns	0,2205

Suppl. 59. ANOVA a una via del TM delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV all'8° giorno.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
Controllo negativo vs. Tirolo	-0,5000	-2,466 to 1,466	No	ns	0,9840
Controllo negativo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,2500	-1,716 to 2,216	No	ns	0,9996
Controllo negativo vs. Acido caffeico	0,3333	-1,633 to 2,300	No	ns	0,9982
Controllo negativo vs. Mix	1,167	-0,7995 to 3,133	No	ns	0,5221
Controllo negativo vs. Controllo HL	-0,6667	-2,633 to 1,300	No	ns	0,9355
Controllo negativo vs. AV HL	1,000	-0,9662 to 2,966	No	ns	0,6894
Tirolo vs. Acido <i>p</i> -cumarico	0,7500	-1,216 to 2,716	No	ns	0,8923
Tirolo vs. Acido caffeico	0,8333	-1,133 to 2,800	No	ns	0,8357
Tirolo vs. Mix	1,667	-0,2995 to 3,633	No	ns	0,1421
Tirolo vs. Controllo HL	-0,1667	-2,133 to 1,800	No	ns	>0,9999
Tirolo vs. AV HL	1,500	-0,4662 to 3,466	No	ns	0,2352
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Acido caffeico	0,08333	-1,883 to 2,050	No	ns	>0,9999
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Mix	0,9167	-1,050 to 2,883	No	ns	0,7671
Acido <i>p</i> -cumarico vs. Controllo HL	-0,9167	-2,883 to 1,050	No	ns	0,7671
Acido <i>p</i> -cumarico vs. AV HL	0,7500	-1,216 to 2,716	No	ns	0,8923
Acido caffeico vs. Mix	0,8333	-1,133 to 2,800	No	ns	0,8357
Acido caffeico vs. Controllo HL	-1,000	-2,966 to 0,9662	No	ns	0,6894
Acido caffeico vs. AV HL	0,6667	-1,300 to 2,633	No	ns	0,9355
Mix vs. Controllo HL	-1,833	-3,800 to 0,1329	No	ns	0,0811
Mix vs. AV HL	-0,1667	-2,133 to 1,800	No	ns	>0,9999
Controllo HL vs. AV HL	1,667	-0,2995 to 3,633	No	ns	0,1421

Suppl. 60. ANOVA a una via della Tmig delle cellule dopo Comet assay nelle colture non acclimatate ai composti fenolici e alle AV all'8° giorno.

Capitolo settimo

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699.
- Aboul-Enein, H. Y., Kruk, I., Kładna, A., Lichsztełd, K., & Michalska, T. (2007). Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers*, 86(3), 222–230. <https://doi.org/10.1002/bip.20725>
- Al-Hoqani, U., Young, R., & Purton, S. (2017). The biotechnological potential of Nannochloropsis. *Perspectives in Phycology*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1127/pip/2016/0065>
- Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R., & Martini, M. (2018). Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality – A review. *Livestock Science*, 214, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.05.006>
- Assunção, J., & Malcata, F. X. (2020). Enclosed “non-conventional” photobioreactors for microalga production: A review. *Algal Research*, 52, 102107. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102107>
- Assunção, M. F. G., Amaral, R., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Ressurreição, S., Santos, S. D., Varejão, J. M. T. B., & Santos, L. M. A. (2017). Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 865–877. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0980-7>
- Belcher, J. H., & Swale, E. M. F. (1977). Species of *Thalassiosira* (Diatoms, Bacillariophyceae) in the plankton of English rivers. *British Phycological Journal*, 12(3), 291–296. <https://doi.org/10.1080/00071617700650311>
- Blainski, A., Lopes, G., & de Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23–72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>

