



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Metodi per il controllo dei predatori nelle colture algali

Relatore:

Prof.ssa Alma BALESTRAZZI

Correlatore:

Prof.ssa Valeria MEZZANOTTE

Dott.ssa Francesca MARAZZI

Tesi di

Andrea GHIDOTTI

Accademico 2025/2026

Sommario

INTRODUZIONE	3
METABOLISMO DELLE ALGHE	65
COLTIVAZIONE DELLE ALGHE.....	940
ALGA <i>Scenedesmus spp.</i>	2224
CONTAMINAZIONI MICROALGALI	2326
METODI DI RILEVAMENTO DELLE CONTAMINAZIONI.....	3033
METODI PER COMBATTERE LE CONTAMINAZIONI NELLE COLTIVAZIONI ALGALI	3135
METODI FISICI.....	3135
METODI CHIMICI	3437
AGENTI ALLELOPATICI.....	3740
CONTROLLO BIOLOGICO	Errore. Il segnalibro non è definito.43
SCOPO DELLA TESI	3945
MATERIALI E METODI.....	4045
PIANO DI LAVORO DEL PROGETTO DI TESI.....	Errore. Il segnalibro non è definito.45
INOCULO ALGALE E DEI ROTIFERI	Errore. Il segnalibro non è definito.50
REATTORI UTILIZZATI PER LA COLTIVAZIONE ALGALE.....	Errore. Il segnalibro non è definito.50
SUBSTRATO DI CRESCITA	Errore. Il segnalibro non è definito.51
LE ANALISI	Errore. Il segnalibro non è definito.52
DENSITA' ALGALE	Errore. Il segnalibro non è definito.52
ANALISI DELLA DENSITÀ OTTICA	Errore. Il segnalibro non è definito.53
ANALISI DELL'ATTIVITÀ FOTOSINTETICA MEDIANTE L'UTILIZZO DEL PHYTO-PAM	Errore. Il segnalibro non è definito.53
ANALISI DEL pH.....	Errore. Il segnalibro non è definito.57
DENSITA' DEI PREDATORI	Errore. Il segnalibro non è definito.58
CONDUZIONE DELLE PROVE	Errore. Il segnalibro non è definito.59
Prove di valutazione della soglia critica	Errore. Il segnalibro non è definito.62
RISULTATI E DISCUSSIONE	5362
CONCLUSIONI	7462
BIBLIOGRAFIA.....	7662

1. INTRODUZIONE

Le alghe, dal latino “*erbe di mare*”, non rappresentano un unico gruppo tassonomico, poiché non esiste un consenso univoco sulla loro classificazione. In generale, il termine comprende tutti quegli organismi caratterizzati da un metabolismo fotoautotrofo, in grado di produrre glucosio a partire da acqua e anidride carbonica, rilasciando ossigeno come prodotto di scarto (EABA, 2019). Si tratta di organismi ubiquitari, diffusi in circa il 70% della superficie terrestre. Sono presenti in ambienti marini, in acque dolci e in corsi d’acqua, ma possono trovarsi anche nel suolo e nei ghiacciai. Inoltre, mostrano un’elevata resistenza all’essiccamento e a condizioni ambientali estreme, sia alle alte temperature desertiche sia alle basse temperature e possono instaurare associazioni simbiotiche con animali e piante (Faruk et al., 2020), la più nota delle quali è costituita dai licheni. Le alghe svolgono un ruolo fondamentale nelle reti trofiche e nei cicli biogeochimici (Stevenson, 2014). La classificazione delle alghe non può basarsi esclusivamente su caratteri morfologici condivisi tra organismi, poiché ciò può risultare fuorviante a causa della presenza di specie criptiche e di fenomeni di convergenza evolutiva. Per specie criptiche si intendono due o più organismi classificati come un’unica specie in quanto morfologicamente indistinguibili (Bickford et al., 2007). La convergenza evolutiva, invece, consiste nell’evoluzione indipendente di caratteri morfologici simili in organismi filogeneticamente distanti (Stayton, 2015). Per superare tali limitazioni, si è fatto ricorso ad approcci di biologia molecolare basati sull’analisi genomica mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (de Souza et al., 2004). In particolare, vengono analizzate specifiche regioni del DNA: nei procarioti il gene dell’rRNA 16S, mentre negli eucarioti il gene dell’rRNA 18S, associato ai ribosomi. Nel caso delle alghe, quest’ultima sequenza viene ricercata nei cloroplasti (Leliaert et al., 2014), sebbene la classificazione di alcune specie algali sia tuttora oggetto di dibattito. Attualmente sono conosciute oltre 70.000 specie algali, meno di 50 delle quali vengono sfruttate a scopo commerciale. Le alghe comprendono organismi procarioti unicellulari, come i cianobatteri, considerati i più antichi organismi fotoautotrofi della Terra (Saber et al., 2022), ed organismi eucariotici sia unicellulari, quali Xantoficee, Criptoficee, Crisoficee, Diatomee, Dinoficee e Cloroficee, sia pluricellulari, ossia le macroalghe, comprendenti alghe verdi, brune (*Phaeophyceae*) e rosse (*Rhodophyceae*) (John et al., 2011). Le alghe costituiscono quindi un gruppo estremamente abbondante e diversificato; la loro composizione e diversità all’interno di un ecosistema possono fornire importanti indicatori ecologici, tra cui il livello di disturbo antropico presente nell’ambiente considerato. Le alghe presentano una notevole varietà morfologica: si possono osservare forme unicellulari mobili, come *Chlamydomonas*, colonie multicellulari flagellate, come *Volvox*, forme unicellulari non mobili, come *Chlorella*, forme filamentose, quali *Ulothrix*, *Oedogonium* e *Spirogyra*, forme eterotriche, come *Coleochaete*, forme sifoniche, come *Acetabularia*, e talli parenchimatici ben sviluppati, come *Ulva*, fino a organismi

caratterizzati da strutture simili a foglie e fusti che ricordano le piante terrestri, come *Chara*. La riproduzione di questi organismi è strettamente legata alle diverse fasi di ploidia del ciclo vitale ed è caratterizzata dall'alternanza di sporofito e gametofito. Lo sporofito, diploide, produce meiospore aploidi mediante meiosi, mentre il gametofito, aploide, è responsabile della produzione dei gameti tramite riproduzione sessuale. Nella maggior parte delle alghe, sporofito e gametofito si alternano all'interno dello stesso ciclo vitale, determinando il fenomeno dell'alternanza di generazioni. Tali fasi risultano fortemente influenzate dalle condizioni ambientali e strettamente interconnesse tra loro (Arora e Sahoo, 2015). Le alghe vengono frequentemente utilizzate come bioindicatori, ossia organismi in grado di fornire informazioni sulla qualità dell'ambiente in cui vivono, grazie alla loro sensibilità alle variazioni ambientali e all'inquinamento (Lutzoni et al., 2009). In particolare, l'analisi dei resti di diatomee e crisofite presenti nei sedimenti lacustri consente di evidenziare variazioni chimico-fisiche dell'acqua, comprese modificazioni della temperatura, e di ottenere informazioni sul contributo antropico alle piogge acide e ai cambiamenti climatici (Smol et al., 2005). La biomassa algale rappresenta inoltre un importante indicatore dello stato qualitativo delle acque, poiché può evidenziare potenziali minacce alla qualità dell'acqua potabile, all'estetica degli ambienti acquatici, alle attività ricreative, alla produttività della pesca e alla biodiversità di pesci e invertebrati. L'abbondanza algale può essere stimata direttamente sul campo oppure mediante raccolta di campioni e successive analisi di laboratorio. In ambiente naturale, la biomassa algale e alcuni aspetti della composizione tassonomica vengono valutati visivamente anche attraverso la misura della torbidità del corso d'acqua, utilizzando strumenti quali il disco di Secchi (Stevenson et al., 2002). A differenza delle piante terrestri, le alghe sono prive di foglie, stomi, radici, tessuti vascolari quali xilema e floema e di strutture lignificate deputate al sostegno (Faruk et al., 2020). Esse presentano differenti forme di crescita, tra cui forme coloniali, unicellulari, planctoniche e bentoniche (Stevenson et al., 2010). Le microalghe costituiscono il fitoplancton degli ecosistemi acquatici; inoltre, possono aderire a differenti substrati formando biofilm e instaurare associazioni simbiotiche. Tra le simbiosi più comuni si annoverano i licheni, derivanti dall'associazione tra cianobatteri e funghi (Lutzoni et al., 2009), e le barriere coralline, costituite dalla simbiosi tra zooxantelle e cnidari, in particolare esacoralli ermatipici (Cairns, 1999; Plaisance et al., 2011). Le barriere coralline sono diffuse prevalentemente nelle acque tropicali e svolgono un ruolo fondamentale come hotspot di biodiversità e produttori di ossigeno. Tuttavia, l'inquinamento e il riscaldamento delle acque marine stanno contribuendo alla progressiva compromissione di tali associazioni simbiotiche (Plaisance et al., 2011). Nonostante il loro importante ruolo ecologico, alcune specie algali possono avere effetti negativi sull'ambiente acquatico. In particolare, determinate specie fitoplanctoniche, organismi vegetali microscopici unicellulari o coloniali (microalghe) i quali vivono nella colonna d'acqua e si distribuiscono grazie ai

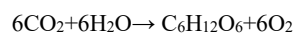
movimenti idrodinamici della corrente comprendono le diatomee, i dinoflagellati, i cocolitofori e i cianobatteri. Sono responsabili delle cosiddette fioriture algali (*blooms*), fenomeni caratterizzati da una crescita massiva della biomassa algale. Grazie agli elevati tassi di crescita e di turnover, il fitoplancton contribuisce a circa il 45–50% della produzione primaria globale e svolge un ruolo fondamentale nel ciclo del carbonio e nella regolazione del clima terrestre (Falkowski e Raven, 2007). Si differenziano dalle macrofite le quali sono, invece, visibili ad occhio nudo (da pochi centimetri a diversi metri); sono organismi pluricellulari bentonici nei quali si evidenzia un differenziamento tessutale per quanto riguarda le funzioni svolte. Sono ancora al substrato mediante strutture specializzate (rizoidi). La loro distribuzione è determinata principalmente dalla disponibilità di substrato, dalla penetrazione della luce, dall'idrodinamismo e dalle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente marino. Oltre a contribuire alla produzione primaria costiera, le macroalghe svolgono un'importante funzione di ingegneri ecosistemici, creando habitat tridimensionali che aumentano la biodiversità, offrono rifugio e aree di alimentazione per numerose specie e influenzano i cicli biogeochimici delle zone costiere (Piazzi e d'Archino, 2021). Si stima che circa 300 specie di fitoplancton possano causare fioriture nocive, formando in superficie accumuli di colore rosso o bruno tossici per gli organismi circostanti (Balaji-Prasath et al., 2022). Le fioriture algali provocano alterazioni delle caratteristiche fisiche e chimiche degli ecosistemi acquatici a causa dell'eccessivo accumulo di biomassa. Tali fenomeni compromettono l'estetica degli ambienti acquatici, favorendo l'intorbidimento delle acque e l'accumulo di materiale organico lungo le coste e le spiagge (Suplee et al., 2008). Inoltre, alcune alghe producono sostanze tossiche o metaboliti secondari, come i triolometani, responsabili di odori e sapori sgradevoli che possono influire negativamente sulla qualità dell'acqua potabile, sulla produzione ittica e sulla salute umana (Watson, 2004). Nei casi di eutrofizzazione dei laghi, la proliferazione eccessiva delle alghe, dovuta a forti apporti di nutrienti, determina inoltre una riduzione dell'ossigeno disciolto negli strati profondi, dove esse vengono decomposte a fine vita, e un aumento del pH delle acque negli strati superficiali, dove è attiva la fotosintesi (Antón et al., 2011; Anderson et al., 2002; Nancy et al., 2009). L'intensificazione dei fenomeni di *bloom* algale sembra essere strettamente correlata agli impatti antropici, che ne aumentano frequenza, intensità ed effetti ecologici.

1.1 METABOLISMO DELLE ALGHE

Le alghe svolgono un ruolo essenziale negli ecosistemi acquatici: sono infatti produttori primari alla base delle catene trofiche e contribuiscono alla produzione di circa il 50% dell'ossigeno presente nell'atmosfera terrestre. La produzione di ossigeno per via fotosintetica è associata al sequestro anidride carbonica (Faruk et al., 2020): il consumo di anidride carbonica è poco inferiore a 2 g CO₂ per g di biomassa microalgale prodotta. La conservazione della biodiversità algale risulta pertanto fondamentale per il mantenimento della funzionalità degli ecosistemi (Cardinale et al., 2012).

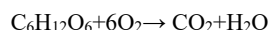
Sebbene la maggior parte delle alghe svolga metabolismo fotosintetico, esistono alcune eccezioni. Determinate specie sono infatti in grado di vivere in assenza di luce utilizzando composti organici come fonte energetica, attraverso un metabolismo eterotrofo, mentre altre presentano un metabolismo mixotrofo, combinando l'utilizzo della luce con l'assimilazione di sostanze organiche (Molina-Grima et al., 2022).

Durante la fotosintesi, l'energia solare viene utilizzata per ossidare le molecole d'acqua, liberando ossigeno molecolare come prodotto di scarto. Contestualmente, il carbonio dell'anidride carbonica viene ridotto per la sintesi di glucosio e la produzione di energia sotto forma di ATP. La reazione generale della fotosintesi può essere rappresentata come segue:



Nelle alghe e nelle piante superiori, la luce viene assorbita da differenti pigmenti fotosintetici, ciascuno caratterizzato da specifici spettri di assorbimento. Il principale pigmento coinvolto nella fotosintesi è la clorofilla, presente nei cloroplasti, sede in cui avvengono le reazioni fotosintetiche. In particolare, la clorofilla *a* assorbe prevalentemente la luce nelle regioni blu-violetta e rossa dello spettro, mentre la clorofilla *b* assorbe principalmente nelle regioni blu e arancione. Nelle alghe sono presenti anche altri pigmenti accessori, tra cui i carotenoidi, che assorbono la luce nelle regioni comprese tra il violetto e il verde, e le ficobiline, capaci di assorbire radiazioni nelle lunghezze d'onda del verde, giallo, arancione e rosso. Tali pigmenti ampliano lo spettro di luce utilizzabile per la fotosintesi, consentendo alle alghe di adattarsi a differenti condizioni ambientali e di illuminazione.

Parallelamente alla fotosintesi, nelle cellule algali avviene anche la respirazione cellulare, localizzata nei mitocondri. Essa consiste in un insieme di reazioni aerobiche attraverso le quali le molecole organiche vengono ossidate con liberazione di energia utilizzabile dalla cellula. La reazione generale della respirazione cellulare può essere rappresentata come segue:



La maggior parte delle alghe colonizza ambienti ricchi di ossigeno; tuttavia, alcuni gruppi algali, come *Chlamydomonas*, sono in grado di vivere anche in condizioni ipossiche, caratterizzate da basse concentrazioni di ossigeno, oppure in ambienti completamente anossici. In tali condizioni limitanti, il mantenimento del metabolismo cellulare è garantito principalmente da processi di fermentazione e respirazione anaerobica.

Le alghe unicellulari, pur essendo prevalentemente fotoautotrofe, possono infatti utilizzare differenti circuiti metabolici associati a varie vie fermentative. Questa flessibilità metabolica evidenzia la notevole capacità adattativa delle alghe rispetto alle condizioni ambientali in cui si sviluppano. La riduzione dei livelli di O_2 nei diversi biotopi può derivare da condizioni geochimiche e fisiche, quali inondazioni, precipitazioni intense e copertura glaciale invernale, ma anche dall'elevata attività metabolica dei batteri in habitat scarsamente aerati. Sebbene le alghe capaci di fermentazione, inclusa la fermentazione acida mista, siano relativamente diffuse, la respirazione anaerobica rappresenta un metabolismo maggiormente associato agli eucarioti eterotrofi (Catalanotti et al., 2013).

Sia in condizioni aerobiche sia anaerobiche, le alghe, come tutti gli organismi viventi, devono soddisfare le proprie esigenze metaboliche attraverso la continua produzione di energia, principalmente sotto forma di ATP, mantenendo al contempo l'equilibrio redox e ionico cellulare. La fermentazione associata a condizioni di anossia è spesso un fenomeno transitorio; tuttavia, in alcuni casi può protrarsi per periodi molto lunghi, variabili da poche ore fino a mesi o anni, e, in alcuni ceppi batterici, persino per tempi estremamente prolungati. Inoltre, anche organismi che vivono in ambienti ossigenati possono attivare metabolismi anossici qualora siano disponibili elevate quantità di substrati fermentabili. Dal punto di vista energetico, il metabolismo anaerobico presenta una resa nettamente inferiore rispetto a quello ossidativo: la fermentazione produce infatti circa 2–3 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio metabolizzata, contro le oltre 30 molecole generate dalla respirazione aerobica. Di conseguenza, il metabolismo ossidativo rappresenta la via energeticamente più vantaggiosa e, pertanto, quella generalmente privilegiata dagli organismi in presenza di ossigeno. Durante i processi anossici vengono prodotti principalmente composti quali formiato, etanolo, acetato, idrogeno molecolare (H_2), succinato, lattato e glicerolo. I processi di digestione anaerobica trovano inoltre applicazione in diversi ambiti biotecnologici, tra cui la produzione di biogas (Catalanotti et al., 2013).

