



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata-Curriculum Scienze della Nutrizione

“Caratterizzazione nutrizionale della microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) isolata dalla Riserva Naturale di Stato Saline di Margherita di Savoia in Puglia”

“Nutritional characterization of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) from Margherita di Savoia solar saltworks”

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Lorena Mitillo

Matricola 1085307

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa:

Alessandra Norici

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

Premessa (4)

Capitolo 1: Introduzione (4)

1.1 Le macroalghe (4)

1.1.1 I valori nutrizionali delle macroalghe (9)

1.2 Le microalghe (11)

1.2.1 L'industria alimentare (12)

1.2.2 Le microalghe nell'alimentazione animale (18)

1.2.3 Coltivazione delle microalghe (19)

Capitolo 2: *Dunaliella salina* (23)

*2.1 Excursus storico degli studi su *Dunaliella salina* (23)*

*2.2 Tassonomia e descrizione del genere *Dunaliella* (24)*

*2.2.1 Riproduzione di *D. salina* (25)*

2.2.2 Carotenoidi (26)

*2.2.3 Fattori che inducono l'accumulo di carotenoidi in *D. salina* (30)*

2.3 La questione del Nitro del Cile (NaNO_3) (34)

Scopo della tesi (35)

Capitolo 3: Materiali e metodi (36)

*3.1 Coltivazione e curve di crescita delle alghe *D. salina* CCAP 19/25 e *D. salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia in Puglia (36)*

3.2 Estrazione e quantificazione della clorofilla a (Chl a), b (Chl b) e dei carotenoidi totali (42)

3.3 Determinazione del contenuto proteico cellulare (43)

3.4 Determinazione del contenuto lipidico cellulare dell'alga D. salina isolata dalle Saline di Margherita di Savoia (44)

3.5 Analisi FT-IR (47)

3.6 Determinazione degli elementi in traccia: analisi PICOFOX (51)

3.7 Analisi statistica dei dati (52)

Capitolo 4: Risultati (54)

4.1 Curve di crescita (54)

4.2 Estrazione dei pigmenti: clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi (55)

4.3 Determinazione del contenuto proteico cellulare (62)

4.4 Determinazione del contenuto lipidico cellulare dell'alga D. salina isolata dalle Saline di Margherita di Savoia (65)

4.5 Analisi FT-IR (70)

4.5.1 C/L (71)

4.5.2 C/P (73)

4.5.3 L/P (76)

4.6 Determinazione degli elementi in traccia: analisi PICOFOX (79)

4.6.1 Fosforo (P) (79)

4.6.2 Potassio (K) (81)

4.6.3 Calcio (Ca) (83)

4.6.4 Ferro (Fe) (85)

4.6.5 Rame (Cu) (87)

4.6.6 Zinco (Zn) (89)

Capitolo 5: Discussione dei risultati (93)

Allegato (108)

P-values dell'analisi statistica dei dati

- *Curve di crescita*
- *Estrazione dei pigmenti: clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi*
- *Determinazione del contenuto proteico cellulare*
- *Determinazione del contenuto lipidico cellulare dell'alga D. salina isolata dalle Saline di Margherita di Savoia*
- *Analisi FT-IR*
- *Determinazione degli elementi in traccia: analisi PICOFOX Bibliografia*

Bibliografia (136)

Sitografia (142)

Premessa

Da amante del sushi e appassionata di integratori alimentari, il mio lavoro di tesi si è incentrato sullo studio delle alghe nella nutrizione umana, in particolare di due microalghe: *Dunaliella salina* CCAP 19/25 e un nuovo ceppo di *Dunaliella salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia in Puglia e mai caratterizzato.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni la cucina dell'Estremo Oriente ha fatto irruzione sulle nostre tavole occidentali partendo dai primi ristoranti Cinesi fino ad arrivare ai numerosissimi locali di sushi. L'ingrediente che più marcatamente delinea la differenza tra la tradizione Orientale e Occidentale è l'alga. Infatti, mentre in Giappone e Cina viene consumata da tempi remoti, in Europa è un elemento innovativo di cui solo recentemente si stanno scoprendo le caratteristiche nutritive.

Quali tipi di alghe vengono cucinate?

1.1 Le macroalghe

Le macroalghe sono alghe “a foglia”, visibili ad occhio nudo (dimensione dell'ordine $\mu\text{m-m}$). Organismi pluricellulari, con cellule differenziate ma non a tal punto da definire tessuti, appartengono a 3 grandi divisioni: alghe verdi (*Chlorophyta*), rosse (*Rhodophyta*) e brune (*Phaeophyta*) in base ai pigmenti predominanti.

Esempi di alghe brune sono:

- *Ascophyllum nodosum*
- *Laminaria digitata*

- *Sargassum* sp.

Esempi di alghe rosse sono:

- *Mastocarpus stellatus* o *Gigartina stellata*
- *Chondrus crispus*
- *Delesseria sanguinea*
- *Palmaria palmata*
- *Kappaphycus alvarezii*

Esempi di alghe verdi sono:

- *Ulva* sp.
- *Codium* sp.
- *Monostroma* sp.

Alcuni autori riportano che il primo approccio dell'uomo alle alghe risale al Neolitico, ma le più antiche testimonianze scritte sono datate a 1700 anni fa in Cina (Buschmann et al., 2017).

Mentre inizialmente venivano sfruttate le macroalghe che si trovavano naturalmente sulle spiagge, negli ultimi 50 anni lo studio e la ricerca hanno portato a capire i cicli biologici di questi organismi così da poter essere addomesticati e coltivati, tanto da far aumentare la loro produzione in modo esponenziale (Fig.1). Secondo i dati FAO (2014) tra il 2003 e il 2012 la coltivazione di alghe è aumentata mediamente dell'8,13% ogni anno accrescendo il suo valore monetario del 6,84% annualmente (Loureiro et al., 2015). Cina e Indonesia sono i maggiori produttori assoluti a livello mondiale con le loro 23 milioni di tonnellate di prodotto nel 2014 (Buschmann et al., 2017), alte produzioni le troviamo anche in Giappone, Korea del Sud, Filippine e Nord Korea seguite da Paesi extrasiatici come il Cile, gli USA, il Canada, il Brasile,

il Messico, la Russia, la Francia, la Norvegia, la Tanzania, il Madagascar e Sud Africa (Nayar et al., 2014).

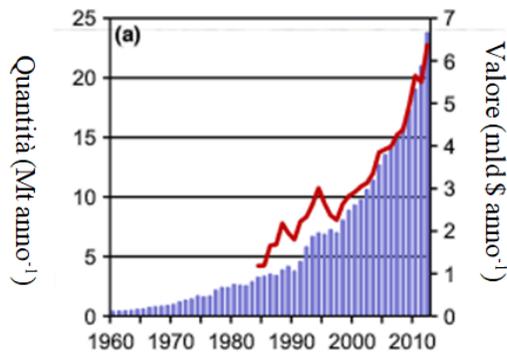


Figura 1 Produzione di biomassa macroalgale attraverso l'acquacoltura (Mt), istogramma e valore monetario (mld \$) all'anno, curva rossa, nel periodo 1960-2012. Modificato da Loureiro et al., 2015

La coltivazione delle macroalge inizia dall'isolamento delle spore in laboratorio fino all'ottenimento di piccoli talli. I talli sono poi legati a corde di netlon galleggianti e ancorate al fondale di baie protette prima e di mare aperto poi, quando sono più grandi e resistenti. I metodi tradizionali prevedono anche la coltivazione diretta sul fondale.

La biomassa algale ottenuta così può essere destinata a molteplici usi: cibo diretto per l'uomo e mangime per animali, ingrediente (anche col ruolo di additivo) per prodotti alimentari, componente di formule per la cosmesi, biocarburante e fertilizzante. Secondo Nayar et al. (2014) la maggior parte del valore monetario annuale dell'industria delle alghe (5 miliardi di \$ su 6 miliardi di \$ annuali) è destinata a prodotti alimentari per l'uomo, il miliardo restante riguarda composti bioattivi estratti dalle alghe, l'alimentazione animale e i fertilizzanti.

Come "cibo diretto" due esempi di alghe utilizzate sono le famosissime alga Nori (*Porphyra* sp.) e Wakame (*Undaria pinnatifida*), che sono alla base del sushi.

L'alga Nori viene consumata sottoforma di fogli essiccati, mentre il wakame fresco, come una lattuga, in insalata con l'aggiunta di semi di sesamo (Fig.2).



Figura 2 Wakame (da <https://www.sakaeshoppe.com/products/chuka-wakame>) e alga Nori (da https://www.buonissimo.it/lericette/340_Sushi)

Gli additivi alimentari, invece, che si ricavano dalle macroalghe sono soprattutto carboidrati utilizzati come gelificanti e addensanti: gli alginati estratti dalle alghe brune, l'agar e i carragenani estratti dalle alghe rosse.

Gli alginati sono sali di Na^+ , K^+ o Ca^{2+}) dell'acido alginico, un polisaccaride strutturale che costituisce la parete cellulare delle alghe brune, costituito da β -(1,4)-D-acido mannuronico (M) e α -(1,4)-L-acido guluronico (G), la cui sequenza dipende dalla specie e dalle condizioni di crescita. Infatti in zone di mare a basso idrodinamismo predominano i blocchi omopolimerici M diversamente, in condizioni di alta idrodinamicità predominano i blocchi omopolimerici G che conferiscono maggiore resistenza all'alga. Gli enzimi digestivi dell'uomo non sono in grado di digerire l'acido alginico che quindi viene classificato come fibra alimentare. Gli alginati vengono utilizzati non solo nell'industria alimentare, ma anche in quella tessile, farmaceutica e in ambito odontoiatrico.

L'agar è un polisaccaride strutturale della parete cellulare delle alghe rosse costituito dal dimero (agarobiosio) D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio legati da legame β 1,4-glicosidico. L'agarobiosio senza addizione o sostituzione di gruppi funzionali è detto agarosio, se l'agarobiosio è metilato, solfatato o presenta residui di piruvato è definito agaropectina. Il rapporto agarosio/agaropectina determina le proprietà fisiche (elasticità, forza, T di fusione) della molecola. L'agar viene utilizzato sia in ambito alimentare, come addensante (ricavato dal genere *Gracilaria*) sia nella ricerca

scientifico (soprattutto in campo microbiologico) che in ambito farmaceutico (es. per i lassativi), ricavato dal genere *Gelidium*.

Carragenani sono polimeri costituiti da unità alternate di 3-β-D-galattopiranosio e 4-α-D-galattopiranosio. Questi composti non riescono ad essere digeriti dalla flora microbica intestinale andando dunque a costituire la fibra alimentare. Proprio come l'agar e gli alginati, i carragenani vengono utilizzati come addensanti e gelificanti per vari preparazioni alimentari come caramelle budini, maionese, gelato chewing-gum.

Oltre che come agenti addensanti, i polisaccaridi delle macroalghe vengono usati come integratori alimentari, ne è un esempio il fucoidano (polisaccaride solfato) che viene estratto dalle alghe brune come ad esempio *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*. Il suo effetto benefico si esplica nell'attenuazione dei dolori articolari e dell'affaticamento. Come infatti riporta uno studio clinico condotto da Myers et al. (2010), la somministrazione orale per 3 mesi di estratti algali contenenti alte quantità di fucoidano a persone affette da osteoartrite, ha avuto come effetto la riduzione dei sintomi dell'osteoartrite in una maniera dose-dipendente.

1.1.1 I valori nutrizionali delle macroalghe

Come riportato nella tabella sottostante (Tabella 1), le macroalghe sono molto ricche di carboidrati (strutturali e di riserva) e contengono invece una più piccola percentuale per peso secco di proteine e una quantità irrisoria di lipidi, tra i quali alti valori di ω3 come DHA e EPA. La composizione lipidica delle macroalghe è, dunque, interessante dato che gli acidi grassi ω3 sono nell'uomo i principali costituenti delle membrane cellulari della retina e dell'encefalo e per questo importantissimi da assumere in gravidanza per il corretto sviluppo di queste strutture nel feto. Su questa linea si basa la ricerca mirata alla sintesi di integratori di EPA e DHA di origine algale, in sostituzione a quelli di origine animale. Integratori algali risponderebbero anche alla crescente richiesta di una sempre più numerosa popolazione a dieta vegetariana e vegana. Inoltre gli acidi grassi vengono anche

utilizzati per produrre trigliceridi usati come olio da cucina, in sostituzione ai più comuni olii come quello di oliva o semi.

		LAMINARIA	GRACILARIA	ULVA
CARBOIDRATI	g/100g	40	50	50
PROTEINE	g/100g	15	10	25
LIPIDI	g/100g	2	3	1

Tabella 1 Composizione in percentuale di peso secco delle macroalghe

Le macroalghe sono anche ricchissime di sali minerali, in particolare di iodio e calcio.

Lo iodio (I), importantissimo per la funzione tiroidea perché costituente degli ormoni tiroidei T3 e T4, è di solito carente nell'alimentazione umana, ma considerando che le alghe brune, molto più delle rosse e delle verdi, ne contengono una quantità pari a circa 500-8000ppm e dato che, stando alle direttive europee (EFSA, 2014) la dose giornaliera di I consigliata (AI, assunzione adeguata) per un adulto medio è di circa 150µg che aumenta a 200µg per le donne in gravidanza, ingerire una piccola quantità di alga essiccata al giorno coprirebbe il fabbisogno quotidiano.

Per quanto riguarda il calcio, l'alga rossa incrostante *Lithothamnion calcareum* ne è molto ricca. La somministrazione di un estratto di minerali da *L. calcareum* preserva la struttura e la funzionalità ossea in femmine di topo alimentate con dieta occidentale (Aslam et al., 2010).

Nella tabella sottostante (Tabella 2) è riportato il contenuto di calcio nel latte, da sempre considerato l'alimento per eccellenza per l'assunzione di calcio, e in alcune macroalghe.

		CALCIO
LATTE	mg/100g	120
LAMINARIA	mg/100g	950
GRACILARIA	mg/100g	4000
ULVA	mg/100g	750

Tabella 2 Contenuto in mg su 100g di calcio nel latte e alcune macroalghe

Va comunque sempre considerata la biodisponibilità dei nutrienti, infatti la presenza di lattosio favorisce l'assorbimento del calcio, mentre la presenza di fibre (proprio come avviene nelle macroalghe che sono ricche di carboidrati non digeribili), andando ad aumentare il transito intestinale, diminuisce la disponibilità del calcio, per questo gli studi sono rivolti alla sintesi di integratori a base di calcio estratto dall'alga piuttosto che ingerire l'alga in sé.

1.2 Le microalghe

Le microalghe sono alghe non visibili ad occhio nudo in quanto costituite da una singola cellula (il diametro cellulare varia da 1µm a 50µm) e diventano evidenti solo nel momento in cui una loro fioritura causa una marea colorata. Le microalghe rappresentano un gruppo molto diversificato da un punto di vista filogenetico.

Questi organismi hanno un importante ruolo ecologico essendo i produttori primari alla base della catena trofica di tutte le acque terrestri, sia dolci che salate. Le microalghe possono essere solitarie o coloniali; le colonie possono essere amorfe o avere una forma ben delineata in cui le cellule, immerse in una mucillagine o guaina comune, non comunicano tra loro. Esistono, però, delle colonie più organizzate, i cenobi, in cui le singole cellule sono collegate da ponti citoplasmatici che permettono di definire ruoli distinti dei singoli organismi. Le microalghe possono essere mobili grazie alla presenza di flagelli o al movimento ameboide o immobili (coccali). Appartengono al microfitoplancton o al microfitobenthos (Abbate et al., 2010).

Negli ultimi anni, proprio come le macroalghe, anche le microalghe hanno ricevuto grande attenzione da parte dell'industria alimentare, dell'industria dei mangimi, dei

materiali, dei biocarburanti e della cosmetica. Al fine di una produzione economicamente vantaggiosa ed ecosostenibile, si cerca sempre più di implementare un approccio olistico circolare nel quale i nutrienti necessari alla coltivazione delle alghe derivano dalla valorizzazione di gas di scarico (per esempio degli stabilimenti industriali che emettono grandi quantità di CO₂) o reflui urbani, industriali e agroalimentari. La biomassa così ottenuta può quindi essere sfruttata nei vari ambiti sopracitati. In questa sede verrà approfondito l'uso di microalghe nel settore alimentare e dei mangimi.

1.2.1 L'industria alimentare

L'industria alimentare ultimamente si sta interessando alle microalghe per la loro eccellente composizione macromolecolare. Infatti, a differenza delle macroalghe, le microalghe sono ricchissime di proteine: ad esempio Spirulina (nome ormai commercialmente usato per indicare il cianobatterio *Arthrospira platensis* o *Spirulina platensis*) può averne fino al 71% del peso secco, tanto da essere definita fabbrica di proteine, single cell protein (SCP) (Becker, 2004). Inoltre le microalghe sono molto meno ricche di carboidrati (presenti sottoforma di amido, glucosio zuccheri e altri polisaccaridi (Spolaore et al., 2006)) e lipidi rispetto alle macroalghe.

Come mostrato dalla tabella sottostante (Tabella 3) le microalghe contengono una quantità di proteine di gran lunga superiore a quella delle più comuni fonti proteiche consumate dall'uomo (ad esempio carne, latte e soia).

ALIMENTO	PROTEINE	CARBOIDRATI	LIPIDI
	% peso secco	% peso secco	% peso secco
Lievito di birra	39	38	1
Carne	43	1	34
Latte	26	38	28
Riso	8	77	2
Soia	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Tabella 3 Composizione macromolecolare (% su peso secco) di cibi comuni e diverse microalghe. Modificato da Becker, 2004.

Grazie a questa eccezionale composizione macromolecolare le microalghe possono essere usate per migliorare il contenuto nutrizionale di comuni preparazioni alimentari con effetto positivo sulla salute umana e animale (Spolaore et al., 2006).

Oltre al quantitativo proteico in sé, il valore biologico delle proteine presenti è l'aspetto molto importante dal punto di vista nutritivo. Infatti le proteine algali hanno un alto valore biologico misurato in termini di digeribilità e composizione amminoacidica (Becker, 2007. Tabelle 4-5), dato che le cellule algali riescono a sintetizzare tutti gli amminoacidi e quindi anche gli essenziali (Spolaore et al., 2006). Come si può vedere dalla tabella sottostante (Tabella 4) il coefficiente di digeribilità delle proteine estratte da *Spirulina* o *Chlorella* sp. è poco inferiore al coefficiente delle proteine nobili dell'uovo o del latte (caseina). Anche l'efficienza proteica (guadagno in peso per unità di proteina consumata) non si discosta molto da quella che caratterizza le proteine nobili di origine animale (Becker, 2007).

Fonte proteica	Coeff. Digeribilità	REP
Caseina	95,1	2,50
Uovo	94,2	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	72,5-88,0	1,14-1,99
<i>Chlorella</i> sp.	59,4-89,0	0,84-2,00
<i>Spirulina</i> sp.	75,5-83,9	1,78-2,10

Tabella 4 Valore biologico di proteine convenzionali e algali in termini di coefficiente di digeribilità e efficienza proteica (REP = Rapporto di Efficienza Proteica). Modificato da Becker, 2007

Fonte	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	Cys	Try	Thr	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Pro	Ser
WHO/FAO	4.0	7.0	5.0	5.5	6.0		3.5		1.0									
-uova	6.6	8.8	7.2	5.3	5.8	4.2	3.2	2.3	1.7	5.0	-	6.2	11.0	12.6	4.2	2.4	4.2	6.9
soia	5.3	7.7	5.3	6.4	5.0	3.7	1.3	1.9	1.4	4.0	5.0	7.4	1.3	19.0	4.5	2.6	5.3	5.8
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.8	8.8	5.5	8.4	5.0	3.4	2.2	1.4	2.1	4.8	7.9	6.4	9.0	11.6	5.8	2.0	4.8	4.1
<i>Dunaliella bardawil</i>	4.2	11.0	5.8	7.0	5.8	3.7	2.3	1.2	0.7	5.4	7.3	7.3	10.4	12.7	5.5	1.8	3.3	4.6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.6	7.3	6.0	5.6	4.8	3.2	1.5	0.6	0.3	5.1	9.0	7.1	8.4	10.7	7.1	2.1	3.9	3.8
<i>Arthrospira maxima</i>	6.0	8.0	6.5	4.6	4.9	3.9	1.4	0.4	1.4	4.6	6.8	6.5	8.6	12.6	4.8	1.8	3.9	4.2
<i>Spirulina platensis</i>	6.7	9.8	7.1	4.8	5.3	5.3	2.5	0.9	0.3	6.2	9.5	7.3	11.8	10.3	5.7	2.2	4.2	5.1
<i>Aphanizomenon</i> sp.	2.9	5.2	3.2	3.5	2.5	-	0.7	0.2	0.7	3.3	4.7	3.8	4.7	7.8	2.9	0.9	2.9	2.9

Tabella 5 Profilo amminoacidico di alcune alghe confrontato con quello di uova e soia e con il pattern amminoacidico di una proteina ben bilanciata (WHO/FAO, 1973) (g/100g). Modificato da Becker, 2007.

Riguardo alla componente lipidica, mentre le piante riescono a sintetizzare i precursori degli acidi grassi $\omega 3$ (acido α -linolenico ALA) e $\omega 6$ (acido linoleico LA) con bassa capacità di accumulo degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena LC-PUFA, le microalghe possiedono tutti gli enzimi necessari (desaturasi per inserire insaturazioni ed elongasi per allungare la catena carboniosa) per ottenere da questi precursori gli LC-PUFA $\omega 3$ EPA e DHA e $\omega 6$ GLA (acido γ -linolenico), DGLA (diomo- γ -linolenico) e AA (acido arachidonico). Questi acidi grassi nell'alimentazione animale (e quindi anche umana) vengono considerati essenziali (ALA e LA) e semi-essenziali (i derivati) in quanto i primi devono essere necessariamente ingeriti con la dieta, i secondi sono sintetizzati dalle vie metaboliche proprie degli animali in una quantità irrisoria non sufficiente a coprire i fabbisogni dell'organismo e pertanto anche quest'ultimi devono essere introdotti con la dieta. In quest'ambito si inseriscono le alghe che, proprio grazie al loro corredo enzimatico, producono una grande quantità di acidi grassi a catena lunga polinsaturi (LC-PUFA)

essenziali, come detto in precedenza, per lo sviluppo e le funzioni della retina e del SNC, per ridurre l'incidenza delle malattie cardiovascolari e per ridurre i livelli di infiammazione (EPA e DHA) e per le risposte cellulari e infiammatorie (GLA, DGLA e AA). A tal fine la ricerca e l'industria si stanno impegnando a capire quali siano le condizioni di crescita algale per aumentare la produzione di LC-PUFA. Uno studio condotto su *Pavlova lutheri* (Tatsuzawa et al., 1995) dimostra che la bassa temperatura (T 15°C) modifica la composizione lipidica e degli acidi grassi dell'alga *P. lutheri* a favore di quelli polinsaturi (20:5 e 22:6), che servono alla cellula per adattarsi e resistere alle basse temperature mantenendo la fluidità della membrana cellulare.

In *Dunaliella salina*, la limitazione di azoto (N), induce la cellula ad accumulare goccioline lipidiche, questo perché il carbonio fissato non può essere incorporato in amminoacidi per mancanza di N e viene utilizzato per la sintesi di lipidi (Fig. 3).

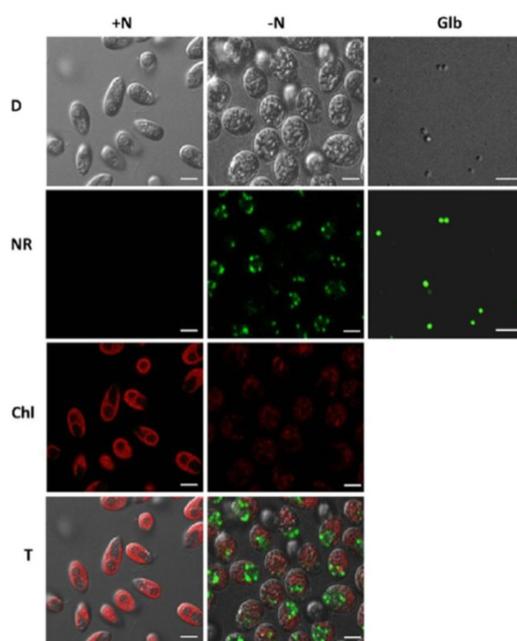


Figura 3 Visualizzazione al microscopio confocale delle goccioline lipidiche in *D. salina*. Le alghe sono state cresciute per 3 giorni in mezzo completo con N (+N) o privo di N (-N). Glb= globuli purificati (verde) dalla *D. salina* cresciuta in -N; NR e Chl= immagini confocali che mettono in risalto i globuli (verde) e la clorofilla (rosso); T= tutte le figure fuse. Modificato da Davidi et al., 2012.

Non solo il fattore limitante N, ma anche un aumento della concentrazione salina da 0,5M NaCl (equivalente all'acqua di mare) a 1M NaCl determina un incremento del contenuto lipidico intracellulare dal 60% al 67% in questa alga (Takagi et al., 2006).

Per quanto detto, studi di ingegneria genetica sono rivolti alla trasformazione di piante terrestri con vettori contenenti geni algali coinvolti nella sintesi di LC-PUFA, così da indurre la produzione e l'accumulo.

Il fatto che gli scienziati e l'industria si stiano sempre più avvicinando alle alghe come fonte di acidi grassi è dettato da più fattori tra i quali:

- 1) produttività: mentre infatti sia i funghi che le piante terrestri hanno bisogno di carbonio organico, acqua dolce, maggiore spazio per la coltivazione (in termini di terra arabile) e tempi più lunghi di crescita, nonché interventi di ingegneria genetica per accumulare LC-PUFA, le microalghe crescono sia in acque dolci che salate, in condizioni autotrofe (a partire da C inorganico), eterotrofe (a partire da C organico) e mixotrofe con tassi più sostenuti e possiedono già il corredo enzimatico necessario alla sintesi dei prodotti di interesse;
- 2) storicamente le principali fonti di acidi grassi essenziali sono i pesci (es. sgombri, triglie e salmoni) ma gli stock sono in diminuzione (causa overfishing) ed è sempre più emergente il problema della contaminazione da mercurio che, in pesci grandi come i salmoni, si accumula più copiosamente a causa del processo di biomagnificazione. È quindi necessaria ad oggi una fonte aggiuntiva e sostenibile di LC-PUFA. Oltre a ciò si vuole dare una fonte alternativa di LC-PUFA alla sempre maggiore percentuale di persone a dieta vegetariana o vegana.

In aggiunta alle caratteristiche finora citate, le microalghe sono fonte di microelementi necessari al corretto funzionamento e alla protezione dell'organismo umano. Le microalghe, infatti, sono ricche di vitamine e sali minerali come illustrato dalle tabelle sottostanti (Tabella 6) che si riferiscono alle quantità di calcio, ferro e

potassio contenute in Spirulina confrontate con quelle di fonti tradizionali. I valori relativi alla Spirulina sono stati forniti dall'Azienda MICOPERI BLUE GROWTH, produttrice di Spicc™ LYO, e si riferiscono a 100g di prodotto liofilizzato (<https://www.aziendainfiera.it/files/immagini/prodotti/mbg/capsule-monodose-spirulina-mbg/catalogo-spicc-mbg-2019.pdf>), quelli relativi agli altri alimenti da www.MYPERSONALTRAINER.it.

		CALCIO
LATTE	mg/100g	120
LAMINARIA	mg/100g	950
GRACILARIA	mg/100g	4000
ULVA	mg/100g	750
SPIRULINA	mg/100g	101

		FERRO
FEGATO OCA	mg/100g	30,53
COSCIA POLLO	mg/100g	6,25
CIOCC.FONDENTE	mg/100g	17,4
SPIRULINA	mg/100g	40
FAGIOLI	mg/100g	5
LENTICCHIE	mg/100g	7,54

		POTASSIO
KETCHUP	mg/100g	5901
Tè	mg/100g	2160
FAGIOLI secchi	mg/100g	~1450
ALBIC. disidr.	mg/100g	1260
UVA secca	mg/100g	864
PRUGNE secche	mg/100g	824
SPIRULINA	mg/100g	2040

Tabella 6 Valori di Calcio, Ferro e Potassio (mg/100g) di Spirulina (liofilizzato) e altri alimenti

Le microalghe sono anche una riserva di pigmenti con funzione antiossidante, come la ficocianina estratta soprattutto da *Spirulina*, l'astaxantina da *Haematococcus pluvialis* e il β -carotene da *Dunaliella salina*.

Le microalghe rappresentano quindi un cibo completo, ricco e nobile per i suoi valori nutritivi.

Purtroppo, ancora le microalghe non vengono consumate abitualmente. I motivi sono diversi: in primis le persone sono restie a nuovi alimenti che conferiscono un brutto colore ai cibi, un sapore non gradevole e sono, infine, costosi. Per tutti questi motivi, l'industria preferisce usare le microalghe come integratori alimentari (Becker, 2007).

1.2.2 Le microalghe nell'alimentazione animale

Stime indicano che circa il 30% della produzione algale venga impiegato nell'alimentazione animale (Becker, 2004). In acquacoltura le alghe vengono utilizzate per nutrire le larve dei pesci, sia in modo diretto che indiretto (ovvero le alghe sono nutrimento delle prede delle larve) (Reitan et al., 1997). Le specie algali selezionate devono essere sicure, di facile coltivabilità, della giusta dimensione in modo che possano essere ingerite dalle larve o dalle prede delle prede e avere un alto valore nutritivo in termini di contenuto proteico, LC-PUFA (DHA, EPA e AA) necessari alla crescita e alla metamorfosi delle larve, e vitamine. I generi più utilizzati sono *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* e *Thalassiosira*, che preferenzialmente vengono miscelati per ottenere la miglior qualità nutrizionale. Le microalghe, inoltre, contribuiscono al miglioramento dell'aspetto dei pesci in quanto apportano nella dieta pigmenti utili a ravvivare il colore naturale degli animali (es. l'astaxantina per il rosa dei salmonidi, i carotenoidi per il rosso e il giallo della carpa) (Spolaore et al., 2006).

Oltre che fonte di cibo, le microalghe utilizzate nell'acquacoltura rappresentano un importante mezzo per migliorare la qualità dell'acqua nelle vasche di allevamento, infatti le alghe aumentano la concentrazione di O₂, stabilizzano il pH, sintetizzano e

rilasciano molecole che inducono il comportamento del prey-catching, regolano la popolazione batterica, hanno funzione probiotica e stimolano il sistema immunitario (green-water technique) aumentando così il tasso di sopravvivenza e di crescita delle specie di pesci coltivate (Moffatt, 1981; Naas et al., 1992; Reitan et al., 1997; Papandroulakis et al., 2001; Spolaore et al., 2006).

Per quanto riguarda gli animali domestici, le alghe possono essere inserite nella loro alimentazione grazie alle innumerevoli proprietà benefiche che non solo contribuiscono al corretto funzionamento dell'organismo, ma rendono anche pelle e pelo più sani (Spolaore et al., 2006): ad esempio, i pigmenti (carotenoidi) rendono più gialli i gambi dei polli e più rossi i tuorli delle uova (Spolaore et al., 2006 e Kotrbáček et al., 2013). Nonostante i molteplici aspetti positivi mostrati nell'integrare i mangimi animali con le microalghe, queste vengono poco utilizzate a causa delle difficoltà riscontrate nel coltivarle, raccoglierle e immagazzinarle nonché degli alti costi di produzione che ne conseguono (Spolaore et al., 2006).