- Branco-Vieira, M., San Martin, S., Agurto, C., Freitas, M. A. V., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Biotechnological potential of *Phaeodactylum tricornutum* for biorefinery processes. *Fuel*, 268, 117357. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117357>
- Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Assis, L. R. de, & Lorentz, J. F. (2022). Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, 305, 135508. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135508>
- Çelebi, H., Bahadır, T., Şimşek, İ., & Tulun, Ş. (2021). Use of *Dunaliella salina* in Environmental Applications; *Proceedings of 1st International Electronic Conference on Biological Diversity, Ecology and Evolution*, 9411. <https://doi.org/10.3390/BDEE2021-09411>
- Chen, F., Leng, Y., Lu, Q., & Zhou, W. (2021). The application of microalgae biomass and bio-products as aquafeed for aquaculture. *Algal Research*, 60, 102541. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102541>
- Cheng, Z., Ren, J., Li, Y., Chang, W., & Chen, Z. (2002). Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(12), 4067–4073. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00267-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00267-5)
- Cho, K., Lee, C.-H., Ko, K., Lee, Y.-J., Kim, K.-N., Kim, M.-K., Chung, Y.-H., Kim, D., Yeo, I.-K., & Oda, T. (2016). Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 17, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.023>
- Cicci, A., Stoller, M., & Bravi, M. (2013). Microalgal biomass production by using ultra- and nanofiltration membrane fractions of olive mill wastewater. *Water Research*, 47(13), 4710–4718. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.030>
- Danellakis, D., Ntaikou, I., Kornaros, M., & Dailianis, S. (2011). Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 101(2), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.015>
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Olszowy, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation

- of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037–1043.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>
- de Farias Silva, C. E., Bertucco, A., Vieira, R. C., Abud, A. K. de S., & Silva Almeida, F. B. P. da. (2022). *Synechococcus* PCC 7002 to produce a carbohydrate-rich biomass treating urban wastewater. *Biofuels*, 13(5), 551–558.
<https://doi.org/10.1080/17597269.2020.1802809>
- de Sousa Andrade, L. N., Lima, T. M. de, Curi, R., & Castrucci, A. M. de L. (2005). Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro*, 19(4), 553–560.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.02.002>
- Deeb, A. A., Fayyad, M. K., & Alawi, M. A. (2012). Separation of Polyphenols from Jordanian Olive Oil Mill Wastewater. *Chromatography Research International*, 2012, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2012/812127>
- Deepachandi, B., Weerasinghe, S., Andrahennadi, T. P., Karunaweera, N. D., Wickramarachchi, N., Soysa, P., & Siriwardana, Y. (2020). Quantification of Soluble or Insoluble Fractions of *Leishmania* Parasite Proteins in Microvolume Applications: A Simplification to Standard Lowry Assay. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/6129132>
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532–1552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>
- Di Lena, G., Casini, I., Lucarini, M., & Lombardi-Boccia, G. (2019). Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. *Food Research International*, 120, 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.043>
- Doula, M. K. (n.d.). *Chapter 2—Olive mill waste: Recent advances for the sustainable development of olive oil industry*. 28.
- Duan, W., Meng, F., Lin, Y., & Wang, G. (2017). Toxicological effects of phenol on four marine microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52, 170–176.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.006>
- Duarte, B., Feijão, E., Goessling, J. W., Caçador, I., & Matos, A. R. (2021). Pigment and Fatty Acid Production under Different Light Qualities in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Sciences*, 11(6), 2550. <https://doi.org/10.3390/app11062550>

- Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals: Prooxidant Activity of Polyphenols and Carotenoids. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1379–1391. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., & Sijistima, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *JRC Scientific and policy reports*, 19-37.
- Fanesi, A., Raven, J. A., & Giordano, M. (2014). Growth rate affects the responses of the green alga *Tetraselmis suecica* to external perturbations: Growth rate, homeostasis and acclimation. *Plant, Cell & Environment*, 37(2), 512–519. <https://doi.org/10.1111/pce.12176>
- Faried, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A., & Ali, A. S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 893–913. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>
- Fraeye, I., Bruneel, C., Lemahieu, C., Buyse, J., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: A review. *Food Research International*, 48(2), 961–969. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.014>
- Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., & McNaughton, D. (2001). FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY AS A NOVEL TOOL TO INVESTIGATE CHANGES IN INTRACELLULAR MACROMOLECULAR POOLS IN THE MARINE MICROALGA *CHAETOCEROS MUELLERII* (BACILLARIOPHYCEAE). *Journal of Phycology*, 37(2), 271–279. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037002271.x>
- Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2015). Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, 10, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.025>
- Hodaifa, G., Sánchez, S., Martínez, M. E., & Órpez, R. (2013). Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium. *Applied Energy*, 104, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.005>

- Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14–35.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
- J. Chen, J. G. Jiang, & Q. S. Lin. (2007). Technical Note: Toxicity Tests of Typical Mutagenic Phenols on *Dunaliella salina*. *Transactions of the ASABE*, 50(2), 685–688.
<https://doi.org/10.13031/2013.22657>
- Jebsen, C., Norici, A., Wagner, H., Palmucci, M., Giordano, M., & Wilhelm, C. (2012). FTIR spectra of algal species can be used as physiological fingerprints to assess their actual growth potential. *Physiologia Plantarum*, 146(4), 427–438. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01636.x>
- Jiang, Y., Yoshida, T., & Quigg, A. (2012). Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.012>
- Kamaya, Y., Kurogi, Y., & Suzuki, K. (2003). Acute toxicity of fatty acids to the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology*, 18(5), 289–294.
<https://doi.org/10.1002/tox.10127>
- Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, 24(3), 237–249.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>
- Katiyar, R., Gurjar, B. R., Biswas, S., Pruthi, V., Kumar, N., & Kumar, P. (2017). Microalgae: An emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 1083–1093.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.028>
- Koller, M. (2015). Design of Closed Photobioreactors for Algal Cultivation. In A. Prokop, R. K. Bajpai, & M. E. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries* (pp. 133–186). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_4
- Li, H., Tan, J., Sun, T., Wang, Y., & Meng, F. (2021). Acclimation of *Isochrysis galbana* Parke (Isochrysidaceae) for enhancing its tolerance and biodegradation to high-level phenol in seawater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111571.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111571>

- Liang, M.-H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., & Jiang, J.-G. (2019). High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2423–2441. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>
- Liu, B., Eltanahy, E. E., Liu, H., Chua, E. T., Thomas-Hall, S. R., Wass, T. J., Pan, K., & Schenk, P. M. (2020). Growth-promoting bacteria double eicosapentaenoic acid yield in microalgae. *Bioresource Technology*, 316, 123916. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123916>
- Lovell, C., Eriksen, N., Lewitus, A., & Chen, Y. (2002). Resistance of the marine diatom *Thalassiosira* sp. To toxicity of phenolic compounds. *Marine Ecology Progress Series*, 229, 11–18. <https://doi.org/10.3354/meps229011>
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., & Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10(1), 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-52>
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Medina-Cabrera, E. V., Gansbiller, M., Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2021). Rheological characterization of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117237. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117237>
- Mendhulkar, V. D., & Shetye, L. A. (2017). Synthesis of Biodegradable Polymer Polyhydroxyalkanoate (PHA) in Cyanobacteria *Synechococcus elongates* Under Mixotrophic Nitrogen- and Phosphate-Mediated Stress Conditions. *Industrial Biotechnology*, 13(2), 85–93. <https://doi.org/10.1089/ind.2016.0021>
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>

- Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications – A review. *Energy Procedia*, 160, 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.02.183>
- Mofeed, J., & Abdel-Aal, E. I. (n.d.). *EFFECT OF PHENOL ON SOME ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE MARINE MICROALGA DUNALIELLA SALINA*. 14.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, Dr. I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Norici, A., Dalsass, A., & Giordano, M. (2002). Role of phospho *enol* pyruvate carboxylase in anaplerosis in the green microalga *Dunaliella salina* cultured under different nitrogen regimes. *Physiologia Plantarum*, 116(2), 186–191. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160207.x>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019a). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019b). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>
- Palmucci, M., Ratti, S., & Giordano, M. (2011). ECOLOGICAL AND EVOLUTIONARY IMPLICATIONS OF CARBON ALLOCATION IN MARINE PHYTOPLANKTON AS A FUNCTION OF NITROGEN AVAILABILITY: A FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY APPROACH I: C ALLOCATION AS A FUNCTION OF N AVAILABILITY. *Journal of Phycology*, 47(2), 313–323. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00963.x>
- Pandeirada, C. O., Maricato, É., Ferreira, S. S., Correia, V. G., Pinheiro, B. A., Evtugin, D. V., Palma, A. S., Correia, A., Vilanova, M., Coimbra, M. A., & Nunes, C. (2019). Structural analysis and potential immunostimulatory activity of *Nannochloropsis oculata* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 222, 114962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.06.001>