Come accennato, le alghe rivestono un ruolo fondamentale per il mantenimento e il benessere degli ecosistemi acquatici. In qualità di produttori primari, contribuiscono al trasferimento di energia lungo la rete trofica e partecipano attivamente ai cicli biogeochimici attraverso l'assorbimento di anidride carbonica atmosferica. Tuttavia, l'aumento delle emissioni antropogeniche di CO₂ sta causando profonde alterazioni ambientali, tra cui il fenomeno dell'acidificazione degli oceani, con importanti conseguenze sulla flora e sulla fauna marina. Attualmente gli oceani assorbono quotidianamente oltre 25 milioni di tonnellate di CO₂ di origine antropica, determinando cambiamenti senza precedenti nella chimica marina. Il pH medio superficiale oceanico è già diminuito di circa 0,1 unità rispetto al valore preindustriale di 8,2 e si prevede che possa raggiungere valori medi prossimi a 7,8 entro la fine del secolo. L'incremento della CO₂ disciolta non comporta solamente una riduzione del pH, ma altera anche l'equilibrio del sistema carbonatico marino, diminuendo la saturazione del carbonato di calcio e aumentando la concentrazione di ioni bicarbonato (HCO₃⁻). Tali modificazioni possono influenzare significativamente i processi di fissazione del carbonio da parte degli organismi fotoautotrofi, determinando potenziali alterazioni ecologiche su larga scala (Porzio et al., 2011).

Molte specie di microalghe e macroalghe possiedono sistemi di concentrazione del carbonio (*Carbon Concentrating Mechanisms*, CCM), che consentono di aumentare la disponibilità di CO₂ in prossimità dell'enzima RuBisCO, ottimizzando così il processo fotosintetico. In condizioni di elevata concentrazione di CO₂, alcune specie possono ridurre il dispendio energetico associato ai CCM e mostrare un temporaneo incremento dell'efficienza fotosintetica e della crescita. Tuttavia, variazioni persistenti del pH possono alterare numerosi processi fisiologici cellulari, tra cui il trasporto ionico, l'attività enzimatica, l'omeostasi intracellulare e la permeabilità di membrana. Inoltre, l'acidificazione può favorire la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), inducendo condizioni di stress ossidativo e danni cellulari che compromettono crescita, riproduzione e capacità di adattamento delle alghe. Gli effetti risultano fortemente specie-specifici e dipendono sia dalla capacità di acclimatazione fisiologica sia dalle caratteristiche ecologiche delle diverse specie algali (Koch et al., 2013; Kroeker et al., 2010; Cornwall et al., 2017).

1.2 COLTIVAZIONE DELLE ALGHE

Le alghe possono essere coltivate per la produzione di biomassa destinata a numerosi impieghi applicativi. L'utilizzo delle alghe a scopo alimentare ha origini molto antiche: in Cina e Giappone, ad esempio, alcune specie di alghe e cianobatteri commestibili, tra cui *Nostoc*, venivano già consumate oltre 2500 anni fa (Harwood e Guschina, 2009).

Negli ultimi cinquant'anni si è osservato un crescente interesse verso lo sfruttamento commerciale delle biomasse algali. Alcune applicazioni risultano ormai consolidate, come la produzione di integratori alimentari, mentre altre sono ancora in fase di sviluppo, tra cui la produzione di biogas e di biocarburanti. Tali innovazioni rappresentano un potenziale strumento per affrontare le attuali sfide ambientali ed energetiche legate ai cambiamenti climatici (Harwood e Guschina, 2009).

L'utilizzo commerciale delle microalghe ebbe inizio negli anni Settanta con l'estrazione del β -carotene e, più in generale, con lo sfruttamento dei lipidi da esse prodotti (Harwood e Guschina, 2009). Successivamente, il settore ha conosciuto una significativa espansione, favorendo la commercializzazione di integratori alimentari a base di *Arthrospira spp.* e *Chlorella spp.* e di prodotti farmaceutici e nutraceutici contenenti proteine, carotenoidi (come il β -carotene), clorofilla, enzimi, esteri, acidi grassi polinsaturi omega-3 e vitamine (A, B, C, D, E, K e B12). Tali composti sono associati a numerose proprietà biologiche, tra cui attività antipertensive, antiossidanti, antinfiammatorie, antibiotiche e antimicotiche (Herrero et al., 2006).

Le alghe rappresentano inoltre una fonte di pigmenti naturali e coloranti che possono essere impiegati in diversi settori industriali quali quello alimentare, tessile, cosmetico, ecc. offrendo un'alternativa ai coloranti sintetici e contribuendo alla riduzione dell'impatto ambientale. Tuttavia, l'impiego dei coloranti naturali è ancora limitato dalla ridotta disponibilità delle biomasse e dalla limitata varietà di tonalità cromatiche ottenibili. Tra i pigmenti maggiormente utilizzati si annoverano la clorofilla nelle alghe verdi, la fucoxantina e altri carotenoidi nelle alghe brune, nonché il β -carotene e la zeaxantina nelle alghe rosse.

Come accennato in precedenza, dalle alghe è possibile ottenere integratori alimentari, tra cui quelli derivanti dai lipidi, come i PUFA (acidi grassi polinsaturi). Tra questi, il DHA (acido docosaesaenoico) è attualmente l'unico disponibile in commercio su larga scala sotto forma di oli algali. L'interesse per il DHA è aumentato negli ultimi anni in seguito al riconoscimento del ruolo fondamentale degli ω -3 PUFA nel mantenimento di un buono stato di salute, in particolare nella riduzione del rischio di patologie cardiovascolari, alcune forme tumorali, artrite e disturbi neurodegenerativi come la demenza.

Per questo motivo, gli oli ricchi di questi lipidi sono considerati “essenziali” per la dieta umana. Negli esseri umani, il DHA è altamente concentrato nel cervello e nella retina, e la sua carenza è stata associata a un ridotto sviluppo e a un’alterata funzionalità cerebrale e visiva, oltre che a una maggiore predisposizione a patologie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer. Sebbene gli oli algali ricchi di DHA risultino nutrizionalmente equivalenti agli oli di pesce, la loro produzione presenta ancora costi elevati rispetto alle fonti tradizionali di origine ittica (Harwood e Guschina, 2009).

Un ulteriore impiego delle alghe in ambito alimentare riguarda la produzione di mangimi destinati all’acquacoltura, grazie al loro completo profilo aminoacidico, vitaminico e minerale, nonché alla presenza di acidi grassi essenziali all’interno delle cellule. Le microalghe vengono utilizzate in diversi stadi di sviluppo di molluschi, negli stadi larvali di crostacei e di alcune specie ittiche, oltre che per l’alimentazione dello zooplankton. In particolare, tra i gruppi più impiegati si annoverano le diatomee, le Prymnesiophyceae, i criptomonadi e le Eustigmatophyceae. Il successo del loro impiego come alimento è attribuibile all’elevata qualità dei micro- e macronutrienti e alla buona capacità di adattamento a diverse condizioni ambientali, tra cui temperatura, salinità e intensità luminosa, soprattutto quando coltivate in vasche all’aperto (Brown et al., 1997).

Oltre agli impieghi nutrizionali, le alghe trovano applicazione anche in ambito biotecnologico e industriale, ad esempio come fonti di marcatori fluorescenti utilizzati per la localizzazione, quantificazione e identificazione di molecole di superficie in analisi specifiche. Alcuni composti algali presentano inoltre proprietà anticoagulanti.

Ulteriori applicazioni includono l’utilizzo nella produzione di alimenti come gelati, e in diversi settori industriali quali la produzione di ceramiche, detergenti e dentifrici (Busi et al., 2014).

In ambito agricolo, le alghe trovano applicazione come biostimolanti vegetali. Tali prodotti suscitano crescente interesse poiché possono migliorare le prestazioni delle colture, aumentarne la resistenza agli stress ambientali, favorire lo sviluppo del raccolto e incrementare l’efficienza nell’utilizzo dei nutrienti. In generale, i biostimolanti vegetali comprendono diverse sostanze organiche e inorganiche, come acidi umici e idrolizzati proteici, oltre a microrganismi procarioti (ad esempio batteri promotori della crescita delle piante) ed eucarioti, quali micorrize e macroalghe marine. Le macroalghe utilizzate in questo contesto includono principalmente alghe brune, verdi e rosse. È importante precisare che i cianobatteri non sono eucarioti, ma organismi procarioti fotosintetici.

I biostimolanti di origine algale sono ottenuti soprattutto da macroalghe raccolte in ambiente marino e da esse si estraggono polisaccaridi, composti fenolici, acidi grassi, vitamine, osmoliti e fitormoni, oltre a molecole ormono-simili coinvolte nei meccanismi di risposta delle piante agli stress abiotici. Attualmente, le macroalghe brune sono il gruppo maggiormente utilizzato in agricoltura, con numerosi prodotti già disponibili sul mercato. Gli effetti benefici degli estratti di alghe marine, attribuiti a molteplici meccanismi d'azione, includono il miglioramento dell'attecchimento delle piantine, della fioritura e dell'allegagione, oltre a un aumento della tolleranza a diversi stress abiotici. Tuttavia, la diffusione dell'inquinamento delle acque limita in alcune aree geografiche la disponibilità di biomassa algale utilizzabile per la produzione di biostimolanti. In questo contesto, le microalghe rappresentano una valida alternativa, in quanto comprendono un ampio gruppo di organismi fototrofi unicellulari, evolutivamente diversificati e in grado di produrre numerosi metaboliti di interesse biotecnologico (Chiaiese et al., 2018).

La fitorimediazione (*phycoremediation*) è definita come l'impiego delle alghe per il trattamento di rifiuti e matrici ambientali contaminate da eccessi di nutrienti (azoto e fosforo), metalli pesanti e xenobiotici (Ruiz-Marín et al., 2010), nonché per la depurazione di acque reflue civili, industriali e agrozootecniche. L'idea di utilizzare le alghe per il trattamento delle acque reflue risale alla metà degli anni Quaranta. Il biorisanamento algale si basa sull'impiego di questi organismi per la depurazione delle acque e rappresenta un approccio sostenibile, poiché composti come azoto, fosforo, zolfo e diversi minerali vengono considerati "nutrienti" utili alla crescita algale piuttosto che contaminanti. La fitorimediazione consente la rimozione di fosfati, nitrati, metalli pesanti (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg e Zn), pesticidi, idrocarburi e, in alcuni casi, la riduzione della domanda biochimica di ossigeno (BOD).

Inoltre, la crescita algale può contribuire a limitare la proliferazione batterica, modificando le condizioni ecologiche del sistema. Nel complesso, i trattamenti biologici risultano spesso più efficaci rispetto a quelli chimici, in quanto economicamente più sostenibili e meno impattanti dal punto di vista ambientale. Le alghe, quindi, rappresentano una potenziale soluzione a diversi problemi ambientali (Harun et al., 2010). La biomassa algale prodotta durante i processi di trattamento delle acque reflue può essere successivamente valorizzata per la produzione di biocarburanti, fertilizzanti, biostimolanti per le piante, ma, naturalmente, non può essere destinata ad usi umani o animali per il suo potenziale contenuto di inquinanti e per la sua contaminazione biologica, in relazione alle caratteristiche del substrato su cui si è sviluppata, anche se, attualmente, nessuna norma lo vieta. Tra i generi più comunemente impiegati nella fitorimediazione delle acque reflue si annoverano *Chlorella* e *Scenedesmus* (Kaloudas et al., 2021).

Esistono ulteriori possibili applicazioni delle alghe che sono ancora in fase di sviluppo. Negli ultimi anni, l'interesse verso le alghe fotosintetiche come possibile risorsa per la produzione di biocarburanti è aumentato significativamente. Alcune specie algali presentano infatti tassi di produzione di biomassa superiori rispetto a quelli delle piante terrestri. Inoltre, molte microalghe eucariotiche sono in grado di accumulare quantità rilevanti di composti ad alto contenuto energetico, quali amido e triacilgliceroli (TAG) (Busi et al., 2014), che possono essere impiegati per la produzione di diversi biocarburanti e biogas, tra cui biodiesel, bioetanolo e bioidrogeno (Brennan e Owende, 2010). L'obiettivo principale di queste applicazioni è la riduzione dell'impatto ambientale legato all'utilizzo dei combustibili fossili, contribuendo così alla mitigazione dei cambiamenti climatici e dei relativi effetti negativi (Busi et al., 2014). I biocarburanti possono essere classificati in prima, seconda e terza generazione. I biocarburanti di prima generazione sono ottenuti da materie prime commestibili, quali mais, soia, canna da zucchero e colza. L'utilizzo di queste risorse a fini energetici ha contribuito, in diversi contesti, all'aumento dei prezzi dei prodotti alimentari. I biocarburanti di seconda generazione, derivati da rifiuti e da materie prime lignocellulosiche dedicate, presentano diversi vantaggi rispetto a quelli di prima generazione, tra cui una maggiore resa e una minore richiesta di suolo, sia in termini qualitativi sia quantitativi. Il principale limite di questa tipologia è la forte resistenza della lignocellulosa alla degradazione, che rende ancora poco conveniente la produzione su larga scala dal punto di vista economico. I biocarburanti di terza generazione sono rappresentati da micro e macroalghe, le quali offrono ulteriori vantaggi rispetto alle categorie precedenti, tra cui elevate rese produttive senza la necessità di utilizzare terreni coltivabili. In particolare, le macroalghe possono raggiungere un potenziale produttivo da 2 a 20 volte superiore rispetto alle colture energetiche terrestri convenzionali, con la capacità di raddoppiare la propria biomassa nell'arco di 24 ore (Montingelli et al., 2015).

Le alghe producono lipidi peculiari, non presenti in altri gruppi di organismi, in particolare acidi grassi polinsaturi ω -3. L'interesse principale è rivolto alla produzione di biodiesel, sebbene il costo attuale di produzione dei biocarburanti algali non sia ancora competitivo rispetto ai combustibili fossili (Harwood e Guschina, 2009).

Oltre ai lipidi, per la produzione di biocarburanti può essere sfruttato anche l'amido contenuto nelle alghe. L'amido svolge un ruolo centrale nel metabolismo cellulare, rappresentando una delle principali riserve di energia chimica. Questo polisaccaride si accumula nei plastidi delle alghe verdi e delle piante terrestri. Nell'ultimo decennio si è registrato un crescente interesse industriale per l'amido, impiegato nella produzione di alimenti, farmaci e bioetanolo. I carboidrati algali possono essere convertiti in diversi biocarburanti, tra cui etanolo, butanolo, idrogeno, lipidi e metano.

Tra i gruppi algali di maggiore interesse figurano Chlorophyta e Rhodophyta per la produzione di bioetanolo tramite fermentazione al buio dell'amido (Busi et al., 2014). Sebbene l'impiego di alghe ricche di amido per la produzione di bioetanolo sia già consolidato, un ulteriore possibile utilizzo riguarda la produzione di idrogeno. La limitazione dello zolfo rappresenta una delle strategie per favorire la produzione di idrogeno in condizioni anaerobiche. Le microalghe unicellulari risultano particolarmente promettenti rispetto alle piante terrestri, in quanto più efficienti nella conversione dell'energia solare in energia chimica e con minori esigenze idriche. Molte specie algali marine sono inoltre in grado di crescere in condizioni ambientali estreme e non accumulano biomassa lignocellulosica recalcitrante. Infine, negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche di ingegneria genetica e biotecnologica sempre più applicate all'ottimizzazione della produzione di biocarburanti nei sistemi algali (Busi et al., 2014). Tuttavia, ad oggi, i processi necessari per convertire la biomassa algale in biocarburanti sono ancora troppo costosi e non risultano quindi sostenibili.

Per quanto riguarda il biogas, in particolare il metano, esso presenta vantaggi significativi rispetto ad altre forme di bioenergia, risultando efficiente dal punto di vista energetico e più sostenibile per l'ambiente, poiché consente una riduzione significativa delle emissioni di gas serra rispetto ai combustibili fossili grazie all'impiego di risorse locali. Per la produzione di biomassa algale destinata alla conversione in biogas è possibile utilizzare il digestato come fonte di nutrienti in sostituzione dei fertilizzanti convenzionali. Le microalghe presentano generalmente un elevato contenuto lipidico, compreso tra il 3% e il 20% del peso secco, con picchi fino al 90% in condizioni di crescita specifiche. Per questo motivo, le microalghe possono essere considerate una materia prima promettente per la digestione anaerobica.

L'accumulo di carboidrati è generalmente correlato ai periodi di massima crescita (fase esponenziale), all'aumento dell'attività fotosintetica e alla riduzione del contenuto proteico. Alcune microalghe possono anche accumulare elevate quantità di carboidrati, fino al 64% del peso secco, con un incremento favorito da elevata intensità luminosa e, in alcuni casi, da temperature elevate, sebbene tali effetti siano specie-specifici.

Un parametro fondamentale per l'efficienza della digestione anaerobica è il rapporto carbonio/azoto (C/N), che influenza direttamente la produzione di biogas. Un rapporto compreso tra 20 e 30 è generalmente considerato ottimale. Quando il rapporto C/N è troppo basso, l'azoto in eccesso viene rilasciato e accumulato sotto forma di ione ammonio (NH_4^+); concentrazioni elevate di ammonio possono aumentare il pH del digestore e generare effetti tossici sul processo.