1.2.3 Coltivazione delle microalghe

Le microalghe possono essere coltivate in sistemi aperti o in fotobioreattori chiusi. I primi (Fig.4) possono essere stagni naturali o vasche artificiali: *open ponds* circolari o divise in corsie dotate di pale miscelanti l'acqua; la vasca è profonda circa 15-20cm per permettere la penetrazione della luce fino al fondo. Lo svantaggio dei sistemi aperti è che, sebbene si ricrei l'ambiente naturale di crescita delle microalghe, non sono facilmente controllabili in termini di T, luce, pH, a causa delle condizioni atmosferiche mutevoli. Altri problemi sono dati dalla luce spesso limitante la crescita algale sul fondo delle vasche in assenza di ottimale miscelazione; dalla presenza di eventuali *grazers* (pascolatori che si cibano di alghe) e batteri che potrebbero contaminare la coltura; dall'evaporazione dell'acqua in climi caldi che aumenta la concentrazione salina causando stress alle alghe coltivate. I sistemi aperti sono però vantaggiosi perchè economici, nonostante infatti richiedano ampi spazi, gli *open ponds* hanno un costo di costruzione e manutenzione basso soprattutto se si utilizza

uno stagno naturale. Inoltre non si verifica accumulo di O_2 nelle vasche in seguito al processo fotosintetico e quindi alla crescita algale poiché l'ossigeno molecolare che diffonde in atmosfera. È importante evitare l'accumulo di ossigeno molecolare per evitare di inibire il processo fotosintetico, infatti la Rubisco in presenza di alte concentrazioni di ossigeno favorisce l'ossidazione dei substrati inibendo la fotosintesi. Nei sistemi aperti di solito si coltivano specie algali estremofile, come ad esempio *Dunaliella salina* che cresce ad alte salinità o *Spirulina* che cresce a pH alcalini (circa 12-13), così da diminuire la possibilità di contaminazioni da parte di altri microrganismi.

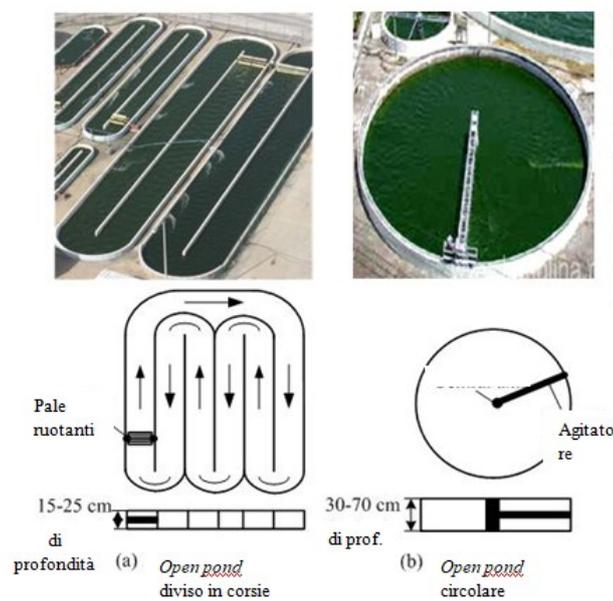


Figura 4 *Open pond* a corsie (a) e circolare (b). Modificato da Shen et al., 2009

I fotobioreattori chiusi sono impianti di coltivazione chiusi di diverse forme: possono essere tubulari orizzontali, tubulari verticali oppure planari (Fig.5). Sono studiati per aumentare il rapporto superficie/volume affinché la luce non rappresenti un fattore limitante la crescita della coltura algale. I fotobioreattori chiusi possono trovarsi all'interno di uno stabilimento, all'aperto o in una serra. La luce può essere naturale o artificiale o naturale e artificiale contemporaneamente, può essere fornita in continuo, senza cioè un fotoperiodo in modo da produrre la maggior quantità di biomassa

possibile, oppure può essere fornita alternando periodo di accensione a periodo di spegnimento. Il fotoperiodo può essere 12h di giorno e 12h di notte o 14h di giorno e 8h di notte.



Figura 5 Fotobioreattori chiusi: verticale (a), orizzontale (b) e planare (c). Modificato da Shen et al., 2009

La caratteristica che più differenzia i sistemi chiusi da quelli aperti è la possibilità di controllare le condizioni di crescita: T, pH, luce, O_2 . Infatti, indipendentemente dalle geometrie, i fotobioreattori sono dotati di sonde per il monitoraggio della temperatura, del pH, della luce e dell' O_2 . Inoltre le colture restano più facilmente sterili e isolate dall'ambiente esterno. L'anidride carbonica può essere insufflata nel sistema allo scopo di aggiustare il pH del mezzo di crescita, fornire carbonio inorganico per la fotosintesi e rimescolare la coltura stessa per una omogenea distribuzione dei nutrienti e della luce ed evitare la sedimentazione della biomassa sulle pareti del reattore. La turbolenza, però, non deve essere eccessiva affinché non si rompano le cellule. L' O_2 in eccesso viene allontanato, altrimenti inibirebbe la fotosintesi, attraverso degli scambiatori di gas.

Come già accennato, gli aspetti positivi dei sistemi chiusi sono la possibilità di controllo delle condizioni di crescita che ne permettono l'ottimizzazione con alta produzione di biomassa e la limitazione delle contaminazioni esterne; gli svantaggi sono invece di ordine economico perché i fotobioreattori necessitano di sonde, fonti di luce e personale specializzato. Per diminuire i costi dell'illuminazione si stanno studiando sistemi a led o con fibra ottica alimentati ad energia solare o eolica.

Capitolo 2

Dunaliella salina

Il lavoro di tesi si concentra sullo studio del valore nutritivo della microalga *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) confrontando due ceppi: il ceppo CCAP 19/25 e il ceppo isolato da A. Norici nel 2014 presso le Saline di Margherita di Savoia in Puglia.

2.1 Excursus storico degli studi su Dunaliella salina

Secondo quanto riportato da A. Oren (2005), il primo rinvenimento di questa microalga risale al 1838 nelle saline di Montpellier in Francia, da parte del professor Dunal che la chiamò *Haematococcus salinus* (Fig. 6). Le ricerche erano state commissionate dall'Académie des Sciences di Parigi per investigare il motivo per cui le saline si presentavano di colore rosso.

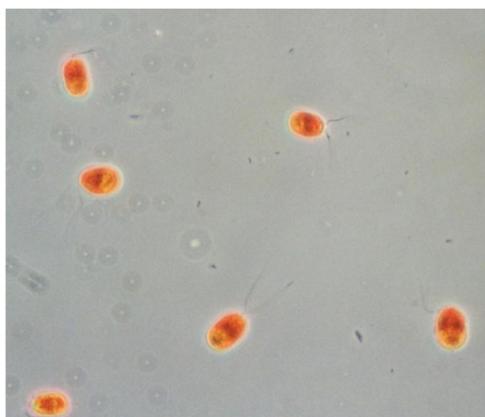


Figura 6 Cellule di *D. salina*. Modificato da Oren, 2005.

Negli anni successivi l'allora alga *H. salinus* venne trovata anche in altre acque salate distribuite in tutto il mondo (Romania, Lorena francese, Crimea, Algeria ecc.) e ogni volta i ricercatori fornivano un nome diverso per designare la microalga osservata, fino al 1905 quando il Professor Teodoresco studiando campioni raccolti da un lago

salato in Romania scrisse un articolo intitolato “Organizzazione e sviluppo di *Dunaliella*, un nuovo genere di Volvocaceae-Polyblepharidae” (Teodoresco, 1905) in cui descrisse dettagliatamente la struttura e la morfologia cellulare, la riproduzione, il comportamento e l’ecologia della microalga e diede il nome definitivo al genere, in ricordo al primo scopritore il Professor Dunal (Tabella 7).

Nome	Autore
<i>Haematococcus salinus</i>	Dunal [1]
<i>Protococcus salinus</i>	Dunal [1]; Geleznow [11]
<i>Monas Dunalii</i>	Joly [8]; Blanchard [16]; Butschinsky [12]
<i>Diselmis Dunalii</i>	Dujardin [17]
<i>Chlamydomonas Dunalii</i>	Cohn [18]; Blanchard [13]; Bujor [15]
<i>Sphaerella lacustris</i> var. <i>Dunalii</i>	Hansgirg [19]
<i>Dunaliella salina</i>	Teodoresco [2,20]

Tabella 7 I diversi nomi attribuiti a *D. salina* (Teodoresco, 1905) dai vari ricercatori 1838-1906. Da Oren, 2005.

In particolare Teodoresco si soffermò a presentare due specie del genere *Dunaliella*: *Dunaliella salina* e *Dunaliella viridis* (successivamente divisa in più specie diverse da Lerche). Nello stesso periodo anche un’altra ricercatrice Clara Hamburger di Heidelberg, studiando campioni delle saline di Cagliari in Sardegna, descrisse il genere *Dunaliella*, ma fu anticipata nelle pubblicazioni da Teodoresco. Questi studi sono stati seguiti da altre pubblicazioni da parte di Cavara, Labbé, Baas Becking, Lerche e Hamel (Oren, 2005).

2.2 Tassonomia e descrizione del genere *Dunaliella*

Il genere *Dunaliella* appartiene alla famiglia della Polyblepharidaceae. Si tratta di alghe verdi (Chlorophytae) unicellulari, prive di parete cellulare e dotate di due

flagelli, la riproduzione avviene per scissione (asessuata) o fusione di due cellule che generano così uno zigote (sessuata) (Oren, 2005).

Teodoresco scrisse che *D. salina*, a differenza della *D. viridis*, si colora di rosso a causa di un massiccio accumulo di carotenoidi in particolari condizioni ambientali (Teodoresco EC, 1906). Ad oggi è noto che solamente alcune specie di *Dunaliella* in risposta a determinati stress ambientali (forte intensità luminosa, limitazione di nutrienti, alta salinità) riescono ad accumulare carotenoidi e non tutte le specie sono alofile.

Dal 1999 la filogenesi e la tassonomia, prima basate su caratteristiche morfologiche e fisiologiche, sono state studiate con tecniche di biologia molecolare (RNA 18S, sequenze geniche, frammenti di restrizione) e i ricercatori hanno trovato delle discrepanze con le ricerche precedenti, mettendo in evidenza anche specie attribuite erroneamente (Oren, 2005).

2.2.1 Riproduzione di *D. salina*

La riproduzione di *D. salina* prevede una divisione cellulare longitudinale (asessuata) ma già Teodoresco nel 1905 prima e Lerche poi nel 1937 (Lerche, 1937) osservarono la riproduzione sessuata in *D. salina*, attraverso la fusione di 2 cellule mobili a generare uno zigote (Fig.7). Secondo Lerche il fattore determinante per la riproduzione sessuata sarebbe la concentrazione di sale nel mezzo, infatti una sua diminuzione dal 10 al 3% farebbe osservare la comparsa di zigoti. Sempre Lerche riferisce che lo zigote altro non è che una sorta di forma di incistamento essendo caratterizzato da un involucro di notevole spessore e resistente che permette a *D. salina* di non soccombere in condizioni di ridotta salinità e/o lunghi periodi di siccità. Quando i fattori esterni ambientali ritornano ottimali, lo strato esterno si rompe rilasciando fino a 32 cellule aploidi. Inoltre, sempre in condizioni di concentrazioni basse di sale, Lerche ha osservato la formazione di cellule immobili arrotondate (palmelloidi).

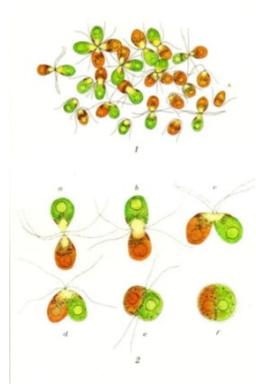


Figura 7 Aggregazione e fusione di cellule di *D. salina*. Modificato da Lerche, 1937

2.2.2 Carotenoidi

Come già Teodoresco (1905), Lerche (1937), Ruinen (1938) avevano osservato (Oren, 2005), *D. salina* è capace di accumulare una grandissima quantità di carotenoidi tale da renderla molto interessante per applicazioni biotecnologiche nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica.

I carotenoidi (Fig.8) sono dei pigmenti liposolubili caratterizzati da una lunga catena carboniosa (elevato numero di unità isoprenoidi con doppi legami coniugati che alle estremità della molecola possono formare anelli esagonali) che può contenere o meno atomi di ossigeno, nel primo caso si parla di xantofille (es. zeaxantina, luteina e astaxantina) nel secondo di caroteni (es. carotene e licopene). I carotenoidi sono i responsabili delle colorazioni giallo-arancio-rosso tipiche di alcuni vegetali, come ad esempio le carote, le foglie autunnali delle piante e, appunto, della *D. salina* in particolari condizioni.

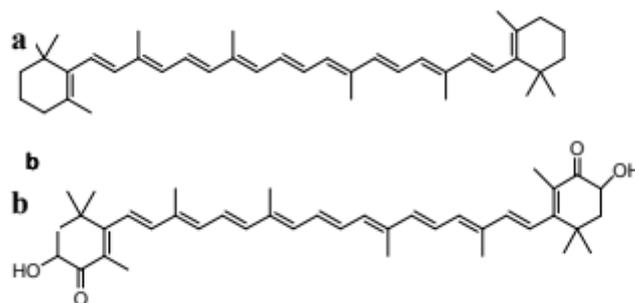


Figura 8 Struttura molecolare di β -carotene (a) e astaxantina (b). Modificato da Spolaore et al., 2006

Negli organismi fotosintetici i carotenoidi sono pigmenti accessori delle antenne, capaci di catturare la luce a lunghezze d'onda (intorno ai 500nm) differenti da quelle catturate dalla clorofilla e trasferire energia, per risonanza, al centro di reazione dove avviene il processo primario di separazione della carica (Fig.9).

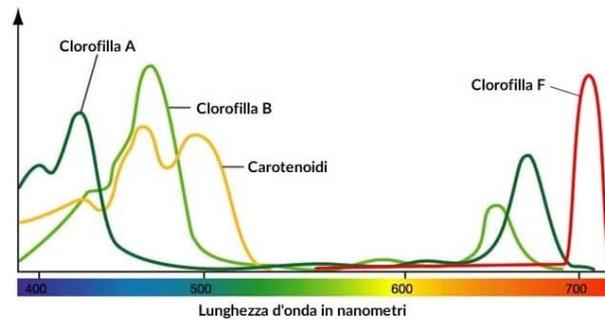


Figura 9 Spettri di assorbimento delle clorofille a e b e dei carotenoidi. Da <https://acquario.top/pigmenti-fotosintetici-piante/>

Inoltre i carotenoidi proteggono la clorofilla stessa dalla fotossidazione. Infatti i carotenoidi operano il quenching del tripletto eccitato della clorofilla $^3\text{Chl}^*$ prima che possa reagire con O_2 e formare il singoletto dell'ossigeno $^1\text{O}_2$, innescando le reazioni tipiche dello stress ossidativo; il quenching genera ^3car che decade termicamente. I carotenoidi possono deeccitare anche l'ossigeno singoletto (Fig.10).

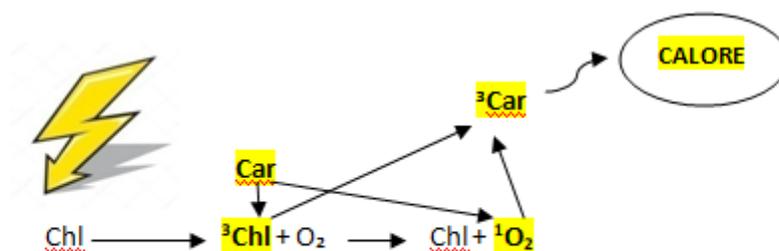


Figura 10 Meccanismo di protezione dalla fotossidazione della clorofilla da parte dei carotenoidi

Inoltre, grazie al ciclo delle xantofille che partecipa al *non photochemical quenching* (NPQ), l'energia luminosa assorbita in eccesso viene dissipata dalla zeaxantina sottoforma di calore; al contrario, in condizioni normali, la zeaxantina è convertita in viola xantina permettendo un efficiente utilizzo dell'energia luminosa nel processo di fotosintesi (Fig.11) (Demming-Adams et al., 2012).

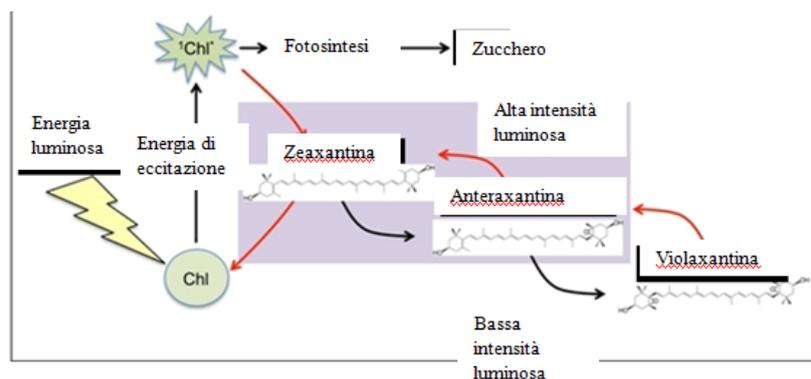


Figura 11 Ciclo delle xantofille. Modificato da Demming-Adams et al., 2012

Negli organismi non fotosintetici i carotenoidi rappresentano una fonte importantissima di antiossidanti, coloranti naturali e precursori della Vitamina A ed è per questo motivo che le industrie del settore alimentare, farmaceutico e cosmetico sono molto interessate alla ricerca e allo studio degli organismi vegetali in grado di accumulare ingenti quantità di carotenoidi e delle condizioni ottimali di crescita per la sintesi di questi pigmenti da parte di tali organismi.

A dimostrazione di ciò, uno studio in vitro condotto su macrofagi murini (RAW264.7) infettati con il virus PRV, capace di indurre la produzione di IL-6, ROS e specie reattive dell'azoto N dovute o all'effetto diretto del virus sulle cellule o comunque come conseguenza della risposta infiammatoria dell'ospite all'infezione, ha dimostrato che il trattamento delle cellule infettate con estratto ricco di carotenoidi di *D. salina* ha ridotto in modo significativo l'accumulo di ROS, NO e IL-6 indotto dall'infezione virale, inoltre ha ridotto la replicazione virale (Lin et al., 2017).

Non solo *in vitro*, studi su modelli animali sono stati condotti anche *in vivo*. In un esperimento fatto su ratti di ceppo albino Wistar trattati con estratto in polvere di alghe *D. salina* 125µg/kg e 250µg/kg di peso corporeo, si è visto come il trattamento protegga dalle tossine (CCl₄). Inoltre, in questo studio si è voluto confrontare l'effetto antiossidante del β-carotene naturale estratto dall'alga rispetto a quello sintetico (somministrato in una dose pari a 250µg/kg di peso corporeo). I risultati dimostrano che il trattamento con 2.0g/kg p.c. di CCl₄ diminuisce l'attività di alcuni enzimi antiossidanti tra cui la superossido dismutasi SOD del 56%, la perossidasi del 54% e la catalasi del 45.9% e quasi raddoppia la perossidazione lipidica rispetto al gruppo di controllo. In seguito, invece, al trattamento precoce dei ratti con 125µg/kg e 250µg/kg p.c. di carotenoidi dopo la somministrazione di CCl₄, ripristina le attività della SOD, della perossidasi e della catalasi del 23.75%, 61.15% e del 25.24%, con il primo dosaggio, del 57.7%, 90.64% e del 53.5%, con il secondo dosaggio, rispetto al controllo. Al contrario applicando lo stesso procedimento, ma trattando con all-trans β-carotene sintetico non si ottiene la stessa percentuale di ripristino delle attività enzimatiche come dimostrano i dati: +7.5% per la catalasi e +23.8% per la perossidasi, nessun effetto sulla SOD e -23% di perossidazione lipidica rispetto al controllo. In riferimento a questi risultati, si può ben capire il grande potenziale benefico ed economico della *D. salina* (Murthy et al., 2005).

La comunità scientifica è unanime nell'affermare le proprietà salutistiche, antiossidanti e protettive dei carotenoidi sugli organismi, ma aspetto ancor più importante è la biodisponibilità di questi composti, dato che il corpo umano non è in grado di sintetizzarli e devono quindi essere introdotti con la dieta. Uno studio condotto su uomini ha rivelato che l'assunzione di Betatene, un preparato di carotene naturale estratto da *D. salina* contenente gli all-trans e 9-cis-β-carotene e l'α-carotene, comporta un buon assorbimento degli all-trans-β-carotene e dell'α-carotene con picco di concentrazione sierica dopo 24-48h, a differenza del 9-cis-β-carotene che non è stato riscontrato nei campioni di sangue umano, nemmeno dopo averne somministrate più dosi. A spiegazione di ciò si può pensare che l'organismo umano

assorba preferenzialmente gli all-trans o che il 9-cis- venga isomerizzato al corrispondente all-trans, o ancora che il 9-cis- venga distribuito in tempi rapidi ai tessuti (Stahl et al., 1993). In questo contesto si inserisce anche lo studio di Ben-Amotz et al. (1996) su uomini a cui hanno somministrato giornalmente per 14 giorni 40mg di β -carotene sintetico o naturale (da *Dunaliella bardawil*), insieme ad una dieta basale. Le analisi sieriche effettuate dopo 2 settimane hanno rivelato la presenza di ossicarotenoidi, all-trans β -carotene e α -carotene ma nessuna traccia del 9-cis β -carotene; ciò ha portato gli autori a concludere che il 9-cis β -carotene *in vivo* è un antiossidante lipofilo molto più efficiente e attivo degli all-trans β -carotene.

2.2.3 Fattori che inducono l'accumulo di carotenoidi in *D. salina*

I carotenoidi, come detto in precedenza, si trovano ancorati alle proteine delle antenne dell'apparato fotosintetico dei cloroplasti insieme alle clorofille, ma la microalga *D. salina*, in condizioni di crescita limitanti, è capace di accumularne grandi quantità all'interno di globuli lipidici nello spazio intertilacoidale del cloroplasto. Di tutti i numerosi isomeri del β -carotene, in *Dunaliella* il 9-cis e l'all-trans β -carotene rappresentano circa l'80% del totale (Gómez et al., 2003).

Quali sono, dunque, gli stress esterni che inducono l'accumulo di β -carotene?

Già Lerche (1937) suggeriva che la limitazione dei nutrienti (dato che il colore rosso si presentava soprattutto in colture vecchie) e un'eccessiva quantità di luce erano le cause dell'elevato contenuto di carotenoidi in *D. salina*. Ad oggi, grazie a diversi esperimenti condotti al riguardo, si sa che non solo la limitazione di azoto e l'eccessiva intensità luminosa (Ben-Amotz et al., 1982 e Lamers et al., 2010) ne sono la causa ma anche le alte salinità dei mezzi di coltura.

Per quanto riguarda l'effetto dell'aumento della salinità sulla carotenogenesi, ci sono diversi studi in letteratura che lo confermano, come ad esempio gli esperimenti condotti su 3 ceppi di *D. salina* isolati in 3 diversi siti da Borowitzka et al. (1990) che hanno dimostrato come un improvviso aumento della salinità prolunghi la fase lag di

crescita in funzione della salinità finale e della grandezza del cambiamento della concentrazione salina che, d'altra parte, ha determinato un aumento dei carotenoidi totali, dovuto soprattutto al β -carotene. In questo contesto è stato osservato che all'aumentare della salinità del mezzo (dal 10 al 20%) il rapporto luteina/carotenoidi diminuisce a favore del rapporto zeaxantina/carotenoidi, questo a suggerimento che lo stress osmotico potrebbe inibire la via biosintetica della luteina portando alla sintesi del β -carotene. L' α -carotene è rimasto nelle stesse proporzioni (Fig.12).

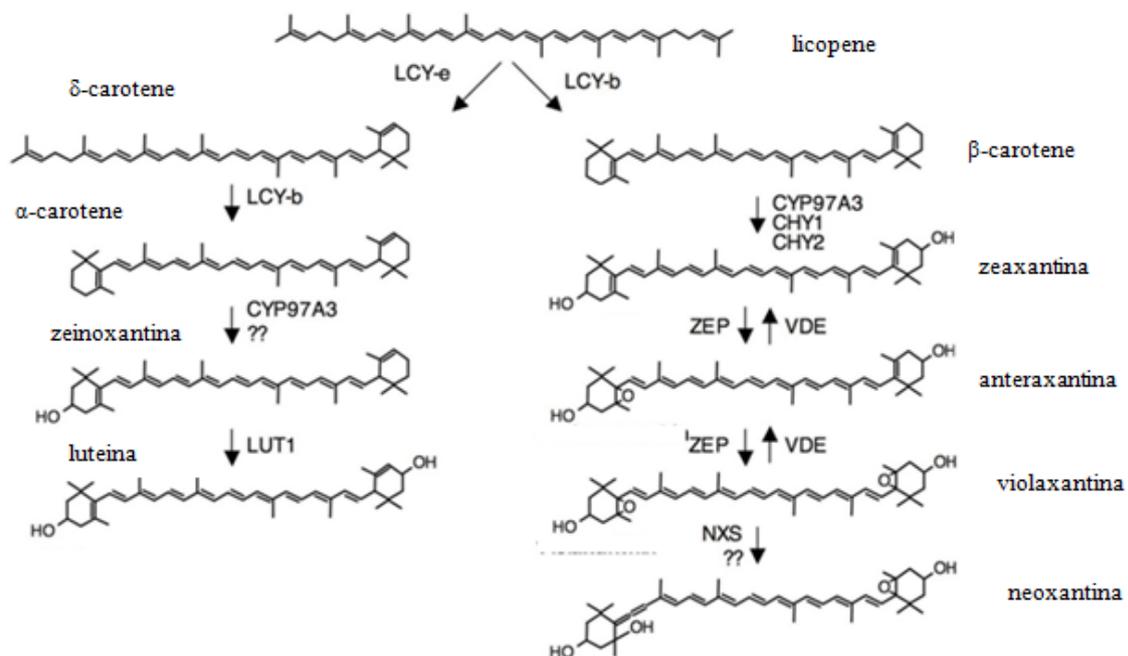


Figura 12 Via biosintetica della luteina e della zeaxantina. Modificato da https://www.researchgate.net/figure/Carotenoid-biosynthesis-pathway-The-enzymes-involved-in-the-various-reactions-are_fig1_6983510

Stesse conclusioni sono state ottenute dai lavori di Gómez et al. (2003) incentrati sullo studio dell'effetto della salinità (1M, 2M e 3M NaCl) sulla quantità e qualità dei carotenoidi sintetizzati e accumulati dal ceppo CONC-007 di *Dunaliella salina* e dal ceppo ATCC 30861 di *D. bardawil*, cresciuti in due mezzi differenti, il Provasoli (PES) (contenente basse concentrazioni di azoto (N) e fosforo (P)) e l'ART (contenente una bassa concentrazione di N ma alta di P in confronto al PES). Per il ceppo CONC-007 di *D. salina*, i ricercatori hanno affermato che il massimo tasso di

crescita è stato riscontrato alla minore salinità (1M NaCl); riguardo al contenuto di carotenoidi, nel mezzo PES si ha un maggior contenuto di carotenoidi per cellula a concentrazioni di 1M e 2M NaCl, nel mezzo ART a 3M NaCl. Nelle colture di *D. salina* è stata comunque osservata una correlazione positiva tra carotenoidi per volume cellulare e salinità, indipendentemente dal terreno di coltura. I risultati di questo studio indicano che sebbene i carotenoidi aumentino con la salinità, un ruolo importante viene giocato anche dalla limitazione di nutrienti (N) nella sintesi e nell'accumulo di carotenoidi.

Altro fattore essenziale per la sintesi e l'accumulo di carotenoidi è, come già anticipato da Lerche, l'eccessiva irradianza. Come dimostrato da Lamers et al. (2010), l'aumento dell'intensità luminosa è immediatamente seguito dalla produzione del β -carotene in *D. salina*. Inoltre è stato osservato che l'accumulo massivo di β -carotene è accompagnato dalla comparsa di globuli di grasso costituiti da acidi grassi a bassa insaturazione (soprattutto C16:0 e C18:1).

Riassumendo, le condizioni di crescita per ottenere un maggior accumulo di carotenoidi, interessanti per applicazioni industriali sono:

- 1) STRESS SALINO: come descritto da Teodoresco (Teodoresco, 1905), le cellule di *D. salina* non hanno una parete cellulare rigida di cellulosa, piuttosto presentano uno strato esterno elastico e flessibile che permette alla cellula di cambiare la sua forma in funzione della concentrazione di sale nel mezzo, più arrotondata con aumento di volume sino anche a scoppiare a basse concentrazioni di NaCl, allungata a più alte salinità (Fig. 13); stesse considerazioni furono fatte da Lerche. Inoltre, la concentrazione intracellulare di NaCl in un intervallo di salinità del mezzo da 0,5M a 4M NaCl è sotto i 100mM, perciò la pressione osmotica intracellulare è minimamente influenzata dalla presenza di NaCl all'interno della cellula (Katz et al., 1985). Ma allora come fa *D. salina* a proteggersi dallo stress osmotico indotto dalle alte salinità del mezzo in cui vive naturalmente? La risposta è fornita da diversi

studi che indicano che all'aumentare della salinità cresce la concentrazione intracellulare di glicerolo, che non solo protegge la cellula dallo stress osmotico ma è anche compatibile con le sue attività enzimatiche (Oren, 2005) che, al contrario, un'alta concentrazione di NaCl intracellulare inibirebbe (Johnson et al., 1968) e, grazie ad una membrana a bassa permeabilità al glicerolo, il composto rimane nello spazio intracellulare (Oren, 2005), e di β -carotene, come largamente descritto in precedenza.



Figura 13 Disegni di Teodoresco (1905) di *D. salina* (1-4) e *D. viridis* (5-8); forma allungata osservata in mezzi ad alta concentrazione salina (9-29); forma arrotondata in mezzi a bassa concentrazione salina (30-31); inizio della mitosi (32-34). Modificato da Oren, 2005

- 2) **STRESS DA ALTA LUCE:** il β -carotene è un pigmento fotoprotettivo che protegge dalla formazione e dall'attività di specie ossidanti (ROS).
- 3) **STRESS DA LIMITAZIONE DI AZOTO:** in mancanza di azoto, il carbonio non può essere incorporato in amminoacidi (portando a crescita della biomassa) e la cellula lo utilizza nella sintesi di lipidi e β -carotene.
- 4) **BASSA TEMPERATURA:** dagli studi di Ben-Amotz (1996) su *D. bardawil* sembra che le basse temperature (10-15°C) stimolino l'accumulo del 9-cis β -carotene che si trova solo in fonti naturali.

Da quanto discusso è ben chiaro che la carotenogenesi è una forma di protezione per *D. salina* ed è quindi massima in condizioni di stress, ovvero quando la crescita di biomassa algale è minima.

2.3 La questione del Nitro del Cile (NaNO_3)

Il mezzo di crescita Amcona, utilizzato per coltivare i due ceppi di *D. salina*, ha come fonte di azoto il nitrato di sodio (NaNO_3), sale conosciuto anche con il nome di Nitro del Cile data la presenza di enormi giacimenti di questo minerale sulla costa settentrionale del Cile.

L'attenzione rivolta a questo sale è dovuta a due motivi.

Innanzitutto, i giacimenti cileni sono in via di esaurimento ed è quindi necessario trovare una fonte alternativa di azoto da inserire nei terreni di coltura per alghe, che sia ugualmente biodisponibile per questi organismi.

La seconda motivazione riguarda il settore dell'agricoltura biologica delle microalghe. Infatti il Regolamento (CE) n. 889/2008, recante le modalità di applicazione del Regolamento (CE) n. 834/2007, relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, ammette come fonte di azoto in agricoltura biologica delle alghe soltanto i nutrienti di origine vegetale o minerale presenti nell'allegato I (Fig.14). Dunque, non essendo elencato in questo allegato, il Nitrato del Cile non può essere impiegato nell'agricoltura biologica delle alghe, inoltre l'Articolo 12 del Reg. (CE) n. 834/2007 specifica che nelle produzioni vegetali non si possono usare concimi minerali azotati. Nel presente regolamento con il termine "alghe marine" si intendono le alghe marine pluricellulari, il fitoplancton e le microalghe (*Articolo 6 bis*).

Articolo 6 quinquies

Coltivazione di alghe marine

1. L'alghicoltura in mare utilizza esclusivamente elementi nutritivi naturalmente presenti nell'ambiente o provenienti dalla produzione di animali dell'acquacoltura biologica, in tal caso preferibilmente prodotti nelle immediate vicinanze, nell'ambito di un sistema di policoltura.

2. Negli impianti a terra che si avvalgono di fonti esterne di nutrienti, i livelli di nutrienti negli effluenti devono essere provatamente uguali o inferiori a quelli dell'acqua in entrata. Possono essere utilizzati soltanto i nutrienti di origine vegetale o minerale elencati nell'allegato I.