- Paraskeva, P., & Diamadopoulos, E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: A review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(9), 1475–1485. <https://doi.org/10.1002/jctb.1553>
- Pavlidou, A., Anastasopoulou, E., Dassenakis, M., Hatzianestis, I., Paraskevopoulou, V., Simboura, N., Rousselaki, E., & Drakopoulou, P. (2014). Effects of olive oil wastes on river basins and an oligotrophic coastal marine ecosystem: A case study in Greece. *Science of The Total Environment*, 497–498, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.088>
- Pelusi, A., Hanawa, Y., Araie, H., Suzuki, I., Giordano, M., & Shiraiwa, Y. (2016). Rapid detection and quantification of haptophyte alkenones by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Algal Research*, 19, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.006>
- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Pezhman Hosseini Shekarabi, S., Shamsaie Mehrgan, M., Razi, N., & Sabzi, S. (2019). BIOCHEMICAL COMPOSITION AND FATTY ACID PROFILE OF THE MARINE MICROALGA *Isochrysis galbana* DRIED WITH DIFFERENT METHODS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(3), 521–524. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.521-524>
- Rasouli, H., Farzaei, M., Mansouri, K., Mohammadzadeh, S., & Khodarahmi, R. (2016). Plant Cell Cancer: May Natural Phenolic Compounds Prevent Onset and Development of Plant Cell Malignancy? A Literature Review. *Molecules*, 21(9), 1104. <https://doi.org/10.3390/molecules21091104>
- Rérat, P. (2012). The New Demographic Growth of Cities: The Case of Reurbanisation in Switzerland. *Urban Studies*, 49(5), 1107–1125. <https://doi.org/10.1177/0042098011408935>

- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 680–686. <https://doi.org/10.1021/jf0630217>
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., & Tava, A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy*, 9(4), 192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Sacksteder, C., & Barry, B. A. (2001). FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY: A MOLECULAR APPROACH TO AN ORGANISMAL QUESTION. *Journal of Phycology*, 37(2), 197–199. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037002197.x>
- Sadovskaya, I., Souissi, A., Souissi, S., Grard, T., Lencel, P., Greene, C. M., Duin, S., Dmitrenok, P. S., Chizhov, A. O., Shashkov, A. S., & Usov, A. I. (2014). Chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-β-d-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers*, 111, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.077>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Saranya, C., Hemalatha, A., Parthiban, C., & Anantharaman, P. (2014). *Evaluation of Antioxidant Properties, Total Phenolic and Carotenoid Content of Chaetoceros calcitrans, Chlorella salina and Isochrysis galbana*. 13.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S-217S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S>
- Schönfeld, P., & Reiser, G. (2021). How the brain fights fatty acids' toxicity. *Neurochemistry International*, 148, 105050. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105050>
- Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Mala, J. (2017). Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1213–1232. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1006-1>
- Singh, D. P., Khattar, J. S., Rajput, A., Chaudhary, R., & Singh, R. (2019). High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under

- optimized culture conditions. *PLOS ONE*, *14*(9), e0221930.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221930>
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, *100*(1–3), 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3)
- Sosa-Hernández, J. E., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarias, C., Rostro-Alanis, M., de la Cruz, R., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Fuentes Grunewald, C., Llewellyn, C. A., Olguín, E. J., Lovitt, R. W., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2019). Light Intensity and Nitrogen Concentration Impact on the Biomass and Phycoerythrin Production by *Porphyridium purpureum*. *Marine Drugs*, *17*(8), 460.
<https://doi.org/10.3390/md17080460>
- Surkatti, R., & Al-Zuhair, S. (2018). Microalgae cultivation for phenolic compounds removal. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(34), 33936–33956.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3450-8>
- Świątkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., & Józefiak, D. (2015). Application of microalgae biomass in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, *71*(4), 663–672.
<https://doi.org/10.1017/S0043933915002457>
- Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S.-H., & Show, P. L. (2020). Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource Technology*, *304*, 122997. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122997>
- Tang, D. Y. Y., Yew, G. Y., Koyande, A. K., Chew, K. W., Vo, D.-V. N., & Show, P. L. (2020). Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *18*(6), 1967–1985.
<https://doi.org/10.1007/s10311-020-01052-3>
- Tiano, L., Littarru, G. P., Principi, F., Orlandi, M., Santoro, L., Carnevali, P., & Gabrielli, O. (n.d.). *Assessment of DNA damage in Down Syndrome patients by means of a new, optimised single cell gel electrophoresis technique*. 9.
- Wang, Y., Cai, J., Jiang, Y., Jiang, X., & Zhang, D. (2013). Preparation of biosilica structures from frustules of diatoms and their applications: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(2), 453–460. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4568-0>

- Widowati, I., Zainuri, M., Kusumaningrum, H. P., Susilowati, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Bourgougnon, N., & Mouget, J.-L. (2017). Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 55, 012067. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/55/1/012067>
- Zhu, J., Tan, X., Hafid, H. S., & Wakisaka, M. (2021). Enhancement of biomass yield and lipid accumulation of freshwater microalga *Euglena gracilis* by phenolic compounds from basic structures of lignin. *Bioresource Technology*, 321, 124441. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124441>