Nella biomassa algale il rapporto C/N è tipicamente intorno a 10:1, valore considerato subottimale per la digestione anaerobica. Per evitare l'accumulo di ammoniaca, è quindi necessaria l'aggiunta di substrati ricchi di carbonio per bilanciare il processo e migliorarne le prestazioni.

La produzione di biogas da biomassa algale deve comunque affrontare alcune criticità legate alle caratteristiche della materia prima. Le alghe presentano infatti un elevato contenuto d'acqua rispetto alle colture energetiche terrestri (78-90%) e una notevole variabilità nella composizione nutrizionale, influenzata da fattori ambientali. Tali variazioni stagionali e ecologiche possono stimolare o inibire la biosintesi dei metaboliti, limitando l'impiego stabile della biomassa algale come substrato per la fermentazione (Montingelli et al., 2015). Inoltre, la parete cellulare delle microalghe ha una forte componente cellulosica la cui digestione richiede tempi lunghi e limita in molti casi la conversione della biomassa algale a biometano.

Le microalghe, in quanto microrganismi fotosintetici unicellulari o pluricellulari, sono in grado di fissare efficacemente la CO₂ proveniente da diverse fonti, tra cui l'atmosfera, i gas di scarico industriali e i composti carboniosi presenti nelle acque reflue. La combinazione tra fissazione della CO₂, produzione di biogas e trattamento delle acque reflue rappresenta un approccio potenzialmente promettente nell'ambito delle strategie di mitigazione delle emissioni di anidride carbonica. A causa della crescente preoccupazione per il riscaldamento globale, attribuibile principalmente all'elevata concentrazione di CO₂ in atmosfera, le Nazioni Unite hanno promosso, a partire dal Protocollo di Kyoto (1997), una serie di obiettivi volti alla riduzione delle emissioni di gas serra. In questo contesto, sono state sviluppate diverse strategie di mitigazione della CO₂, generalmente suddivisibili in due categorie principali: (1) approcci basati su reazioni chimico-fisiche e (2) strategie di mitigazione biologica. La mitigazione biologica della CO₂ si basa sulla conversione dell'anidride carbonica in biomassa attraverso il processo di fotosintesi, effettuato da piante e microrganismi fotosintetici. Tuttavia, il contributo delle piante terrestri alla riduzione delle emissioni di CO₂ da combustibili fossili è stimato essere limitato (circa il 3–6%), principalmente a causa dei loro ridotti tassi di crescita. Le alghe, al contrario, mostrano una maggiore efficienza nella fissazione della CO₂, con una capacità di conversione dell'energia solare fino a 10–50 volte superiore rispetto alle piante terrestri. Tra gli organismi maggiormente utilizzati per la biofissazione rientrano le microalghe eucariotiche, in particolare le alghe verdi (Chlorophyta) e le diatomee (Bacillariophyta).

La biomitigazione della CO₂ comporta un aumento della produzione di biomassa, che può essere successivamente convertita in biocarburanti per la produzione energetica e integrata con processi di trattamento delle acque reflue, contribuendo così a sistemi produttivi più sostenibili (Wang et al., 2008).

Inoltre, esiste la possibilità potenziale di coltivare macroalghe in impianti di energia rinnovabile offshore, come i parchi eolici. La condivisione delle infrastrutture con impianti offshore può risultare vantaggiosa dal punto di vista della pianificazione, della progettazione e della gestione operativa. Tuttavia, possono emergere conflitti e incompatibilità a livello funzionale e gestionale tra le diverse attività (Montingelli et al., 2015).

Le microalghe richiedono una quantità di acqua inferiore rispetto alle piante terrestri e non necessitano di acque di elevata qualità; di conseguenza, possono svilupparsi anche in acque reflue (Molina-Grima et al., 2022). Inoltre, non dipendono da suoli fertili per la crescita e possono quindi essere coltivate anche su terreni non idonei all'agricoltura. Rispetto alle piante superiori, presentano rese energetiche più elevate, poiché ogni cellula è fotosinteticamente attiva, mentre nelle piante terrestri solo alcuni tessuti sono deputati alla fotosintesi. Infine, l'utilizzo della CO₂ come principale substrato di crescita contribuisce alla riduzione delle emissioni di gas serra (Mata et al., 2010). Di conseguenza, la biomassa algale può essere coltivata oppure recuperata da corpi idrici naturali eutrofizzati e degradati (Montingelli et al., 2015).

La crescita delle colture in modalità batch, ovvero in bioreattori chiusi, si articola generalmente in diverse fasi:

1. Fase di acclimatazione (fase lag): in questa fase non si osserva un incremento significativo della biomassa algale. Le cellule si adattano alle nuove condizioni ambientali e attivano i processi metabolici necessari alla crescita.
2. Fase esponenziale (fase log): la coltura cresce in modo esponenziale con un tempo di generazione costante e un'elevata attività metabolica.
3. Fase stazionaria: la crescita cellulare si arresta a causa dell'equilibrio tra divisione cellulare e mortalità, generalmente dovuto alla riduzione dei nutrienti disponibili e all'accumulo di metaboliti.
4. Fase di declino (fase di morte): si verifica una progressiva diminuzione della biomassa per esaurimento dei nutrienti e/o per condizioni ambientali non più favorevoli (Forget et al., 2010)

I fattori che influenzano la crescita algale presentano un proprio valore ottimale (*optimum*), specifico per ciascuna specie, e possono agire sia come fattori promotori sia come fattori limitanti (Odum e Barrett, 2005). Tali variabili non agiscono in modo indipendente, ma interagiscono tra loro determinando un equilibrio dinamico che condiziona la crescita delle colture. L'intensità luminosa rappresenta uno dei parametri principali, in quanto le alghe sono organismi prevalentemente fotoautotrofi. All'aumentare dell'irradianza luminosa si osserva generalmente un incremento della crescita algale; tuttavia, oltre il punto di saturazione luminosa possono verificarsi fenomeni di fotoinibizione e fotoossidazione, con conseguente riduzione della crescita o, nei casi più estremi, morte cellulare. Anche la concentrazione di CO₂ influisce in modo significativo sui tassi di crescita, aumentando la produttività fino al raggiungimento di livelli ottimali, oltre i quali può esercitare effetti inibitori. Esiste inoltre una stretta interazione tra concentrazione di CO₂ e intensità luminosa: in particolare, elevate concentrazioni di CO₂ favoriscono una migliore crescita soprattutto a basse intensità luminose. La rapida diminuzione della CO₂ disciolta può determinare la formazione di strati limite diffusionali e un conseguente aumento del pH fino a valori fortemente alcalini (pH 10–12). In tali condizioni l'equilibrio del carbonio inorganico si sposta verso bicarbonati e carbonati, che possono comunque essere utilizzati come fonti alternative di carbonio dalle alghe. Altri fattori che influenzano significativamente la crescita algale includono temperatura, pH, disponibilità di macronutrienti e stress di taglio. La temperatura ottimale varia in funzione della specie e delle interazioni con altri parametri, come l'intensità luminosa; tuttavia, per molte specie algali un intervallo ottimale di crescita si colloca intorno ai 25 °C. Come descritto, la CO₂ disciolta e la presenza di sistemi tampone (ioni alcalini e fosfati) influenzano direttamente il pH, che a sua volta determina la distribuzione delle forme di carbonio inorganico. Poiché la CO₂ disciolta rappresenta la forma più facilmente assimilabile di carbonio per le alghe, condizioni prossime alla neutralità del pH risultano generalmente più favorevoli alla crescita, in quanto massimizzano la disponibilità di CO₂ senza determinare condizioni acide o basiche dannose. L'aumento delle concentrazioni di macronutrienti, in particolare azoto e fosforo, favorisce la crescita della biomassa algale e lo sviluppo dei biofilm; tuttavia, concentrazioni eccessive possono portare a fenomeni di eutrofizzazione e risultare inibitorie per la crescita. Infine, ulteriori fattori di rilievo includono salinità, disponibilità di ossigeno, caratteristiche del substrato di crescita e fattori biologici, quali la presenza di virus, batteri, altre specie algali o predatori (Schnurr e Allen, 2015).

Le biomasse microalgali possono essere coltivate sia in ambienti indoor sia outdoor. I sistemi di coltivazione più comunemente impiegati sono i sistemi *batch*, nei quali non vi è né ingresso né uscita di materiale: la coltura viene quindi mantenuta fino all'esaurimento dei nutrienti disponibili. In alternativa, si utilizzano sistemi in continuo, nei quali le colture sono mantenute in una condizione prossima alla fase stazionaria mediante un apporto costante di substrato e la rimozione continua di una quantità equivalente di sospensione algale. La coltivazione delle microalghe può essere realizzata in differenti configurazioni impiantistiche e condizioni ambientali, che influenzano in modo significativo la produttività, la stabilità della coltura e la composizione biochimica della biomassa. (Mata et al., 2010).

I sistemi indoor si basano su condizioni altamente controllate dei parametri chimico-fisici, come luce, temperatura, aerazione e disponibilità di nutrienti. Generalmente in fotobioreattori chiusi o ambienti climatizzati. Questo approccio consente di ottenere un'elevata riproducibilità dei risultati sperimentali, assieme ad una riduzione del rischio di contaminazione da parte di batteri, funghi e zooplancton. Tuttavia, i sistemi indoor presentano anche alcune limitazioni, principalmente legate ai costi energetici elevati, alla complessità impiantistica e alla difficoltà di scalabilità industriale. Per questo motivo, essi sono frequentemente utilizzati in fase di ricerca o per la produzione di metaboliti ad alto valore aggiunto, piuttosto che per produzione su larga scala (Mata et al., 2010; Apel e Weuster-Botz, 2015).

I sistemi outdoor comprendono principalmente vasche aperte (*open ponds*) e fotobioreattori esposti all'ambiente esterno. In questo caso, la crescita delle microalghe dipende direttamente dalle condizioni climatiche e ambientali locali, come intensità luminosa, temperatura e stagionalità. I sistemi outdoor rappresentano la soluzione più economicamente sostenibile per la produzione su larga scala, ma presentano limitazioni importanti come un rischio maggiore di contaminazione, controllo limitato di pH e nutrienti insieme ad una produttività meno stabile. Nonostante ciò, il vantaggio principale è la riduzione significativa dei costi di produzione, grazie all'utilizzo diretto della luce solare e di ambienti non controllati artificialmente. Inoltre, gli impianti outdoor sono particolarmente adatti per applicazioni ambientali come il trattamento delle acque reflue e la cattura di CO₂ (Chisti, 2007; Mata et al., 2010).

Il sistema batch è una delle modalità operative più utilizzate nella coltivazione delle microalghe, sia indoor che outdoor. In questo sistema, la coltura viene inoculata in un volume definito di mezzo nutritivo e non vi è aggiunta o rimozione continua di substrato durante il ciclo produttivo, fino all'esaurimento dei nutrienti o al raggiungimento della fase stazionaria (Mata et al., 2010).

Tali sistemi hanno le caratteristiche di essere semplici da gestire e implementare, garantiscono una flessibilità ambientale, possiedono ridotti requisiti di sterilità rispetto ai sistemi continui e una possiedono l'idoneità per studi su limitazione nutrizionale e cinetiche di crescita. Le limitazioni sono date dalle condizioni di crescita variabili nel tempo, dalla riduzione progressiva dei nutrienti, necessità di frequenti reinoculi e minore produttività media rispetto ai sistemi continui. Nonostante ciò, il batch rimane uno dei sistemi più diffusi sia a livello di laboratorio sia in impianti pilota, grazie alla sua semplicità e alla possibilità di adattarlo facilmente a diverse specie algali (Mata et al., 2010; Sarker e Salam, 2020).

Per la coltivazione su larga scala delle microalghe vengono comunemente utilizzati fotobioreattori (Mata et al., 2010) e vasche aperte (*open ponds*) (Chisti, 2007). I fotobioreattori sono sistemi chiusi, mentre le vasche aperte sono sistemi coltivati in ambienti non completamente confinati, le cui prestazioni dipendono in larga misura dalle condizioni climatiche, geografiche e ambientali locali. Inoltre, questi ultimi risultano più esposti a contaminazioni esterne. Per tale motivo, le vasche aperte sono generalmente meno vantaggiose in termini di controllo del processo, soprattutto per quanto riguarda la gestione delle contaminazioni da parte di predatori o microrganismi competitori. Al contrario, i fotobioreattori consentono un controllo più preciso dei nutrienti e dei principali parametri di coltivazione, quali temperatura, concentrazione di CO₂ disciolta e pH, oltre a ridurre significativamente il rischio di contaminazione, garantendo così una maggiore produttività di biomassa algale. Tuttavia, essi presentano costi di investimento iniziali elevati e richiedono una progettazione specifica in funzione della fisiologia del ceppo algale coltivato (Harun et al., 2010).

Nelle vasche aperte le colture algali sono mantenute in sospensione in sistemi poco profondi, nei quali la miscelazione e la circolazione del substrato di crescita sono generalmente garantite da una ruota a pale. Nei fotobioreattori, invece, la luce deve attraversare superfici trasparenti per raggiungere le cellule in coltura, rendendo il trasferimento luminoso un parametro critico del sistema. Entrambi i sistemi possono essere ulteriormente ottimizzati integrando il trattamento delle acque reflue come substrato di crescita, grazie all'elevato contenuto di nutrienti. In questo contesto, le microalghe assimilano i nutrienti disciolti e, attraverso la fotosintesi, producono ossigeno che può essere utilizzato dai batteri per l'ossidazione della sostanza organica.

Tuttavia, diversi parametri critici influenzano la crescita algale in acque reflue, tra cui intensità luminosa, temperatura, pH, disponibilità di CO₂, ossigeno disciolto, concentrazione di nutrienti e presenza di zooplancton erbivoro o patogeni, oltre alla composizione chimica del mezzo, che può limitarne ulteriori applicazioni. Tali limitazioni hanno spesso portato all'utilizzo di acque reflue diluite (Montingelli et al., 2015).

Infine, in risposta alle problematiche legate all'inquinamento atmosferico, le vasche aperte si sono dimostrate particolarmente efficaci anche nella cattura della CO₂ atmosferica, grazie all'attività fotosintetica delle microalghe coltivate (Faruk et al., 2020).

Gli *open ponds* possono essere costituiti sia da bacini naturali, quali lagune, laghi e stagni, sia da vasche artificiali. I sistemi a vasca aperta si distinguono generalmente in vasche non agitate e vasche agitate. Le vasche non agitate risultano più economiche e semplici da gestire, ma presentano diverse limitazioni operative, tra cui la predazione delle alghe da parte dello zooplancton, la presenza di popolazioni algali miste e la possibile proliferazione di agenti patogeni, fattori che possono influenzare negativamente la crescita algale. Nonostante tali criticità, questi sistemi sono in grado di garantire una significativa rimozione della domanda chimica di ossigeno (COD), dell'ammoniaca e del fosforo (Kaloudas et al., 2021).

La coltivazione delle microalghe si conclude con la fase di raccolta, durante la quale le cellule vengono separate dalla fase liquida, ossia dal mezzo di crescita. La raccolta rappresenta uno dei principali fattori limitanti nello sviluppo di sistemi produttivi economicamente sostenibili, a causa della sua complessità. Le microalghe, infatti, risultano difficili da separare per via delle loro ridotte dimensioni, della bassa densità specifica e della carica superficiale negativa, in particolare durante la fase di crescita esponenziale (Montingelli et al., 2015).

Tra le principali tecniche di raccolta si annoverano la centrifugazione, la flocculazione, la sedimentazione e la filtrazione. La centrifugazione è una delle metodologie più comunemente utilizzate (Uduman et al., 2010). Essa si basa sull'applicazione di un'accelerazione centripeta che consente la separazione della biomassa algale dal mezzo di coltura in frazioni a diversa densità. Una volta completata la separazione, il surnatante può essere rimosso mediante drenaggio. In alcuni casi è possibile impiegare sistemi di filtrazione in combinazione con la centrifugazione per migliorare l'efficienza di separazione. Tuttavia, le elevate forze di taglio generate durante il processo possono danneggiare le cellule, limitandone l'applicabilità, soprattutto su larga scala. Inoltre, l'elevato consumo energetico rende questo metodo poco vantaggioso dal punto di vista economico per grandi volumi (Harun et al., 2010).

La flocculazione consente l'aggregazione delle cellule algali, facilitandone la successiva sedimentazione (Uduman et al., 2010). Le microalghe presentano generalmente una carica superficiale negativa che ne impedisce l'autoaggregazione in sospensione; tale carica può essere neutralizzata mediante l'aggiunta di flocculanti chimici cationici.

Tra i flocculanti inorganici più utilizzati si annoverano i sali di ferro e alluminio, come $Al_2(SO_4)_3$ (solfato di alluminio), $FeCl_3$ (cloruro ferrico) e $Fe_2(SO_4)_3$ (solfato ferrico). Sono inoltre impiegati flocculanti organici, come i polielettroliti anionici o cationici, che favoriscono il legame fisico tra le cellule. Le caratteristiche principali di questi polimeri, quali carica, peso molecolare e concentrazione, influenzano direttamente l'efficienza del processo. Sebbene la flocculazione chimica sia economicamente vantaggiosa dal punto di vista operativo, l'impiego di agenti chimici può comportare impatti ambientali negativi. Un fenomeno alternativo è l'autoflocculazione, che può verificarsi spontaneamente in seguito all'interruzione dell'apporto di CO_2 e all'aumento del pH, spesso associato alla precipitazione di sali di magnesio, calcio, fosfati e carbonati insieme alle cellule algali (Harun et al., 2010).