Figura 14 Tipi di nutrienti utilizzabili nell'agricoltura biologica delle alghe. Modificato da Reg. (CE) 889/2008, articolo 6 quinquies.

A tale scopo si è cercata una fonte alternativa di azoto permessa dai regolamenti europei sui prodotti biologici per crescere il ceppo *D. salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia, in modo che possa essere certificata come proveniente da agricoltura biologica.

Scopo della tesi

In questo lavoro di tesi si sono volute caratterizzare le proprietà nutrizionali di *D. salina* isolata da una salina italiana e mai studiata in termini di composizione macromolecolare (carboidrati, proteine e lipidi) e di contenuto di sali minerali. Il ceppo è stato poi confrontato con un ceppo custodito nella collezione algale europea SAMS, allo scopo di stabilirne le potenzialità applicative. Inoltre si è voluto testare se la *D. salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia riesce a crescere con una fonte alternativa di azoto permessa dalle normative europee sui prodotti biologici e, nel caso, caratterizzarne le proprietà nutrizionali.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Coltivazione e curve di crescita delle alghe *D. salina* CCAP 19/25 e *D. salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia in Puglia

L'alga *Dunaliella salina* CCAP 19/25, da qui in poi nominata *D. salina* CCAP, e l'alga *D. salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia nel 2014, da qui in poi nominata *D. salina* MS, sono state coltivate e studiate in fase stazionaria e in fase esponenziale di crescita a 3 salinità (0,5M – 1,5M – 5M NaCl) in mezzo di crescita Amcona. Inoltre l'alga *D. salina* MS è stata coltivata in mezzo Amcona contenente 0,5M, 1,5M o 5M NaCl in cui la sola fonte di N aggiunto è stata il fertilizzante STIMOLO[®] al posto di NaNO₃ in modo da mantenere la stessa concentrazione di N nel mezzo.

Questa fonte di N alternativa risulta conforme alle direttive sui concimi ammessi nel biologico secondo l'allegato I del Reg. (CE) 889/2008 (Fig.15).

Infatti STIMOLO[®] è un idrolizzato proteico di erba medica ricco di amminoacidi a basso peso molecolare, alghe (*Ascophyllum nodosum*) e melasso (da cui si ricava la borlanda), prodotto dall'azienda FERTENIA SRL (Salerno) (<http://www.fertenia.it/ita/biopromotori/stimolo.pdf>; <http://www.fertenia.it/depliant/stimolo.pdf>) (Fig.16 e 17).

▼B	A	Prodotti e sottoprodotti di origine vegetale per la fertilizzazione	Esempi: panelli di semi oleosi, gusci di cacao, radichette di malto
	A	Algh e prodotti a base di algh e	Se ottenuti direttamente mediante: i) processi fisici comprendenti disidratazione, congelamento e macinazione; ii) estrazione con acqua o soluzione acida e/o alcalina; iii) fermentazione
	A	Borlande ed estratti di borlande	Escluse le borlande estratte con sali ammoniacali

Figura 15 Concimi ammessi dal Reg. (CE) 889/2008

Per ogni coltura nelle due fasi di crescita sono state allestite 3 repliche biologiche.

Per coltivare le algh e sono state usate beute in pyrex da 250ml, chiuse da garze che permettono il passaggio dei gas garantendo la sterilit  della coltura. Le beute sono state posizionate all'interno di camere di coltura illuminate da neon (circa $118\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) e alla temperatura di circa 20°C .

Le colture sono state preparate da inoculi di colture madre adattate ciascuna alla rispettiva salinit . Il volume di ogni inoculo dalla coltura madre   stato calcolato al fine di avere 50000cell/ml in 150ml finali di coltura. Il volume di fertilizzante Stimolo da aggiungere al mezzo Amcona   stato calcolato in modo da mantenere la stessa concentrazione di azoto presente nella ricetta originaria del mezzo Amcona (137 μl di Stimolo in 100ml di Amcona) (Fig.17).

Di seguito   riportata la ricetta del mezzo Amcona.

AMCONA (1L)

	[] Stock	[] Finale	Volume per 1 L
NaCl		363 mM	21.21 g
Na ₂ SO ₄	1 M	25 mM	25 mL
KCl	2 M	8.04 mM	4.02 mL
NaHCO ₃	1 M	2.07 mM	2.07 mL
KBr	1 M	725 μM	725 μL
H ₃ BO ₃	0.5 M	372 μM	744 μL
NaF	0.5 M	65.7 μM	131.4 μL
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 M	41.2 mM	20.6 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 M	9.14 mM	9.14 mL
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.5 M	82 μM	164 μL
NaNO ₃	1 M	549 μM	549 μL
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	100 mM	21 μM	210 μL
*Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	105 mM	205 μM	2 mL
*CuSO ₄ · 5H ₂ O	40 μM	40 nM	1 mL

- Soluzione di metalli I – Ferro

1 mL di stock 6.5 mM concentrazione finale 6.56 μM

- Soluzione di metalli II- Metalli Traccia

1 mL della soluzione stock

- Soluzione di Vitamine

1mL della soluzione stock

- TRIS-HCl , pH 8.1, concentrazione finale 10 mM

STOCK METALLI I – ferro [1 mL L⁻¹] 6.56 Mm

gL⁻¹ soluzione stock

FeCl₃ · 6H₂O 1.77

Na₂EDTA · 2H₂O 3.09

STOCK METALLI II – metalli traccia [1 mL L⁻¹]

	gL ⁻¹ soluzione stock	Concentrazione finale
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.073	254 nM
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.016	5.69 nM
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.54	2.42 μM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.48 x 10 ⁻³	6.1 nM
Na ₂ SeO ₃	1.73 x 10 ⁻⁴	1 nM
NiCl ₂ · 6H ₂ O	1.49 x 10 ⁻³	6.3 nM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	2.44	8.29 μM

STOCK VITAMINE [1 mL L⁻¹]

	gL ⁻¹ soluzione stock	Concentrazione finale
Tiamina-HCL	0.1	297 nM

Biotina	0.002	4.09 nM
B ₁₂	0.001	1.47 nM

Composizione		Proprietà Fisiche
Aminoacidi totali	28,0 %	Formulazione: LIQUIDA
Azoto (N) totale	4,5 %	Densità: 1,237
Azoto (N) Organico	4,5 %	pH (sol. 1%) 5,2
Carbonio (C) organico	15,0 %	Conducibilità (E.C. 1‰ mS/cm 18° C): 0,16
Componenti		
Idrolizzato di erba medica, estratto di yucca schidigera		

Figura 16 Composizione del fertilizzante Stimolo. Da <http://www.fertenia.it/ita/biopromotori/stimolo.pdf>

RISULTATI ANALITICI									
	Valore/ Incertezza	U.M.	LoQ	LoD	R	Data inizio fine analisi	Unità op.	Ri ga	
SUL CAMPIONE TAL QUALE									1
AZOTO TOTALE (KJELDAHL)	5,63±0,18	g/100 g (come N)	0,020			09/07/2018- -12/07/2018	01	2	
Met.: MP 2241 rev 0 2017									
COMPOSIZIONE DEGLI ZUCCHERI									01
Met.: MP 1114 rev 6 2016									
Glucosio	< LoQ	g/100 g	0,010			09/07/2018- -13/07/2018		4	*
Fruttosio	0,0208±0,0073	g/100 g	0,010					5	*
Lattosio	< LoQ	g/100 g	0,010					6	*
Saccarosio	< LoQ	g/100 g	0,010					7	*
Maltosio	< LoQ	g/100 g	0,010					8	*
Somma degli zuccheri	0,0208±0,0073	g/100 g	0,010					9	*
ARSENICO	0,080±0,018	mg/kg	0,010	0,0067	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	10	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
CADMIO	tracce	mg/kg	0,0050	0,0017	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	11	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
FERRO	361±71	mg/kg	1,0	0,33	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	12	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
FOSFORO	165±21	mg/kg	25	5,0	103.4*	09/07/2018- -13/07/2018	02	13	
Met.: MP 1289 rev 10 2017									
MANGANESE	7,1±1,6	mg/kg	0,020	0,0083	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	14	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
MERCURIO	tracce	mg/kg	0,0050	0,0017	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	15	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
PIOMBO	0,0181±0,0042	mg/kg	0,0050	0,0017	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	16	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
POTASSIO	18 600±1 800	mg/kg	25	5,0	103.4*	09/07/2018- -13/07/2018	02	17	
Met.: MP 1289 rev 10 2017									
RAME	1,76±0,37	mg/kg	0,050	0,017	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	18	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
ZINCO	2,14±0,52	mg/kg	0,50	0,17	108.69	09/07/2018- -11/07/2018	02	19	
Met.: MP 1288 rev 13 2017									
FITOFARMACI								20	

Figura 17 Composizione del fertilizzante Stimolo, analisi effettuate da CHELAB SRL per l'azienda GREENTECH SRL di Jesi (Ancona).

Riguardo alle colture in terreno Amcona+STIMOLO, le uniche cellule che sono riuscite a sopravvivere sono state quelle coltivate a salinità 5M NaCl. Questa coltura al microscopio è risultata avere una minor carica batterica rispetto alle colture alle due salinità minori (0,5M e 1,5M NaCl) e forse proprio questo è stato il fattore determinante la morte di queste ultime due. Per questo motivo, lo studio del tasso di crescita, della produzione di pigmenti, del contenuto proteico e lipidico cellulare e degli elementi in traccia è stato effettuato solo nella coltura in Amcona 5M NaCl+STIMOLO.

Le curve di crescita sono state costruite dalle colture allestite (coltivazione in *batch*) per raggiungere la fase stazionaria prelevando da ogni beuta (3 repliche biologiche per ogni salinità) un campione di coltura e contando le cellule/ml al contatore automatico Casy® (Contatore cellulare Casy TT (Roche Innovatis)), settato per la conta di particelle dal diametro 5-40µm. Per la conta sono stati prelevati ogni volta 100µl di coltura, a cui sono stati aggiunti 10ml di soluzione Casy tone. Una volta riportati i valori, per ciascuna replica biologica, su un grafico cartesiano x (tempo in giorni) e y (densità cellulare, cell/ml) sono state distinte 3 fasi di crescita: fase lag e cioè di adattamento, fase logaritmica (log) e cioè di crescita esponenziale e fase stazionaria. I valori (cell/ml) della fase esponenziale, sono stati trasformati in logaritmo naturale (ln), e ne è stata tracciata la retta la cui pendenza corrisponde al tasso di crescita μ (1/giorni).

$$\mu \text{ (1/giorni)} = \ln (N_t/N_0) \times 1/t$$

dove N_t = cell/ml al tempo t; N_0 = cell/ml al tempo 0.

A partire da μ è stato calcolato il tempo di divisione, ovvero il tempo necessario affinché il numero di cell/ml raddoppi:

$$(T_d) = \ln 2 / \mu.$$

Una volta ottenuti i 3 tassi di crescita relativi alle 3 repliche biologiche, ne è stata calcolata la media e la deviazione standard.

Questo procedimento è stato applicato per entrambi i ceppi di *D. salina* a ciascuna delle 3 salinità e per la coltura di Margherita di Savoia cresciuta in Amcona 5M+Stimolo.

3.2 Estrazione e quantificazione della clorofilla a (Chl a), b (Chl b) e dei carotenoidi totali

Cellule precedentemente contate sono state prelevate in base alla densità cellulare per arrivare ad una quantità totale di circa $0,5-1 \times 10^7$ cellule, centrifugate a 3000rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e, dopo aver allontanato il surnatante, il pellet cellulare è stato risospeso in 1ml o 1,5ml (a seconda delle condizioni) di acetone 80%. L'estrazione dei pigmenti è avvenuta al buio a 4°C fino all'ottenimento di un pellet bianco. I campioni sono stati centrifugati a 13000rpm per 3 minuti. Il pellet è stato congelato a -20°C per la quantificazione successiva delle proteine.

I pigmenti dell'estratto sono stati quantificati leggendo le assorbanze a $\lambda 470$, $\lambda 647$ e $\lambda 663$ e applicando le formule seguenti (Lichtenthaler, 1987) (Fig.18).

$$\begin{aligned} &\text{Acetone, 80\% (v/v):} \\ C_a &= 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8} \\ C_b &= 21.50A_{646.8} - 5.10A_{663.2} \\ C_{a+b} &= 7.15A_{663.2} + 18.71A_{646.8} \\ C_{x+c} &= \frac{1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b}{198} \end{aligned}$$

Figura 18 Formule per la quantificazione delle clorofille a e b e dei carotenoidi totali estratti in acetone 80%. Da Yocum et al., 1987.

3.3 Determinazione del contenuto proteico cellulare

Per determinare il quantitativo di proteine cellulari è stato usato il Metodo di Lowry (1951). Il saggio sfrutta la formazione, a pH alcalino, del complesso rame-proteine in cui il Cu^{2+} viene ridotto a Cu^+ , il quale a sua volta reagisce con il reagente di Folin-Ciocalteu. Il meccanismo di reazione porta all'ossidazione dei residui di cisteina, tirosina e triptofano e alla riduzione del reattivo di Folin-Ciocalteu con comparsa di una colorazione blu.

Il protocollo prevede che il campione cellulare da saggiare venga dapprima trattato con 500 μl di 1%SDS e NaOH 0,1M, così da permettere il rilascio delle proteine dalla cellula e creare un ambiente basico (pH circa 10). A questo punto dopo aver vortexato per 1 minuto vengono aggiunti 500 μl di reagente A, si vortexano i campioni e si aspettano 10 minuti per poi aggiungere alla miscela di reazione 500 μl di reagente B (Fig.19). Dopo 30 minuti compare una colorazione blu di intensità direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina nel campione analizzato, che viene quantificata attraverso lettura dell'assorbanza a $\lambda 750\text{nm}$. Per correlare il valore spettrofotometrico con il quantitativo di proteina nei campioni, i dati vengono in una retta di taratura costruita con i valori ottenuti da campioni a concentrazione nota di BSA (albumina da siero bovino).

SOLUZIONE SDS	
SDS 1%	10% tot SDS 10%
NaOH 0.1M	12,5% tot NaOH 0,8M
H ₂ O	77,5% tot

REAGENTE A		
H ₂ O	25% tot	
CTC*	25% tot	
NaOH 0.8M	25% tot	3.2g in 100ml
10% SDS	25% tot	10g in 100ml

*CTC	0,1% CuSO ₄ : 5H ₂ O
	0,2% tartrato di NaK
	10% Na ₂ CO ₃
	91ml H ₂ O

REAGENTE B	
Folin-Cioc.	20% tot
H ₂ O	80% tot

Figura 19 Composizione dei reagenti per la quantificazione delle proteine

In questo caso i campioni cellulari per l'analisi delle proteine sono i pellet conservati a -20°C e derivanti dalla determinazione dei pigmenti.

Il contenuto proteico è stato in pg/cell.

3.4 Determinazione del contenuto lipidico cellulare dell'alga D. salina isolata dalle Saline di Margherita di Savoia

Per valutare il valore nutrizionale di un'alga è essenziale analizzare anche il suo contenuto lipidico sia in termini di quantità (assolute e relative) che di qualità.

Per l'estrazione dei lipidi totali è stato usato il Metodo Folch 1957, metodo principalmente utilizzato in letteratura per la determinazione dei lipidi in alghe e microalghe.

L'analisi è stata condotta su colture (da 500ml) di *D. salina* MS alle 3 salinità (0.5M, 1.5M e 5M NaCl) in fase stazionaria di crescita e sulla coltura dello stesso ceppo contenente Amcona 5M NaCl+Stimolo in fase stazionaria di crescita. La fase stazionaria è stata scelta perché presenta un maggior accumulo di lipidi. Per ogni campione sono state effettuate 3 corse cromatografiche (3 repliche strumentali).

Preliminarmente si sono centrifugate le colture a 3500rpm (quelle a salinità 0,5M NaCl e 1,5M NaCl) e a 3000 rpm (quelle a 5M NaCl e Amcona 5M NaCl+Stimolo) per 10minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso e lavato in 50ml di Ammonio Formato (AF), a concentrazione isotonica rispetto al mezzo di crescita per evitare la lisi osmotica delle cellule. I campioni sono stati quindi congelati a -80°C, temperatura che permette di preservare le strutture lipidiche.

	VOLUME DELLA COLTURA (ml) centrifugati	Cell/ml
0,5M NaCl	448	$8,4 \times 10^5$
1,5M NaCl	458	$9,6 \times 10^5$
5M NaCl	448	$5,4 \times 10^5$
5M NaCl +STIM.	500	$4,2 \times 10^5$

Tabella 8 Volume e densità cellulare delle colture di *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita centrifugate per la determinazione del contenuto lipidico cellulare.

A questo punto i campioni sono stati liofilizzati (20°C sottovuoto per 24h) per procedere all'estrazione dei lipidi (Folch, 1957) con l'aggiunta di standard interno (acido nonadecanoico 100μL).

I campioni sono stati tenuti in congelatore (circa -17°C) overnight.

L'indomani i campioni sono stati filtrati con filtri in fibra di vetro permeabili ai lipidi con lo stesso mix di estrazione del Metodo Folch, 1957 (cloroformio + metanolo 2:1).

Il filtro è stato precedentemente imbevuto con il mix di estrazione. Dopo il processo di filtrazione, la provetta di estrazione è stata lavata con un'aliquota da 1ml della soluzione, questo filtrato è stato aggiunto al filtrato precedente. Anche il filtro utilizzato per l'estrazione è stato lavato con 2 aliquote da 1ml e anch'esse recuperate. Il filtrato, in cui sono presenti solo i lipidi, è stato fatto evaporare a 80°C (temperatura massima possibile che evita la degradazione dei lipidi) e messo in stufa per 1 ora a 80°C per eliminare l'umidità eventualmente assorbita dall'ambiente. Dopo 1 ora si pesano i filtrati e si risospendono in 1.5ml di N-eptano, che permette di recuperare solamente i lipidi apolari. Ai campioni è stata aggiunta la soluzione di trans esterificazione (NaOCH_3 , sodio metilato per sintesi ~97%), che permette di staccare gli acidi grassi dal glicerolo, che precipita, e di legare loro il gruppo metile $-\text{CH}_3$ che li rende più volatili. Quest'ultima reazione è stata condotta in agitazione, per 3 minuti e con un eccesso (50 μl) di soluzione NaOCH_3 per esser certi che tutti i lipidi venissero esterificati. I campioni al termine della reazione sono stati centrifugati a 1000rpm per 1 minuto, il surnatante è stato recuperato (1.5ml) e neutralizzato in agitazione per 1 minuto con circa 40g di NaHSO_4 . I campioni, all'interno dei pesafiltri, sono stati messi in stufa per 1 ora e pesati. Dopo averli centrifugati a 1000rpm per 1 minuto è stato prelevato tutto il surnatante e 1 μl di questo è stato iniettato nella macchina (Agilent 6890N GC e Agilent5973 MASSA) per l'analisi GC/MS.

La gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS) è una tecnica di analisi che permette, grazie ad un gascromatoforo di separare le specie chimiche (in questo caso i vari tipi di lipidi) del campione e di rivelarle e quantificarle attraverso uno spettrometro di massa.

Il gascromatografo separa le specie chimiche del campione, introdotto nella colonnina capillare dove è presente un flusso di gas inerti (in questo caso è presente He 6.0), in funzione della loro affinità con la fase stazionaria che può essere liquida o solida (in questo caso si tratta di una colonna capillare con microstrato liquido) e in funzione della temperatura che può essere modulata. In tandem al gascromatografo si

trova uno spettrometro di massa, in grado di ionizzare le specie chimiche così che possano essere distinti i vari componenti chimici in base al rapporto massa/carica, alla fine della sequenza è prevista la presenza di un analizzatore che processa e elabora i dati ottenuti.

Il profilo lipidico è stato espresso in percentuale e quantificato come mg di acido grasso per 100 g di alga dw (dry weight).

3.5 Analisi FT-IR

L'analisi FT-IR (Spettroscopia ad infrarosso con trasformata di Fourier) permette di ottenere dati strutturali del campione utilizzando onde elettromagnetiche nel campo dell'infrarosso. Grazie alle informazioni fornite, si possono studiare le strutture molecolari del campione, ovvero i gruppi funzionali presenti e i legami chimici implicati.

Nel campo della fisiologia delle alghe, la spettroscopia FT-IR permette di analizzare la composizione biochimica delle alghe e di determinare il rapporto tra le concentrazioni delle macromolecole (carboidrati, proteine, lipidi e acidi nucleici) in cellule intere seccate, senza che siano necessari pretrattamenti) si riduce al minimo l'eventuale influenza di errori e artefatti dovuti alle procedure tradizionali di estrazione e analisi (Giordano et al., 2001 e Hirschmugl et al., 2006). La spettroscopia infrarossa si basa sul principio che quando un fotone infrarosso, emesso da una sorgente, colpisce una molecola, quest'ultima lo assorbe passando dallo stato vibrazionale fondamentale a quello eccitato. Ciascuna molecola assorbe i fotoni in maniera diversa in funzione dei gruppi funzionali e dei relativi legami chimici presenti che vibrano a λ specifiche (bande). Proprio queste differenze sono alla base dell'identificazione e quantificazione relativa dei costituenti molecolari cellulari. Le vibrazioni dei legami chimici causate dall'assorbimento del fotone possono essere di stiramento (stretching) o di deformazione dell'angolo di legame (bending).

L'analisi FT-IR viene eseguita posizionando i campioni all'interno di uno spettrometro nel quale la sorgente luminosa invia un fascio IR verso un interferometro (splitter) che lo divide in 2 fasci distinti diretti uno verso uno specchio fisso e l'altro verso uno specchio mobile. La mobilità di quest'ultimo produce un'interferenza positiva o negativa con il fascio riflesso dallo specchio fisso. Il fascio ricombinato IR colpisce il campione che, in base alle caratteristiche molecolari, assorbe energia a diverse $l'\lambda$ rilasciandola in modalità vibrazionale e ciò origina bande nello spettro vibrazionale, ciascuna descritta da una frequenza e ampiezza. Il segnale rilevato dal detector, l'interferogramma, viene implementato con la trasformata di Fourier e manipolato con modelli matematici, così da ottenere un grafico che presenta sull'asse delle X il numero d'onda ($1/\lambda$, cm^{-1}) delle radiazioni incidenti e sull'asse delle Y l'Assorbanza/Trasmittanza di ciascuna banda vibrazionale (Sacksteder et al., 2001 e webusers.fis.uniroma3.it>gio) (Fig.20 e Fig.21).

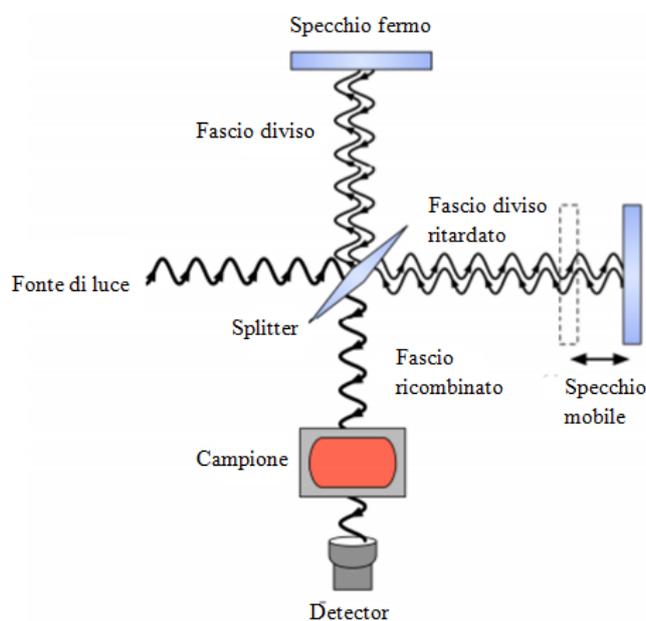


Figura 20 Principio di funzionamento della tecnica FT-IR. Modificato da webusers.fis.uniroma3.it>gio.

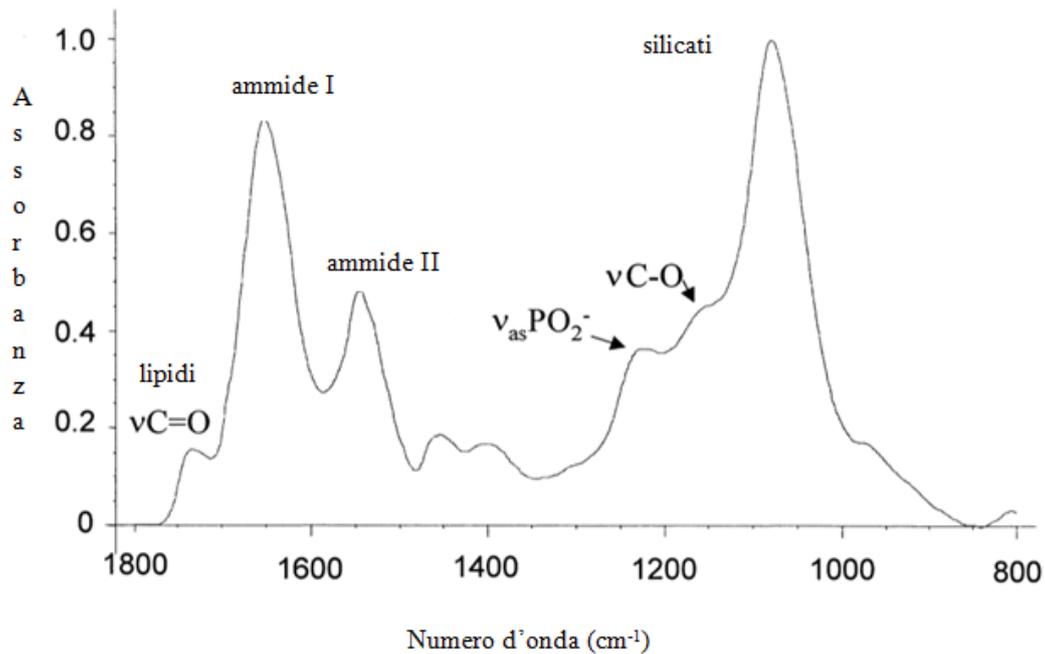


Figura 21 Esempio di spettro FT-IR (1800-800 cm⁻¹) relativo a cellule di *Chetoceros muellerii*. Modificato da Giordano et al., 2001.

Nelle analisi dei 2 ceppi di *D. salina* è stato usato lo spettrometro FT-IR Tensor 27 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germania). L'acquisizione dello spettro è stata operata con il programma OPUS 6.5. Ogni spettro è stato privato del rumore di fondo attraverso la funzione Manipulate – Baseline Correction. Per individuare i singoli contributi che formano lo spettro complesso, è stata applicata l'opzione Manipulate – Derivative – Order of derivate: 2 per l'intervallo 1800-500cm⁻¹. A questo punto, con l'opzione Evaluate – Curve fit è stata condotta la deconvoluzione dei picchi, precedentemente identificati, e le aree risultanti sono state usate per calcolare i rapporti di assorbanza tra le macromolecole (carboidrati/lipidi, carboidrati/proteine e lipidi/proteine).

Come rappresentato dalla tabella sottostante (Tabella 9), ad ogni picco spettroscopico corrisponde un gruppo funzionale (Giordano et al., 2001).

Numero d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione banda	Commenti
3025-3006	=C-H	Legami C=C
2953	-C-H di gruppi CH ₃	Legami C-C
2924	-C-H di gruppi CH ₂	Legami C-C
1730±5	C=O di gruppi funzionali esteri	Trigliceridi. Usata per la semiquantificazione dei lipidi
1650±10	C=O delle ammidi	Ammide I. Usata per la semiquantificazione delle proteine
1540±10	N-H di ammidi	Ammide II
1240±5	P=O fosfodiesteri	Acidi nucleici (DNA e RNA), potrebbe anche essere dovuta a proteine fosforilate e zuccheri polifosfati e fosfati
1200-900 (1024; 1150; 1050)	C-O-C di gruppi eteri dei carboidrati	Primariamente dovuta ai carboidrati. Il picco a 1155 cm ⁻¹ è usato per la semiquantificazione dei carboidrati
~1075	SiO di silicati	Frustuli silicati di diatomee

Tabella 9 Assegnazione bande FT-IR. Modificato da Giordano et al., 2001.

Per la preparazione dei campioni si è prelevata una certa quantità di coltura in funzione della densità cellulare al fine di ottenere circa $0,5-2 \times 10^7$ cellule. Le cellule sono state centrifugate a 3000rpm per 10 minuti, dopo aver allontanato il surnatante, il pellet è stato risospeso in AF isosmotico rispetto al mezzo di crescita; questo passaggio permette il lavaggio delle cellule eliminando i residui salini del mezzo nel pellet. Le cellule sono state nuovamente centrifugate a 3000rpm per 10 minuti e il pellet è stato risospeso in 2ml di AF e diviso in 2 aliquote da 1ml ciascuna, una aliquota è servita per l'analisi delle macromolecole l'altra per l'analisi degli elementi in traccia.

A questo punto l'aliquota è stata centrifugata a 13000 rpm per 3 minuti e il pellet è stato risospeso in 150µl di AF alla corrispondente concentrazione: tre volumi da 50µl di campione sono stati disposti su dischetti porta campione in silice (replica strumentale). Per ogni salinità è stato preparato anche un bianco (50µl) costituito dall'AF alla corrispondente concentrazione. I campioni così preparati sono stati

lasciati seccare in stufa a 80°C (temperatura affinché l'AF evapori) per una notte. L'indomani si sono acquisiti gli spettri.

3.6 Determinazione degli elementi in traccia: analisi PICOFOX

Per quantificare i microelementi presenti nelle cellule algali è stato usato lo strumento S2 PICOFOX BRUKER, uno spettrometro da banco che si basa sul principio della spettroscopia di fluorescenza a raggi X a riflessione totale (TXRF). L'utilizzo di questo dispositivo è vantaggioso in quanto permette la rilevazione di più microelementi (raggiungendo l'ordine di grandezza del ppb e ppm) contemporaneamente anche in piccoli campioni ($\mu\text{g-ng}$). Le analisi vengono effettuate attraverso uno standard interno, il gallio.

Il dispositivo è costituito da un tubo a raggi X che genera un fascio a raggi X diretto verso un monocromatore multistrato che ne seleziona un intervallo di λ ridotto. A questo punto il fascio colpisce il campione (posizionato su un dischetto di quarzo) con un'angolazione minore di 0.1° , e viene totalmente riflesso verso il rivelatore. Quest'ultimo componente riesce a discernere tra i vari elementi in traccia grazie alle diverse e caratteristiche di fluorescenza emessa da ciascun elemento (Fig.22). La misurazione risulta essere molto precisa grazie alla vicinanza del porta campione al rivelatore che permette di ridurre l'assorbimento della fluorescenza da parte dell'aria e una resa di fluorescenza ottima (<https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/s2-picofox/overview.html>).

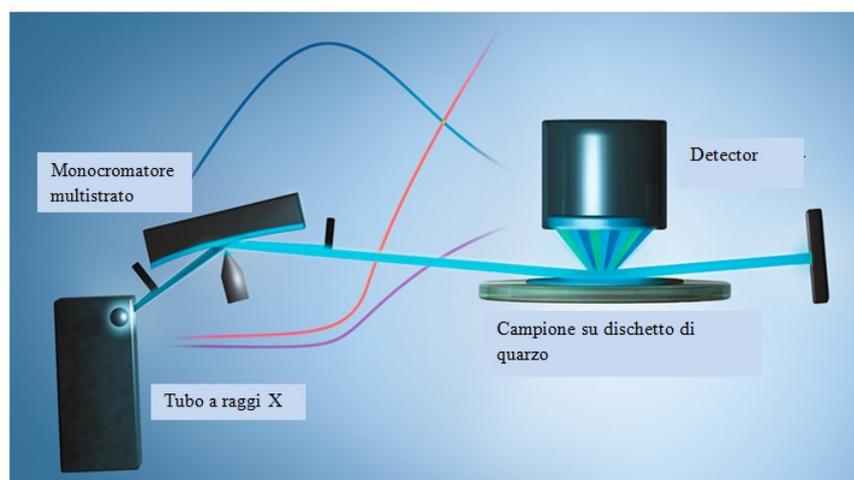


Figura 22 Principio di funzionamento del dispositivo S2 PICOFOX BRUKER. Modificato da <https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/s2-picofox/overview.html>

I campioni sono stati allestiti secondo la procedura illustrata nel paragrafo precedente riguardante l'analisi FT-IR. Ad ogni aliquota di campione da 1ml sono stati aggiunti 5µl di standard Ga alla concentrazione di 5mg/l. Dopo aver vortexato il campione, 10µl sono stati posizionati al centro di un dischetto di quarzo e fatti seccare su piastra riscaldata (acqua e AF evaporano). A questo punto il dischetto è stato posizionato nel porta oggetti del dispositivo Pico-FOX per procedere all'acquisizione dello spettro.