La sedimentazione avviene per gravità all'interno di apposite vasche e la sua efficienza dipende dalla densità della biomassa microalgale; può essere ulteriormente migliorata mediante l'aggiunta di flocculanti (Brennan e Owende, 2010).

Infine, la filtrazione rappresenta un'ulteriore tecnica di separazione, realizzata mediante l'impiego di filtri di diversa tipologia. Un'elevata concentrazione di microalghe può causare il rapido intasamento del filtro, mentre concentrazioni troppo basse possono ridurre l'efficienza di cattura. Le principali tecniche includono microfiltrazione, ultrafiltrazione, filtrazione a pressione, filtrazione sottovuoto e filtrazione a flusso tangenziale (TFF). In generale, la filtrazione consiste nel far passare il mezzo di coltura attraverso membrane filtranti sulle quali le cellule algali vengono trattenute, consentendo al liquido di attraversare il filtro. Tra i metodi più efficienti dal punto di vista energetico si annoverano la filtrazione a flusso tangenziale e la filtrazione sotto pressione, mentre le tecniche più semplici possono essere combinate con la centrifugazione per migliorarne l'efficienza complessiva (Harun et al., 2010).

La coltivazione delle microalghe può essere effettuata anche nell'ambito del trattamento delle acque reflue, come già accennato, utilizzando reflui tal quali, effluenti parzialmente trattati oppure la frazione liquida dei digestati come substrati di crescita. L'impiego di reflui rappresenta una fonte nutritiva alternativa e un passo importante verso una produzione microalgale più sostenibile sia dal punto di vista ecologico sia economico. Il digestato è uno dei prodotti della digestione anaerobica di matrici biodegradabili, come scarti agricoli e residui organici.

Tuttavia, esso contiene anche sostanze indesiderate e potenzialmente problematiche, quali solidi sospesi (fibre, particolato e solidi disciolti) e composti colorati, che conferiscono al mezzo una scarsa trasparenza e spesso una colorazione scura.

Di conseguenza, il suo utilizzo come substrato per la crescita algale risulta complesso, poiché la ridotta penetrazione della luce costituisce un fattore limitante significativo. Nonostante ciò, il digestato rappresenta una valida risorsa in quanto ricco di nutrienti essenziali, spesso limitanti per la crescita delle microalghe. La composizione dei reflui è altamente variabile; tuttavia, le microalghe possiedono un'elevata capacità di adattamento, che consente loro di tollerare tali fluttuazioni. Per ottimizzare l'impiego del digestato è generalmente necessaria una fase preliminare di separazione solido-liquido e, se necessario, ulteriori trattamenti. In questo modo si ottiene una frazione più chiara, con minore contenuto di solidi e ridotta assorbanza luminosa, che può essere ulteriormente diluita e utilizzata per la coltivazione delle microalghe. Tale separazione può essere effettuata mediante decantazione o centrifugazione. Il tasso di crescita algale in digestato risulta generalmente inferiore rispetto a quello osservato in terreni di coltura sintetici, a causa dell'elevata torbidità, dell'elevata concentrazione di azoto ammoniacale, dello squilibrio nei rapporti tra nutrienti e della possibile presenza di microrganismi competitori o contaminanti. Tuttavia, l'utilizzo del digestato presenta vantaggi significativi: il costo è pressoché nullo e la crescita delle microalghe consente una parziale depurazione e ossigenazione del mezzo, contribuendo così a una riduzione dei costi energetici ed economici associati ai trattamenti tradizionali (Bauer et al., 2021).

Per il trattamento delle acque reflue si utilizzano frequentemente gli stagni algali ad alto carico (*High Rate Algal Ponds*, HRAP). Si tratta di sistemi a circuito chiuso, generalmente dotati di miscelazione mediante pale, con profondità ridotta (circa 0,3–0,5 m) e superfici che possono estendersi fino a diversi ettari. Gli HRAP sono considerati reattori efficienti per il recupero di acqua, nutrienti ed energia dalle acque reflue organiche. La produttività di questi sistemi è variabile e può essere incrementata mediante l'apporto artificiale di CO₂, che aumenta la disponibilità di carbonio per la crescita algale. Le prestazioni degli HRAP dipendono da molteplici fattori, tra cui variabili climatiche (luce e temperatura), pH, concentrazione di CO₂, profondità dell'acqua, ossigeno disciolto (DO), disponibilità di nutrienti, tempo di ritenzione idraulica (HRT) e fattori biologici come la presenza di parassiti, funghi e zooplancton erbivoro. Tra questi, lo zooplancton rappresenta una delle principali criticità nella gestione e nell'efficienza del sistema (Montemezzani et al., 2015). La biomassa algale raccolta mediante i sistemi di separazione sopra descritti può essere successivamente impiegata come biostimolante oppure come materia prima per la produzione di biometano, biocarburanti, o bioplastiche.

Tuttavia, le alghe cresciute su substrati di scarto come le acque reflue o i digestati non possono essere valorizzate per usi di maggior pregio quali quelli degli ambiti alimentari, mangimistici, nutraceutici, farmaceutici o cosmetici.

1.3 *Scenedesmus* spp.

Il genere *Scenedesmus* comprende microalghe verdi d'acqua dolce documentate in letteratura fin dagli inizi del XVIII secolo. Si tratta di organismi fotosintetici appartenenti alle Chlorophyceae, caratterizzati da una notevole diversità tassonomica; all'interno di questo genere sono state identificate oltre 200 specie (Kim et al., 2007). Le cellule presentano forma ellissoidale o fusiforme e, in alcune specie, spine o ornamentazioni superficiali che svolgono una funzione difensiva nei confronti del grazing da parte dello zooplankton (Van Donk et al., 2010). La riproduzione avviene prevalentemente per via asessuata attraverso formazione di autospore. Durante questo processo, la cellula madre genera internamente un numero definito di cellule figlie che vengono successivamente rilasciate in seguito alla lisi della parete cellulare materna. Tale modalità riproduttiva consente rapidi tassi di crescita e un'elevata capacità di colonizzazione degli ambienti acquatici (Trainor, 1996). La parete cellulare di *Scenedesmus* risulta particolarmente complessa e resistente. Essa è costituita da una struttura multilamellare comprendente uno strato interno ricco in cellulosa e uno strato esterno contenente biopolimeri. La presenza di tali componenti conferisce elevata rigidità meccanica e resistenza chimica alle cellule algali. Inoltre, la composizione della parete cellulare può variare in funzione delle condizioni di crescita e dello stadio fisiologico della coltura (Halim et al., 2024). Dal punto di vista metabolico, *Scenedesmus* possiede un metabolismo principalmente fotoautotrofo, basato sulla fotosintesi ossigenica; tuttavia, numerose specie sono in grado di crescere anche in condizioni mixotrofiche o eterotrofiche utilizzando composti organici presenti nel mezzo di coltura, come glucosio e altri substrati carboniosi. In condizioni mixotrofiche, la contemporanea utilizzazione di carbonio organico e inorganico può incrementare significativamente la produttività di biomassa rispetto alla crescita strettamente autotrofa (Msanne et al., 2020)

Scenedesmus spp. è un ceppo ubiquitario e rappresenta uno dei generi dominanti negli ecosistemi lacustri e fluviali di acqua dolce (Hegewald, 1997). Questo per via di una notevole tolleranza ambientale, essendo in grado di adattarsi a differenti condizioni di temperatura, intensità luminosa, concentrazione di nutrienti e livelli di CO₂. Tale plasticità fisiologica rappresenta una delle principali ragioni dell'interesse biotecnologico verso questo genere, soprattutto per applicazioni in sistemi outdoor e nel trattamento di acque reflue industriali (Msanne et al., 2020).

Scenedesmus spp. riveste un ruolo di interesse nell'ambito della ricerca biotecnologica grazie al suo potenziale impiego come biorisorsa in numerose applicazioni, tra cui mangimi per acquacoltura, alimenti e integratori per uso umano, prodotti farmaceutici e processi di biorisanamento delle acque contaminate. Questo genere presenta infatti una notevole capacità adattativa, risultando in grado di crescere in differenti terreni di coltura.

I processi di crescita sono influenzati da variazioni biochimiche e fisiologiche delle cellule algali, determinate sia dalla composizione dei nutrienti sia dalle condizioni fisiche di coltura e dalle tecnologie di trasformazione genetica adottate (Kim et al., 2007).

Tra i possibili substrati di coltura rientrano anche le acque reflue, ricche di composti organici e nutrienti inorganici, quali azoto e fosfato, responsabili dei fenomeni di eutrofizzazione dei corpi idrici. Le microalghe, inclusa *Scenedesmus* spp., sono state pertanto studiate come agenti di biorisanamento per la rimozione di nutrienti inorganici dalle acque contaminate, con l'obiettivo di migliorarne la qualità ambientale nel breve termine (Kim et al., 2007).

1.4 CONTAMINAZIONI DELLE COLTURE MICROALGALI

Come accennato nel paragrafo precedente, nelle colture algali, in particolare nei sistemi HRAP (*High Rate Algal Ponds*), le prestazioni della coltura dipendono da numerosi fattori ambientali, fisico-chimici e biologici. Tra i principali fattori ambientali rientrano l'intensità luminosa e la temperatura, mentre le condizioni della coltura comprendono parametri quali pH, concentrazione di CO₂, e disponibilità di nutrienti. Anche i parametri fisici, come la profondità della coltura, il tempo di residenza idraulico ($HRT = Hydraulic\ Retention\ Time$), influenzano significativamente la produttività algale (Montemezzani et al., 2015).

Un ulteriore fattore critico è rappresentato dalle contaminazioni biologiche, costituite da organismi esterni caratterizzati spesso da elevata capacità riproduttiva. Tali contaminanti possono compromettere la crescita delle microalghe attraverso fenomeni di predazione o competizione, causando consistenti perdite economiche. È stato infatti stimato che milioni di litri di colture vengano persi annualmente a causa di contaminazioni biologiche (Tillmann, 2004).

Il controllo di questi organismi risulta particolarmente complesso. Ad esempio, il mantenimento di valori di pH prossimi alla neutralità mediante l'aggiunta di CO₂ favorisce sia la rimozione dei nutrienti in eccesso sia la produzione di biomassa microalgale, ma allo stesso tempo può promuovere la sopravvivenza e la proliferazione di organismi contaminanti (Montemezzani et al., 2015).

Inoltre, il numero e la tipologia delle contaminazioni dipendono fortemente da fattori ambientali e stagionali, dalla qualità dell'acqua, dallo stato trofico del sistema, dal pH e dalle dinamiche di predazione. In molti casi, le contaminazioni non determinano un danno diretto alla biomassa algale, ma interferiscono con la crescita delle microalghe sottraendo nutrienti e riducendo la disponibilità di radiazione luminosa necessaria ai processi fotosintetici (Smith et al., 2014).

Oltre alle contaminazioni biologiche, ulteriori fonti di interferenza possono derivare dall'ambiente esterno, inclusi particolato atmosferico, polveri, foglie, materiale organico trasportato dal vento e insetti, particolarmente frequenti nei sistemi di coltivazione outdoor (Mendes & Vermelho, 2013).

Le principali contaminazioni biologiche nei sistemi di coltivazione algale sono rappresentate dai predatori, e principalmente da organismi zooplanctonici quali rotiferi e piccoli crostacei (Molina-Grima et al., 2022). In ambienti naturali, quali laghi, fiumi e zone umide, così come nei sistemi artificiali, lo zooplancton può disperdersi attraverso la corrente o mediante dispersione passiva e attiva degli organismi. Il movimento avviene sia tramite locomozione autonoma sia attraverso il trasporto idrodinamico. Nei bioreattori e nei sistemi di coltivazione algale, tali organismi riescono a sopravvivere grazie all'elevata disponibilità di nutrienti e alla ridotta presenza dei loro predatori naturali, come i pesci. In queste condizioni possono raggiungere densità elevate e contribuire in modo significativo alla riduzione della biomassa microalgale.

All'interno dei sistemi HRAP, la stabilizzazione delle comunità zooplanctoniche è fortemente influenzata dal rapporto tra la velocità di crescita e l'HRT (*Hydraulic Retention Time*). In generale, tendono a persistere le specie caratterizzate da tempi di generazione inferiori all'HRT del sistema (Montemezzani et al., 2015).

I rotiferi sono organismi zooplanctonici di piccole dimensioni (generalmente inferiori a 200 μm) caratterizzati da un'elevata plasticità riproduttiva. In condizioni ambientali favorevoli si riproducono prevalentemente per via asessuata, mentre in condizioni di stress possono attivare la riproduzione sessuale, producendo uova in grado di entrare in criptobiosi. Questa forma di resistenza consente la sopravvivenza dell'organismo in attesa di condizioni più favorevoli, quali elevata disponibilità di nutrienti, pH neutro e temperature ottimali. Il ciclo vitale dei rotiferi è fortemente influenzato dalla temperatura dell'acqua e può variare indicativamente tra 30 e 40 giorni (Montemezzani et al., 2015). Nonostante le ridotte dimensioni, essi sono predatori efficaci di microalghe.

Inoltre, possono nutrirsi anche di batteri e particolato organico di piccole dimensioni, grazie a strutture specializzate come il mastax e l'apparato ciliato, che facilitano l'ingestione di materiale particolato (Smith & Crews, 2014).

I rotiferi sono tra gli organismi zooplanctonici più abbondanti sia negli ecosistemi naturali sia nei sistemi artificiali di coltivazione. Tra i generi più frequentemente osservati si annoverano *Brachionus*, *Keratella* e *Filinia*, oltre ai Bdelloidei, anch'essi ampiamente distribuiti in ambienti acquatici (Montemezzani et al., 2015).

Tra i piccoli crostacei zooplanctonici si annoverano cladoceri, copepodi e ostracodi, organismi ampiamente distribuiti sia in ambienti dulciacquicoli sia marini. Essi si alimentano principalmente di microalghe, batteri, protozoi e rotiferi, svolgendo un ruolo chiave nelle dinamiche trofiche delle comunità planctoniche. I cladoceri presentano dimensioni generalmente comprese tra 0,2 e 0,5 mm e, rispetto ai rotiferi, sono in grado di predare microalghe di dimensioni maggiori. Tra i generi più rappresentativi si annoverano *Daphnia* e *Moina*. La loro sopravvivenza è strettamente legata a condizioni ipereutrofiche e alla temperatura dell'acqua. In particolare, *Moina* spp. risulta spesso dominante in ambienti variabili grazie alla capacità di tollerare ampie fluttuazioni di ossigeno disciolto, favorita dalla presenza di emoglobina intracellulare. La riproduzione dei cladoceri è analoga a quella dei rotiferi, con cicli asessuati prevalenti in condizioni favorevoli e strategie sessuate in condizioni di stress. Insieme ai rotiferi, essi costituiscono un fattore di rischio nei sistemi di coltivazione algale, poiché caratterizzati da elevati tassi di crescita e capacità di ridurre significativamente la biomassa microalgale, talvolta esaurendola nell'arco di circa una settimana (Montemezzani et al., 2015).

Gli ostracodi, con dimensioni tipiche di 0,3–0,5 mm, sono crostacei protetti da un carapace calcareo bivalve. Essi mostrano un'elevata tolleranza ambientale, essendo in grado di sopravvivere sia in condizioni oligotrofiche sia in ambienti fortemente inquinati, caratterizzati da bassi livelli di ossigeno e alta concentrazione di sedimenti e materia organica. Sono organismi onnivori e si nutrono di microalghe, batteri, protozoi e materiale organico detritico di origine vegetale e animale. Il loro ciclo riproduttivo è generalmente più lungo rispetto a quello di altri gruppi zooplanctonici (fino a circa tre mesi), motivo per cui risultano meno abbondanti nei sistemi di coltivazione. La loro riproduzione è prevalentemente asessuata, ma in condizioni avverse possono produrre forme di resistenza o proteggersi all'interno delle valve (Montemezzani et al., 2015).

Un ulteriore limite alla completa eliminazione dello zooplancton nei sistemi di coltivazione algale è rappresentato dalla produzione di uova in diapausa, una forma di resistenza generata tramite riproduzione sessuata in risposta a condizioni di forte stress ambientale. Tale risposta viene indotta da fattori quali ridotta intensità luminosa, temperature estreme, basso pH e scarsa disponibilità di ossigeno disciolto. Le uova in diapausa possono rimanere quiescenti per periodi prolungati e schiudersi nuovamente quando le condizioni ambientali tornano favorevoli per un intervallo di tempo adeguato; tuttavia, la loro vitalità tende a ridursi progressivamente con il prolungarsi della fase di inattività (Montemezzani et al., 2015).

In alcuni casi, l'eliminazione totale dello zooplancton non rappresenta la strategia più efficace dal punto di vista gestionale. Può infatti risultare preferibile mantenere una bassa densità di organismi zooplanctonici, ad esempio per favorire il controllo selettivo della coltura e contribuire all'ottenimento di condizioni di quasi-monocoltura. In particolare, alcuni piccoli predatori possono esercitare una pressione selettiva su microalghe di dimensioni ridotte, contribuendo a modulare la composizione della comunità algale. Inoltre, lo zooplancton rappresenta una risorsa di potenziale interesse biotecnologico ed economico. Esso può infatti essere impiegato come mangime in acquacoltura, nonché come fonte di chitina, proteine e acidi grassi polinsaturi per applicazioni nell'industria alimentare e cosmetica (Montemezzani et al., 2015).

Ulteriori potenziali predatori nei sistemi di coltivazione algale includono pesci, nematodi, alcuni uccelli acquatici (quali fenicotteri, cigni e folaghe) e insetti appartenenti agli ordini dei ditteri ed emitteri (Molina-Grima et al., 2022; Mendes & Vermelho, 2013). Tuttavia, tali gruppi risultano generalmente poco rilevanti nelle coltivazioni algali controllate, ad eccezione dei nematodi, che possono rappresentare una componente più stabile e influente delle comunità contaminanti. Un ruolo particolarmente significativo è svolto dai protozoi, tra cui ciliati, amebe e flagellati, organismi unicellulari che possono agire sia come predatori sia come parassiti delle microalghe. Molti protozoi sono in grado di formare cisti, strutture di resistenza che consentono la sopravvivenza in condizioni ambientali sfavorevoli. In tali condizioni possono persistere per lunghi periodi e riattivarsi quando l'ambiente torna favorevole, determinando in alcuni casi infezioni rapide e improvvise delle colture (Chambouvet et al., 2011).

I protozoi possono ridurre significativamente la biomassa microalgale, con effetti riportati fino a una diminuzione di 30–40 volte della densità algale (Smith & Crews, 2014). In alcuni contesti, tuttavia, possono essere utilizzati in modo controllato per la riduzione di cianobatteri e per il contenimento delle fioriture algali (blooms), che rappresentano una problematica ambientale rilevante, poiché tali organismi costituiscono spesso le loro prede preferenziali (Brabrand et al., 1983).

Le amebe sono in grado di perforare le pareti cellulari delle microalghe mediante pseudopodi appuntiti, permettendo l'estrazione del contenuto cellulare (Hess et al., 2012). All'interno del supergruppo degli Alveolata, i ciliati sono noti per la capacità di infettare dinoflagellati responsabili di fioriture algali naturali, inducendo mortalità cellulare anche in tempi brevi e in assenza di riproduzione dell'ospite (Gachon et al., 2010). Nonostante ciò, i ciliati non rappresentano generalmente il principale fattore limitante nelle coltivazioni algali, poiché le loro ridotte dimensioni consentono l'ingestione prevalentemente di particelle inferiori rispetto alle microalghe stesse (Montemazzani et al., 2015).

Un ulteriore fattore critico che può compromettere la produttività delle colture di microalghe è rappresentato dalla contaminazione da patogeni, tra cui virus, batteri e funghi (Day, 2013). Tra questi, i batteri costituiscono uno dei gruppi più rilevanti e includono generi quali flavobatteri, bacilli, *Pseudomonas* e mixobatteri, spesso definiti batteri litici del fitoplancton (Wang et al., 2013). Questi microrganismi possono inibire la crescita algale attraverso meccanismi di parassitismo batterico, che includono la lisi cellulare mediata da enzimi extracellulari quali glucosidasi, chitinasi e cellulasi (Afi et al., 1996). Dopo la lisi della cellula algale, i batteri possono utilizzare i composti intracellulari rilasciati come fonte di nutrienti. Un ulteriore meccanismo di interferenza è rappresentato dalla competizione per le risorse disponibili, che comporta una riduzione dei tassi di crescita delle microalghe a vantaggio della componente batterica (Ramanan et al., 2016).

Non tutte le interazioni batterio-alga risultano tuttavia negative. È infatti stato dimostrato che alcuni batteri simbiotici possono favorire la crescita algale e incrementare l'efficienza metabolica del sistema (Amin et al., 2015), risultando particolarmente utili in applicazioni quali il trattamento delle acque reflue. Alcuni batteri possono inoltre fornire metaboliti essenziali, come vitamine, che le microalghe non sono in grado di sintetizzare autonomamente (Croft et al., 2005). Queste interazioni rappresentano un esempio di coevoluzione tra alghe e batteri, basata sullo scambio di vitamine e nutrienti inorganici quali azoto e fosforo (Kim et al., 2014).

Ulteriori benefici possono derivare dal rilascio di fitormoni batterici, in grado di essere percepiti dalle microalghe e di stimolarne la crescita (Teplitski & Rajamani, 2011). Le interazioni simbiotiche più comuni includono mutualismo e commensalismo. Il mutualismo è un'interazione in cui entrambe le specie traggono beneficio reciproco (Cooper & Smith, 2015), come nel caso di batteri che forniscono vitamina B12 alle alghe in cambio di carbonio organico fissato (Croft et al., 2005). Il commensalismo, invece, è una relazione in cui solo uno dei due partner trae vantaggio, come osservato in *Chlamydomonas reinhardtii*, che utilizza vitamina B12 prodotta da batteri eterotrofi senza che questi ultimi traggano un beneficio diretto dal carbonio algale (Kazamia et al., 2012).

È importante sottolineare che il confine tra mutualismo, commensalismo e parassitismo è dinamico e può essere influenzato da fattori ambientali. In particolare, disponibilità di nutrienti, rapporto N:P e intensità luminosa possono determinare transizioni tra diverse forme di interazione, modulando il bilancio tra effetti benefici e dannosi, sebbene i meccanismi alla base di tali transizioni non siano ancora completamente chiariti.

I virus rappresentano un ulteriore gruppo di patogeni ubiquitari negli ambienti acquatici. Essi contengono un singolo tipo di acido nucleico (DNA o RNA) e sono parassiti obbligati con elevata specificità di ospite (Brussaard, 2004). Il loro ciclo replicativo può essere litico o lisogeno. Nel ciclo litico, il virus prende rapidamente il controllo della cellula ospite, inducendo la produzione di nuove particelle virali e determinando la lisi cellulare. Nel ciclo lisogeno, invece, il materiale genetico virale si integra nel genoma dell'ospite, determinando una replicazione più lenta e una possibile alterazione fenotipica senza immediata lisi cellulare. Il periodo di latenza varia generalmente tra 3 e 48 ore (Brussaard, 2004).

I funghi costituiscono un ulteriore gruppo di potenziali contaminanti nei sistemi di coltivazione algale. Essi possono agire come ectoparassiti, penetrando e colonizzando le cellule algali fino a determinarne la morte (Molina-Grima et al., 2022). Tra i principali gruppi fungini coinvolti nelle interazioni con le microalghe si annoverano i Chytridiomycota, comunemente noti come chitridi, funghi zoosporici uniflagellati (Salomon & Imai, 2014). Altri gruppi rilevanti includono oomiceti, labirintulidi, thraustochytridi e fagomixidi (Carney & Lane, 2014).

Si stima che solo una piccola frazione dei funghi conosciuti (circa lo 0,6%) sia di origine marina e che tali organismi siano solo lontanamente imparentati con i funghi tipicamente studiati in ambienti terrestri (Richards et al., 2012). I chitridi producono stadi vitali mobili e dispersivi, le zoospore, e possono comportarsi sia come saprotrofi sia come parassiti. Essi svolgono un ruolo importante nelle reti trofiche acquatiche e nel ciclo del carbonio, con uno spettro di ospiti variabile a seconda della specie (Gleason et al., 2008; Carney & Lane, 2014). Inoltre, la formazione di cisti a parete spessa conferisce loro elevata resistenza a molte tecniche di disinfezione, rendendo la loro eliminazione particolarmente complessa e favorendo la persistenza nelle colture successive (Fott, 1967).

I Labyrinthulidi, appartenenti alla classe *Labyrinthulomycetes* e comunemente noti come “muffe melmose”, comprendono diversi parassiti di alghe e piante marine. Essi sono in grado di causare patologie debilitanti nelle fanerogame marine e di parassitare anche alghe verdi e cianobatteri (Raghukumar, 1987). Gli oomiceti, noti anche come muffe acquatiche, costituiscono un gruppo di organismi parassiti in grado di infettare un ampio spettro di ospiti, tra cui piante terrestri, macroalghe e microalghe marine (Li et al., 2010).

In ambito produttivo, gli oomiceti sono stati associati a perdite significative nella coltivazione di alghe, che in alcuni casi possono raggiungere il 10–60% della produzione annuale (Gachon et al., 2010). Sebbene la loro presenza nei sistemi di coltivazione algale non sia ancora stata ampiamente documentata, è plausibile che la loro rilevanza aumenti con l'espansione dell'industria delle microalghe e con l'adozione più diffusa di tecniche molecolari di rilevamento e monitoraggio (Carney & Lane, 2014).

Infine, un'ulteriore fonte di contaminazione nelle colture algali è rappresentata dalla presenza di altre microalghe. Sebbene l'obiettivo principale dei sistemi di coltivazione sia spesso l'ottenimento di monoculture, nei sistemi aperti (*open ponds*) è frequente l'ingresso e la proliferazione di specie algali non desiderate, che possono competere con il ceppo target per risorse essenziali, interferendo con la produttività complessiva della coltura o rendendo comunque discontinue le caratteristiche della biomassa finale prodotta. I principali meccanismi attraverso cui le microalghe contaminanti influenzano la coltura sono tre (Wang et al., 2013):

- Contatto diretto e competizione per lo spazio, che può determinare il predominio di una o più specie a scapito delle altre attraverso interazioni fisiche e competizione per l'habitat disponibile;
- Competizione per le risorse, poiché le diverse specie algali presentano differenti capacità di assimilazione di nutrienti inorganici e di anidride carbonica, con conseguente vantaggio competitivo per le specie più efficienti;
- Allopatia, ovvero la capacità di alcune microalghe di produrre e rilasciare metaboliti secondari che possono influenzare positivamente o negativamente la crescita di altre specie algali.

La contaminazione da altre microalghe rappresenta un problema rilevante soprattutto nei processi industriali, nei quali è necessario garantire la produzione di biomassa con composizione costante e predominanza assoluta del ceppo o della specie di interesse. Tuttavia, in alcuni contesti la presenza di più specie algali può non essere necessariamente negativa. La biodiversità algale, infatti, può apportare alcuni vantaggi funzionali rispetto alle monoculture, tra cui una maggiore stabilità del sistema. In particolare, una comunità più diversificata può ridurre l'impatto del pascolo da parte dello zooplankton, incrementare la produzione complessiva di biomassa e diminuire la suscettibilità a patogeni e malattie. Inoltre, sistemi algali più diversificati risultano generalmente più resilienti a variazioni improvvise delle condizioni ambientali o operative (Smith et al., 2014).

1.5 METODI DI RILEVAMENTO DELLE CONTAMINAZIONI

Un aspetto fondamentale nella coltivazione di microalghe è la rilevazione e l'identificazione dei contaminanti, al fine di definire strategie appropriate di gestione e controllo della coltura. Per la visualizzazione dei protisti è possibile impiegare sistemi automatizzati di citometria a flusso e microscopia, come il FlowCAM (*Fluid Imaging Technologies*) (Sieracki et al., 1998; Day et al., 2012). Tuttavia, il rilevamento al microscopio ottico rappresenta ancora uno dei sistemi più utilizzati ed economicamente sostenibili.

Accanto ai metodi ottici, le moderne tecniche molecolari offrono alternative più sensibili e specifiche. Queste possono includere il sequenziamento Sanger o approcci di tipo shotgun metagenomico. Tali sistemi si basano sull'amplificazione o sull'ibridazione di oligonucleotidi su regioni genetiche bersaglio specifiche. Le principali regioni utilizzate per l'identificazione e il rilevamento appartengono al gene dell'rRNA ribosomiale (rRNA), in particolare la subunità piccola (SSU), la subunità grande (LSU) e la regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*), costituita dagli spaziatori ipervariabili ITS1 e ITS2 (Carney & Lane, 2014).

Tra i metodi molecolari, la PCR quantitativa (qPCR= quantitative Polymerase Chain Reaction) è una tecnica ampiamente utilizzata grazie alla sua elevata sensibilità e specificità (Botes et al., 2013). Per ridurre la contaminazione di fondo e massimizzare le prestazioni analitiche, sono fondamentali procedure accurate di preparazione del campione, inclusa la corretta progettazione e validazione dei primer e delle sonde (ad es. sonde TaqMan o molecular beacons), oltre alla selezione ottimale dei reagenti. Le reazioni di qPCR possono essere anche multiplex, consentendo il rilevamento simultaneo di più specie all'interno della stessa reazione. Questa tecnica è stata applicata anche in contesti produttivi per quantificare variazioni di densità di microalghe e dei loro parassiti, inclusi i chitridi, in colture di massa (Shurin et al., 2013; Letcher et al., 2013).

Metodi alternativi includono sistemi basati sull'ibridazione, come i phylochip, che utilizzano array di sonde oligonucleotidiche (Metfies et al., 2007). Sebbene meno sensibili rispetto alla qPCR, essi consentono il rilevamento simultaneo di un'elevata diversità di specie e possono risultare vantaggiosi in termini di costo e rapidità, soprattutto in applicazioni su larga scala o in ambito industriale.

Per quanto riguarda i virus, l'identificazione non può basarsi su caratteristiche morfologiche e richiede necessariamente approcci molecolari, quali la PCR (Chen & Suttle, 1995). In realtà la PCR, essendo un metodo distruttivo, non consente di valutare la vitalità del virus che può essere analizzata soltanto mediante metodi tradizionali che prevedono l'inoculo in cellule ospiti e risultano quindi complessi e difficilmente utilizzabili per il monitoraggio ambientale.

Per la rilevazione dei funghi sono disponibili diverse metodologie basate su microscopia e colorazione. Il bianco di calcofluor è comunemente utilizzato per la visualizzazione dei chitridi, poiché lega la chitina presente nelle pareti cellulari di specifici stadi vitali (Rasconi et al., 2009). È stato inoltre proposto un metodo di doppia colorazione per la valutazione dei tassi di infezione da chitridi nei cianobatteri, basato sull'uso combinato di calcofluor white e SYTOX Green, un colorante per acidi nucleici (Gerphagnon et al., 2013), che consente la distinzione tra zoospore e sporangi mediante fluorescenza differenziale. Tuttavia, l'utilizzo del calcofluor può presentare alcune limitazioni, poiché esso si lega anche alla cellulosa, componente della parete cellulare di alcune microalghe, interferendo con la specificità della rilevazione (Damiani et al., 2006). Inoltre, tale colorante non è efficace nei confronti di funghi privi di chitina. In alternativa, può essere impiegato il rosso Nilo, utilizzabile anche in stadi giovanili (Gutman et al., 2009). La colorazione con rosso Congo è invece stata utilizzata per la visualizzazione degli oomiceti (Gachon et al., 2010).

1.6 METODI PER COMBATTERE LE CONTAMINAZIONI NELLE COLTIVAZIONI ALGALI

In letteratura sono riportate diverse metodologie finalizzate a contrastare la proliferazione delle contaminazioni biologiche nelle colture algali, ma ben poche applicazioni reali.

L'applicazione di tali metodologie è di fondamentale importanza in considerazione della continua espansione della produzione microalgale e della crescente necessità di ottenere colture pure e produzioni costanti al fine di poter valorizzare in scala reale la produzione microalgale.

1.6.1 METODI FISICI

Le metodologie fisiche rappresentano generalmente le strategie più efficaci per il controllo delle contaminazioni biologiche nelle colture algali, sebbene possano comportare elevati costi operativi e gestionali.

Tra queste, la radiazione ultravioletta di tipo UVC, caratterizzata da una lunghezza d'onda compresa tra 100 e 280 nm, può essere impiegata per il controllo delle specie invasive; tuttavia, la sua efficacia nei confronti dei parassiti algali non è stata ancora completamente dimostrata (Liebich et al., 2012). L'applicazione efficace degli UVC nelle colture microalgali contaminate dipenderebbe dalla maggiore resistenza delle microalghe all'irradiazione rispetto ai parassiti. Tale differenza potrebbe essere attribuita al più elevato contenuto di pigmenti fotosintetici delle microalghe, in grado di fornire una maggiore protezione nei confronti della radiazione.

In alternativa, gli UVC possono essere utilizzati per la sterilizzazione delle riserve liquide di nutrienti o delle acque impiegate nella coltivazione, riducendo così le fonti di contaminazione. Generalmente, questa tecnologia trova applicazione in acque limpide e a bassa torbidità piuttosto che nei reflui (Molina-Grima et al., 2022); di conseguenza, il suo impiego nei sistemi HRAP (*High Rate Algal Ponds*) è limitato e non ottimale (Montemezzani et al., 2015).

Un'altra metodologia fisica consiste nell'impiego di campi elettrici pulsati (*Pulsed Electric Fields*, PEF) per il controllo dei rotiferi, che ha mostrato risultati particolarmente promettenti (Lytle e Sagripanti, 2005). In particolare, l'applicazione di campi elettrici pulsati per circa 6 ore, mediante impulsi di 65 μ s a 50 Hz, ha determinato effetti limitati sulla crescita microalghe fino al superamento del tempo di trattamento indicato. Gli effetti osservati sulle microalghe hanno riguardato principalmente alterazioni della morfologia della membrana cellulare, fenomeno che sembrerebbe comunque reversibile. Nei rotiferi, invece, il trattamento ha provocato l'arresto della crescita, l'inibizione della capacità riproduttiva, danni cellulari e morte dell'organismo. In particolare, è stata osservata la morte dell'87% dello zooplancton entro le prime 6 ore di esposizione, percentuale che ha raggiunto il 100% dopo alcuni giorni di trattamento (Rego et al., 2015).