I valori degli elementi traccia sono stati espressi come fg/cellula.

3.7 Analisi statistica dei dati

I dati sono stati analizzati statisticamente mediante analisi della varianza a due vie (two-way ANOVA) e successive comparazioni multiple attraverso il Tukey-test che valuta la significatività della correlazione, utilizzando il programma GraphPad Prism versione 8.2.1.

L'analisi statistica dei risultati relativi al tasso di crescita, all'estrazione dei pigmenti, alla determinazione del contenuto proteico e degli elementi traccia è stata effettuata inserendo nel programma le medie e le deviazioni standard calcolate su 3 repliche biologiche.

Per l'analisi FT-IR sono state inserite le medie e le deviazioni standard calcolate su 2 repliche strumentali per le 3 repliche biologiche, mentre per la determinazione dei lipidi cellulari di *D. salina* isolata da Margherita di Savoia sono state inserite le medie e le deviazioni standard calcolate su 3 repliche strumentali.

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Curve di crescita

Dal grafico (Fig.23) è evidente che la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata alle 3 salinità mantiene un tempo di divisione T_d non statisticamente diverso, di circa un giorno e mezzo. Questo andamento, invece, non è riscontrabile nella *D. salina* CCAP che, mentre a bassa (0,5M NaCl) e media (1,5M NaCl) salinità cresce velocemente con un T_d di circa 0,6 giorni, non statisticamente differente tra le due condizioni di crescita, ad alta concentrazione 5M NaCl, cresce più lentamente con un T_d pari a circa 2 giorni e mezzo. Considerando le singole salinità, non si riscontrano differenze significative tra i due ceppi. Crescere il ceppo isolato da Margherita di Savoia a salinità 5M NaCl in Amcona+Stimolo allunga il T_d a circa 4 giorni e mezzo.

Nel ceppo *D. salina* isolata da Margherita di Savoia, nonostante i tassi di crescita siano paragonabili, la massima densità cellulare (Tabella 10) è stata raggiunta a salinità 0,5M NaCl al giorno 15, dato paragonabile alla coltura a salinità 1,5M NaCl (al giorno 21) ed infine la minima densità cellulare è stata osservata nella coltura a 5M NaCl (al giorno 15).

Nel ceppo CCAP si è raggiunta una densità cellulare (cell/ml) maggiore rispetto alla *D. salina* MS in tutte e tre le condizioni di coltura.

Salinità (M NaCl)	<i>D. salina</i> MS		<i>D. salina</i> CCAP	
	μ (gg ⁻¹)	cell/ml x 10 ⁻⁶	μ (gg ⁻¹)	cell/ml x 10 ⁻⁶
0,5	0,57±0,06	1,65±310098,9	1,13±0,21	2,85±164150,3
1,5	0,47±0,04	1,33±71077,4	1,02±0,06	2,25±495186,2
5	0,37±0,09	0,31±171452,1	0,29±0,04	1,56±146186
Amcona 5M+Stimolo	0,15±0,01	0,26±13803,02		

Tabella 10 Tassi di crescita (μ gg⁻¹) con relative deviazioni standard e densità cellulare (cell/mlx10⁻⁶) dei ceppi *D. salina* MS e *D. salina* CCAP alle 3 salinità di crescita e di *D. salina* MS in Amcona 5M+Stimolo. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche biologiche.

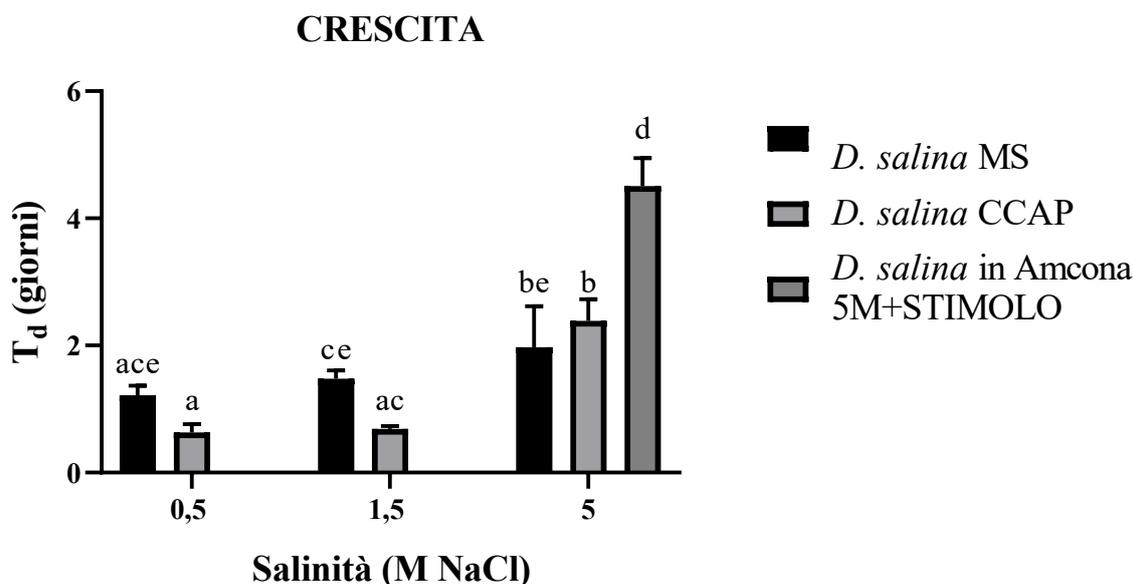


Figura 23 Tempo di divisione (Td) del ceppo *D. salina* MS e *D. salina* CCAP cresciuti in presenza di 0,5M, 1,5M o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.2 Estrazione dei pigmenti: clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi

Dal grafico 1(Fig.24) si evidenzia che il contenuto di carotenoidi per cellula varia al variare della fase di crescita: nella coltura in presenza di 1,5M NaCl è circa 2,5-3

volte maggiore nella fase stazionaria rispetto alla fase di crescita esponenziale, mentre nella coltura a 0,5M NaCl i carotenoidi per cellula nella fase stazionaria sono circa la metà rispetto a quelli presenti in fase esponenziale, al contrario nella coltura a 5M NaCl non si notano differenze nel contenuto di carotenoidi per cellula in funzione della fase di crescita.

Il grafico 2 (Fig.24) evidenzia che il ceppo isolato da Margherita di Savoia ha più clorofilla a salinità bassa e intermedia in fase esponenziale mentre ad alta salinità (5M NaCl) in fase esponenziale il contenuto di clorofilla è evidentemente contenuto.

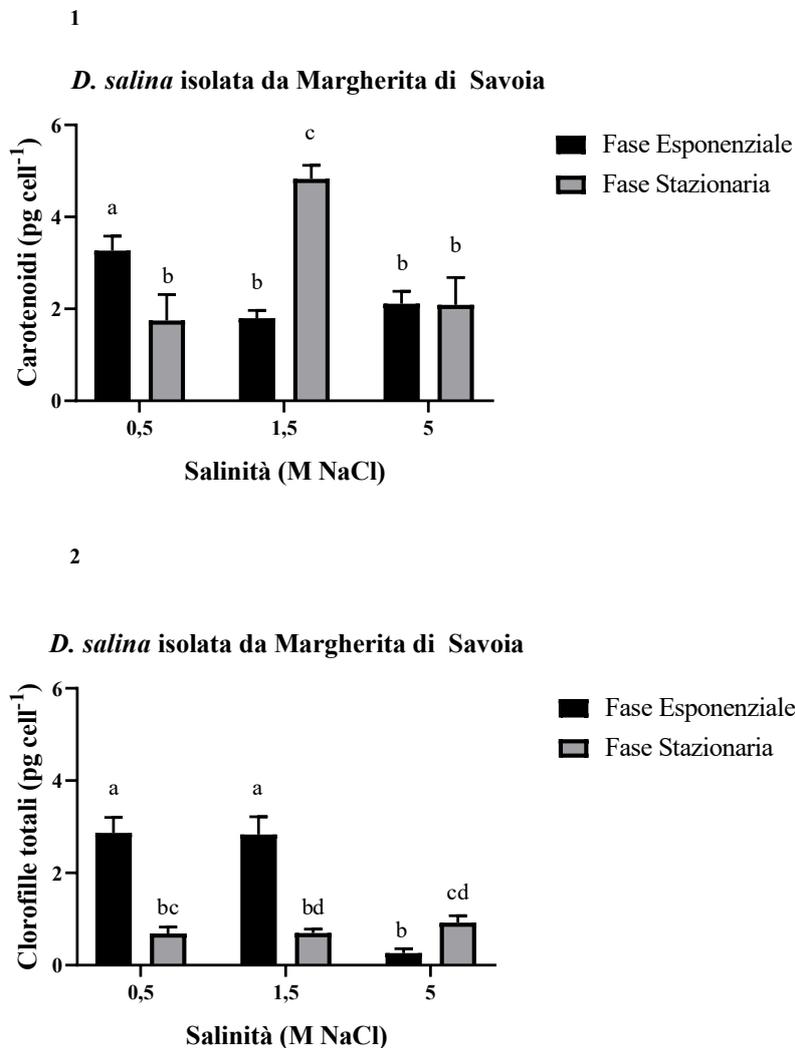


Figura 24 Contenuto cellulare (pg cell⁻¹) di carotenoidi (1) e clorofille totali a+b (2) in fase esponenziale e stazionaria di crescita delle colture del ceppo *D. salina* MS coltivato in presenza di 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

Il grafico 1 (Fig.25) evidenzia che nella *D. salina* CCAP la quantità di carotenoidi per cellula non varia significativamente né in funzione della salinità né della fase di crescita. Considerazioni analoghe possono essere fatte per il contenuto di clorofilla a+b per cellula (grafico 2), ad eccezione della coltura in fase esponenziale di crescita a 0,5M NaCl che sembra accumularne una quantità leggermente più cospicua rispetto alla coltura a 5M NaCl.

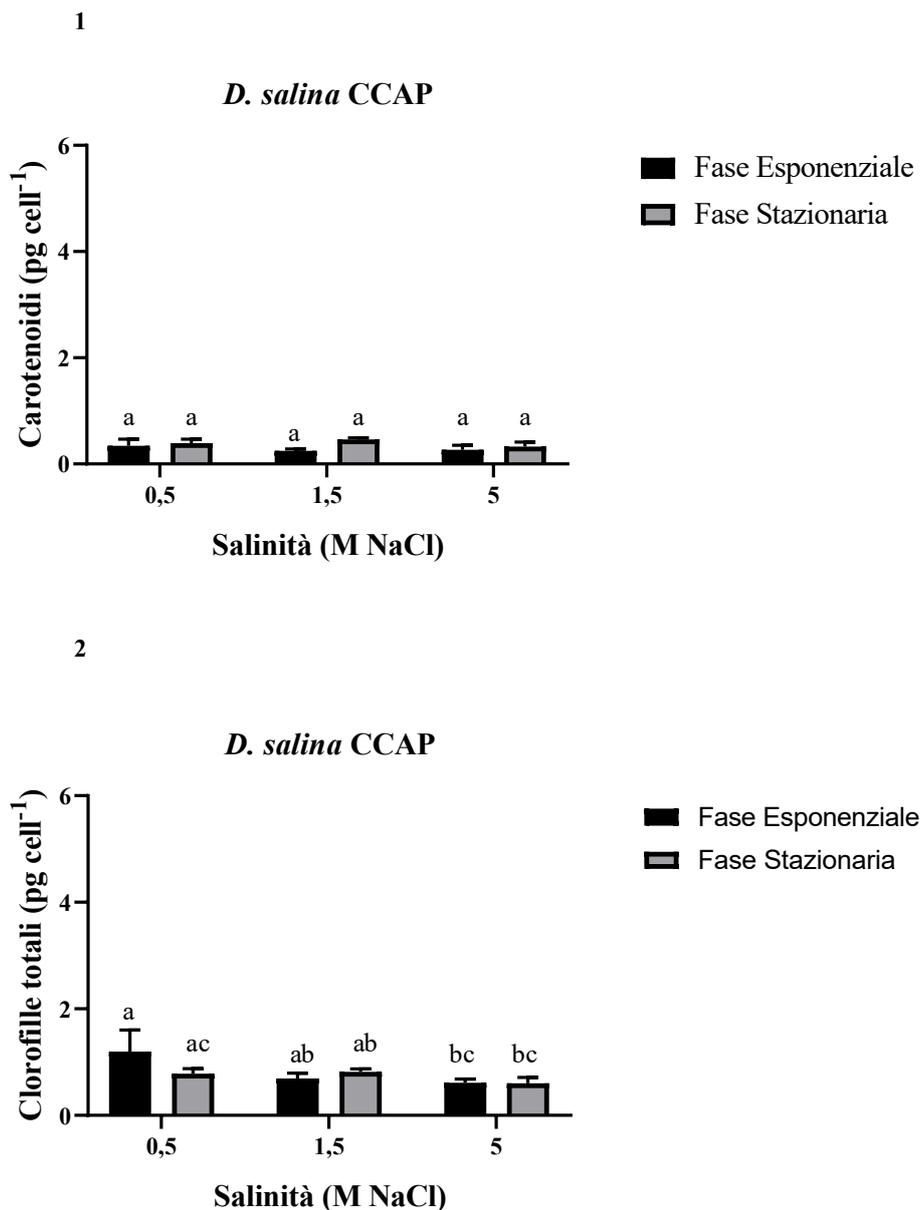


Figura 25 Contenuto cellulare (pg cell⁻¹) di carotenoidi (1) e clorofille totali a+b (2) in fase esponenziale e stazionaria di crescita delle colture del ceppo *D. salina* CCAP coltivato in presenza di 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

Dai grafici 1-3-5 (Fig.26) è evidente che le cellule di *D. salina* isolata da Margherita di Savoia accumulano, indipendentemente dalla salinità e dalla fase di crescita, più carotenoidi delle cellule del ceppo CCAP. Per quanto riguarda le clorofille totali (grafici 2-4-6), anche in questo caso l'alga *D. salina* isolata da Margherita di Savoia in particolari condizioni di salinità e crescita (0,5M NaCl in fase esponenziale; 1,5M NaCl in fase esponenziale; 5M NaCl in fase stazionaria) accumula più clorofilla per cellula rispetto al ceppo CCAP.

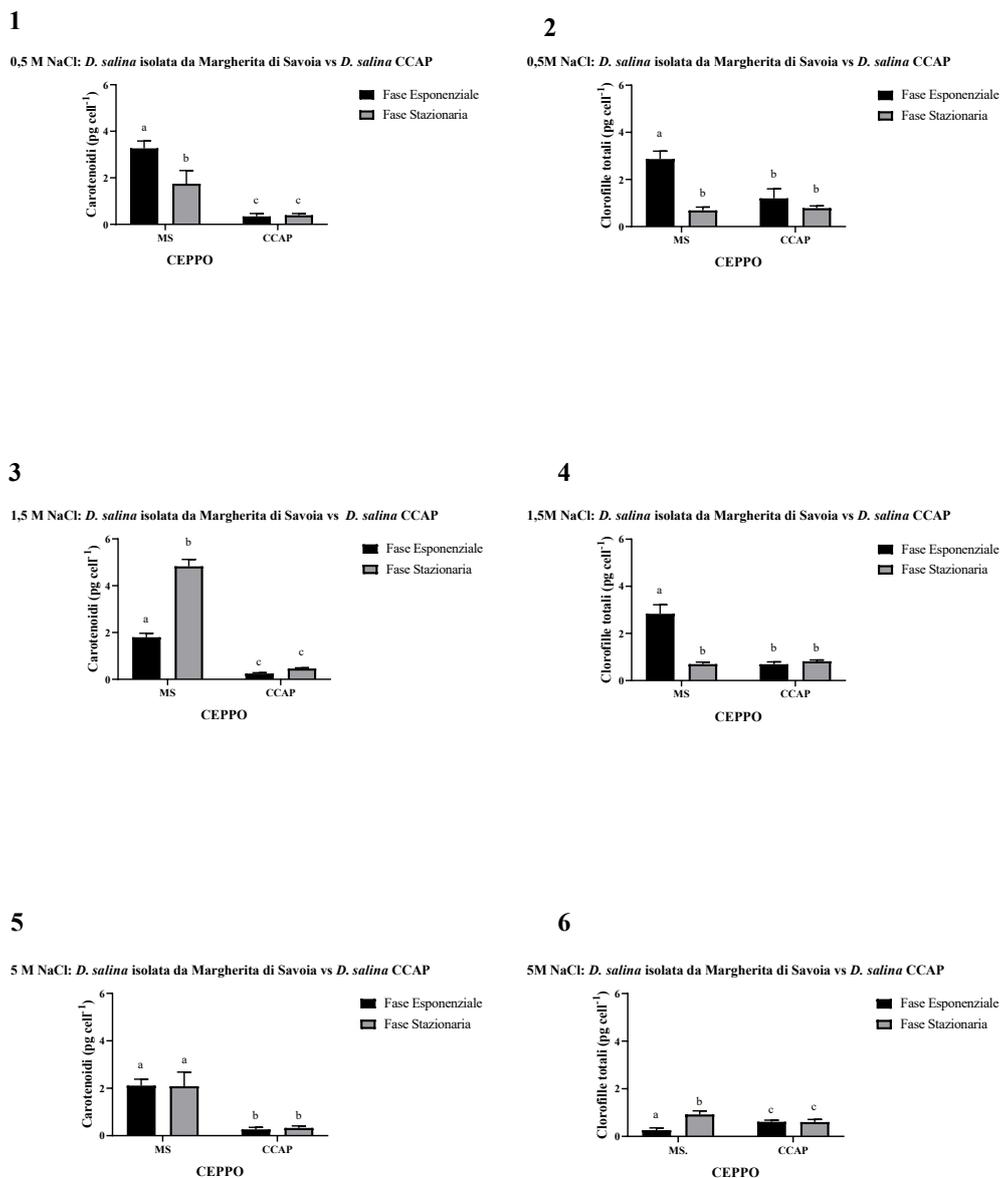
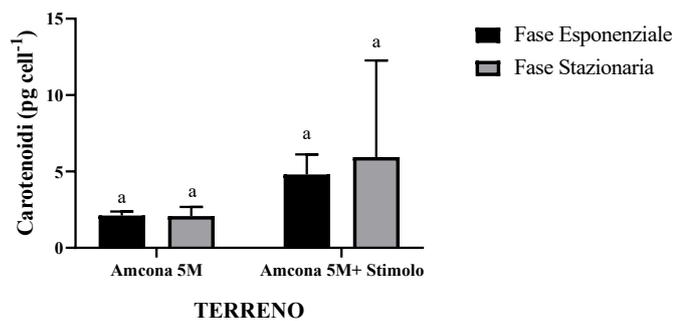


Figura 26 Confronto tra il contenuto di carotenoidi per cellula (1-3-5) e di clorofilla a+b per cellula (2-4-6) tra i due ceppi di *D. salina* (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase stazionaria e esponenziale di crescita coltivati a 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

Dai grafici (Fig.27) si nota che le quantità di carotenoidi e clorofilla totali per cellula del ceppo *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivato a salinità 5M NaCl in terreno Amcona+Stimolo non risultano essere particolarmente differenti in funzione della fase di crescita. Inoltre la quantità di carotenoidi per cellula presente non è statisticamente diversa dallo stesso ceppo coltivato in Amcona 5M NaCl, questo a prova del fatto che la differente forma di N del mezzo di crescita non influenza la quantità di carotenoidi sintetizzati. Stesso discorso per le clorofille totali, ad eccezione della fase esponenziale della coltura in Amcona 5M+Stimolo, che presenta una grande quantità di clorofilla per cellula, pari a circa 16 volte quella misurata nella corrispondente fase esponenziale della coltura di *D. salina* MS in Amcona 5M NaCl.

D. salina isolata da Margherita di Savoia in Amcona vs Amcona 5M+Stimolo



D. salina isolata da Margherita di Savoia in Amcona 5M vs Amcona 5M+Stimolo

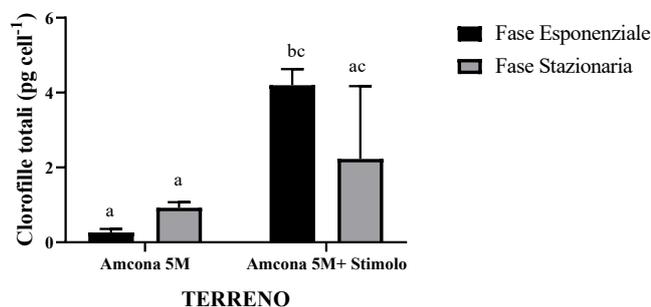


Figura 27 Contenuto di carotenoidi e clorofilla a+b per cellula nel ceppo *D. salina* isolata da Margherita di Savoia in fase esponenziale e stazionaria di crescita, cresciuta in presenza di NaNO₃ (Amcona 5M NaCl) o STIMOLO (Amcona 5M NaCl+STIMOLO) come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

Dal grafico (Fig.28) è evidente che il ceppo *D. salina* MS coltivato in Amcona 1,5M NaCl vede aumentare il rapporto carotenoidi/clorofilla a+b per cellula passando dalla fase esponenziale di crescita a quella stazionaria, ciò è giustificato dall'alto contenuto di carotenoidi per cellula in questa fase di crescita (Fig.24), mentre a salinità 0,5M NaCl questa differenza non è significativa, tanto che la coltura si presenta arancione sin dalla fase esponenziale di crescita (Fig.29). La coltura in Amcona 5M NaCl in fase di crescita esponenziale, a causa di un ridottissimo contenuto di clorofilla a+b (Fig.24), presenta un elevato rapporto carotenoidi/clorofille a+b. Questo andamento è confermato dal colore molto aranciato delle colture, ad eccezione della coltura in Amcona 1,5M NaCl che, a discapito di un rapporto carotenoidi/clorofilla a+b per cellula elevato, rimane più verde (Fig.29 c). La coltura cresciuta in Amcona 5M NaCl+STIMOLO è caratterizzata da un rapporto carotenoidi/clorofilla a+b non significativamente differente in funzione della fase di crescita. Questo andamento non coincide col colore sempre più aranciato della coltura al trascorrere dei giorni, ma forse potrebbe essere spiegato dal fatto che il fertilizzante Stimolo è scuro e potrebbe in fase esponenziale di crescita coprire il colore aranciato delle cellule, mentre in fase stazionaria, l'alta densità cellulare potrebbe far virare il colore da scuro all'arancio.

Il ceppo CCAP è caratterizzato da bassi rapporti carotenoidi/clorofilla a+b (Fig.28), dovuti ad un contenuto di clorofilla a+b leggermente maggiore di quello dei carotenoidi (Fig.25). Questo basso rapporto è testimoniato visivamente dal colore verde brillante delle colture (Fig.29).

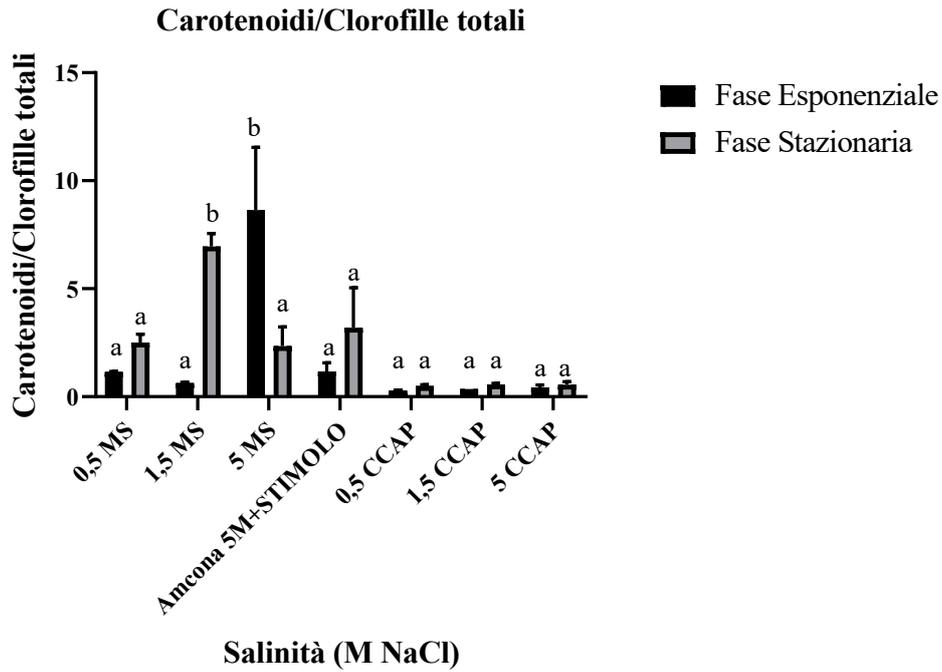


Figura 28 Rapporto carotenoidi/clorofilla a+b per cellule nei due ceppi di *D. salina* (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) cresciuti a salinità 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

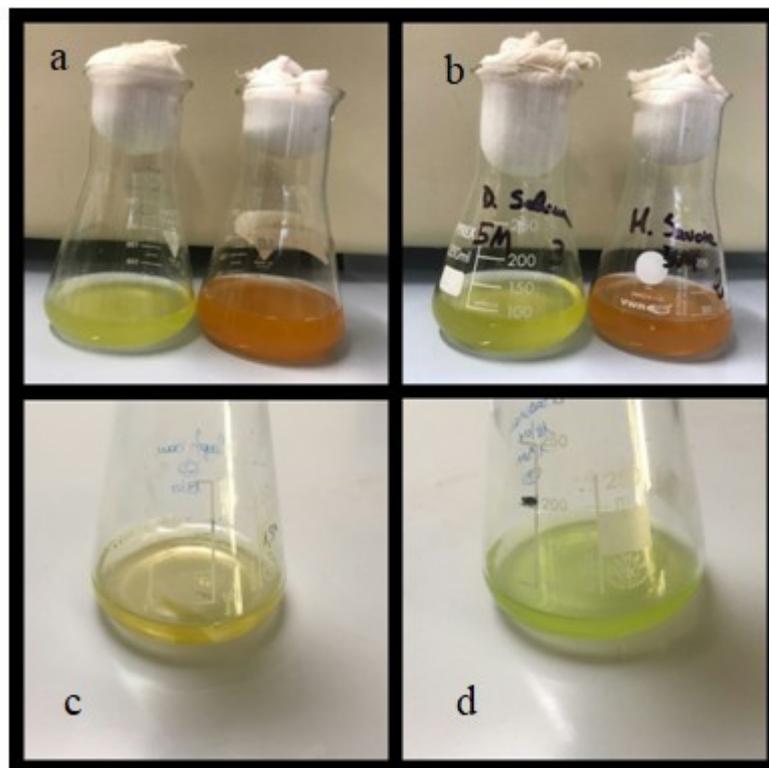


Figura 29 Colori dei due ceppi di *D. salina* a confronto. Colture in Amcona 0,5M NaCl (a), in Amcona 5M NaCl (b) e in Amcona 1,5M NaCl (c, d). Le colture verdi sono del ceppo CCAP mentre le arancioni del ceppo isolato dalle Saline di Margherita di Savoia.

	<i>D. salina</i> MS		<i>D. salina</i> CCAP	
	esponenziale	stazionaria	esponenziale	stazionaria
0,5M NaCl				
Chl a+b (pg/cell)	2,87±0,33	0,69±0,14	1,20±0,41	0,78±0,1
Cx+c (pg/cell)	3,27±0,32	1,75±0,57	0,34±0,12	0,39±0,08
1,5M NaCl				
Chl a+b (pg/cell)	2,83±0,39	0,70±0,08	0,69±0,10	0,82±0,05
Cx+c (pg/cell)	1,80±0,17	4,83±0,30	0,25±0,04	0,46±0,03
5M NaCl				
Chl a+b (pg/cell)	0,26±0,09	0,92±0,15	0,61±0,07	0,60±0,11
Cx+c (pg/cell)	2,11±0,27	2,09±0,60	0,27±0,09	0,33±0,08
Amcona+STIMOLO				
Chl a+b (pg/cell)	4,20±0,43	2,23±1,94		
Cx+c (pg/cell)	4,81±1,31	5,95±6,3		

Tabella 11 Clorofille totali (Chl a+b) e carotenoidi (Cx+c) presenti nelle cellule dei due ceppi di *D. salina* esaminati (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) cresciuti in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.3 Determinazione del contenuto proteico cellulare

I grafici (Fig.30) riportano il quantitativo di proteine presenti nelle cellule dell'alga *D. salina* MS e dell'alga *D. salina* CCAP come pg/cell.

Dal grafico 1 si può notare come in *D. salina* MS il contenuto proteico varia al variare della fase di crescita, infatti nelle colture in Amcona 0,5M NaCl le proteine cellulari in fase esponenziale di crescita sono circa 3,5 volte di più rispetto a quelle delle cellule in fase stazionaria, mentre a salinità 5M NaCl il trend si inverte essendo il contenuto proteico delle cellule in fase stazionaria circa 3 volte superiore di quello delle cellule in fase esponenziale di crescita. A salinità 1,5M NaCl questo andamento non è riscontrabile non essendoci differenze significative tra il contenuto proteico delle cellule nelle due fasi di crescita; inoltre non è statisticamente differente dai due elevati contenuti proteici cellulari sopra descritti.

Nel ceppo CCAP (grafico 2), invece, non si evidenziano differenze significative nel contenuto cellulare di proteine né in funzione della fase di crescita né della salinità del mezzo.

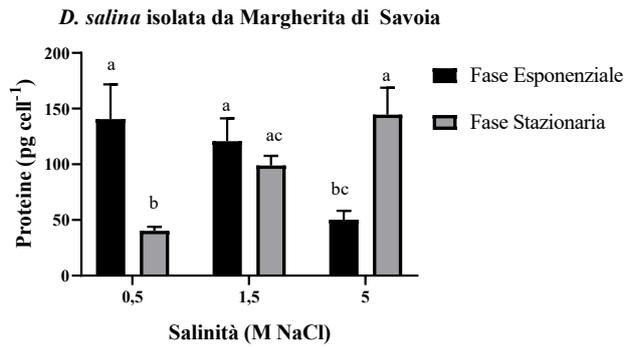
Il grafico 3 mette a confronto le proteine accumulate dal ceppo di Margherita di Savoia cresciuto a salinità 5M NaCl in Amcona con quelle presenti in alghe cresciute in Amcona 5M NaCl+Stimolo. Dai dati ottenuti è evidente che il ceppo cresciuto in Amcona+Stimolo in fase stazionaria accumula più proteine (circa il doppio) dello stesso ceppo coltivato in Amcona in fase stazionaria di crescita.

I grafici 4-5-6 evidenziano la grande quantità di proteine accumulate nelle cellule della *D. salina* MS rispetto alla CCAP considerando le singole salinità di crescita. Il ceppo isolato da Margherita di Savoia ha circa 3-5 volte più proteine per cellula rispetto alla CCAP, soprattutto quando le alghe crescono in 0,5M NaCl in fase di crescita esponenziale, 1,5M NaCl sia in fase di crescita esponenziale che stazionaria e a 5M NaCl in fase stazionaria.