Un'ulteriore strategia impiegata per il controllo delle contaminazioni biologiche consiste nell'asfissia o deossigenazione della coltura (Molina-Grima et al., 2022). Tale effetto può essere ottenuto mediante un'intensa immissione di CO₂ nell'impianto oppure attraverso l'aumento del carico organico, con conseguente incremento della respirazione microbica e riduzione dell'ossigeno disponibile. Questo approccio ha mostrato risultati promettenti nella diminuzione dello zooplancton contaminante, in particolare nei confronti di cladoceri e rotiferi. Nei cladoceri, il trasporto di ossigeno avviene tramite molecole analoghe all'emoglobina umana (Pirow et al., 1999); l'aumento della concentrazione di anidride carbonica agisce sia direttamente sia indirettamente, attraverso l'abbassamento del pH, riducendo la capacità di legame di tali molecole con l'ossigeno (Weber e Vinogradov, 2001).

Nei rotiferi, invece, gli scambi gassosi avvengono principalmente per diffusione attraverso la superficie corporea e mediante l'acqua ingerita (Prosser, 1973). In questo caso, elevate concentrazioni di CO₂ limitano la capacità dell'organismo di rilasciare nell'acqua l'anidride carbonica prodotta durante la respirazione (Montemezzani et al., 2017).

L'efficacia del trattamento dipende sia dalla specie contaminante sia dallo stadio di sviluppo dello zooplancton. Per periodi di esposizione brevi si osserva generalmente soltanto un'immobilizzazione temporanea degli organismi, accompagnata da una riduzione dei parametri vitali (Montemezzani et al., 2017). Per ottenere una riduzione pari a circa il 99% dello zooplancton contaminante, il processo di asfissia deve essere protratto per circa 48 ore (Montemezzani et al., 2015).

La variazione di alcuni parametri della coltura rappresenta la principale metodologia di controllo. In particolare, si può intervenire sulla temperatura, portandola a superare i 35°C per un tempo limitato, sebbene non debba superare i 60-100°C per evitare di danneggiare anche le microalghe, oltre che aumentare notevolmente i costi di energia. La tolleranza alle alte temperature delle microalghe è estremamente specie-specifica, le microalghe verdi tollerano temperature intorno ai 35°C, altre possono arrivare fino a 44°C (Montemezzani et al., 2015).

Un'ulteriore metodologia fisica è rappresentata dalla sonicazione, che consiste nell'applicazione di onde sonore ad alta frequenza, generalmente ultrasoniche (McDaniel, 2011). Tale trattamento induce il fenomeno della cavitazione, ossia la disgregazione fisica degli organismi contaminanti mediante l'implosione di microbolle generate dalle rapide variazioni di pressione all'interno della massa d'acqua (Holm et al., 2008). La dose dipende dalle dimensioni delle cellule: gli organismi più grandi richiedono un apporto energetico inferiore per la disgregazione rispetto a quelli più piccoli. Questo rende la sonicazione particolarmente interessante per il controllo dei predatori, soprattutto negli stadi adulti, ma potenzialmente meno efficace per i parassiti e ha un basso effetto sulle microalghe (Montemezzani et al., 2015).

Un'ulteriore strategia di controllo delle contaminazioni biologiche consiste nell'impiego di sistemi di filtrazione per la rimozione meccanica dello zooplancton (Montemezzani et al., 2015). Questa metodologia rappresenta una soluzione pratica, rapida ed economicamente vantaggiosa. Attraverso l'utilizzo di filtri caratterizzati da differenti dimensioni delle maglie è possibile rimuovere selettivamente diverse specie di zooplancton presenti nella coltura. Per la rimozione dei virus potrebbero teoricamente essere impiegati filtri con porosità estremamente ridotta, dell'ordine dei micrometri molto fini, in grado di consentire il passaggio esclusivamente delle particelle virali. Tuttavia, tale approccio risulta difficilmente applicabile nelle sospensioni microalgali (Jacquet et al., 2013). Il principale limite dell'utilizzo di filtri a maglie molto sottili è infatti rappresentato dal rapido intasamento causato dalla presenza delle microalghe, soprattutto quando queste tendono a flocculare. I materiali filtranti possono essere di diversa natura, tra cui gomma o sabbia con granulometria variabile (Montemezzani et al., 2015).

Le turbolenze generate da forze idrodinamiche rappresentano un'altra metodologia fisica per il controllo dello zooplancton. In particolare, l'impiego di mulini a sfere (*bead mills*) genera uno stress meccanico continuo e moderato, particolarmente efficace nei confronti dei cladoceri (Montemezzani et al., 2015). L'eliminazione dello zooplancton avviene attraverso una combinazione di collisioni meccaniche, turbolenze e onde d'urto prodotte dall'implosione di bolle (Sawant et al., 2008).

Questa tecnica risulta maggiormente efficace sui cladoceri rispetto ai rotiferi, poiché i primi possiedono una struttura corporea più grande e rigida. Tuttavia, le elevate forze di taglio generate dal trattamento possono causare anche la rottura dei fiocchi microalgali-batterici e delle colonie algali debolmente aggregate (Montemezzani et al., 2017). La selettività del trattamento potrebbe essere modulata variando le dimensioni delle sfere utilizzate nel sistema. Gli organismi zooplanctonici di maggiori dimensioni, come gli adulti di piccoli crostacei, possono inoltre essere rimossi mediante idrocycloni, sistemi che sfruttano flussi d'acqua ad alta velocità per generare centrifugazioni continue. Questa metodologia consente di eliminare circa il 62,7% dello zooplancton presente, mentre il 95,3% degli organismi rimanenti risulta non vitale dopo il trattamento. Gli idrocycloni si dimostrano tuttavia meno efficaci nei confronti di organismi di piccole dimensioni, come i rotiferi (Montemezzani et al., 2015).

1.6.2 METODI CHIMICI

Le metodologie chimiche risultano particolarmente efficaci nel controllo dei rotiferi, soprattutto quando vengono applicate successivamente a metodi fisici finalizzati alla rimozione degli organismi contaminanti di maggiori dimensioni. Uno dei principali vantaggi di queste strategie risiede nella loro elevata selettività, che consente di colpire specifici organismi contaminanti limitando gli effetti negativi sulle microalghe e sugli eventuali organismi utili presenti nella coltura. Tuttavia, l'impiego di sostanze chimiche presenta alcune criticità, poiché le microalghe possono assorbire parte dei composti introdotti nel sistema. Per questo motivo, si predilige l'utilizzo di molecole caratterizzate da una breve emivita, in modo da ridurre l'accumulo di residui nella biomassa e nell'acqua di coltura. Tra le principali strategie chimiche adottate rientrano la variazione della salinità, dell'intensità luminosa, del pH e della concentrazione dei nutrienti, oltre all'impiego di agenti chimici naturali o di sintesi (Montemezzani et al., 2015).

L'aumento significativo della salinità può compromettere i meccanismi osmoregolatori dei predatori presenti nella coltura, senza determinare una significativa perdita di cellule microalgali (Hu Q et al., 1998). Analogamente, la riduzione del pH fino a valori pari a 3,0 si è dimostrata efficace nell'eliminazione di organismi flagellati contaminanti (Liu e Lu, 1990).

Gli effetti della variazione del pH risultano tuttavia fortemente specie-specifici. In generale, condizioni estreme di acidità o alcalinità ($\text{pH} < 3$ e $\text{pH} > 11$) possono causare la morte della maggior parte degli organismi zooplanctonici. È necessario, però, considerare anche la tolleranza delle microalghe alle variazioni di pH.

Valori eccessivamente acidi possono compromettere la crescita microalgale, poiché la fotosintesi tende naturalmente a spostare il sistema verso condizioni più alcaline. Anche valori di pH molto elevati ($\text{pH} > 11$) possono risultare dannosi per le microalghe, inducendo fenomeni di autoflocculazione della biomassa e la conseguente sedimentazione delle cellule algali (Montemezzani et al., 2015).

È possibile aumentare l'efficacia del controllo delle contaminazioni biologiche combinando più fattori ambientali e nutrizionali. È stato infatti osservato che condizioni caratterizzate da elevata intensità luminosa e ridotta disponibilità di fosforo determinano una significativa diminuzione della crescita dello zooplancton (Flynn et al., 2017).

La limitazione da fosforo induce uno stato di stress fisiologico che favorisce, nelle microalghe, la produzione di metaboliti secondari potenzialmente nocivi per i predatori (Granéli e Flynn, 2006). Inoltre, basse concentrazioni di fosforo sembrano ridurre anche la suscettibilità agli attacchi di funghi parassiti appartenenti ai Chytridiomycota (Bruning, 1991).

Tra i composti chimici maggiormente impiegati per il controllo delle contaminazioni si annoverano ipoclorito di sodio, ammoniaca libera, urea (Molina-Grima et al., 2022) e bicarbonato d'ammonio (He et al., 2022). Sono stati inoltre utilizzati insetticidi e pesticidi quali Trichlorphon, Decamethrin, Tralocythrin e Buprofezin (Wang H et al., 2013), oltre a solfato di rame (Fott, 1967) e al tensioattivo Triton-N (Benderliev et al., 1993).

L'ammoniaca libera ($\text{NH}_3\text{-N}$) rappresenta uno dei composti più tossici per lo zooplancton. Essa può essere aggiunta direttamente alla coltura oppure formarsi spontaneamente in seguito all'aumento del pH causato dall'attività fotosintetica delle alghe. In tali condizioni, infatti, l'ammonio (NH_4^+), comunemente utilizzato come fonte di azoto per le microalghe, tende a dissociarsi formando ammoniaca non ionizzata all'aumentare del pH, in particolare oltre valori di circa 7,5. L'impiego dell'ammoniaca può essere modulato in funzione della durata del trattamento: per esposizioni prolungate si mantiene generalmente il pH in un intervallo compreso tra 9 e 11, mentre per trattamenti di breve durata, pari a poche ore, il pH può essere aumentato oltre 11. Nonostante la buona efficacia, questa metodologia presenta costi operativi elevati. (Montemezzani et al., 2015).

L'uso di insetticidi e i pesticidi rappresenta un'ulteriore strategia chimica per il controllo delle contaminazioni biologiche nelle colture microalgali. Molti di questi composti agiscono interferendo con il metabolismo della chitina, principale componente dell'esoscheletro dei crostacei.

In particolare, la chitinasi, enzima prodotto da batteri, funghi, piante e insetti durante i processi di muta, è in grado di idrolizzare la chitina che costituisce il rivestimento esterno dei crostacei, periodicamente degradato e ricostruito durante l'ecdisi (Molina-Grima et al., 2022).

In generale, queste sostanze sembrano risultare maggiormente efficaci nei confronti dei cladoceri rispetto ai rotiferi. La chitinasi è stata inoltre sfruttata per la produzione di biopesticidi in grado di degradare anche le pareti cellulari dei funghi, sebbene i costi di applicazione risultino elevati. Un'alternativa consiste nell'impiego di sostanze che interferiscono con la biosintesi della chitina (Montemezzani et al., 2015).

Ulteriori approcci sperimentali hanno previsto l'utilizzo di proteine antifungine isolate da batteri marini, impiegate per proteggere le alghe rosse dagli oomiceti responsabili della cosiddetta "malattia del marciume rosso" (Woo e Kamei, 2003). L'aggiunta di solfato di rame ai terreni di coltura si è dimostrata in grado sia di stimolare la produttività algale sia di esercitare un'azione fungicida contro i chitridi (Fott, 1967). Anche il tensioattivo Triton-N, inoculato prima della fase di crescita esponenziale della biomassa algale, è stato utilizzato per ridurre la proliferazione dei chitridi (Benderliev et al., 1993).

Diversi disinfettanti commerciali hanno inoltre mostrato efficacia nel controllo dei chitridi responsabili delle infezioni negli anfibi a livello globale (Webb et al., 2012), suggerendo una possibile applicazione anche nelle colture microalgali di massa. Tuttavia, l'impiego di fungicidi nelle colture algali non appare sempre ottimale, poiché tali composti possono provocare non soltanto la morte dei funghi bersaglio, ma anche danni significativi alle stesse microalghe (McMahon et al., 2012).

Tra gli insetticidi più studiati vi è il temephos, che ha dimostrato elevata efficacia eliminando completamente i cladoceri e riducendo drasticamente le popolazioni di rotiferi. L'emivita del composto è pari a circa 28,7 giorni a pH 7 e non sono stati osservati effetti negativi significativi sulle microalghe, la cui crescita è risultata addirittura aumentata dopo il trattamento (Montemezzani et al., 2015).

Anche il carbaryl si è dimostrato efficace nell'eliminazione sia dei cladoceri sia dei rotiferi. Il trattamento non ha evidenziato effetti tossici rilevanti sulle microalghe; tuttavia, è stato osservato un rapido recupero delle popolazioni di cladoceri, probabilmente dovuto alla rapida degradazione del composto. L'emivita del carbaryl dipende fortemente dal pH: in acqua distillata è pari a circa 3,2 ore a pH 9, 12,1 giorni a pH 7 e oltre 4 anni a pH 5 (Montemezzani et al., 2015).

Per il controllo dei ciliati è stato proposto l'utilizzo del solfato di chinino, che sembra causare soltanto lievi danni alle microalghe. La medesima concentrazione può essere efficace anche nei confronti dei rotiferi, mentre gli effetti sullo zooplancton di maggiori dimensioni non risultano ancora completamente chiariti. Un altro composto utilizzato è la permetrina, che non sembra alterare significativamente né la fotosintesi né la crescita microalgale. La sostanza tende tuttavia ad accumularsi nei sedimenti, sebbene la sua concentrazione nell'acqua diminuisca di circa sei volte entro 24 ore dal trattamento (Montemezzani et al., 2015).

Tra i prodotti commerciali a breve emivita e ad ampio spettro d'azione si possono infine citare PeracleanOcea, SeaKleen e acroleina. PeracleanOcea risulta attivo contro batteri, lieviti, muffe, protozoi, spore e virus in un intervallo di pH compreso tra 5 e 9. SeaKleen appare particolarmente efficace nei confronti di cladoceri e rotiferi adulti, mostrando al contempo una minore tossicità verso le microalghe verdi. L'acroleina, invece, richiede particolare cautela nella manipolazione poiché costituisce un forte irritante per pelle, occhi e vie respiratorie; la sua emivita varia generalmente tra 8 e 24 ore (Montemezzani et al., 2015).

È necessario considerare che gli organismi contaminanti bersaglio possono sviluppare forme di resistenza nei confronti dei trattamenti chimici impiegati per il loro controllo (Fravel, 2005). Inoltre, l'utilizzo di sostanze biocide comporta un aumento dei costi operativi, rappresentando un limite significativo nelle coltivazioni microalgali su larga scala (Klein-Marcuschamer et al., 2013).

Il trattamento con ozono è stato impiegato principalmente per il controllo di specie invasive; tuttavia, la sua applicazione specifica contro i parassiti algali non è stata ancora ampiamente documentata (Tsolaki e Diamadopoulos, 2010). Nei confronti dei parassiti, è stato inoltre osservato che alcune microalghe possono sviluppare meccanismi di difesa autonomi, tra cui la produzione e il rilascio di acido abscissico (ABA), molecola coinvolta nelle risposte cellulari allo stress (Pouneva, 2006).

Gli effetti degli agenti chimici sulla crescita delle microalghe devono tuttavia essere ancora approfonditi.

1.6.3 AGENTI ALLELOPATICI

Una metodologia ancora poco studiata per il controllo delle contaminazioni biologiche nelle colture microalgali è rappresentata dall'impiego di agenti allelopatici. L'allelopatia rientra tra le metodologie chimiche e consiste nella produzione, da parte di un organismo, di una o più sostanze biochimiche, generalmente metaboliti secondari, capaci di influenzare positivamente (allelopatia positiva) o

negativamente (allelopatia negativa) la sopravvivenza, la crescita o la riproduzione di altre specie (Molina-Grima et al., 2022).

In particolare, l'allelopatia negativa è stata proposta come potenziale strategia per il controllo delle specie indesiderate nei sistemi di coltivazione microalgale (Mendes e Vermelho, 2013). Le biomolecole coinvolte, denominate allelochimici, sono metaboliti secondari prodotti da diversi organismi, tra cui piante, alghe, batteri, coralli e funghi (Mendes e Vermelho, 2013). Oltre all'azione allelopatica, tali composti svolgono numerose funzioni ecologiche, tra cui la difesa chimica, la chelazione dei nutrienti e, nel caso delle piante terrestri, la regolazione della biota del suolo (Macías et al., 2003).

Nelle microalghe, l'allelopatia può compromettere le prestazioni biologiche dei predatori, provocandone l'inattivazione o la morte attraverso l'azione di singole molecole o di gruppi di composti bioattivi. Fenomeni di rilascio di sostanze allelopatiche sono stati osservati soprattutto durante le fioriture di alghe tossiche (Tillmann, 2004).