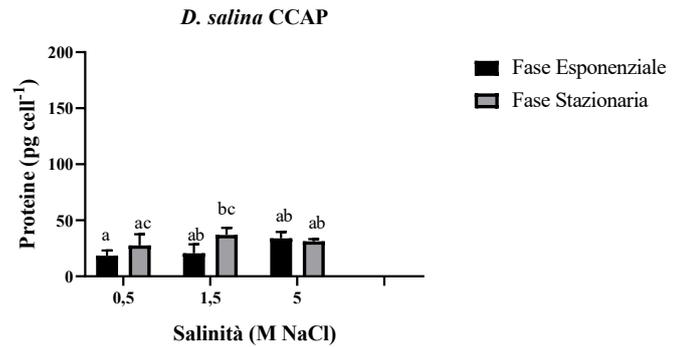
	Contenuto proteico cellulare (pg/cell)			
	<i>D. salina</i> MS		<i>D. salina</i> CCAP	
	esponenziale	stazionaria	esponenziale	stazionaria
0,5M NaCl	140,57±31,11	40,19±3,75	18,47±4,57	27,54±10,05
1,5M NaCl	120,71±20,50	98,89±8,63	20,64±7,93	36,96±6,29
5M NaCl	50,26±7,94	144,56±24,23	33,88±5,66	31,25±2,03
Amcona+STIMOLO	227,48±12,99	328,29±136,88		

Tabella 12 Contenuto cellulare di proteine (pg cell⁻¹) dei due ceppi di *D. salina* (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) cresciuti in Amcona a salinità 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl, con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche biologiche.

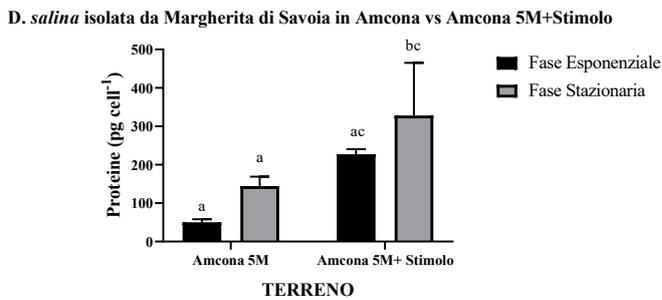
1



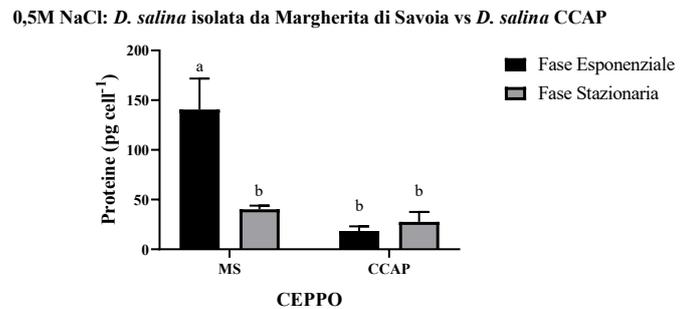
2



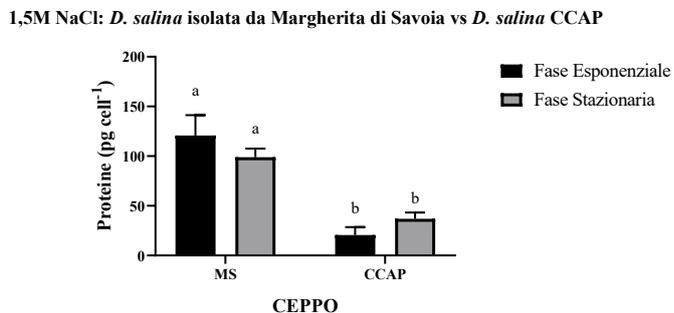
3



4



5



6

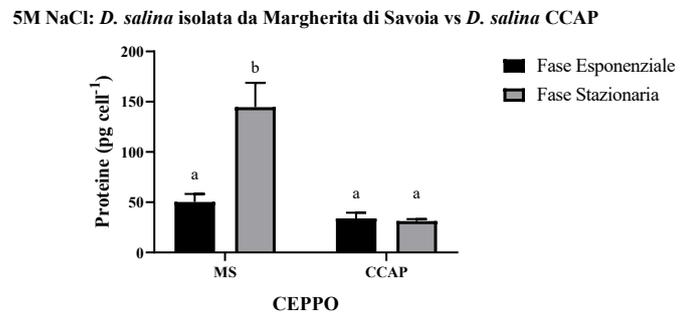


Figura 30 Contenuto cellulare di proteine (pg cell⁻¹) dei due ceppi di *D. salina* (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) cresciuti in Amcona a salinità 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl, con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.4 Determinazione del contenuto lipidico cellulare dell'alga D. salina isolata dalle Saline di Margherita di Savoia

Dalla tabella 13 si nota che la maggior percentuale di lipidi su peso secco (19% dw) si riscontra nelle alghe oggetto di studio cresciute in Amcona 0,5M NaCl, mentre la percentuale di lipidi delle colture in Amcona a salinità 1,5M NaCl, 5M NaCl e Amcona 5M NaCl+Stimolo non varia considerevolmente, rappresentando circa il 9-9.5% del dw in tutte e tre le condizioni.

La tabella 14 mostra la composizione lipidica delle alghe in studio alle quattro condizioni di crescita. In generale si può affermare che tra gli acidi grassi saturi (C:0) prevale l'acido palmitico (C16:0) con una percentuale che varia dal 23,4% \pm 0,7 (Amcona 5M+Stimolo) al 26,5% \pm 0,3 (1,5M NaCl); tra gli acidi grassi monoinsaturi (C:1) il più abbondantemente presente è l'acido oleico (C18:1 n-9, ω 9) con una percentuale che va dal 9,91% \pm 0,04 (1,5M NaCl) al 26,2% \pm 0,1 (0,5MNaCl); tra gli acidi grassi polinsaturi (C:2/3/4/5/6) è da sottolineare la grande presenza degli acidi grassi a 18 atomi di Carbonio ω 3 (C18:3 n-3 acido α -linolenico ALA, essenziale), con percentuali che vanno dal 22,0% \pm 0,3 (0,5M NaCl) al 39,6% \pm 0,2 (1,5M NaCl), e ω 6 (C18:2 n-6 acido linoleico AL, essenziale), con percentuali dal 11,6% \pm 0,0 nella coltura a salinità 1,5M NaCl al 17,4% \pm 0,1 nella coltura cresciuta in Amcona 5M NaCl+Stimolo, e C18:3 n-6 acido γ -linolenico isomero dell'ALA presente maggiormente nella coltura a salinità 0,5M NaCl con una percentuale del 4,03% \pm 0,0). Mentre, dunque, sono presenti i due acidi grassi essenziali ALA e AL, capostipiti rispettivamente della serie di acidi grassi ω 3 e ω 6, non sono presenti gli acidi grassi a valle di queste due serie ad eccezione dell'acido γ -linolenico, ovvero EPA (C20:5 n-3), DHA (C22:6 n-3) e acido arachidonico (C20:4 n-6).

	Classi di lipidi Percentuali (%)			
	0.5M NaCl	1.5M NaCl	5M NaCl	Amcona+Stimolo
% Lip dw	19,7	9,5	9,1	9,6
Saturi	28,7±0,5	31,3±0,3	35,9±0,6	34,6±0,8
Mono	29,7±0,1	12,8±0,1	19,2±0,1	21,8±0,2
Poli	41,6±0,3	55,9±0,2	44,9±0,3	43,6±0,3
ω3	22,0±0,3	39,6±0,2	27,5±0,3	23,9±0,3
ω6	19,0±0,1	15,1±0,1	16,6±0,1	18,0±0,1

Tabella 13 Contenuto lipidico cellulare (% lipidi su peso secco, dw) del ceppo *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita coltivato in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche strumentali.

	Percentuali (%) vs Fas totali			
	0.5M NaCl	1.5M NaCl	5M NaCl	Amcona+Stimolo
12:0	0,021±0,001	0,039±0,01	0,13±0,00	0,10±0,00
14:0	0,70±0,02	1,10±0,02	1,55±0,04	1,31±0,03
16:0	25,72±0,5	26,45±0,3	26,28±0,6	23,43±0,7
16:1n-9	0,50±0,02	0,39±0,01	0,64±0,02	0,74±0,03
16:1n-7	0,81±0,05	1,13±0,01	0,46±0,01	0,46±0,01
16:2n7	0,49±0,00	1,20±0,01	0,87±0,02	1,72±0,05
18:0	2,03±0,05	3,57±0,04	7,16±0,13	7,77±0,20
18:1n-9	26,17±0,1	9,91±0,04	17,14±0,1	19,2±0,2
18:1n-7	1,89±0,03	1,25±0,03	0,73±0,02	0,91±0,02
18:2n-6	15,00±0,1	11,56±0,0	16,08±0,1	17,42±0,1
18:3n-6	4,03±0,00	3,52±0,02	0,47±0,01	0,59±0,01
18:3n-3	22,05±0,3	39,61±0,2	27,49±0,3	23,9±0,3
20:0	0,25±0,01	0,15±0,01	0,79±0,02	2,01±0,06
20:1n-9	0,32±0,01	0,10±0,00	0,21±0,00	0,44±0,01
20:4n-6				
20:5n-3				
22:6n-3				

Tabella 14 Composizione lipidica del ceppo *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita coltivato in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche strumentali.

Dal grafico sottostante (Fig. 31) le alghe cresciute in Amcona a salinità 0,5M NaCl hanno la maggior quantità di lipidi saturi, mono e polinsaturi, espressi in mg/100gdw, rispetto alle alghe coltivate a salinità più elevate e a quelle cresciute in Amcona 5M NaCl +Stimolo.

Analizzando le singole classi di lipidi in funzione della salinità, si nota che le quantità di grassi saturi delle colture cresciute a salinità 1,5M NaCl, 5M NaCl e 5M NaCl Amcona+Stimolo non sono significativamente differenti, stesso trend si riscontra per gli acidi grassi monoinsaturi, mentre l'abbondanza degli acidi grassi polinsaturi diminuisce al crescere della concentrazione di NaCl nel mezzo e ulteriormente nel mezzo Amcona 5M NaCl+Stimolo.

Considerando le singole salinità 1,5M NaCl, 5M NaCl e Amcona 5M NaCl+Stimolo, il grafico (Fig.31) e la tabella 13 indicano che i lipidi più abbondanti sono i polinsaturi, seguiti dai saturi e infine dai monoinsaturi, mentre a concentrazione 0,5M NaCl i polinsaturi allo stesso modo rappresentano la componente lipidica più cospicua, mentre le quantità dei saturi e monoinsaturi non sono statisticamente differenti.

Le alghe che presentano il più alto rapporto di polinsaturi su lipidi totali, come mostrato dalla tabella 13 e dal grafico (Fig.31), sono quelle cresciute a salinità 1,5M NaCl.

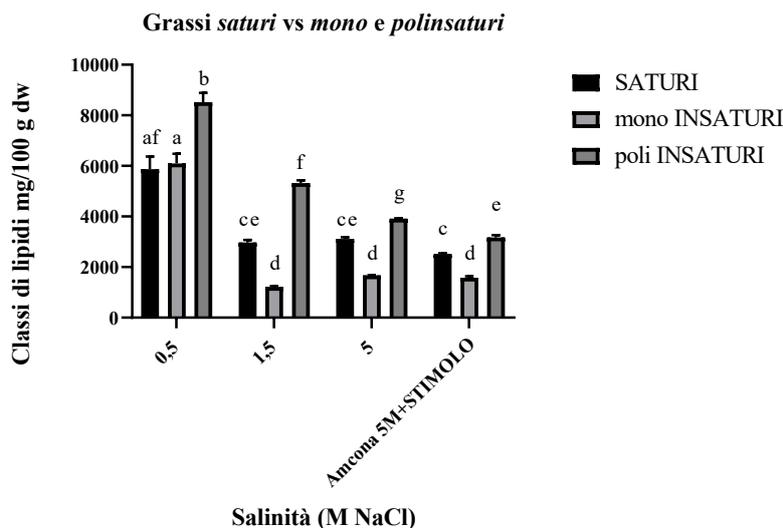


Figura 31 Classi di lipidi (mg/100g dw) del ceppo *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita cresciuto in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche strumentali.

Il grafico sottostante (Fig.32) riporta le quantità di $\omega 3$ e $\omega 6$ come mg/100g dw mentre il grafico seguente (Fig.33) il rapporto tra le due tipologie di poli insaturi. Dal primo si nota che l'abbondanza degli $\omega 3$ diminuisce significativamente all'aumentare della concentrazione di NaCl del mezzo e ulteriormente nelle alghe cresciute in Amcona 5M NaCl+Stimolo.

L'abbondanza degli $\omega 6$ diminuisce passando dalla bassa salinità 0,5M NaCl a concentrazioni più elevate, sebbene non ci siano significative differenze tra le quantità di $\omega 6$ a salinità 1,5M NaCl, 5M NaCl e Amcona 5M NaCl+Stimolo.

Considerando le singole salinità, il primo grafico (Fig.32) e le tabelle 13 e 14 mostrano che gli $\omega 3$ sono più abbondanti degli $\omega 6$. La massima differenza $\omega 3$ - $\omega 6$ si ha nelle alghe coltivate a salinità 1,5M NaCl come dimostrato dall'alto rapporto $\omega 3/\omega 6$ e basso rapporto $\omega 6 /\omega 3$ (Fig.33).

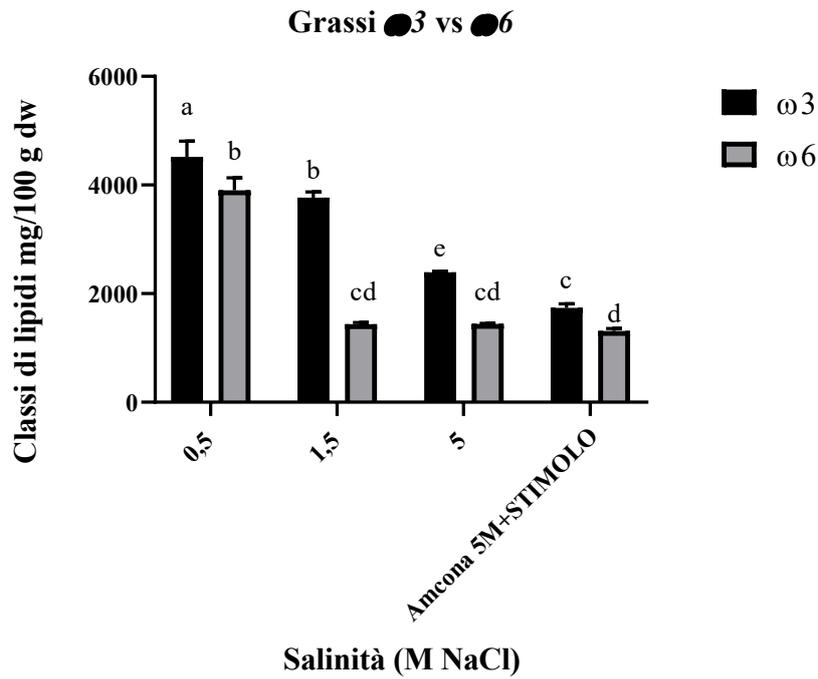


Figura 32 Composizione lipidica in termini di $\omega 3$ e $\omega 6$ dell'alga *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita cresciuta in Amcna 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO_3 o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche strumentali.

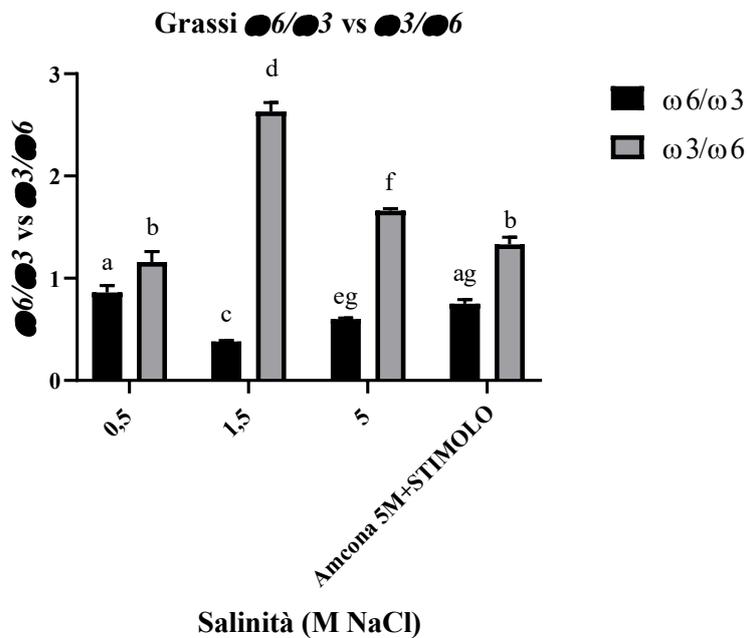


Figura 33 Rapporto $\omega 6/\omega 3$ e $\omega 3/\omega 6$ dell'alga *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita cresciuta in Amcna 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO_3 o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche strumentali.

4.5 Analisi FT-IR

L'analisi della composizione macromolecolare tramite spettroscopia FT-IR ha evidenziato i picchi di assorbimento riportati da Giordano et al. (2001) per quanto riguarda carboidrati e proteine; per i lipidi sono stati considerati picchi tra 1710-1740 cm^{-1} diversamente presenti nei ceppi e nei regimi colturali come mostrato dalla tabella 15 seguente. Nelle analisi effettuate infatti, oltre al picco intorno a λ 1740-1745 cm^{-1} , comunemente usato come approssimazione dei lipidi, è stato osservato anche un picco a 1710 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} , quest'ultimo può essere associato all'acido carbossilico -COOH (O'reilly et al., 1983), ovvero allo stiramento del gruppo carbonilico C=O (Bimestre et al., 2009); anche il picco a 1710 cm^{-1} è ascrivibile alla presenza di acidi grassi (acido oleico secondo Yang et al., 2010) ovvero allo stiramento del gruppo carbonilico C=O (Marshall et al, 2005), quindi i due picchi sono stati inseriti nelle analisi.

D. salina MS	STAZIONARIA	1710 cm^{-1}	1720 cm^{-1}	1740 cm^{-1}
	0,5MNaCl		X	X
	1,5MNaCl		X	X
	5MNaCl		X	X
	Amcona+Stimolo		X	
	ESPONENZIALE			
	0,5MNaCl	X		
	1,5MNaCl		X	X
	5MNaCl	X	X	
	Amcona+Stimolo		X	
D. salina CCAP	STAZIONARIA			
	0,5MNaCl		X	X
	1,5MNaCl		X	X
	5MNaCl		X	
	ESPONENZIALE			
	0,5MNaCl		X	X
	1,5MNaCl		X	X
	5MNaCl	X	X	X

Tabella 15 Lunghezze d'onda di assorbimento dei lipidi dell'alga *D. salina* MS e CCAP in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO_3 o STIMOLO come fonte di N.

4.5.1 C/L

Il grafico 1 (Fig.34) mostra i risultati dell'analisi FT-IR in riferimento al rapporto tra carboidrati e lipidi (C/L) presenti nelle cellule di *D. salina* MS. Dal grafico è evidente che considerando le singole condizioni di crescita (0,5M NaCl, 1,5M NaCl e 5M NaCl) il rapporto C/L non è influenzato dalla fase di crescita (esponenziale e stazionaria), inoltre il rapporto C/L delle colture in fase stazionaria non varia significativamente in funzione della salinità, mentre in fase esponenziale è da sottolineare il basso C/L della coltura a 0,5M NaCl.

Stesse considerazioni possono essere fatte per i dati C/L ottenuti dall'analisi FT-IR delle cellule dell'alga *D. salina* CCAP (Fig.34, grafico 2). L'unica differenza rispetto all'altro ceppo è che in questo caso la coltura cresciuta a salinità 0,5M NaCl in fase esponenziale presenta un più alto rapporto C/L rispetto alle colture in fase esponenziale alle due salinità maggiori.

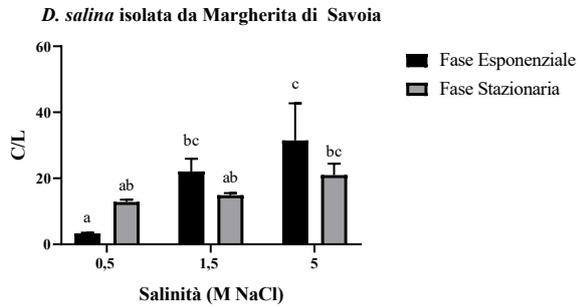
Dai grafici 3-4-5 (Fig.34) relativi alle singole salinità, si può concludere che tra i due ceppi di *D. salina* non si riscontrano differenze significative ad eccezione delle cellule cresciute a salinità 0,5M NaCl in fase esponenziale per le quali il ceppo CCAP presenta un C/L circa 12 volte maggiore. Il grafico 5 (Fig.34), inoltre, mostra che crescere l'alga *D. salina* MS a salinità 5M NaCl in terreno Amcona o Amcona+Stimolo non ha effetti sul rapporto C/L.

<i>D. salina</i> MS	
ESPONENZIALE	C/L
0,5M NaCl	3,30±0,21
1,5M NaCl	22,08±3,83
5M NaCl	31,49±11,25
Amcona+STIMOLO	46,30±10,36
STAZIONARIA	
0,5M NaCl	12,47±0,40
1,5M NaCl	14,86±0,69
5M NaCl	20,98±3,47
Amcona+STIMOLO	23,47±4,66

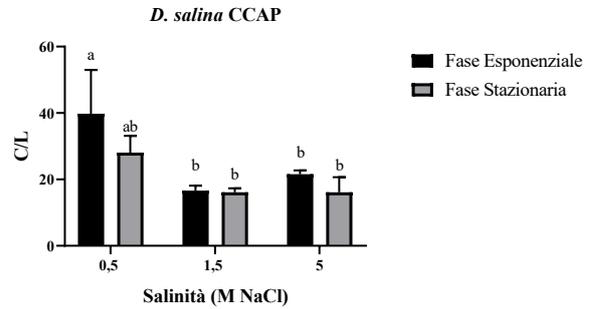
<i>D. salina</i> CCAP	
ESPONENZIALE	C/L
0,5M NaCl	39,76±13,22
1,5M NaCl	16,61±1,53
5M NaCl	21,58±1,14
STAZIONARIA	
0,5M NaCl	28,06±5,04
1,5M NaCl	16,14±1,19
5M NaCl	16,12±4,54

Tabella 16 Rapporto carboidrati/lipidi (C/L) delle alghe *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. La deviazione standard è relativa alla media calcolata su 2 repliche strumentali per ognuna delle 3 repliche biologiche.

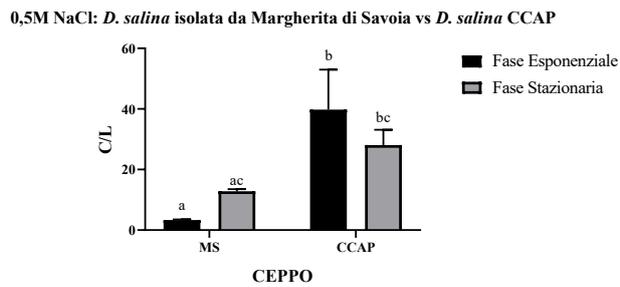
1



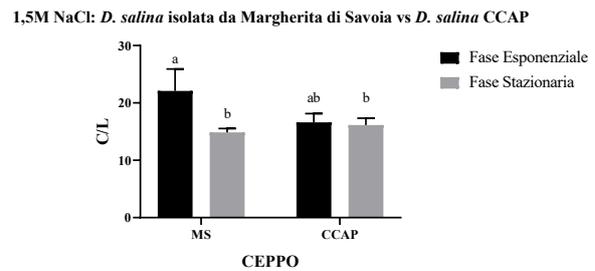
2



3



4



5

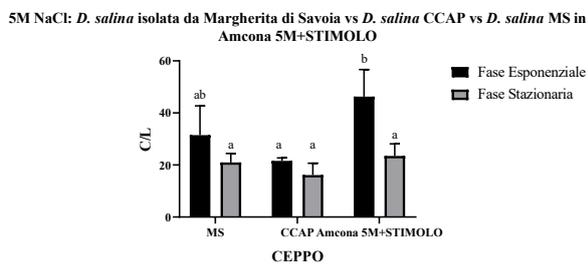


Figura 34 Rapporto carboidrati/lipidi (C/L) delle alghe *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 2 repliche strumentali per ognuna delle 3 repliche biologiche.

4.5.2 C/P

Il grafico 1 (Fig.35) mostra i risultati dell'analisi FT-IR in riferimento al rapporto tra carboidrati e proteine (C/P) presenti nelle cellule dell'alga *D. salina* isolata da Margherita di Savoia.

Dal grafico è evidente che quando il mezzo contiene 0,5M NaCl e 5M NaCl il rapporto C/P in fase stazionaria di crescita non varia; a salinità intermedia (1,5M NaCl) questo rapporto aumenta di circa 1,5 volte rispetto al valore precedente. Considerando le singole salinità di crescita, le colture a 0,5M NaCl e a 1,5M NaCl in fase esponenziale di crescita presentano un C/P minore (di circa 1,5/2 volte) rispetto al valore che assume in fase stazionaria, questa tendenza non è riscontrabile nelle colture cresciute a salinità 5M NaCl in cui C/P non varia significativamente in funzione della fase di crescita.

Il grafico 2 (Fig.35) presenta i dati C/P relativi all'alga *D. salina* CCAP. Come per l'alga isolata dalla salina di Margherita di Savoia, la condizione di crescita a salinità 1,5M NaCl in fase stazionaria presenta un alto valore C/P, ma in questo caso non è significativamente diverso dalla corrispondente fase stazionaria di crescita delle cellule coltivate a 0,5M NaCl. Le microalghe in terreno 5M NaCl, indipendentemente dalla fase di crescita, presentano un valore di C/P minore (circa la metà) del valore riscontrato alle due salinità più basse.

I grafici 3-4-5 (Fig. 35) mostrano i valori C/P dei 2 ceppi in funzione della salinità di crescita. Dai dati ottenuti si evidenzia che mentre a concentrazioni saline pari a 1,5M NaCl e 5M NaCl tra i due ceppi di *D. salina* non si riscontrano differenze significative, queste sono presenti a bassa salinità (0,5M NaCl) alla quale il ceppo CCAP presenta un C/P circa doppio indipendentemente dalla fase di crescita.

Il grafico 5 (Fig.35), come per il rapporto C/L, dimostra che coltivando il ceppo di *D. salina* isolata da Margherita di Savoia a salinità 5M NaCl in Amcona o

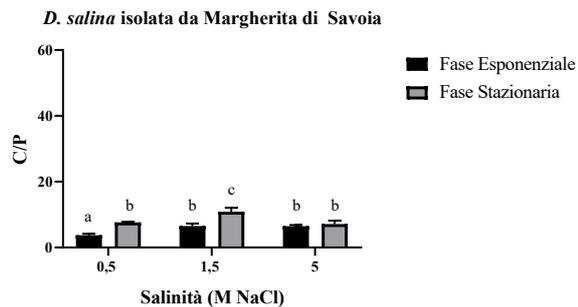
Amcona+Stimolo non si hanno effetti sul rapporto C/P e ciò è indipendente dalla fase di crescita della coltura.

<i>D. salina</i> MS	
ESPONENZIALE	C/P
0,5M NaCl	3,73±0,45
1,5M NaCl	6,50±0,77
5M NaCl	6,48±0,34
Amcona+STIMOLO	4,27±0,70
STAZIONARIA	
0,5M NaCl	7,41±0,04
1,5M NaCl	10,89±1,21
5M NaCl	7,15±1,04
Amcona+STIMOLO	6,70±1,00

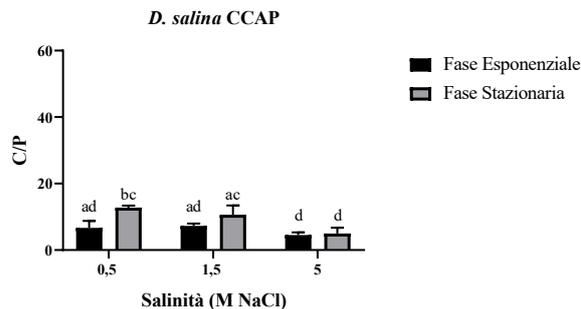
<i>D. salina</i> CCAP	
ESPONENZIALE	C/P
0,5M NaCl	6,69±2,07
1,5M NaCl	7,27±0,69
5M NaCl	4,53±0,79
STAZIONARIA	
0,5M NaCl	12,76±0,61
1,5M NaCl	10,61±2,83
5M NaCl	5,00±1,72

Tabella 17 Rapporto carboidrati/proteine (C/P) delle alghe *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. La deviazione standard è relativa alla media calcolata su 2 repliche strumentali per ognuna delle 3 repliche biologiche.

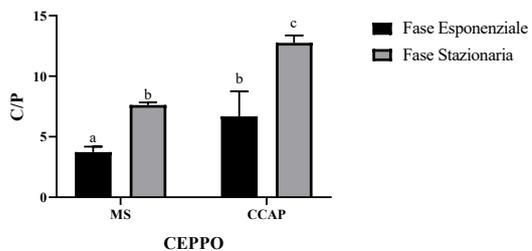
1



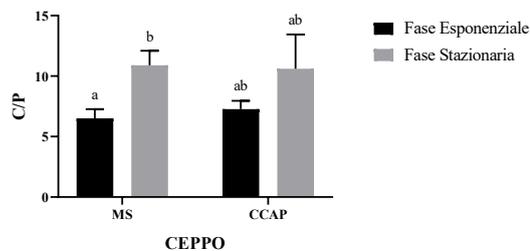
2



3

0,5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP

4

1,5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP

5

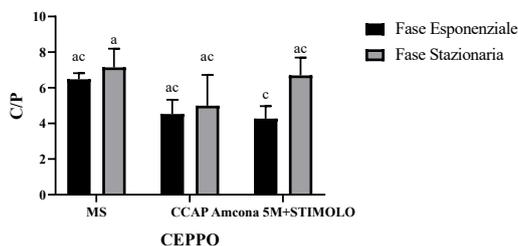
5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP vs *D. salina* MS in Amcona 5M+STIMOLO

Figura 35 Rapporto carboidrati/proteine (C/P) delle alghe *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 2 repliche strumentali per ognuna delle 3 repliche biologiche.

4.5.3 L/P

Il grafico 1 (Fig.36) mostra i risultati dell'analisi FT-IR in riferimento al rapporto tra lipidi e proteine (L/P) presenti nelle cellule dell'alga *D. salina* isolata da Margherita di Savoia.

Dai dati rilevati risulta che in funzione della salinità non si riscontrano differenze significative nel rapporto L/P in fase stazionaria di crescita, differenza che si nota invece considerando le colture in fase esponenziale di crescita: infatti la coltura a 0,5M NaCl in fase esponenziale presenta un rapporto L/P circa 4-5 volte superiore rispetto al rapporto L/P delle colture in fase esponenziale in terreno 1,5M NaCl e 5M NaCl. Peculiare è il trend opposto tra le colture alla salinità 0,5M NaCl e 1,5M NaCl.

Il grafico 2 (Fig.36) presenta i dati L/P relativi all'alga *D. salina* CCAP.

Considerando le colture in fase stazionaria di crescita, i rapporti L/P non sono statisticamente differenti in funzione della salinità, mentre lo sono considerando le colture in fase di crescita esponenziale, infatti la coltura a salinità 1,5M NaCl in fase esponenziale presenta un L/P circa 2-2,5 volte superiore allo stesso rapporto relativo alle colture in esponenziale a salinità 0,5M NaCl e 5M NaCl.

I grafici 3-4-5 mostrano le differenze nel rapporto L/P tra i due ceppi di *D. salina* considerando le singole salinità.

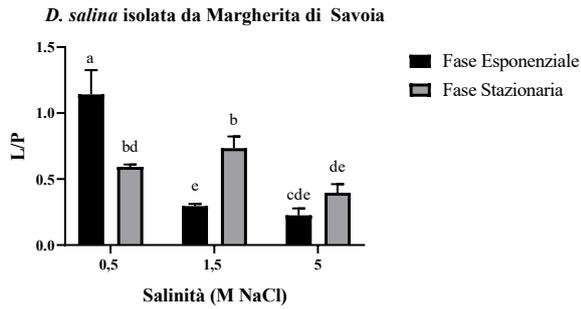
A salinità 0,5M NaCl l'alga *D. salina* MS in fase di crescita esponenziale mostra un rapporto L/P marcatamente più elevato, circa 7 volte più alto rispetto al valore in *D. salina* CCAP in fase di crescita esponenziale a salinità 0,5M NaCl, mentre in fase stazionaria di crescita non si riscontrano differenze significative. Le colture dei due ceppi a salinità 1,5M NaCl sono paragonabili in funzione della fase di crescita, stesse considerazioni per le colture a salinità 5M NaCl. Il grafico 5 (Fig.36), inoltre, mostra che come per i rapporti C/L e C/P, anche il rapporto L/P della *D. salina* isolata da Margherita di Savoia a salinità 5M NaCl non è influenzato dal terreno (Amcona o Amcona+STIMOLO).

<i>D. salina</i> MS	
ESPONENZIALE	L/P
0,5M NaCl	1,14±0,18
1,5M NaCl	0,30±0,02
5M NaCl	0,23±0,05
Amcona+STIMOLO	0,12±0,06
STAZIONARIA	
0,5M NaCl	0,59±0,02
1,5M NaCl	0,73±0,09
5M NaCl	0,40±0,07
Amcona+STIMOLO	0,30±0,09

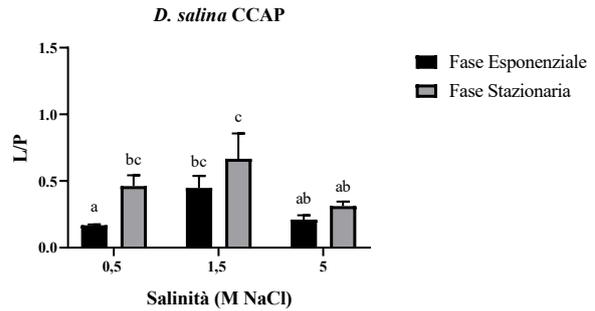
<i>D. salina</i> CCAP	
ESPONENZIALE	L/P
0,5M NaCl	0,17±0,01
1,5M NaCl	0,45±0,09
5M NaCl	0,21±0,03
STAZIONARIA	
0,5M NaCl	0,46±0,08
1,5M NaCl	0,67±0,19
5M NaCl	0,31±0,03

Tabella 18 Rapporto lipidi/proteine (L/P) delle alghe *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. La deviazione standard è relativa alla media calcolata su 2 repliche strumentali per ognuna delle 3 repliche biologiche.

1

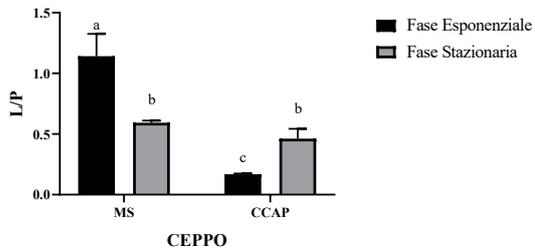


2



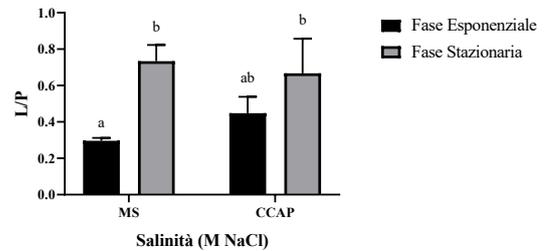
3

0,5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP



4

1,5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP



5

5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP vs *D. salina* MS in Amcona 5M+STIMOLO

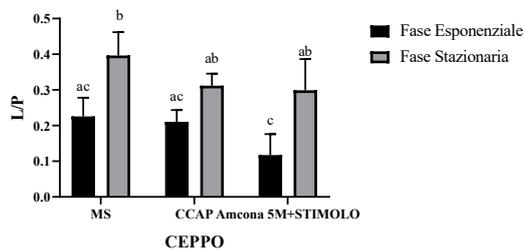


Figura 36 Rapporto lipidi/proteine (L/P) delle alghe *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 2 repliche strumentali per ognuna delle 3 repliche biologiche.

4.6 Determinazione degli elementi in traccia: analisi PICOFOX

4.6.1 Fosforo (P)

Nel grafico 1 (Fig.37) relativo alla quantità di P presente nel ceppo *D. salina* MS in funzione della salinità e della fase di crescita, è interessante sottolineare la grande presenza di questo elemento nelle microalghe coltivate a concentrazione 5M NaCl in fase stazionaria di crescita, infatti il contenuto di P in questa coltura è circa 10-20 volte maggiore rispetto a quello delle colture a 0,5M NaCl e 1,5M NaCl in fase di crescita stazionaria.

Questa tendenza non è evidenziabile nel ceppo CCAP (grafico 2, Fig.37) che anzi, come mostrato dai grafici 3-4-5 (Fig.37), presenta in generale a parità di salinità una minor quantità di fosforo.

Lo stesso ceppo isolato da Margherita di Savoia coltivato in Amcona 5M NaCl in presenza di Stimolo come fonte di N (grafico 6, Fig.37) non presenta in fase stazionaria un quantitativo simile di fosforo essendo circa 6,8 volte minore.

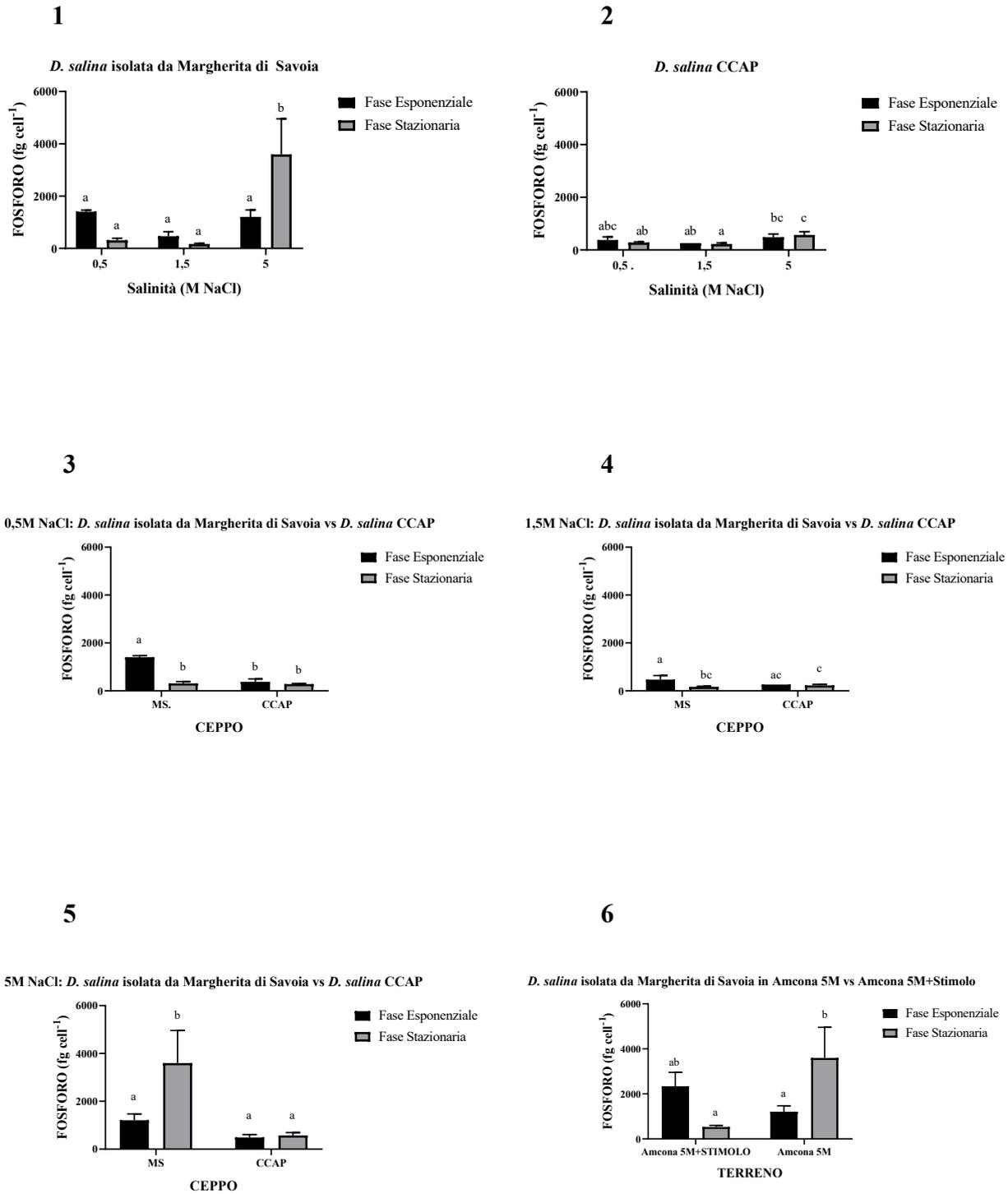


Figura 37 Contenuto di Fosforo (P) in cellule di *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita, coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

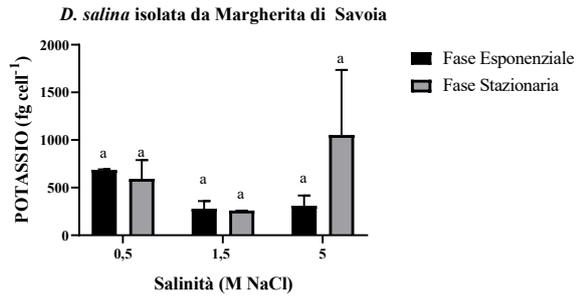
4.6.2 Potassio (K)

Dal grafico 1 (Fig.38) si evince che nè la salinità nè la fase di crescita influenzano significativamente il contenuto di K nelle cellule del ceppo *D. salina* MS; andamento differente si nota nel ceppo CCAP (grafico 2, Fig.38) che presenta un contenuto circa 5 volte maggiore di potassio alla salinità 5M NaCl in fase stazionaria rispetto alle colture a salinità 0,5M NaCl e 1,5M NaCl in fase di crescita stazionaria.

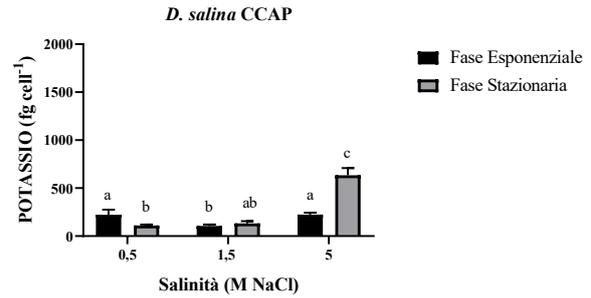
Il ceppo MS a salinità minori (grafici 3-4, Fig.38) ha, indipendentemente dalla fase di crescita, più potassio del ceppo CCAP, questa differenza significativa non si nota a salinità maggiore 5M NaCl.

Il ceppo *D. salina* MS coltivato in Amcona+Stimolo (grafico 6, Fig.38) presenta una quantità di potassio circa 10 volte maggiore del corrispondente in Amcona 5M NaCl in fase esponenziale di crescita ma non in fase stazionaria.

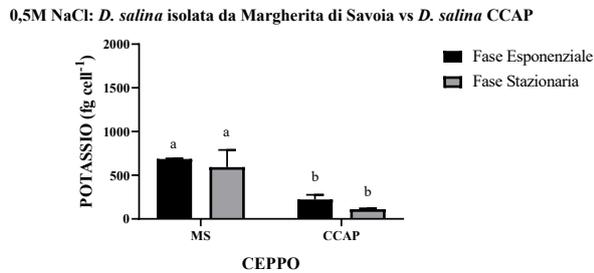
1



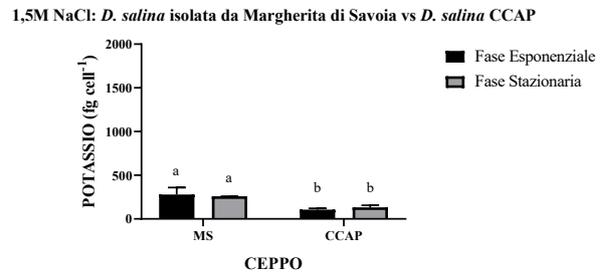
2



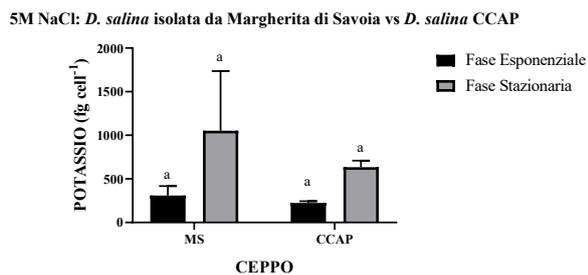
3



4



5



6

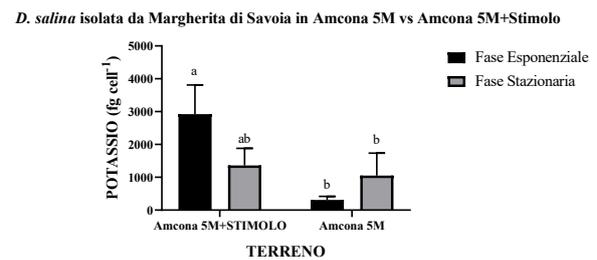


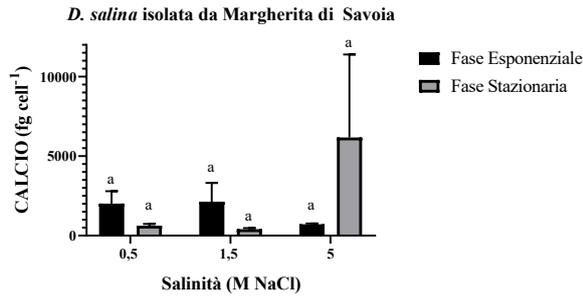
Figura 38 Contenuto di Potassio (K) in cellule di *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita, coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.6.3 Calcio (Ca)

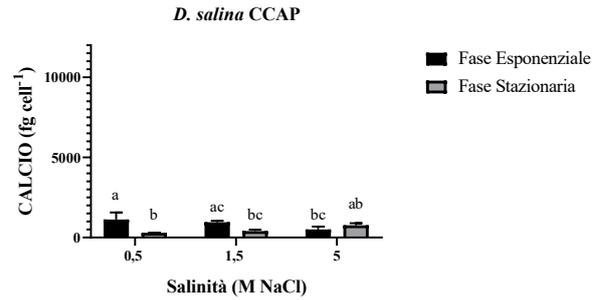
Come si può vedere dai grafici 1-2 (Fig.39) la salinità non sembra giocare un ruolo decisivo nel determinare il contenuto di Ca né nelle cellule del ceppo *D. salina* MS (1) né del ceppo CCAP (2), inoltre le differenze di Ca tra i due ceppi (grafici 3-4-5, Fig.39) a parità di salinità e fase di crescita non sono significative.

Il grafico 6 (Fig.39) evidenzia che crescere il ceppo MS a salinità 5M NaCl in mezzo Amcona o Amcona+Stimolo non ha effetto sul contenuto cellulare di Ca.

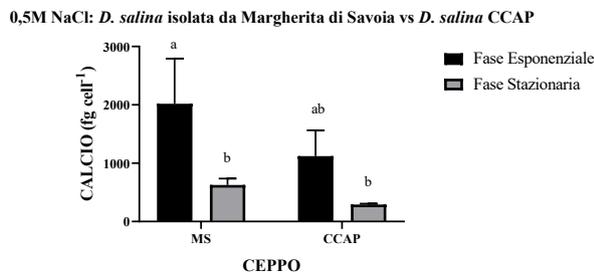
1



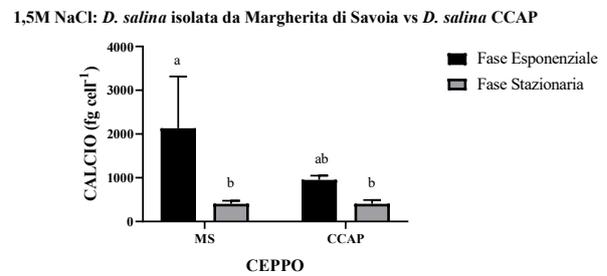
2



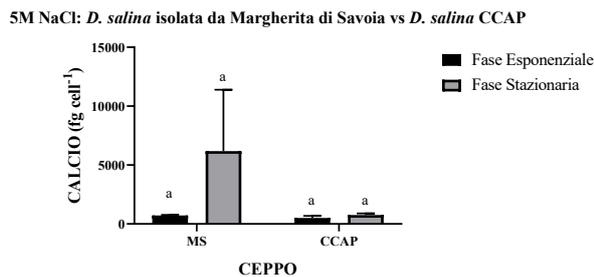
3



4



5



6

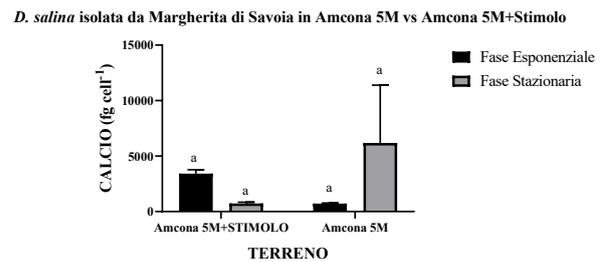


Figura 39 Contenuto di Calcio (Ca) in cellule di *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita, coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.6.4 Ferro (Fe)

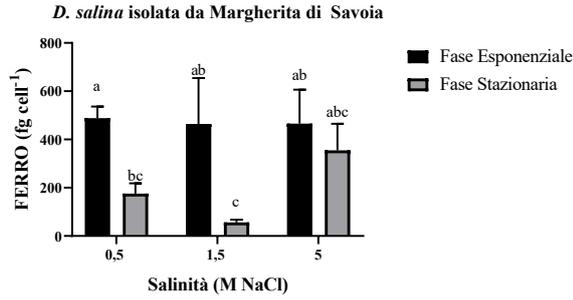
Il ceppo *D. salina* MS (grafico 1, Fig.40) accumula Fe soprattutto in fase esponenziale di crescita, senza che ci siano differenze significative in funzione della salinità del mezzo (0,5M NaCl e 1,5M NaCl). Ad alta concentrazione 5M NaCl la differenza in funzione della fase di crescita non è rilevabile.

Questo trend non è riscontrabile nel ceppo CCAP (grafico 2, Fig.40) che, sebbene non si sia potuto determinare per problemi tecnici il dato della coltura a salinità 1,5M NaCl in fase esponenziale di crescita, presenta una quantità di ferro a salinità 5M NaCl maggiore di quella presente a salinità minori.

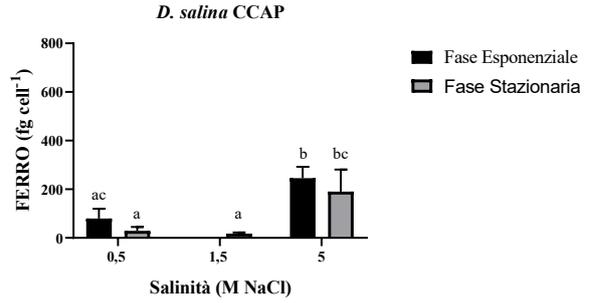
A basse concentrazioni di sale (grafici 3-4, Fig.40) la *D. salina* MS ha in fase esponenziale di crescita circa 6 volte più ferro della CCAP, invece nelle colture a salinità 5M NaCl questa differenza non è significativa.

Il grafico 6 (Fig.40) evidenzia che il ceppo *D. salina* MS coltivato a 5M NaCl in Amcona+Stimolo in fase esponenziale accumula una quantità di ferro circa 6 volte più elevata rispetto allo stesso ceppo coltivato in Amcona in fase esponenziale di crescita, differenza non rilevabile in fase stazionaria di crescita.

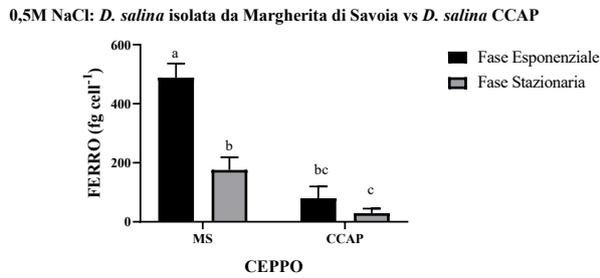
1



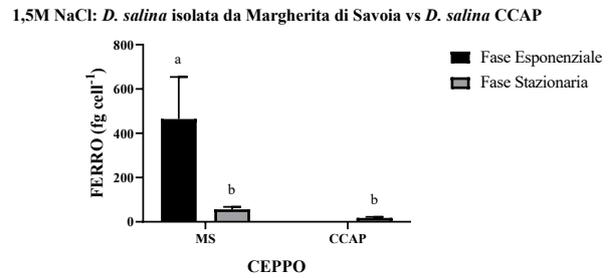
2



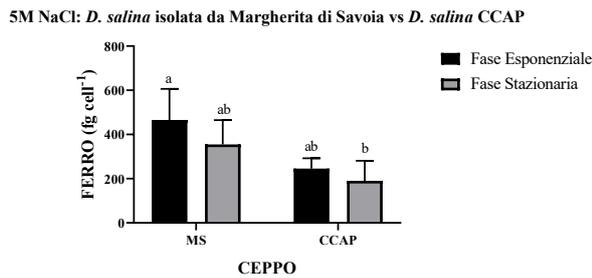
3



4



5



6

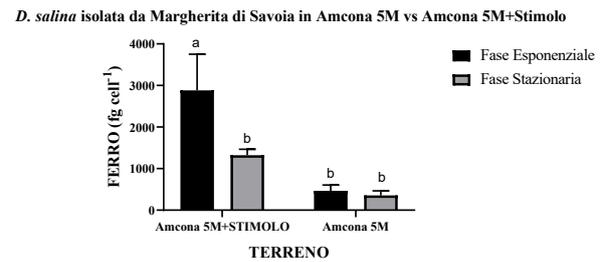


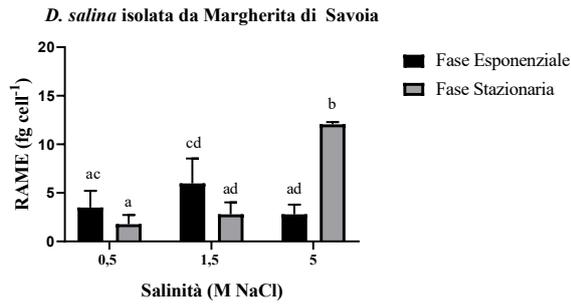
Figura 40 Contenuto di Ferro (Fe) in cellule di *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita, coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.6.5 Rame (Cu)

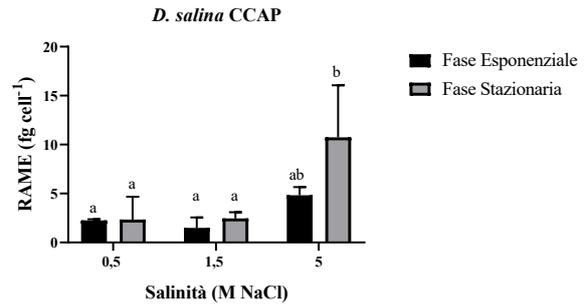
Il grafico 1 (Fig.41) mostra come l'alga *D. salina* MS cresciuta a concentrazioni di sale pari a 0,5M NaCl e 1,5M NaCl abbia una quantità di rame non significativamente diversa né in funzione della salinità né della fase di crescita, tendenza che non si riscontra, invece, alla concentrazione 5M NaCl in cui le cellule algali in fase stazionaria presentano un quantitativo di rame circa 4 volte più elevato di quello che caratterizza la fase esponenziale precedente. Questo valore è anche più maggiore di circa 4-6 volte rispetto a quello relativo alle colture in fase stazionaria coltivate alle due salinità più basse. Stesso trend è riscontrabile nel ceppo CCAP (grafico 2, Fig.41), il quale, però, a salinità 5M NaCl non presenta differenze significative tra la fase stazionaria e la fase esponenziale di crescita, ma ugualmente è circa 4 volte più ricco di rame rispetto alle cellule coltivate a salinità minori.

Dai grafici 3-4-5 (Fig.41) emerge che, considerando le singole salinità, non ci sono particolari differenze tra i due ceppi di *D. salina*, mentre crescendo il ceppo MS in Amcona+Stimolo le cellule in fase esponenziale sono circa 20 volte più ricche di rame rispetto alle cellule dello stesso ceppo in fase esponenziale di crescita coltivate in Amcona 5M NaCl.

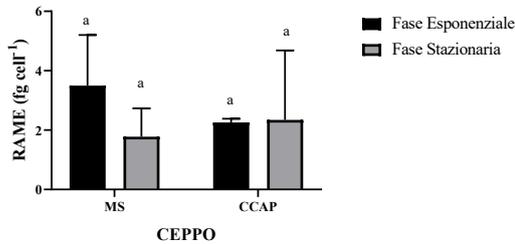
1



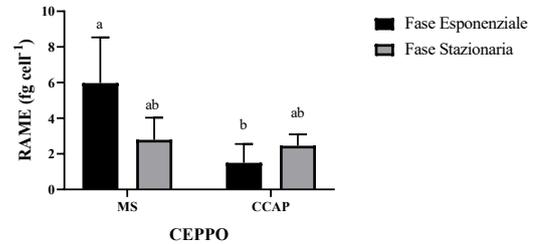
2



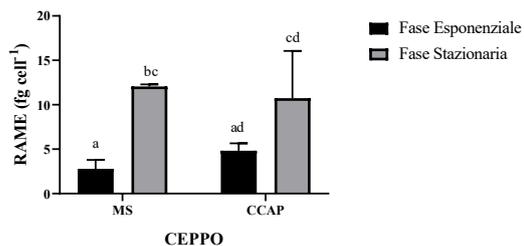
3

0,5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP

4

1,5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP

5

5M NaCl: *D. salina* isolata da Margherita di Savoia vs *D. salina* CCAP

6

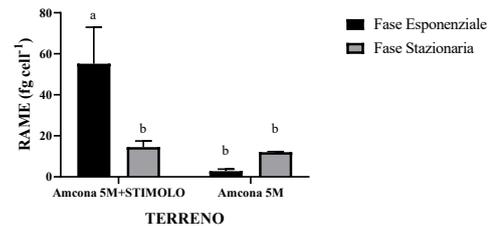
D. salina isolata da Margherita di Savoia in Amcona 5M vs Amcona 5M+Stimolo

Figura 41 Contenuto di Rame (Cu) in cellule di *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita, coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

4.6.6 Zinco (Zn)

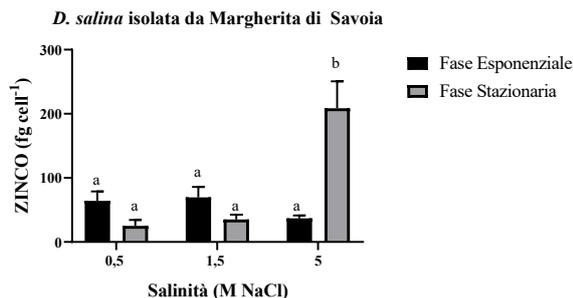
I risultati riportati nel grafico 1 (Fig.42) indicano che il ceppo *D. salina* MS presenta una grande quantità di zinco se cresciuta ad alta salinità 5M NaCl in fase stazionaria. A più basse concentrazioni di sale (0,5M NaCl e 1,5M NaCl) il contenuto di zinco è circa 6-8 volte minore rispetto alla coltura sopra citata e non significativamente differente in funzione né della salinità del mezzo di coltura né della fase di crescita.

Questo trend non è riscontrabile nel ceppo CCAP (grafico 2, Fig.42) il quale non presenta picchi di zinco ad alta salinità.

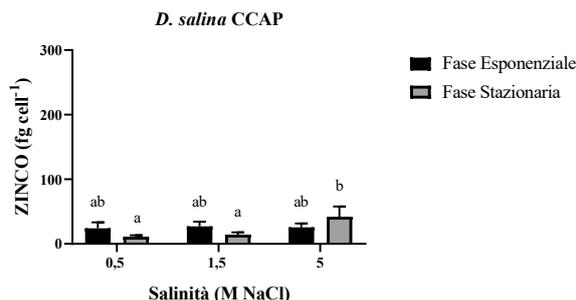
Dai grafici 3-4-5 (Fig.42) emerge che il ceppo MS indipendentemente dalla salinità del mezzo è più ricca di zinco, nello specifico in terreno Amcona 0,5M NaCl il ceppo MS in fase esponenziale di crescita ha circa 2,5 volte più Zn della corrispondente coltura CCAP, stesso trend si riscontra analizzando le colture a salinità 1,5M NaCl, mentre a concentrazione 5M NaCl il ceppo MS in fase stazionaria di crescita presenta un contenuto di Zn 5 volte maggiore della corrispondente coltura del ceppo CCAP.

Il grafico 6 (Fig.42) indica che sostituendo l'N inorganico (NaNO_3 , Amcona) con N organico (contenuto nel fertilizzante Stimolo) il ceppo MS a 5M NaCl inverte il trend, avendo più zinco in fase esponenziale che stazionaria.

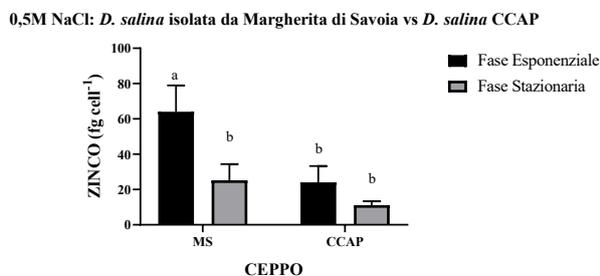
1



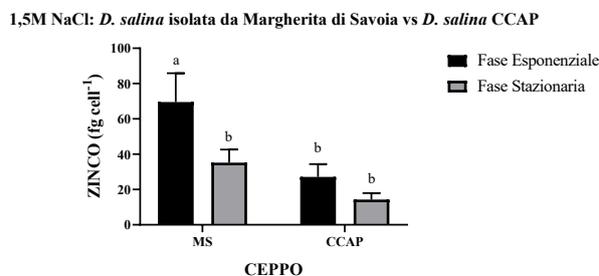
2



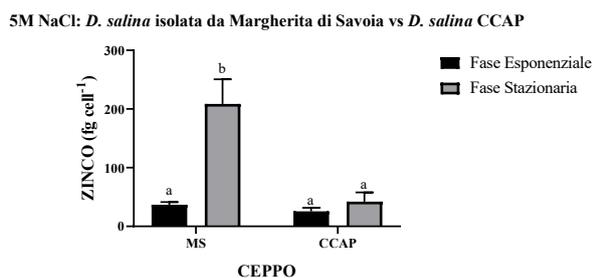
3



4



5



6

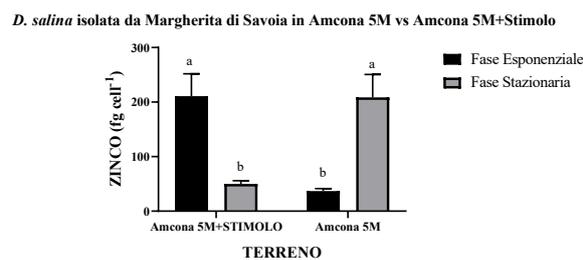


Figura 42 Contenuto di Zinco (Zn) in cellule di *D. salina* MS e CCAP (MS = ceppo isolato da Margherita di Savoia; CCAP = ceppo CCAP 19/25) in fase esponenziale e stazionaria di crescita, coltivate in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl con NaNO₃ o STIMOLO come fonte di N. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata su 3 repliche biologiche.