L'attività allelopatica è influenzata sia da fattori abiotici sia da fattori biotici. Tra i fattori abiotici che sembrano favorire la produzione di sostanze allelopatiche vi sono la carenza di nutrienti, in particolare composti azotati e fosforati, basse intensità luminose, basse temperature e valori di pH relativamente elevati (circa 9,0). Al contrario, elevate intensità luminose, alte temperature, abbondanza di nutrienti e valori di pH più acidi (intorno a 6,0) sembrano inibire i processi allelopatici. La struttura chimica dei composti tossici coinvolti e i meccanismi mediante i quali i fattori ambientali regolano l'allelopatia non risultano ancora completamente chiariti. Tra i fattori biotici più rilevanti rientra invece la densità cellulare delle microalghe produttrici di metaboliti tossici, con dinamiche che ricordano i fenomeni di *quorum sensing* osservati nei batteri (Granéli et al., 2012).

L'allelopatia può inoltre associarsi a fenomeni di mixotrofia, quali fagotrofia e osmotrofia, senza compromettere l'attività fotosintetica delle microalghe. In alcuni casi, le tossine prodotte sembrano partecipare direttamente ai processi di cattura delle prede. Ad esempio, alcuni dinoflagellati sono in grado di paralizzare gli organismi bersaglio prima dell'ingestione (Stoecker et al., 2006).

Gli organismi predatori stessi possono successivamente rappresentare una fonte di nutrienti per le microalghe allelopatiche, favorendone ulteriormente la crescita. Le microalghe che combinano metabolismo fotosintetico con meccanismi eterotrofi, quali fagotrofia e osmotrofia, mostrano spesso tassi di crescita superiori.

In questo contesto, l'allelopatia rappresenta un importante fattore ecologico capace di influenzare la struttura delle comunità acquatiche, la dinamica delle popolazioni e la competizione per spazio, luce e nutrienti, oltre a costituire un sistema di difesa chimica contro microrganismi e micro-pascolatori. I metaboliti allelopatici prodotti dalle microalghe potrebbero inoltre rappresentare una promettente fonte di nuovi agenti antimicrobici, erbicidi e biopesticidi (Macías et al., 2007). Tra i principali metaboliti secondari identificati nelle microalghe si annoverano acidi grassi, come acido α -linolenico, oleico, linoleico e palmitico, oltre ad alcaloidi, peptidi e amminoacidi bioattivi (Jones et al., 2009).

Le aldeidi sono una classe di composti derivanti dall'ossidazione di molecole più complesse. Tra questi, le aldeidi polinsature (*Polyunsaturated Aldehydes*, PUA) sono una delle categorie di ossilipine maggiormente tossiche e sono state identificate inizialmente nelle diatomee marine e d'acqua dolce. Altre classi di ossilipine comprendono idrossiacidi e alcoli epossidici. Tali molecole sembrano svolgere un ruolo importante nei meccanismi di difesa delle diatomee nei confronti dei copepodi e di altri organismi predatori (Ianora et al., 2011).

Gli enzimi svolgono un ruolo fondamentale in tutti gli organismi viventi, catalizzando numerosi processi metabolici. Le microalghe, inclusi i cianobatteri, sono in grado di produrre sostanze inibitrici di specifici enzimi, tra cui glicosidasi e peptidasi (Gross, 2003). È stato stimato che circa il 20% dei cianobatteri presenti nei biofilm possieda attività inibitoria nei confronti delle glucosidasi, associata a proprietà allelopatiche e a effetti tossici verso gli organismi pascolatori (*grazers*) (Jüttner e Wu, 2000).

2. SCOPO DELLA TESI

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso l'Università degli Studi di Milano Bicocca in collaborazione con l'Istituto Sperimentale Lazzaro Spallanzani (Località La Quercia, Rivolta d'Adda (CR)).

Lo scopo di questo lavoro di tesi era la validazione di metodiche per l'eliminazione dei rotiferi nelle colture algali senza intaccare la crescita delle culture algali.

Inoltre, si è valutata la stagionalità della presenza di questi predatori all'interno di un HRAP pilota in esercizio presso l'Istituto Sperimentale Lazzaro Spallanzani di Rivolta d'Adda (CR), alimentato con digestato agro-zootecnico.

Infine, verificato che la presenza di rotiferi nella coltura è praticamente costante, si sono individuate le soglie critiche di densità algale al di sotto delle quali la presenza di tali predatori poteva causare danni tangibili alla coltura stessa.

3. MATERIALI E METODI

3.1 L'IMPIANTO PILOTA DEL POLO DELLE MICROALGHE

In questo lavoro di tesi si è deciso di testare il ceppo algale *Scenedesmus* spp. Questa specie ha dimostrato una buona capacità di crescita sia su digestati agro zootecnici, sia su medium artificiali; nonché alle sue proprietà fitostimolanti (Álvarez-González et al., 2025).

Per la sperimentazione sono state utilizzate alghe provenienti da un impianto pilota comprendente un fotobioreattore chiuso multitubolare (MHT) e un raceway (RW).

L'MHT (realizzato da A4F, SA, Portogallo) è in vetro, è costituito da un sistema tubolare a 10 curve e ha un volume di 450 L. La sospensione è mantenuta in agitazione grazie alla turbolenza indotta dal passaggio lungo il percorso del reattore. È stato utilizzato per produrre l'inoculo per il raceway ed è stato alimentato con medium sintetico. Un'immagine dell'MHT è riportata in Figura 1. Il retto MHT viene alimentato con terreno sintetico BBM (Garcia-Martinez et al., 2022).



Figura 1. Fotobioreattore MHT (multi tubular horizontal) presso Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani

Il raceway ha un volume di 700 litri e una superficie di $3,78 \text{ m}^2$, con un battente di 17 cm e veniva alimentato con la frazione liquida di digestato agrozootecnico trattato e diluito in acqua di rete al 30-40%.

È costituito da componenti diverse, il cui schema è in Figura 2. La Figura 3 riporta invece un'immagine del reattore.

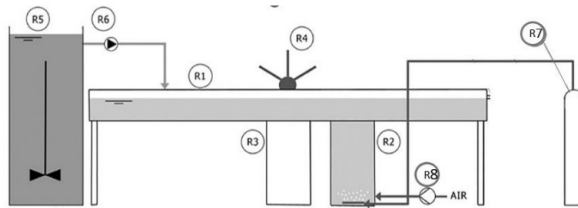


Figura 2. Schema del raceway (RW) usato per la coltivazione in autotrofia. R1= vasca (volume = 700 L), R2 = cilindro per il contatto tra la sospensione algale, la CO₂ e l'aria, R3 = pannello di controllo connesso con le sonde (temperatura, ossigeno disciolto e pH), R4 = mulino per la movimentazione della sospensione algale, R5 = tanica per l'alimento, R6 = pompa di alimentazione, R7 = bombola per la CO₂, R8 = pompa per l'immissione di CO₂ nel cilindro R2.



Figura 3. Raceway presso Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani

Entrambi i reattori sono posti sotto una serra realizzata in PVC per mitigare le basse temperature invernali senza compromettere il passaggio di PAR e raggi infrarossi (Rossi et al., 2024).

Dal reattore MHT sono stati prelevati gli inoculi di *Scenedesmus* utilizzati per le prove in laboratorio. Il monitoraggio della presenza di rotiferi è stato invece effettuato prelevando campioni dal raceway, alimentato con digestato agro-zootecnico.

3.2 I FOTOBIOREATTORI DEL DISAT

Per le prove che prevedevano l'uso di agenti chimici sono state utilizzate beute di dimensione variabile (100 ml e 25 ml), riportate in Figura 4 e in Figura 5, tappate con cotone per evitare l'evaporazione della coltura algale presente al loro interno consentendo gli scambi gassosi.



Figura 4. Beute utilizzate in laboratorio poste sull'agitatore



Figura 5. Beute di dimensioni più grandi poste sull'agitatore usate in laboratorio

Le sostanze che hanno dato migliori risultati nell'eliminazioni dei rotiferi sono state testate in fotobioreattori da banco da 4,5 L, con un volume di lavoro di 3 L (Figura 6). Il sistema, fornito da IDEA Bioprocess Technology Srl, è costituito da 4 fotobioreattori a colonna in plexiglas con un diametro di 11 cm e un'altezza di 40 cm. Il sistema è dotato di luci LED bianche che hanno funzionato per 12 ore/giorno. I fotobioreattori sono stati mantenuti a temperatura ambiente e le colture algali

sono state miscelate da agitatori magnetici, con velocità di agitazione di 300 rpm. Mediante il gorgogliamento di CO₂ il pH è stato mantenuto tra 6,8 e 7,2.

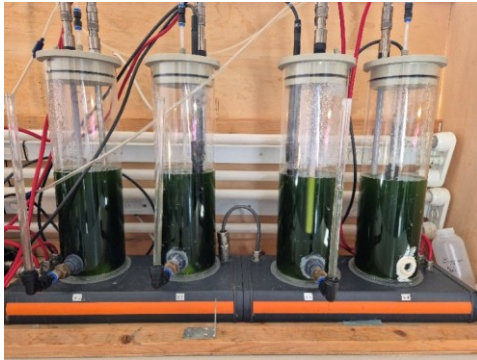


Figura 6. Immagine dei fotobioreattori usati in laboratorio

3.3 L'ALLEVAMENTO DEI ROTIFERI

Per disporre di rotiferi da inoculare nei campioni per simulare le diverse condizioni di contaminazione è stato allestito un allevamento di rotiferi presso il laboratorio del DISAT dell'Università di Milano Bicocca.

I rotiferi venivano allevati in beute da 1 L contenenti acqua distillata, al fine di ridurre il rischio di contaminazioni batteriche. In ciascuna beuta sono stati inoculati 10 mL di coltura algale contenente rotiferi. I rotiferi sono stati alimentati ogni 2 giorni mediante aggiunta di 1 g di lievito madre ogni 10⁶ rotiferi presenti all'interno della beuta. Le beute sono state mantenute in condizioni di oscurità per evitare la proliferazione delle microalghe e costantemente aerate. La conta dei rotiferi veniva effettuata al microscopio con la camera di Rafter.

3.4 IL MICROSCOPIO, LA CAMERA DI BURKER E LA CAMERA DI RAFTER

L'osservazione al microscopio ottico dei campioni in esame è stata eseguita allestendo dei vetrini con alcune gocce delle colture, sia per la densità algale e sia dei predatori. I preparati sono stati osservati mediante un microscopio ottico munito di una telecamera digitale collegata ad un computer.

Il numero di cellule presenti in un campione può essere determinato mediante conta diretta al microscopio ottico. Questa conta viene fatta utilizzando la camera di Burker. Si tratta di una camera di conta costituita da un particolare vetrino da microscopio su cui è inciso un reticolo costituito da tanti quadrati di area definita.

La distanza tra il reticolo e il vetrino copri oggetto è nota; perciò, anche il volume di sospensione algale contenuta nel riquadro è definito. Infatti, si determina uno spessore di 1/10 di mm in cui si raccoglie un volume di campione pari a 1/10 di mm³.

Contando il numero di cellule in un quadrato si può calcolare la concentrazione di particelle microbiche del campione. Per avere un conteggio adeguato e ridurre l'errore sperimentale si contano le cellule contenute in numerosi riquadri. Dopo aver contato diversi quadrati si determina la media dei valori ottenuti. Tale metodo è affidabile quando la concentrazione non è né troppo elevata né troppo bassa, condizioni che potrebbero causare errori sperimentali di conta; per questo è opportuno lavorare con adeguate diluizioni.

In caso si lavori con specie diverse i limiti di questo metodo sono dati dalla difficoltà di identificare le cellule appartenenti a specie diverse e, inoltre, risulta difficoltoso contare cellule di dimensioni particolarmente ridotte o di specie dotate di motilità. Con questo metodo si effettua una conta totale in quanto si contano tutte le cellule presenti nel campione, sia quelle vive sia quelle morte ma ancora integre. Infine, si può identificare l'eventuale comparsa di specie aliene.

Per quanto riguarda il conteggio dei predatori in laboratorio veniva usata la camera di Rafter, ideale per il conteggio dello zooplancton sospeso in sostanza acqua per il monitoraggio ambientale. La camera ha dimensioni note di 50 mm x 2 mm x 1 mm, per un volume totale di 1 mL. Al suo interno è costituita da una griglia di 1000 quadrati (1 mm x 1 mm). Siccome il volume è noto il conteggio è facilmente convertibile in densità. Il campione da analizzare viene distribuito uniformemente sulla griglia (1 mL). Se il campione risultasse troppo denso bisogna apportare le dovute diluizioni, al fine di avere una conta più precisa. Si può ricorrere all'uno di un fissativo, come la soluzione di Lugol (soluzione di iodio), quando i predatori sono troppo numerosi o se si muovono velocemente. Una volta distribuito il campione da analizzare bisogna riporre sopra la camera un vetrino copri oggetto, evitando la formazione di bolle; così che il campione rimanga uniformemente distribuito e così da migliorare la messa a fuoco e la nitidezza delle immagini al microscopio ottico. Il campione viene fatto sedimentare per 10-15 minuti per far sì che gli organismi si depositano sul fondo per garantire una miglior visibilità. Utilizzando un opportuno ingrandimento al microscopio ottico si contano i quadrati, oppure solo una parte di questi e si fanno in seguito le dovute proporzioni. Un problema nell'utilizzo della camera di Rafter consiste nella difficoltà di ottenere il numero reale di organismi per via della loro sovrapposizione o del loro corpo trasparente. Per ovviare a questo problema si può ricorrere a delle repliche per poi calcolare la media, così da ridurre l'errore statistico.

3.5 IL PAM

Il fluorimetro Phyto-PAM II (Walz, Germania) (Fig.7) viene utilizzato per valutare l'attività fotosintetica delle alghe. Un'analisi tipica della fluorimetria PAM prevede l'utilizzo di impulsi di saturazione, cioè impulsi luminosi brevissimi di alta intensità che permettono di rilevare la fluorescenza in tempi brevissimi.



Figura 7. strumento Phyto-Pan II compact version

Prima dell'analisi il campione deve essere mantenuto al buio per 20-30 minuti in modo tale che la catena di trasporto degli elettroni si liberi; a questo punto è possibile applicare il primo impulso di saturazione, così denominato perché satura la catena di trasporto degli elettroni. Parte della luce viene utilizzata per la fotosintesi e una parte viene emessa come fluorescenza che viene misurata. Successivamente il campione viene sottoposto ad altri impulsi luminosi che permettono di calcolare la resa fotosintetica, cioè la quantità di luce effettivamente utilizzata dalla cellula per svolgere la fotosintesi. È quindi possibile avere delle informazioni sulla salute dell'apparato fotosintetico e, di conseguenza, sullo stato di salute delle alghe o dei cianobatteri. L'energia luminosa assorbita viene trasferita verso i centri di reazione dei fotosistemi (PSII e PSI) e utilizzata per alimentare le reazioni fotochimiche. Una parte di questa energia non raggiunge il centro di reazione ed è dissipata sotto forma di calore dall'antenna stessa. Un'altra parte, pur raggiungendo il centro di reazione, viene riemessa sotto forma di fluorescenza.

Tramite l'analisi della fluorescenza della clorofilla si possono ottenere informazioni sull'efficienza degli apparati fotosintetici, e quindi di valutare lo stato fisiologico dei campioni fotosintetici esaminati. La quantità di energia dissipata in forma di fluorescenza durante la fotosintesi è piccola; un incremento dell'emissione di fluorescenza indica una riduzione dell'efficienza della fotosintesi.

Le tecniche di analisi usate possono essere basate sull'analisi della fluorescenza attiva o della fluorescenza passiva. Si definisce “attiva” la fluorescenza indotta dall'esposizione a luce artificiale, di intensità e composizione note, di un campione fotosintetico precedentemente adattato a condizioni di buio o di luce. È invece “passiva” la fluorescenza emessa spontaneamente da un campione fotosintetico nelle condizioni reali di illuminazione. La misura della fluorescenza è una tecnica molto sensibile, in grado di rilevare i cambiamenti dello stato bioenergetico negli organismi fotosintetici fornendo, direttamente o indirettamente, informazioni su tutti i momenti della fase luminosa della fotosintesi.

In questo modo è possibile misurare le risposte degli organismi esaminati ai cambiamenti dei parametri ambientali (radiazioni luminose, temperature, stato idrico, inquinamento ambientale, ecc.), e di conseguenza l'insorgere di condizioni di stress e i meccanismi di acclimatazione.

In un campione fotosintetico adattato al buio tutti i centri di reazione sono nello stato ossidato (centri di reazione “aperti”). Al momento dell'applicazione di una luce attinica (luce in grado di provocare cambiamenti chimici) inizia la prima fase della fluorescenza indotta. La fluorescenza iniziale (Fo) è associata alla perdita di energia del pigmento antenna del PSII. La fluorescenza attiva viene indotta tramite l'applicazione di luce. Se il campione è stato precedentemente adattato al buio, all'inizio dell'induzione luminosa si osserva un forte incremento della fluorescenza fino ad un picco massimo (Fm), dopo di che la fluorescenza decresce lentamente fino a raggiungere un livello stabile (Fs). La fluorescenza massima indica la riduzione del pool dei plastochinoni (chiusura dei centri di reazione). La successiva fase discendente è associata alle reazioni enzimatiche necessarie alla sintesi di ATP, NADPH e la riduzione della CO2 nella fase oscura. Infine, il livello stabile (fluorescenza stazionaria) esprime l'equilibrio fra l'assorbimento dell'energia luminosa e l'organizzazione del carbonio (Fig 8).