<i>D. salina MS</i>		
ELEMENTO	Esponenziale	Stazionaria
0,5M NaCl	(fg/cell)	(fg/cell)
P	1405,24±62,61	310,78±78,22
K	685,68±6,42	591,83±197,38
Ca	2019,50±771,41	625,13±110,57
Fe	488,21±48,15	175,88±42,65
Cu	3,50±1,71	1,78±0,95
Zn	64,02±14,91	25,18±9,21
1,5M NaCl		
P	466,97±168,75	169,68±23,91
K	279,12±80,26	258,48±0,52
Ca	2132,01±118,04	405,69±68,86
Fe	464,40±190,00	56,46±11,25
Cu	5,97±2,57	2,79±1,24
Zn	69,51±16,36	35,21±7,41
5M NaCl		
P	1209,16±265,66	3598,29±1357,84
K	309,99±107,44	1051,99±684,03
Ca	715,82±52,40	6179,86±5216,76
Fe	465,65±140,1	355,33±109,84
Cu	2,79±0,99	12,06±0,23
Zn	36,81±4,62	208,66±42,01

Tabella 19 Risultati dell'analisi PICOFOX relativi al ceppo *D. salina MS* in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivato in Amcona 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche biologiche.

<i>D. salina MS</i>		
Amcona 5M NaCl+STIMOLO	Esponenziale	Stazionaria
ELEMENTO	(fg/cell)	(fg/cell)
P	2335,51±622,96	530,35±73,70
K	2922,77±887,58	1359,01±521,01
Ca	3414,10±352,00	728,43±116,25
Fe	2880,38±870,21	1321,82±141,70
Cu	55,16±17,78	14,52±2,95
Zn	210,99±40,88	49,89±5,95

Tabella 20 Risultati dell'analisi PICOFOX relativi al ceppo *D. salina MS* in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivato in Amcona 5M NaCl e STIMOLO come fonte di N. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche biologiche.

<i>D. salina</i> CCAP		
ELEMENTO	Esponenziale	Stazionaria
0,5M NaCl	(fg/cell)	(fg/cell)
P	379,78±119,95	282,91±26,31
K	223,01±52,65	111,65±8,66
Ca	1121,17±443,47	290,03±16,58
Fe	79,67±40,17	29,19±15,72
Cu	2,26±0,12	2,34±0,00
Zn	24,04±9,21	11,14±2,24
1,5M NaCl		
P	262,91±0,00	228,58±44,12
K	106,58±14,34	133,27±22,57
Ca	950,50±96,59	405,27±87,72
Fe		17,53±4,85
Cu	1,50±1,06	2,45±0,64
Zn	27,13±7,27	14,30±3,67
5M NaCl		
P	487,77±121,67	572,76±117,37
K	224,64±18,71	634,08±75,00
Ca	509,71±175,85	761,93±130,51
Fe	245,87±46,45	190,45±90,58
Cu	4,82±0,85	10,74±5,32
Zn	25,50±6,06	42,20±15,61

Tabella 21 Risultati dell'analisi PICOFOX relativi al ceppo *D. salina* CCAP in fase esponenziale e stazionaria di crescita coltivato in Amconca 0,5M NaCl, 1,5M NaCl o 5M NaCl. Le deviazioni standard sono relative alla media calcolata su 3 repliche biologiche.

Capitolo 5

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I risultati ottenuti possono essere utilizzati per capire quale dei due ceppi di *D. salina* coltivati è meglio scegliere e a quale salinità è opportuno portare avanti la coltura per avere la massima produzione del composto biologico di interesse.

In termini di crescita si è potuto constatare che nel ceppo *D. salina* isolata da Margherita di Savoia la salinità non gioca un ruolo decisivo nel determinare il tempo di divisione (T_d). Questa indipendenza tra crescita e concentrazione di NaCl è stata documentata anche da Ginzburg et al. (1985) studiando la crescita nell'intervallo di salinità 0,5-4M NaCl di *Dunaliella* K1. Diversa la risposta del ceppo CCAP al sale che, invece, ad alta concentrazione (5M NaCl) aumenta di molto il tempo di divisione. Anche questa condizione è stata riportata da Ginzburg et al. (1985) nei ceppi *Dunaliella* A12, I4 e IRAN6 nei quali ha osservato un tempo di divisione costante a salinità intermedie e molto aumentato a concentrazione di sale estrema (4M NaCl). Analoghi andamenti sono stati documentati da Cifuentes et al. (1996) studiando due ceppi cileni di *D. salina* CONC-006 e CONC-007, i quali sono stati coltivati a diverse salinità in terreno Provasoli (PES) ed entrambi hanno mostrato un tasso di crescita maggiore a salinità minore (5% NaCl: 0,76 div/giorno CONC-007 e 0,53div/gorno CONC-006), per poi diminuire il tasso di divisioni al giorno all'aumentare della concentrazione salina del terreno. Lo stesso ceppo CONC-007 coltivato in Provasoli (PES) e terreno ART a salinità 1M, 2M e 3M NaCl è stato studiato da Gómez et al.(2003), ed anche in questo caso il massimo tasso di crescita è stato osservato alla concentrazione salina minore.

Tale profilo di crescita potrebbe essere il risultato di diversi fattori di inibizione indotti dall'alta concentrazione salina. Fra questi è da sottolineare la disponibilità limitata di CO₂ per la fotosintesi a causa di una diminuzione della sua solubilità in mezzi altamente salini, l'effetto negativo del sale NaCl sulle macromolecole della

microalga e dunque sulle attività enzimatiche e sulla struttura della membrana (la *D. salina* è priva di parete) ed infine l'elevato investimento energetico che la cellula deve sostenere per sintetizzare glicerolo per difendersi dall'alta pressione osmotica (Ginzburg et al.,1985).

Nel caso oggetto di studio, inoltre, la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia cresciuta a salinità 5M NaCl in Amcona+Stimolo mostra un T_d molto lungo che potrebbe essere dovuto al colore scuro del terreno in presenza del fertilizzante Stimolo®, il quale impone alla cellula un grande dispendio di energia nel captare la luce e di conseguenza vengono sottratte risorse alla crescita.

Proprio a testimonianza di questa necessità di riuscire a captare più luce possibile in un terreno scuro, c'è l'elevata quantità di clorofilla riscontrata nella *D. salina* isolata da Margherita di Savoia cresciuta a salinità 5M NaCl in Amcona+Stimolo in fase esponenziale rispetto alla corrispondente cresciuta in Amcona 5M NaCl, ovvero in un terreno trasparente in cui l'unico fattore limitante per la luce è l'ombreggiamento causato dalla densità cellulare.

Per quanto riguarda l'accumulo di carotenoidi, dai dati è emerso che il ceppo che maggiormente ne produce è la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia e la massima quantità di carotenoidi per cellula viene raggiunta dalle microalghe cresciute a salinità intermedia 1,5M NaCl in fase di crescita stazionaria. Questo risultato, sebbene collida con il suo colore meno aranciato rispetto a quello mostrato dalle colture alle due salinità estreme (Fig.29, Capitolo 4), è in linea con lo studio di Gómez et al. (2003) che riporta che il massimo contenuto di carotenoidi per cellula (*D. salina* CONC-007 in PES) è stato raggiunto a salinità bassa (1M NaCl) e media (2M NaCl). I dati ottenuti sono un po' contrastanti da quanto ci si aspetterebbe in funzione della salinità del mezzo, infatti lo stress salino dovrebbe indurre un maggior accumulo di carotenoidi insieme al glicerolo, come dimostrato dallo studio precedentemente citato sulla *D. salina* CONC-007 coltivata in ART che raggiunge la massima quantità carotenoidi/cellula a 3M NaCl; allo stesso risultato sono giunti El-

Baky et al.(2004) studiando la *D. salina* (ottenuta dal Dipartimento di Botanica della Texas University, Austin, Texas, U.S.A.), la quale ha accumulato la maggior quantità di carotenoidi quando irradiata con UV-B e in condizioni di azoto N limitante e alta salinità. Al contrario, in questo lavoro, la quantità cellulare di carotenoidi relativa alla coltura alla massima concentrazione 5M NaCl in fase stazionaria non è significativamente diversa da quella della coltura cresciuta in terreno a bassa concentrazione 0,5M NaCl nella stessa fase di crescita, mentre questo aumento si nota passando dal mezzo 0,5M NaCl al terreno 1,5M NaCl in fase stazionaria, probabilmente dovuto sia allo stress salino che alla limitazione di azoto N tipica di questa fase di crescita, nella quale le cellule hanno consumato gran parte del nitrato del mezzo.

Interessante è notare che a salinità 5M NaCl la carotenogenesi, sia in fase esponenziale di crescita che stazionaria, non è influenzata dalle due diverse fonti di azoto (inorganico del mezzo Amcona e organico del mezzo Amcona+Stimolo).

Dai risultati è emerso che le colture di *D. salina* isolate da Margherita di Savoia che presentano il massimo rapporto carotenoidi/clorofilla totale sono quelle cresciute a salinità 1,5M NaCl in fase di crescita stazionaria e a salinità 5M NaCl in fase di crescita esponenziale, ma tra loro non sono significativamente differenti. Questo aspetto è in contrasto con quanto riportato dagli studi condotti sulla *D. salina* CONC-006 e CONC-007 che dimostrano che all'aumentare della concentrazione salina del mezzo aumenta il rapporto carotenoidi/clorofilla totali (Cifuentes et al.,1996 e Gómez et al., 2003), nel nostro caso questo andamento è riscontrabile passando dalla salinità 0,5M NaCl a salinità 1,5M NaCl.

Interessante è notare che, come testimoniato dai colori delle colture (Fig.29, Capitolo 4) il ceppo studiato presenta per cellula molti più carotenoidi del ceppo CCAP indipendentemente dalla salinità di crescita. Aspetto molto importante se si considera che la coltivazione industriale dell'alga *D. salina* è mirata proprio alla produzione e all'estrazione del β -carotene.

In conclusione si può affermare, incrociando il caso oggetto di studio e i dati riportati in bibliografia, che la carotenogenesi è un equilibrio tra diversi fattori esogeni quali luce, non analizzata in questo lavoro, concentrazione salina del mezzo, composizione del terreno di coltura e fase di crescita e endogeni, ovvero il ceppo di *D. salina* coltivato.

L'analisi del contenuto proteico cellulare ha dimostrato che l'alga *D. salina* isolata da Margherita di Savoia accumula in generale più proteine del l'alga *D. salina* CCAP. Questa grande quantità è rilevabile soprattutto nelle colture a salinità 0,5M NaCl in fase esponenziale, a 1,5M NaCl sia in fase esponenziale che stazionaria e a 5M NaCl in fase stazionaria. Mentre per le prime due condizioni è lecito pensare che l'elevato contenuto sia dovuto proprio alla crescita dell'alga stessa in fase esponenziale, per le ultime due il grande quantitativo proteico (circa 36,9% del dw singola cellula a 1,5M NaCl e circa il 58,76% del dw singola cellula a 5M NaCl) potrebbe essere determinato dalla sintesi, oltre che di enzimi del metabolismo della cellula e di proteine strutturali, di proteine indotte dal sale. Questo fenomeno è stato documentato da diversi studi condotti sull'alga *D. salina* coltivata ad alte concentrazioni saline e si è scoperto che in queste condizioni aumenta il livello della proteina di membrana p150 (Sadka et al., 1991 e Fisher et al., 1997). Questa proteina viene sintetizzata dopo il completamento degli adattamenti osmotici cellulari e il suo aumento coincide con la ripresa dei cicli cellulari, dimostrando che la p150 è essenziale per la vitalità delle cellule in mezzi ad alta salinità, rappresentando quindi una delle caratteristiche che rende la *D. salina* alotollerante (Sadka et al., 1991). Inoltre, in uno studio postumo Fisher et al. (1997) ha dimostrato che la p150 è la prima testimonianza di una proteina transferrin-like in un organismo non animale e potrebbe supportare le cellule nella diminuzione della biodisponibilità di ferro in mezzi ad alta salinità.

Inoltre al crescere della salinità del mezzo è stato dimostrato che aumenta il livello di una proteina di membrana, la p60, un'anidrasi carbonica che migliora l'assorbimento di CO₂ in ambienti ipersalini dove, come già accennato, la disponibilità di CO₂ diminuisce (Fisher et al., 1996).

A prescindere dal motivo di questo aumento nel contenuto di proteine, la percentuale di proteine/peso secco ottenuta nella coltura di *D. salina* isolata da Margherita di Savoia cresciuta a 5M NaCl è pari a circa 58,76% e si avvicina ai dati riportati in bibliografia da Becker (2004) che indicano un livello pari a circa 57%.

Da sottolineare è il grande quantitativo cellulare di proteine presenti nella coltura in fase stazionaria in terreno Amcona 5M NaCl+ Stimolo rispetto alla coltura in Amcona 5M NaCl, ciò significa che la fonte organica di azoto viene positivamente utilizzata dalle cellule di *D. salina* MS.

Queste grandi percentuali sono state confermate dall'analisi FT-IR che hanno evidenziato nel ceppo di Margherita di Savoia un rapporto C/P minore del rapporto C/L, indicando che la componente proteica delle cellule è maggiore di quella lipidica. Inoltre confrontando i valori C/P con i valori proteici si giunge alla conclusione che i carboidrati delle colture a 0,5M NaCl in fase esponenziale di crescita sono circa il doppio di quelli delle stesse cellule in fase stazionaria, mentre a 1,5M NaCl considerando che il contenuto proteico delle cellule in fase stazionaria e esponenziale di crescita non varia significativamente mentre varia il C/P essendo in fase stazionaria circa 1,5 volte quello della fase esponenziale si può concludere che in questo caso le cellule in fase stazionaria sono più ricche di carboidrati rispetto a quelle nella fase esponenziale, stesse considerazioni possono essere fatte per le cellule cresciute a salinità 5M NaCl. Inoltre confrontando le salinità di crescita, si nota che in fase stazionaria di crescita C/P a 0,5M NaCl è paragonabile al C/P a 5M NaCl mentre le proteine per cellula della coltura a 5M NaCl sono circa 3,5 volte di più, il che fa concludere che la percentuale dei carboidrati delle colture a 5M NaCl è maggiore di quella delle cellule coltivate a 0,5M NaCl, mentre sono paragonabili a quella delle colture in fase stazionaria di crescita a 1,5M NaCl. Analizzando i grafici L/P e confrontandoli con i dati del contenuto proteico, si deduce che a salinità 1,5M NaCl e 5M NaCl le colture presentano un contenuto lipidico maggiore in fase stazionaria di crescita rispetto alla fase esponenziale, come ci si aspetterebbe in seguito alla sintesi di glicerolo in risposta allo stress salino.

Dall'analisi FT-IR sulla *D. salina* CCAP è emerso che il rapporto C/L è maggiore del rapporto C/P di circa 2-3 volte in fase di crescita stazionaria, indipendentemente dalla salinità del mezzo, mentre in fase di crescita esponenziale a salinità 0,5M NaCl C/L è circa 6 volte C/P e a salinità 5M NaCl C/L è circa 5 volte C/P, questi dati permettono di concludere che il contenuto di proteine per cellula è maggiore del contenuto lipidico. Inoltre, confrontando i grafici riportanti il rapporto C/P con i grafici dei dati relativi al contenuto proteico cellulare la coltura cresciuta a salinità 0,5M NaCl in fase stazionaria di crescita presenta un contenuto glucidico più alto rispetto alla precedente fase stazionaria, testimoniato da un contenuto proteico simile ma un C/P più elevato in fase stazionaria di crescita. Mentre le colture coltivate a salinità 1,5M NaCl e 5M NaCl sono caratterizzate da una percentuale di carboidrati che non varia considerevolmente tra la fase esponenziale e stazionaria di crescita, ciò può essere dedotto da un contenuto simile di proteine alle due fasi di crescita seguito da un rapporto C/P altrettanto simile tra le due fasi. Inoltre, non si notano differenze significative nel contenuto glucidico in funzione della salinità, ad eccezione della coltura a 5M NaCl in fase stazionaria di crescita che presenta un contenuto glucidico minore rispetto alla coltura a 0,5M NaCl nella stessa fase di crescita.

Confrontando il grafico del rapporto L/P dell'alga *D. salina* CCAP con il grafico relativo ai dati del contenuto proteico cellulare si nota che le colture coltivate a 0,5M NaCl passando dalla fase esponenziale di crescita a quella stazionaria aumentano il contenuto lipidico cellulare, trend non riscontrabile nelle colture cresciute alle due salinità maggiori che invece sembrano mantenere un contenuto lipidico invariato nelle due fasi di crescita. Interessante è sottolineare che da questi dati si può dedurre che in fase stazionaria di crescita le colture a salinità 5M NaCl presentano un contenuto lipidico cellulare più basso rispetto a quelle coltivate a 1,5M NaCl (contenuto proteico simile ma L/P maggiore a salinità 1,5M NaCl) a discapito di quanto si potrebbe pensare sull'accumulo di glicerolo in funzione della salinità.

Confrontando i due ceppi a singola salinità, si nota che a salinità 0,5M NaCl la CCAP in fase stazionaria di crescita ha più carboidrati rispetto alla corrispondente coltura

del ceppo *D. salina* MS, in quanto a fronte di un contenuto proteico simile, la prima presenta un C/P circa doppio rispetto alla seconda. A salinità 1,5M NaCl sia in fase stazionaria di crescita che esponenziale la *D. salina* MS presenta una percentuale glucidica cellulare maggiore della CCAP, in quanto ha un più elevato contenuto proteico (circa 5,6 volte in più in fase esponenziale e 2,5 volte in più in fase stazionaria di crescita) ma un simile rapporto C/P. Stesse considerazioni possono essere fatte per giustificare il più alto contenuto glucidico della *D. salina* MS coltivata a salinità 5M NaCl in fase stazionaria di crescita rispetto alla corrispondente CCAP, differenza che non si nota considerando le fasi esponenziali di crescita delle due colture citate.

Confrontando i due ceppi riguardo il rapporto L/P è interessante notare che le colture dei due ceppi cresciute a salinità 0,5M NaCl in fase stazionaria di crescita presentano un contenuto proteico cellulare simile e un rapporto L/P simile, il che conduce a concludere che la percentuale lipidica cellulare sia simile nei due ceppi, al contrario in fase esponenziale di crescita nonostante il ceppo *D. salina* MS presenti un contenuto proteico molto maggiore della CCAP, ha anche un L/P molto più elevato il che significa che la prima presenta una % lipidica molto più consistente rispetto al secondo ceppo.

A salinità 1,5M NaCl sia in fase esponenziale che stazionaria di crescita la *D. salina* MS, a discapito di una percentuale proteica maggiore della CCAP, presenta un L/P paragonabile al ceppo CCAP dovuto sicuramente ad un contenuto lipidico maggiore. A salinità 5M NaCl i due ceppi in fase esponenziale di crescita sono caratterizzati da una percentuale lipidica simile (contenuto proteico simile e L/P simile), mentre in fase stazionaria la *D. salina* MS presenta più lipidi della CCAP per le stesse considerazioni fatte per le colture a salinità 1,5M NaCl.

Per queste ragioni l'analisi della composizione lipidica è stata effettuata solamente per il ceppo *D. salina* MS in fase stazionaria di crescita, coltivato alle 3 salinità e in terreno Amcona+Stimolo.

Dall'analisi dei lipidi condotta sul ceppo di Margherita di Savoia alle 3 salinità e in terreno Amcona 5M NaCl+Stimolo, è emerso che la coltura coltivata a 0,5M NaCl è quella che presenta la più alta percentuale di lipidi su dw (19,6%), mentre alle altre salinità e in Amcona+Stimolo il contenuto è paragonabile (circa 9,5%) ed è maggiore rispetto alla percentuale lipidica della *D. salina* riportata da Becker (2004) che indicano un livello pari a circa il 6% del peso secco (dw). I valori ottenuti dimostrano i dati dell'FT-IR ottenuti in questo lavoro e riportati pocanzi, ovvero che C/P è minore di C/L infatti in fase stazionaria di crescita a salinità 1,5M NaCl il contenuto proteico è pari a 36,9% dw mentre quello lipidico è 9,5% dw, a salinità 5M NaCl la % proteica è circa 58,8% mentre quella lipidica è 9,1% ed è simile a quella che caratterizza le colture in Amcona 5M NaCl+Stimolo (9,6%dw), l'unica discrepanza si ha nella coltura a salinità 0,5M NaCl che a fronte di una % lipidica pari al 19,7% dw presenta solo un 15,88% dw di proteine . Ciò che è interessante notare è che ci si sarebbe aspettato un contenuto maggiore di lipidi a salinità più elevate a causa dell'accumulo di glicerolo in risposta allo stress salino, mentre nel nostro caso di studio si è dimostrato il contrario.

A livello di composizione qualitativa dei lipidi, in ogni condizione di salinità, prevalgono gli acidi grassi polinsaturi, soprattutto nella coltura a 1,5M NaCl, la quale presenta anche il miglior rapporto $\omega 3/\omega 6$ (2,63 ds 0,01). Importante, a tal proposito, è ricordare che mentre gli $\omega 3$ hanno un ruolo antiinfiammatorio e preventivo nei confronti di malattie cardiovascolari e metaboliche e sono essenziali per lo sviluppo e la funzionalità di occhi e cervello, gli $\omega 6$ (es. acido arachidonico) vanno a costituire la cascata pro infiammatoria , quindi un eccesso di $\omega 6$ su $\omega 3$, come avviene nella dieta occidentale (ricca di olio di girasole, soia, mais), è deleterio.

Il lato negativo riguardante gli $\omega 3$ e $\omega 6$ presenti nelle colture oggetto di studio è che sono ricche dei precursori delle due cascate ovvero ALA (acido α -linolenico, serie $\omega 3$), AL (acido linoleico, serie $\omega 6$) e GLA (acido γ -linolenico, serie $\omega 6$) mentre sono del tutto prive degli acidi grassi a valle delle due serie ovvero EPA e DHA (serie $\omega 3$) e acido arachidonico (serie $\omega 6$). Ciò rende questo ceppo poco interessante ai fini di

sintetizzare integratori di $\omega 3$ a base di EPA e DHA, infatti sarebbe poco utile integrare la dieta con ALA e AL (AGE, ovvero essenziali per l'uomo) dato che l'organismo umano ha un apparato di trasformazione (elongasi e desaturasi) di questi due precursori in EPA e DHA poco efficiente, ovvero non in grado di sintetizzare le quantità necessarie al fabbisogno dell'organismo. Stesso discorso va fatto per l'alimentazione dei pesci in acquacoltura. Anche gli organismi marini hanno una bassa efficienza di trasformazione dei precursori delle due serie in EPA, DHA e AA (acido arachidonico), ma ne sono ricchi perché in natura si cibano di alghe. Questo dato è, dunque, in contrasto con quanto riportato in bibliografia che vede le alghe pluri e monocellulari in prima linea nel contenuto di EPA e DHA, come dimostrato, ad esempio, da uno studio condotto da Atalah et al. (2007) che ha evidenziato che sostituire l'olio di pesce con la microalga *Cryptecodinum cohnii* (dinoflagellata eterotrofa) omogeneizzata nella dieta di 6000 postlarve di *Sparus aurata* (orata) per 57 giorni ha migliorato la sopravvivenza degli organismi e la loro crescita, questa dinoflagellata infatti produce grandi quantità di DHA facilmente assimilabile dagli organismi e purificabile (Mendes et al., 2009).

Di seguito vengono riportate le percentuali di $\omega 3$ e $\omega 6$ di alcuni cibi tradizionalmente considerati ricchi di LC-PUFA.

ALIMENTO	%$\omega 3$
chia	64
kiwi	62
lino	55
<i>D. salina</i> MS 1,5M NaCl	39,6
nocci	10,4
soia	8

Tabella 22 Contenuto di $\omega 3$ in alcuni alimenti considerati ricchi di $\omega 3$. Da www.mypersonaltrainer.it

ALIMENTO	% ω 6
girasole	65,7
mais	59
soia	51
noci	51
<i>D. salina</i> MS. 1,5M NaCl	15,1
Spicc TM (Micoperi)	16

Tabella 23 Contenuto di ω 6 in alcuni alimenti considerati ricchi di ω 6. Da www.mypersonaltrainer.it; il valore relativo a SpiccTM si riferisce alla percentuale di ω 6 su 100g di prodotto liofilizzato (<https://www.aziendainfiera.it/files/immagini/prodotti/mbg/capsule-monodose-spirulina-mbg/catalogo-spicc-mbg-2019.pdf>)

Da sottolineare è anche l'elevata percentuale di acido oleico ω 9, soprattutto nelle colture a 0,5M NaCl (26,2% ds 0,1) che le rende un possibile sostituto dell'olio d'oliva.

Interessante è evidenziare che a qualsiasi salinità siano state cresciute le alghe, queste presentano comunque una percentuale di LC-PUFA più alta di Spirulina. Infatti, da quanto riportato dall'azienda Micoperi Blue Growth, la *S. platensis* (SpiccTM) (<https://www.aziendainfiera.it/files/immagini/prodotti/mbg/capsule-monodose-spirulina-mbg/catalogo-spicc-mbg-2019.pdf>) ha un 30% di LC-PUFA mentre la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia ne presenta 41,6% a 0,5M NaCl, 55,9% a 1,5M NaCl, 44,9% a 5M NaCl e 43,6% a 5M NaCl in Amcona+Stimolo.

Stesso discorso per quanto riguarda la percentuale di acido oleico della *D. salina* isolata da Margherita di Savoia a qualsiasi salinità che è maggiore di quella di SpiccTM (9%).

Dall'analisi Pico-Fox è emerso che la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata a 5M NaCl in fase stazionaria presenta in generale la più alta quantità per cellula di elementi in traccia. Questa tendenza è evidenziabile soprattutto a livello del fosforo, dello zinco e del rame che sono marcatamente più presenti in questa coltura. Confrontando questi dati in mg/100g di coltura liofilizzata con i valori riportati

dall’Azienda MICOPERI BLUE GROWTH per *Spirulina platensis* (Spicc™), la microalga considerata Superfood, si può notare che la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata a 5M NaCl in fase stazionaria presenta una maggior quantità di P, Zn e Cu.

	<i>D. salina</i> MS		Spicc™
P	1462,72	(mg/100g liof.)	867
Zn	84,82	(mg/100g liof.)	6,5
Cu	4,90	(mg/100g liof.)	0,5

Tabella 24 Contenuto di P, Cu e Zn tra *D. salina* MS e Spicc™

(<https://www.aziendainfiera.it/files/immagini/prodotti/mbg/capsule-monodose-spirulina-mbg/catalogo-spicc-mbg-2019.pdf>)

L’importanza del P per l’organismo umano è evidente dato che va a costituire ossa e denti, legami ad alta energia (ATP e fosfocreatina), fosfolipidi di membrana, è essenziale nelle attività enzimatiche (fosforilazione e defosforilazione), è costituente degli acidi nucleici ed è implicato nel sistema tampone del sangue, inoltre migliora la memoria. Il fabbisogno giornaliero di fosforo va dagli 700mg in un adulto medio ai 1000mg per gli anziani fino ai 1250mg per adolescenti e donne incinta (fonte SINULARN), il che significa che 100g di *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata a 5MNaCl in fase di crescita stazionaria liofilizzata copre il fabbisogno giornaliero. Il contenuto di P della microalga oggetto di studio è inoltre più alto degli alimenti comunemente considerati ricchi di fosforo come ad esempio la crusca dei cereali (1013-1677mg/100g), germe di grano (842mg/100g), formaggio pecorino (760mg/100g), noci brasiliane (725mg/100g), spigola (1150mg/100g), orata (1050mg/100g) (Fonte: www.mypersonaltrainer.it). Queste considerazioni rendono la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata a 5M NaCl in fase di crescita stazionaria un’ottima materia prima da cui ricavare integratori a base di fosforo.

Lo Zn è un minerale essenziale per la salute umana in quanto è implicato in molti processi biologici dalla catalisi enzimatica, in quanto costituente degli enzimi, alla funzionalità sinaptica e di segnalazione cellulare, inoltre lo zinco lo si ritrova in abbondanza nella prostata e rappresenta un minerale essenziale per la corretta attività riproduttiva maschile, andando a stabilizzare le membrane biologiche e il DNA degli spermatozoi, difendendo le cellule spermatiche dai ROS e coadiuvandole nei processi di fecondazione anche favorendo la secrezione nel liquido seminale di citrato, essenziale per la loro motilità e capacitazione (Salzano, 2008).

Secondo i dati riportati da LARN-SINU il fabbisogno medio AR giornaliero di un adulto è di circa 8-10mg di Zn che non varia molto in caso di persone anziane o donne incinta o che allattano. Dunque 100g di *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata a 5M NaCl in fase di crescita stazionaria liofilizzata eccede il fabbisogno giornaliero ed è di gran lunga maggiore rispetto alle quantità (mg/100g) dei cibi considerati ricchi di Zn che, ad eccezione delle ostriche che sono intorno ai 100mg/100g, si aggirano sui 12mg/100g (germe di grano e fegato bovino), 9 mg/100g (cioccolato fondente e lievito di birra), 6-7mg/100g (carni) (Fonte: www.mypersonaltrainer.it). In questo caso anche le colture a 1,5M NaCl e 0,5M NaCl in fase stazionaria di crescita presentano una quantità che soddisfa le dosi giornaliere consigliate in quanto contengono rispettivamente 13,14mg/100g dw e 9,95mg/100g dw di Zn, quindi come base per sintetizzare integratori a base di Zn possono essere usate indifferentemente.

Il Cu è un cofattore di molte attività enzimatiche ossido-riduttive implicate in vari processi metabolici come ad esempio la formazione del collagene e la respirazione mitocondriale, inoltre insieme alla Zn costituisce la rame-zinco superossidodismutasi (Cu/Zn-SOD) essenziale nella difesa dai radicali liberi. Stando alle dosi consigliate SINU-LARN di un adulto medio che si aggirano intorno agli 0,7mg/die fino agli 0,9mg/die in gravidanza e l'1,2mg/die durante l'allattamento, la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia liofilizzata coltivata a salinità 5M NaCl in fase stazionaria di crescita rappresenta un'ottima base da cui ricavare integratori naturali di rame.

Per quanto riguarda il potassio (ione implicato nel potenziale di membrana, Na-K) il ceppo Margherita di Savoia ne produce, indipendentemente dalla salinità, più del ceppo CCAP, sebbene non si notino differenze significative in funzione della salinità. I valori di K alle 3 salinità in fase stazionaria sono: 0,5M NaCl K= 233,92mg/100g dw , 1,5M NaCl K= 96,45mg/100g dw, 5M NaCl K= 427,646mg/100g dw che sono molto inferiori rispetto ai 2040mg/100g liofilizzato di SpiccTM e al contenuto di K nei cibi tradizionalmente considerati ricchi di potassio come ad esempio il ketchup (5901mg/100g), la soia (1740mg/100g) o i fagioli borlotti (1478mg/100g)(Fonte: www.mypersonaltrainer.it), quindi il ceppo oggetto di studio non è raccomandabile come fonte di potassio.

L'analisi Pico-Fox ha evidenziato che nel determinare il contenuto di calcio (il maggior costituente delle ossa, essenziale per la contrazione muscolare, per l'attività sinaptica e per i processi di esocitosi in generale, come segnale intracellulare e nella coagulazione del sangue) nelle cellule coltivate la salinità del mezzo non ha giocato nessun ruolo decisivo, né si sono rilevate differenze tra i 2 ceppi. Considerando ciascuna salinità in fase stazionaria il contenuto di Calcio in *D.salina* MS è: 0,5M NaCl Ca=247,09mg/100g dw , 1,5M NaCl Ca= 151,38 mg/100g dw e 5M NaCl Ca= 2512,14 mg/100g dw. Mentre il contenuto di calcio nelle colture a 0,5M NaCl e 1,5M NaCl è paragonabile a quello di SpiccTM (101mg/100g liofilizzato), la coltura a 5M NaCl presenta un valore di calcio circa 9 volte più alto e maggiore anche di quello presente nei prodotti caseari (considerati ottime fonti di calcio) che variano da un minimo di circa 300mg/100g ad un massimo di 1323mg/100g del latte di vacca in polvere scremato (Fonte: www.mypersonaltrainer.it). Considerando che i dati SINULARN indicano un fabbisogno giornaliero per il calcio che varia dagli 800mg/die per un adulto medio fino a toccare i 1000-1100 mg/die per gli adolescenti, donne in gravidanza e anziani, la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia coltivata a salinità 5M NaCl in fase di crescita stazionaria può essere considerata una buona fonte di calcio.

L'analisi Pico-Fox ha rivelato che il ceppo isolato da Margherita di Savoia accumula più ferro del ceppo CCAP, soprattutto a salinità 0,5M NaCl e 1,5M NaCl in fase esponenziale e a 5M NaCl senza distinzione nella fase di crescita. Ciò che è interessante notare è che all'aumentare della salinità il Fe contenuto nelle cellule si mantiene costante e questo potrebbe essere dovuto, come detto in precedenza parlando della quota proteica cellulare, ad un aumento della proteina p150 che aiuterebbe le cellule a fronteggiare una possibile diminuita disponibilità di Fe in terreni ad alta salinità (Sadka et al., 1991 e Fisher et al., 1997). Il contenuto di Fe del ceppo Margherita di Savoia a 5M NaCl in fase stazionaria è pari a circa 144,44mg/100g dw mentre a salinità 0,5M NaCl 69,52mg/100g dw e 21,07mg/100g dw a salinità 1,5M NaCl. La coltura cresciuta a 5M NaCl in fase stazionaria di crescita ha un contenuto cellulare di ferro pari a circa 3,6 volte il contenuto di Fe di SpiccTM (40 mg/100g liofilizzato) e molto più elevato di alimenti comunemente ritenuti ricchi di ferro come il fegato degli animali (ad esempio il fegato d'oca ne contiene 30,53mg/100g). Considerando i dati SINU-LARN sul fabbisogno giornaliero di Fe che si aggirano intorno ai 7mg/die per un maschio adulto, 10mg/die per le femmine adulte (a causa del ferro legato all'emoglobina perso con il ciclo mestruale) e ben 22mg/die in gravidanza per sostenere la crescita del feto, la *D. salina* isolata da Margherita di Savoia liofilizzata, cresciuta a 0,5M, 1,5M o 5M NaCl in fase stazionaria di crescita, può essere considerata un'ottima fonte di Fe.

Concludendo, è bene precisare che si è parlato sempre della *D. salina* isolata da Margherita di Savoia come materia prima per la sintesi di integratori salini perché quando si confrontano le quantità di sali minerali nei cibi e le AR consigliate, non bisogna far riferimento solo alle dosi presenti negli alimenti quanto soprattutto alla loro biodisponibilità, ovvero quanto di questa dose l'intestino umano, ed animale in generale, riesce ad assorbire. Infatti la presenza di sostanze come fibre, fitati (depositi di fosforo nei vegetali) e ossalati possono diminuire la capacità di assorbimento dei sali minerali o perché aumentano il transito intestinale diminuendo il tempo di contatto dei nutrienti con la parete del lume intestinale o perché chelano (come ad

esempio gli ossalati e i fitati con il calcio) gli oligoelementi non rendendoli disponibili all'assorbimento. Inoltre, spesso per avere un'assimilazione ottimale gioca un ruolo essenziale il rapporto tra nutrienti, ad esempio il calcio presente nel latte e derivati è molto disponibile per la presenza nella stessa matrice alimentare di lattosio, che fermentando diminuisce il pH del lume intestinale aumentando la solubilità dei sali di calcio, e per l'ottimo rapporto Ca/P. Quindi, estraendo i singoli oligoelementi dalle alghe e tenendo conto delle considerazioni sopra riportate, è possibile sintetizzare integratori caratterizzati da un'ottima biodisponibilità dei loro componenti.

In conclusione, sebbene l'alga *D. salina* CCAP raggiunga densità cellulari leggermente più elevate alle tre salinità di crescita, l'alga *D. salina* MS si è dimostrata più ricca di proprietà nutrizionali a livello cellulare. Ciò rende questo ceppo più vantaggioso in termini economici in quanto si lavorerebbe con meno cellule, diminuendo lo sforzo di recupero della biomassa, ma da cui si possono estrarre ingenti quantità di prodotti utili.

Allegato

P Values dell'analisi statistica dei dati

- Curve di crescita

0,5M NaCl:D.salina MS vs. 0,5M NaCl:D. salina CCAP	0,3208
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	0,002
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 1,5M NaCl:D.salina MS	0,9727
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 1,5M NaCl:D. salina CCAP	0,4335
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	0,002
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:D.salina MS	0,1019
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	0,0032
0,5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	0,2417
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 1,5M NaCl:D.salina MS	0,05
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 1,5M NaCl:D. salina CCAP	>0,9999
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	0,2417
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:D.salina MS	0,0007
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	<0,0001
0,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 1,5M NaCl:D.salina MS	0,0002
0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 1,5M NaCl:D. salina CCAP	0,1681
0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	>0,9999
0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 5M NaCl:D.salina MS	<0,0001
0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	<0,0001
0,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
1,5M NaCl:D.salina MS vs. 1,5M NaCl:D. salina CCAP	0,0764
1,5M NaCl:D.salina MS vs. 1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	0,0002
1,5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:D.salina MS	0,5223
1,5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	0,0283
1,5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
1,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO	0,1681
1,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:D.salina MS	0,0011
1,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	<0,0001
1,5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 5M NaCl:D.salina MS	<0,0001
1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	<0,0001
1,5M NaCl:Amcona+STIMOLO vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:D. salina CCAP	0,7255
5M NaCl:D.salina MS vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001
5M NaCl:D. salina CCAP vs. 5M NaCl:Amcona+STIMOLO	<0,0001

- **Estrazione dei pigmenti: clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi**

Carotenoidi

D. salina MS

0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0059
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0075
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0048
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0383
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0334
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,8657
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8975
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9192
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9426
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	>0,9999

D. salina CCAP

0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9754
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,6764
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,4865
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,8443
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9998
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,3002
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8708
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,4531
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,916
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0538
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9994
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8138
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0919
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,356
5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9372

0,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0023
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001

MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0038
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0047
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,998

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,466

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,9996
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0006
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0008
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0007
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0009
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9961

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	>0,9999
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale	0,7445
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,5082
Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale	0,739
Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,5028
Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,9719

Clorofilla a+b

D. salina MS

0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	<0,0001
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	<0,0001

0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,2925
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8008
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,2666
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8327
5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0402

D. salina CCAP

0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,1331
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0506
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,1994
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0213
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0184
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9897
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9998
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,87
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8329
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9505
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9946
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9891
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,7439
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,6967
5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	>0,9999

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0003
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,188
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9738
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,3242

1,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999

MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8863
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8688

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS.:Fase Esponenziale vs. MS.:Fase Stazionaria	0,0004
MS.:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0191
MS.:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0232
MS.:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0352
MS.:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0288
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9988

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,849
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale	0,0057
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,1522
Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale	0,0163
Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,4289
Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,1514

Carotenoidi/clorofilla a+b

0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria	0,8945
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl MS:Fase Esponenziale	<0,0001
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl MS:Fase Stazionaria	0,9549
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,4004
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,9976
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,9999
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,999
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,9996
0,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale	0,5408
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria	0,0004
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl MS:Fase Esponenziale	<0,0001
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl MS:Fase Stazionaria	>0,9999

0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,9083
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9997
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,2889
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,4335
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,3337
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,4845
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,385
0,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,4744
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl MS:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl MS:Fase Stazionaria	0,6723
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,1338
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl MS:Fase Esponenziale	0,6873
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl MS:Fase Stazionaria	0,0002
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0039
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
1,5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl MS:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,9626
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9977
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,3974
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,5621
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,4505
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,6158
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,5089
5M NaCl MS:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,6053
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase	0,4227

Stazionaria

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,9966
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,9998
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,9985
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,9994
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,0526
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,094
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,0642
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,1118
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	0,0788
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	0,1081
0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
5M NaCl CCAP:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999

• Determinazione del contenuto proteico cellulare

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0003
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,7841
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,1437
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0008
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9998
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0022
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,023
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9838
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0002
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,7162
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0064
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,6417
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0692

1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0951
5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0006

D. salina CCAP

0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,5634
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9983
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0439
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,1125
0,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,2379
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Esponenziale	0,788
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,5284
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,8388
0,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9798
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0858
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,2099
1,5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,4087
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,9912
1,5M NaCl:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,8879
5M NaCl:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9957

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0003
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0002
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,4294
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,7893
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9058

1,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,2065
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0002
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0012
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4129

5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	<0,0001
--	---------

MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,4642
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,3494
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9943

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,4052
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale	0,0574
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,0054
Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale	0,5048
Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,0489
Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+ Stimolo:Fase Stazionaria	0,3541

- **Determinazione del contenuto lipidico cellulare dell'alga *D. salina* isolata dalle Saline di Margherita di Savoia**

Grassi saturi vs grassi mono/poli insaturi

0,5M NaCl:SATURI vs. 0,5M NaCl:mono INSATURI	0,9795
0,5M NaCl:SATURI vs. 0,5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. 1,5M NaCl:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. 1,5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. 1,5M NaCl:poli INSATURI	0,1412
0,5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 0,5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 1,5M NaCl:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 1,5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 1,5M NaCl:poli INSATURI	0,0096
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. 1,5M NaCl:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. 1,5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. 1,5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001

0,5M NaCl:poli INSATURI vs. 5M NaCl:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
0,5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:SATURI vs. 1,5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:SATURI vs. 1,5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:SATURI	0,9993
1,5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	0,001
1,5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	0,3481
1,5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	0,9883
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. 1,5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:SATURI	<0,0001
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	0,357
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	<0,0001
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	0,6535
1,5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:poli INSATURI vs. 5M NaCl:SATURI	<0,0001
1,5M NaCl:poli INSATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:poli INSATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	<0,0001
1,5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
1,5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001
5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:mono INSATURI	<0,0001
5M NaCl:SATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	0,0072
5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	0,0783
5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
5M NaCl:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	>0,9999
5M NaCl:mono INSATURI vs. 5M NaCl:poli INSATURI	<0,0001
5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	0,0039
5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	>0,9999
5M NaCl:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001
5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI	<0,0001
5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	<0,0001
5M NaCl:poli INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	0,0153
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI	0,0012
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:SATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	0,0391
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:mono INSATURI vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:poli INSATURI	<0,0001

ω3 vs ω6

0,5M NaCl:ω3 vs. 0,5M NaCl:ω6	0,0011
0,5M NaCl:ω3 vs. 1,5M NaCl:ω3	0,0001
0,5M NaCl:ω3 vs. 1,5M NaCl:ω6	<0,0001
0,5M NaCl:ω3 vs. 5M NaCl:ω3	<0,0001
0,5M NaCl:ω3 vs. 5M NaCl:ω6	<0,0001
0,5M NaCl:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3	<0,0001
0,5M NaCl:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	<0,0001
0,5M NaCl:ω6 vs. 1,5M NaCl:ω3	0,9253
0,5M NaCl:ω6 vs. 1,5M NaCl:ω6	<0,0001
0,5M NaCl:ω6 vs. 5M NaCl:ω3	<0,0001
0,5M NaCl:ω6 vs. 5M NaCl:ω6	<0,0001
0,5M NaCl:ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3	<0,0001
0,5M NaCl:ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	<0,0001
1,5M NaCl:ω3 vs. 1,5M NaCl:ω6	<0,0001
1,5M NaCl:ω3 vs. 5M NaCl:ω3	<0,0001
1,5M NaCl:ω3 vs. 5M NaCl:ω6	<0,0001
1,5M NaCl:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3	<0,0001
1,5M NaCl:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	<0,0001
1,5M NaCl:ω6 vs. 5M NaCl:ω3	<0,0001
1,5M NaCl:ω6 vs. 5M NaCl:ω6	>0,9999
1,5M NaCl:ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3	0,1988
1,5M NaCl:ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	0,9465
5M NaCl:ω3 vs. 5M NaCl:ω6	<0,0001
5M NaCl:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3	0,0006
5M NaCl:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	<0,0001
5M NaCl:ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3	0,2164
5M NaCl:ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	0,9329
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6	0,0272

ω6/ω3 vs ω3/ω6

0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. 0,5M NaCl :ω3/ω6	0,0004
0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. 1,5M NaCl :ω6/ω3	<0,0001
0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. 1,5M NaCl :ω3/ω6	<0,0001
0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. 5M NaCl :ω6/ω3	0,0018
0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. 5M NaCl :ω3/ω6	<0,0001
0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6/ω3	0,4022
0,5M NaCl :ω6/ω3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3/ω6	<0,0001
0,5M NaCl :ω3/ω6 vs. 1,5M NaCl :ω6/ω3	<0,0001
0,5M NaCl :ω3/ω6 vs. 1,5M NaCl :ω3/ω6	<0,0001
0,5M NaCl :ω3/ω6 vs. 5M NaCl :ω6/ω3	<0,0001
0,5M NaCl :ω3/ω6 vs. 5M NaCl :ω3/ω6	<0,0001
0,5M NaCl :ω3/ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω6/ω3	<0,0001
0,5M NaCl :ω3/ω6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:ω3/ω6	0,0567

1,5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. 1,5M NaCl : ω 3/ ω 6	<0,0001
1,5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. 5M NaCl : ω 6/ ω 3	0,0083
1,5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. 5M NaCl : ω 3/ ω 6	<0,0001
1,5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 6/ ω 3	<0,0001
1,5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 3/ ω 6	<0,0001
1,5M NaCl : ω 3/ ω 6 vs. 5M NaCl : ω 6/ ω 3	<0,0001
1,5M NaCl : ω 3/ ω 6 vs. 5M NaCl : ω 3/ ω 6	<0,0001
1,5M NaCl : ω 3/ ω 6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 6/ ω 3	<0,0001
1,5M NaCl : ω 3/ ω 6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 3/ ω 6	<0,0001
5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. 5M NaCl : ω 3/ ω 6	<0,0001
5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 6/ ω 3	0,1167
5M NaCl : ω 6/ ω 3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 3/ ω 6	<0,0001
5M NaCl : ω 3/ ω 6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 6/ ω 3	<0,0001
5M NaCl : ω 3/ ω 6 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 3/ ω 6	0,0001
Amcona 5M NaCl+STIMOLO: ω 6/ ω 3 vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:	<0,0001

- **Analisi FT-IR**

C/L

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2647
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0069
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1266
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0002
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0108
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,2913
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9957
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0073
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,4121
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,5316
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,2754
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9998
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0165
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,6838
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1869

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2524
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,006

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0051
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0317
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0051
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,2703
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2366
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,783
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2353
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9116
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,8777
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,8762

0,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,4068
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0115
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0071
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1115
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,2564

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0152
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0591
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0408
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,7621
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8861
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9931

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona o Amcona+STIMOLO vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,4704
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,529
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1438
MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Esponenziale	0,1679
MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Stazionaria	0,7181
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	>0,9999
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9501
MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Esponenziale	0,0078
MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9974

CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9213
CCAP:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Esponenziale	0,0093
CCAP:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9993
CCAP:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Esponenziale	0,0019
CCAP:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Stazionaria	0,7825
Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl +STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0162

C/P

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0005
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0081
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M:Fase Esponenziale	0,0087
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M:Fase Stazionaria	0,0015
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,5082
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0022
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M:Fase Esponenziale	0,485
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M:Fase Stazionaria	0,9715
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0002
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M:Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M:Fase Stazionaria	0,896
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M:Fase Esponenziale	0,0001
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M:Fase Stazionaria	0,0007
5M:Fase Esponenziale vs. 5M:Fase Stazionaria	0,8801

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,008
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9977
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1111
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,6271
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,8115
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0164
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,6288
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0007
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0011
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2147
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,3942
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,5772
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,008
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0141
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9992

0,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0114
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0461
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,7391
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0021
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0007

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0432
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9363
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0581
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0975
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9964
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1309

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona o Amcona+STIMOLO vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,9609
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,2562
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,5167
MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,1618
MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9998
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,073
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1769
MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,0436
MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9931
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9923
CCAP:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,9995
CCAP:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,1734
CCAP:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,9481
CCAP:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,3788
Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,1066

L/P

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	<0,0001
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0015
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	<0,0001
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0166
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,45
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0034
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1552
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0008
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9246
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7524
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0002
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0067
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2638

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0226
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0313
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0003
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9927
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,4621
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1544
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,057
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,4158
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1141
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0782
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,5181
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0007
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,006
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7686

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0007
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0002
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0038

MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4334
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0299

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0069
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,4199
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0174
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0611
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8885
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1665

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona o Amcona+STIMOLO vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0341
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9995
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4917
MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,2775
MS:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,6475
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,02
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,5158
MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,0008
MS:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,3731
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,3341
CCAP:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,4195
CCAP:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,4691
CCAP:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale	0,0147
CCAP:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,9997
Amcona 5M+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0234

• **Determinazione degli elementi in traccia: analisi PICOFOX**

Fosforo

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2475
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,3887
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1575
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9979
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0052
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9993

0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9996
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,4316
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0001
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9856
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,6174
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0002
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,2921
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0026

D. salina CCAP

0,5M NaCl .:Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl .:Fase Stazionaria	0,7479
0,5M NaCl .:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,5894
0,5M NaCl .:Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,3374
0,5M NaCl .:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,661
0,5M NaCl .:Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1437
0,5M NaCl .:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9997
0,5M NaCl .:Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9688
0,5M NaCl .:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,1103
0,5M NaCl .:Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,015
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9959
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0698
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0094
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0311
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0042
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,8316

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS.:Fase Esponenziale vs. MS.:Fase Stazionaria	<0,0001
MS.:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS.:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
MS.:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,718
MS.:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9715
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4815

1,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0139
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0835
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0426
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,5894

MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8439
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9619

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0128
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,6057
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,6893
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0027
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0032
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9987

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0755
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,333
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,252
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,7025
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0049
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0203

Potassio

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9985
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,5656
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,5173
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,6389
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,6612
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,7825
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7374
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,8438
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,4434
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0651
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0565
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0804

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0451
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0347
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1337
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9828
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0414
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9581
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0319
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,1236
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,6863
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0024
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0006
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0096
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0019
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,5692

1,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,9299
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0046
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0124
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0099
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0277
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8645

5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,1155
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9899
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,6775
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0757
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,496

CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase
Stazionaria

0,5118

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0587
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0038
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0252
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,2406
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9272
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,4982

Calcio

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,967
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9404
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9751
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2622
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9546
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0791
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9227
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9648
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2861
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0647
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0859

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,004
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9091
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0122
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0342
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,3456
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0211
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9815
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,7862
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1318

1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0656
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,1749
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,8701
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,988
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,3525
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,6829

0,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0216
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,1434
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0065
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,5574
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,7978
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1844

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0308
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,1482
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0307
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,6882
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,6877

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,1231
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9996
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	>0,9999
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,1075
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1268
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9994

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,6113
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,608
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,5903
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	>0,9999
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,1248

Ferro*D. salina MS*

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0404
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9998
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0043
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9998
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,6802
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,063
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7627
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0615
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,394
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0067
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,8206
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0066
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0519
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,814

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7438
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,3218
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,565
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0073
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0901
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9638
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9995
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0008
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0091
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9962
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0003
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0025
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0005
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0054
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,6693

0,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0626
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0072
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4315

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0034
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0015
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0019
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,8839
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9566
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9956

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,5794
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,1137
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0448
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,5851
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,2761
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9089

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,012
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0008
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0006
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,1697
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,1118
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9899

Rame

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7089
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,3679
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9898
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,99
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0001
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,0401
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9533
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9528
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1586
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,1592
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0029
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9987
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,7906
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0114
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9978
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,8108
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0122
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,9961
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,579
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,006
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,8372
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0134
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0968

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,5435
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,7569
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,7909
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9791

MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9675
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9999

1,5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,1331
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0318
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0918
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,7437
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,993
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8725

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0138
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,8028
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0307
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0476
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9321
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1096

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0025
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0005
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0017
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,4342
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9862
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,6116

Zinco

D. salina MS

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,24
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9993
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,5232
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,5785
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001

0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,1449
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,988
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9771
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,3511
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,3974
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	<0,0001

D. salina CCAP

0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 0,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,4717
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9973
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,7274
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	>0,9999
0,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,1689
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Esponenziale	0,2674
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,997
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,3659
0,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0079
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 1,5M NaCl :Fase Stazionaria	0,4775
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,9999
1,5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,3199
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Esponenziale	0,6087
1,5M NaCl :Fase Stazionaria vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,0168
5M NaCl :Fase Esponenziale vs. 5M NaCl :Fase Stazionaria	0,2309

0,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0061
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0051
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0009
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9989
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,3714
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4367

1,5M NaCl D. salina MS vs D. salina CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	0,0118
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,0034
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,0006

MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,7519
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,1174
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,4333

5M NaCl *D. salina* MS vs *D. salina* CCAP

MS:Fase Esponenziale vs. MS:Fase Stazionaria	<0,0001
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Esponenziale	0,9263
MS:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,9908
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Esponenziale	<0,0001
MS:Fase Stazionaria vs. CCAP:Fase Stazionaria	<0,0001
CCAP:Fase Esponenziale vs. CCAP:Fase Stazionaria	0,8055

5M NaCl *D. salina* MS in Amcona vs Amcona+STIMOLO

Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria	0,0007
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,0004
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,9996
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale	0,946
Amcona 5M NaCl+STIMOLO:Fase Stazionaria vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0008
Amcona 5M NaCl:Fase Esponenziale vs. Amcona 5M NaCl:Fase Stazionaria	0,0005

BIBLIOGRAFIA

- Abbate G., Acosta A., Baldan B., Basile A., Caporali E., Casadoro G., Cozzolino S., Felicini G.P., Forni C., Giovi E., Maggi O., Mazzucca S., Navazio L., Pasqua G., Perrone C., Selvi F., Signorini M.A., Spada A. & Trainotti L. “Botanica generale e diversità vegetale, II edizione” Piccin, 2010.
- Aslam M.N., Kreider J.M., Paruchuri T., Bhagavathula N., DaSilva M., Zernicke R.F., Goldstein S.A. & Varani J. “A Mineral-Rich Extract from the Red Marine Algae *Lithothamnion calcareum* Preserves Bone Structure and Function in Female Mice on a Western-Style Diet” *Calcified Tissue International* 86 (4), 313-324, doi: [10.1007/s00223-010-9340-9](https://doi.org/10.1007/s00223-010-9340-9), 2010.
- Atalah E., Hernández Cruz C.M, Izquierdo M.S., Rosenlund G., Caballero M.J., Valencia A. & Robaina L. “Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*)” *Aquaculture*, 270 (1–4): 178-185, 2007.
- Becker EW “Microalgae in human and animal nutrition” *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science, 312, 2004.
- Becker EW. “Microalgae as a source of proteins” *Biotechnology Advances* 25 (2), 207–210, 2007.
- Ben-Amotz A., Katz A. & Avron M. “accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta)” *J. Phycol*, 18: 529-537, 1982.
- Ben-Amotz A. & Levy Y. “Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans beta-carotene in human serum” *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63 (5): 729-734, 1996.
- Ben-Amotz A. “Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta)” *J. Phycol.* 32: 272-275, 1996.

- Bimestre B.H. & Saron C. “Caracterização por FTIR das mudanças químicas no PET reciclado após processamento reativo com extensores de cadeia” Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Engenharia de Materiais – DEMAR-EEL/USP., 2009.
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. & Kessly D. “Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*” Journal of Applied Phycology, 2 (2): 111-119, 1990.
- Buschmann A.H., Camus C., Infante J., Neori A., Israel Á., Hernández-González M.C., Pereda S.V., Gomez-Pinchetti J.L., Golberg A., Tadmor-Shalev N. & Critchley A.T. “Seaweed production: overview of the global state exploitation, farming and emerging reasearch activity” European Journal of Phycology, 52:4, 391-406, doi: [10.1080/09670262.2017.1365175](https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365175), 2017.
- Cifuentes A. S., Gonzalez M. A. & Parra O.O. “ The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco” Biol Res 29: 227-236, 1996.
- Davidi L., Katz A. & Pick U. “Characterization of major lipid droplet proteins from *Dunaliella*” Planta 236 (1), 19-33, doi: 10.1007/s00425-011-1585-7, 2012.
- Demming-Adams B., Cohu C.M. & Adams W.W. III “Dealing with the hazards of harnessing sunlight” Nature Education Knowledge , 4 (1): 18, 2012.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) “Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iodine” EFSA Journal / Volume 12, Issue 5, 2014.
- El-Baky H. H. A., El Baz F. K. & El-Baroty G. S. “Production of Antioxidant by the Green Alga *Dunaliella salina*” International Journal of Agriculture & Biology, 6 (1), 2004.
- Fisher M., Gokhman I., Pick U. & Zamir A. “A Salt-resistant Plasma Membrane Carbonic Anhydrase Is Induced by Salt in *Dunaliella salina*” Journal of biological chemistry, 271 (30): 17718 –17723, 1996.

- Fisher M., Gokhman I., Pick U. & Zamir A. “A structurally-novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities” *Journal of biological chemistry*, 272 (3): 1565-1570, 1997.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G. H. “A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues” *Journal of biological chemistry* 226 (1): 497-509, 1957.
- Ginzburg B. Z. & Ginzburg M. “Studies of the comparative physiology of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Volvocales)” *British Phycological Journal*, 20 (3): 277-283, DOI: 10.1080/00071618500650281, 1985.
- Giordano M., Kansiz M., Heraud P., Beardall J., Wood B. & McNaughton D. “Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae)” *J. Phycol.* 37: 271-279, 2001.
- Gómez P.I., Barriga A., Cifuentes A.S. & González M.A. “Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain Conc-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta” *Biol Res*, 36: 185-192, 2003.
- Hirschmugl C. J., Bayarri Z-E, Bunta M., Holt J. B. & Giordano M. “ Analysis of the nutritional status of algae by Fourier transform infrared chemical imaging” *Infrared Physics & Technology* 49 (1-2): 57-63, 2006.
- Johnson M. K., Johnson E. J., MacElroy R. D., Speer H. L. & Bruff B. S. “Effects of salt on the alofilic algae *Dunaliella viridis*” *J. Bacteriol.* 95: 1461-1468, 1968.
- Katz A. & Avron M. “Determination of intracellular osmotic volume and sodium concentration in *Dunaliella*” *Plant Physiology*, 78: 817-820, 1985.
- Kotrbáček V., Skřivan M., Kopecký J., Pěnkava O., Hudečková P., Uhríková I. & Doubek J. “Retention of crotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*” *Czech Journal of Animal Science* 58 (5), 193-200, 2013.

- Lamers P. P., van de Laak C. C.W., Kaasenbrood P. S., Lorier J., Janssen M., De Vos R. C. H., Bino R. J. & Wijffels R. H. “Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*” *Biotechnology and Bioengineering*, 106 (4): 638-648. doi:[10.1002/bit.22725](https://doi.org/10.1002/bit.22725), 2010.
- Lamers P. P., Janssen M., De Vos R. C. H., Bino R. J. & Wijffels R. H. “Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga” *Journal of Biotechnology*, 162 (1): 21-27, 2012.
- Lerche W. “Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*” *Arch f Protistenkd*, 88: 236-268, 1937.
- Lichtenthaler H. K. “Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes” *Methods in enzymology* 148: 350-382, 1987.
- Lin H-W., Liu C-W., Yang D-J., Chen C-C., Chen S-Y, Tseng J-K., Chang T-J. & Chang Y-Y. “*Dunaliella salina* algae extract inhibits the production of interleukin-6, nitric oxide, and reactive oxygen species by regulating nuclear factor- κ B/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription in virus-infected RAW264.7 cells” *Journal of Food and Drug Analysis*, 25: 908-918, 2017.
- Loureiro R., Gachon C. MM & Rebours C. “Seaweed cultivation: Seaweed cultivation: potential and challenges of crop domestication at an unprecedented pace” *New Phytol*, 206: 489-492. doi:[10.1111/nph.13278](https://doi.org/10.1111/nph.13278), 2015.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. “Protein measurement with the Folin phenol reagent” *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275, 1951.
- Marshall C. P., Javaux E. J., Knoll A. H. & Walter M. R. “ Combined micro-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of Proterozoic acritarchs: a new approach to palaeobiology” *Precambrian Research* 138 (3-4): 208-224, 2005.
- Mendes A., Reis A., Vasconcelos R., Guerra P. & Lopes da Silva T. “*Cryptothecodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review” *Journal of Applied Phycology*, 21 (2): 199-214, 2009.

- Moffatt N.M. “Survival and growth of northern anchovy larvae on low zoo plankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom” RappP-VRéunConsint Explor 178, 475-480, 1981.
- Murthy K.N.C., Vanitha A., Rajesha J., Mahadeva Swamy M., Sowmya P.R. & Gokare A. “In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green microalgae” Life Sciences, 76 (12), 1381-1390, 2005.
- Myers P.S., O’Connor J., Fitton J.H., Brooks L., Rolfe M., Connellan P., Wohlmuth H., Cheras P.A. & Morris C. “A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis” Bilogics: Targets & Therapy, 4: 33-44, 2010.
- Naas KE. & Harboe T. “Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water” Aquaculture 105(2), 143-156, 1992.
- Nayar S. & Bott K. “Current status of global cultivated seaweed production and markets” World Aquaculture 45 (2), 32-37, 2014.
- O’reilly J. M. & Mosher R. A. “Functional groups in carbon black by FTIR spectroscopy” Carbon 21 (1): 47-51, 1983.
- Oren A. “A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005” Saline systems 1 (1), 2, 2005.
- Papandroulakis N., Divanach P., Anastasiadis P. & Kentouri M. “The pseudo-green water technique for the intensive rearing of sea bream larvae (*Sparus aurata*)” Aquaculture International, 9 (3), 205-216, 2001.
- Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, del 28 giugno 2007, relativo alla produzione biologica e all’etichettatura dei prodotti biologici.
- Regolamento (CE) n. 889/2008 della Commissione, del 5 settembre 2008, recante modalità di applicazione del Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Øie G. & Olsen Y. “A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae” Aquaculture, 155 (1-4), 207-221, 1997.

- Sacksteder C. & Barry B. A. “Fourier transform infrared spectroscopy: a molecular approach to an organismal question” *Journal of Phycology* 37 (2): 197-199, 2001.
- Sadka A., Himmelhoch S. & Zamir A. “A 150 Kilodalton Cell Surface Protein Is Induced by Salt in the Halotolerant Green Alga *Dunaliella salina*” *Plant Physiology*, 95 (3): 822-831, DOI: 10.1104/pp.95.3.822, 1991.
- Shen Y., Pei Z.J., Mao E, Yuan W. & Wu Q. “Microalgae Mass Production Methods” *ResearchGate*, DOI: 10.13031/2013.27771, 2009.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. & Isambert A. “Commercial Applications of Microalgae” *Journal of bioscience and bioengineering* 101 (2), 87-96, 2006.
- Stahl W., Schwarz W. & Sies H. “” *The Journal of Nutrition*, 123 (5): 847-851, 1993.
- Takagi M., Karseno, Yoshida T. “Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(3), 223-226 , 2006.
- Tatsuzawa H. & Takizawa E. “Changes in lipid and fatty acid composition of *Pavlova lutheri*” *Phytochemistry* 40 (2), 397-400, 1995.
- Teodoresco EC “Organizzazione e sviluppo di *Dunaliella*, nuovo genere di Volvocacée-Polyblepharidée” *Beih z Bot Centralbl*, Bd. XVIII: 215-232, 1905.
- Teodoresco EC: “Osservazioni morfologiche e biologiche sul genere *Dunaliella*”. *Rev Gén Bot.*18: 353-371. 18: 409-427, 1906.
- Yang K., Peng H., Wen Y. & Li N. “Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles” *Applied surface science* 256 (10): 3093-3097, 2010.

SITOGRAFIA

- www.MYPERSONALTRAINER.it
- <https://acquario.top/pigmenti-fotosintetici-piante/>
- <http://www.fertenia.it/ita/biopromotori/stimolo.pdf>
- <http://www.fertenia.it/depliant/stimolo.pdf>
- [webusers.fis.uniroma3.it>gio](http://webusers.fis.uniroma3.it/gio)
- <https://www.aziendainfiera.it/files/immagini/prodotti/mbg/capsule-monodose-spirulina-mbg/catalogo-spicc-mbg-2019.pdf>
- <https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/s2-picofox/overview.html>
- www.sinu.it
- Salzano, 2008: <https://www.lascienzadelfitness.it/zinco-e-infertilita-maschile/>
- https://www.researchgate.net/figure/Carotenoid-biosynthesis-pathway-The-enzymes-involved-in-the-various-reactions-are_fig1_6983510
- <https://www.sakaeshoppe.com/products/chuka-wakame>
- https://www.buonissimo.it/lericette/340_Sushi