Source	Equation
Maximum photochemical quantum yield of PS II (Kitajima and Butler, 1975)	$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$

Figura 8. Formula per il calcolo della resa quantica fotochimica del fotosistema II (tratta da manuale d'uso Phyto Pam)

L'intensità della fluorescenza è un valore assoluto che dipende dalle condizioni di illuminazione e può variare di molti ordini di grandezza. Lo yield (resa quantica) invece è molto meno variabile perché esprime il rapporto fra fotoni assorbiti e fotoni riemessi.

Nella fluorimetria PAM la sorgente di luce usata per misurare la fluorescenza è modulata, cioè applicata con impulsi ad alta frequenza, e la misura avviene solo sulla parte di fluorescenza generata dagli impulsi modulati (Fig. 9).

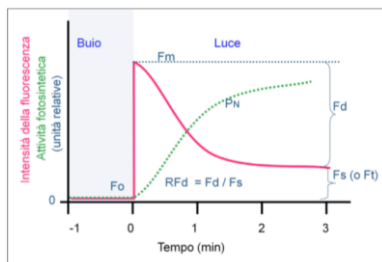


Figura 9. Curve di induzione di fluorescenza della clorofilla.

La tecnica PAM consente una misurazione accurata della fluorescenza iniziale in campioni adattati al buio (F_0). La debole radiazione iniziale (ML) non ha effetto di induzione della fotosintesi, e la fluorescenza della clorofilla proviene principalmente dalla perdita di energia dall'antenna, e quindi il suo valore può essere assunto come per F_0 . Prima della misura di F_0 può essere applicato un debole impulso di luce nel rosso lontano (far red, FR). Successivamente viene somministrato un impulso di saturazione (SP = saturation pulse) per un tempo di circa 0,8s. si tratta di un impulso con intensità molto forte che causa la riduzione di tutti gli accettori del PSII, il blocco momentaneo delle reazioni fotochimiche e, di conseguenza, l'aumento dell'intensità della fluorescenza fino a raggiungere il valore massimo (F_m). Dopo che l'intensità della fluorescenza è tornata al livello di F_0 , viene nuovamente somministrata una luce attinica (AL). Questa luce provoca un aumento di fluorescenza fino a F_p (picco di fluorescenza). Nei minuti successivi la fluorescenza diminuisce nuovamente fino al livello costante (stabile) di F_s (steady state fluorescence). Dopo che è stato raggiunto F_s , viene somministrato il secondo impulso (SP) che riduce nuovamente gli accettori di elettroni del PSII. Questo impulso provoca un nuovo aumento di fluorescenza fino al livello F_m' , che è sempre inferiore a F_m . La differenza tra F_m e F_m' è dovuta alla estinzione non fotochimica di energia. Successivamente, un impulso di luce nel rosso lontano (far red, FR) in assenza di luce attinica consente di misurare F_0' , che è il livello minimo di fluorescenza quando i centri di reazione del PSII sono aperti in un campione adattato alla luce. Si assume che in tal modo venga eccitato preferenzialmente il PSI rispetto al PSII, rimuovendo così gli elettroni dal sito degli accettori del PSII (ossidazione del pool dei plastochinoni associati al PSII) e favorendo l'apertura dei centri di reazione del PSII (Fig. 10).

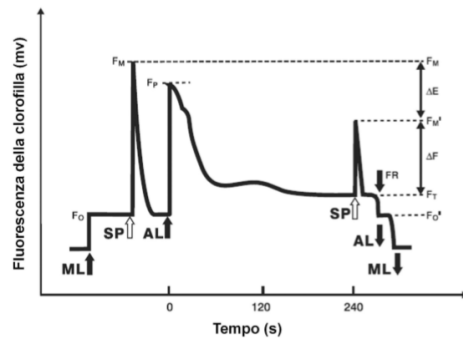


Figura 10. Esempio di cinetica di fluorescenza modulata

Tramite la misura della fluorescenza è anche possibile stabilire la composizione di una popolazione algale. Lo strumento comprende da cinque luci LED di diverse lunghezze d'onda: 440 nm, 480 nm, 540 nm, 590 nm e 625 nm, oltre alla luce bianca (440-640 nm) e al rosso lontano (735 nm).

Le prime cinque luci permettono di distinguere quattro diversi tipi di pigmenti antenna e i relativi gruppi di organismi fotosintetici (hanno dei pigmenti differenti che emettono fluorescenza diversa): alghe verdi, cianobatteri, diatomee/flagellati e organismi contenenti ficoeritrina quali criptofite. E' così possibile effettuare la deconvoluzione, cioè la valutazione dell'incidenza percentuale in proporzione dei diversi gruppi algali sul totale della popolazione.

Per poter essere analizzati in modo corretto attraverso questo strumento è necessaria una specifica preparazione dei campioni. Vengono filtrati 2 ml mediante pompa a vuoto e la biomassa raccolta dal filtro viene risospesa in 4 ml di medium sintetico (BBM, nel corso della sperimentazione) per evitare interferenze colorimetriche ed effettuare una prima diluizione del campione. Il campione viene lasciato al buio per 20 minuti in modo tale da permettere che i centri di reazione siano aperti e la dissipazione di energia non fotochimica sia minima. Successivamente dal campione appena preparato vengono prelevati 200 µl e immessi in una cuvetta in quarzo contenente 4 mL di medium BBM. Per poter meglio interpretare i dati risultanti dalle analisi con Phyto Pam II è possibile considerare come soglia del buono stato fisiologico della coltura un valore di F_v/F_m pari a 0.5 (Ranglová et al., 2019).

3.6 LO SPETTROFOTOMETRO

L'analisi della densità ottica è un metodo indiretto per misurare la massa cellulare. Le cellule presenti in sospensione riflettono e disperdono la luce e maggiore è la concentrazione di cellule presenti, tanto maggiore sarà la luce diffusa e maggiore sarà il valore dell'assorbanza misurato dallo spettrofotometro. La lunghezza d'onda utilizzata per determinare la densità algale è di 680 nm.

3.7 pHmetro

Per le analisi è stato usato un pH-metro, XS PC510, opportunamente calibrato con soluzioni tampone a pH noto (4, 7 e 10) a temperatura ambiente.

La misura del pH è fondamentale per valutare l'attività fotosintetica della coltura algale: il consumo fotosintetico di CO₂ provoca l'aumento del pH. Un calo del pH può indicare una diminuzione dell'attività fotosintetica o l'attività concomitante di altri organismi (ad esempio i nitrificanti) o anche la presenza di rotiferi che comporta un aumento della respirazione, quindi un aumento della CO₂ e, di conseguenza, un abbassamento del pH.

3.8 PIANO DEL LAVORO

In Tabella 1 sono riassunte le attività svolte nei diversi ambiti della ricerca

	Origine dei campioni	Numero di prove	Analisi effettuate	Sostanze saggiate	N. repliche
Monitoraggio dei rotiferi	Raceway Polo delle Microalghe	6	OD680, conte rotiferi, attività fotosintetica (PAM)		
Confronto tra diversi agenti chimici	Sospensione algale MHT Polo delle Microalghe (BBM)	2	OD680, conte rotiferi, attività fotosintetica (PAM)	Ipoclorito di sodio	3 controlli + 3 trattati
	Sospensione algale Raceway Polo delle microalghe (Digestato diluito)	3	OD680, conte rotiferi, attività fotosintetica (PAM)	Ipoclorito di sodio	3 controlli + 3 trattati
	Sospensione algale Raceway Polo delle microalghe (Digestato diluito)	3	OD680, conte rotiferi, attività fotosintetica (PAM)	Urea	3 controlli + 3 trattati

	Sospensione algale MHT Polo delle Microalghe (BBM)	2	OD680, conte rotiferi, attività fotsintetica (PAM)	NaOH	3 controlli + 3 trattati
	Sospensione algale Raceway Polo delle microalghe + Sospensione algale MHT Polo delle Microalghe (BBM)	1	OD680, conte rotiferi, attività fotsintetica (PAM)		1 controlli + 3 trattati
	Sospensione algale Raceway Polo delle microalghe	1	OD680, conte rotiferi, attività fotsintetica (PAM)		2 controlli + 2 trattati
	Sospensione algale MHT Polo delle Microalghe (BBM)	6	OD680, conte rotiferi, attività fotsintetica (PAM)	PAA	1 controllo + 2 trattati
Determinazione della soglia critica alghe/rotiferi	Sospensione algale Raceway Polo delle microalghe	2	OD680, conte rotiferi, attività fotsintetica (PAM)		2 controlli + 2 trattati
	Sospensione algale MHT Polo delle Microalghe (BBM)				3 controlli + 3 trattati

3.8.1 MONITORAGGIO DEI ROTIFERI NELL'IMPIANTO PILOTA DEL POLO DELLE MICROALGHE

Per un periodo compreso tra ottobre 2025 e marzo 2026, presso il laboratorio del DISAT dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca, sono stati periodicamente monitorati i rotiferi presenti nell'impianto pilota Raceway del Polo delle Microalghe dell'Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani".

I rotiferi sono stati conteggiati e identificati a livello di specie mediante osservazione al microscopio ottico e utilizzando la camera di conteggio di Rafter. Per ciascun campione è stato analizzato un volume di 1 mL. L'identificazione tassonomica è stata effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche osservabili al microscopio.

3.8.2 CONFRONTO TRA DIVERSI AGENTI CHIMICI

Sono state testate varie sostanze con tempi diversi di contatto tra la coltura algale e le sostanze testate, sulla base dei risultati riportati in letteratura al fine di valutare gli effetti sulla crescita. Come ultima metodologia si è incrementato artificialmente e in modo repentino il pH tramite aggiunta di NaOH.

Per ogni prova sono state effettuate tre repliche e le performance di crescita sono state confrontate con i triplicati senza le sostanze testate (controlli). Le analisi eseguite su queste prove sono state: conte al microscopio delle alghe e dei predatori, e misura di pH, ossigeno disciolto ed efficienza fotosintetica delle alghe. Le colture algali sono state mantenute in semicontinuo (HRT 7-10 giorni) per 2 HRT dopo la fine della prova per verificare eventuali effetti a lungo termine del trattamento sulla coltura. Le condizioni delle prove sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2. Condizioni delle prove

Sostanza testata	Origine alghe	Origine rotiferi	pH iniziale	pH finale	Rotiferi/ml	Concentrazion e sostanza testata	Beute utilizzate	Durata prova	
Ipoclorito di sodio (NaClO)	MHT	Allevamento in laboratorio			400	0,28 mg/L	100 ml	3 giorni	
	Raceway				750				
		150							
		200							
		250							
Urea (CO(NH ₂) ₂)	Raceway				150	120 mg/l	100 ml	7 giorni	
					250				
					500				
Idrossido di sodio (NaOH)	MHT	Allevamento in laboratorio	9	12,5*	50		20 ml	*2 ore, 7 giorni	
				12,5* (abbassato a 7 tramite CO ₂)					
			8	12,5	250		20 ml	3 ore, 7 giorni	
	MHT + Raceway		7	11,5	500	45 ml	Reattor e da 3L	2 ore, 13 giorni	
	Raceway		7		150	65 ml		2 ore, 7 giorni	
	MHT			7		250	2 mg/l	20 ml	

Acido peracetico (PAA)		Allevamento in laboratorio	7,5			4 mg/l		2 ore, 4 giorni
						15 mg/l		
						30 mg/l		
						0,19 mg/l		1 ora, 4 giorni
						0,38 mg/l		
						0,77 mg/L		

3.8.3 DETERMINAZIONE DELLA SOGLIA CRITICA ALGHE/ROTIFERI

Per definire una soglia del rapporto tra la densità di alghe e quella dei rotiferi oltre la quale i rotiferi possono creare problemi effettivi alla coltura algale si sono aggiunti inoculi di rotiferi a concentrazioni scalari in colture algali a diverse densità, come riportato in Tabella 3. Per ogni prova sono state effettuate tre repliche, in beute da 100 ml. Le alghe insieme ai rotiferi provenivano dal raceway, alimentato col 40% di digestato; le performance di crescita sono state confrontate con i triplicati senza la presenza dei rotiferi (controlli). Le condizioni valutate sono state (Tabella 3):

- Densità Algali (Preda): 10^4 , 10^5 e 10^6 cell/mL
- Densità Rotiferi (Predatore): 100, 500 e 1000 ind/mL.
- Controllo: Colture algali alle medesime densità (10^4 , 10^5 e 10^6 cell/mL) in assenza di rotiferi.

Durante le prove sono state misurate la densità ottica (680 nm), l'efficienza fotosintetica, la densità algale e dei rotiferi e il pH.

Tabella 3. Condizioni delle prove.

Concentrazione iniziale delle alghe	Rotiferi/ml	Durata	Alghe/Rotiferi
10^6	100	7 giorni	1,00E+04
10^5	100	7 giorni	1,00E+03
10^6	300	10 giorni	3,33E+03
10^4	150	8 giorni	6,67E+01

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 MONITORAGGIO DEI ROTIFERI NELL'IMPIANTO PILOTA DEL POLO DELLE MICROALGHE

In Figura 11 è riportato l'andamento temporale delle specie di rotiferi monitorate nel periodo compreso tra ottobre 2025 e marzo 2026. Come si può osservare, l'abbondanza complessiva dei rotiferi ha subito un marcato calo nel mese di dicembre 2025, per poi aumentare nuovamente verso la fine del periodo di campionamento. Tale diminuzione è probabilmente riconducibile al calo delle temperature durante il periodo invernale.

Fino alla fine di novembre 2025, la specie predominante nell'impianto è stata quella appartenente al gruppo dei Bdelloidea, mentre nei mesi più freddi, da dicembre 2025 fino all'inizio di marzo 2026, la specie prevalente è risultata essere *Brachionus quadridentatus*. Successivamente, fino al termine del periodo di monitoraggio, i Bdelloidea sono tornati a rappresentare il gruppo più abbondante.

Complessivamente sono state effettuate 15 osservazioni nel periodo considerato per il monitoraggio. Per queste analisi è stato possibile effettuare un numero limitato di campionamenti, poiché, con l'avanzare della stagione invernale, l'impianto Raceway ha smesso progressivamente di funzionare. Pertanto, i risultati ottenuti devono essere considerati preliminari e forniscono esclusivamente una prima indicazione dell'andamento della comunità di rotiferi nel periodo di studio

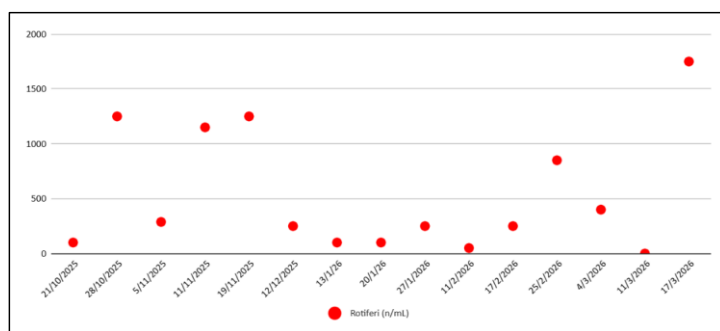


Figura 11. Monitoraggio temporale dei rotiferi nell'impianto Pilota del Polo delle Microalghe

4.2 CONFRONTO TRA DIVERSI AGENTI CHIMICI

4.2.1 Ipoclorito di sodio

Nella prima prova eseguita in MHT con aggiunta di 0,28 mg/L di ipoclorito di sodio (pari a 0,133 mg/L di Cl) alla sospensione algale cresciuta su medium sintetico nel reattore MHT dopo 2 giorni dal trattamento i rotiferi risultavano assenti nei trattati, ma anche nei controlli la densità era bassissima, come riportato in Figura 12. L'attività fotosintetica ha determinato un innalzamento del pH che, dopo 2 giorni, era passato da 8,3 A 11,70 in entrambi i casi. Le buone condizioni della coltura sono confermate dai valori dell'assorbanza che è rimasta invariata (Fig. 13).

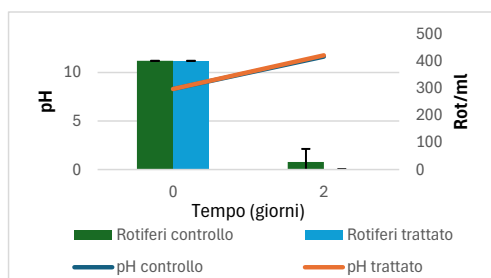


Figura 12. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con ipoclorito di sodio (rotiferi trattato) e andamento del pH nel controllo e trattato.

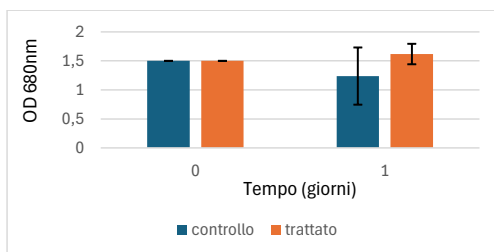


Figura 13. Andamento della densità algale nel tempo nel controllo rispetto ai campioni trattati con ipoclorito di sodio.

Nella seconda prova eseguita sulla coltura del reattore MHT si sono saggiate le stesse condizioni della prima. I rotiferi sono diminuiti in misura meno marcata. Il pH, che inizialmente era di 6,42, dopo 3 giorni era aumentato a 7,14 sia nei controlli che nei trattati come riportato in Figura 14. Anche in questo caso la densità algale, inizialmente inferiore a quella della prova precedente, si è mantenuta invariata dopo 3 giorni, come indicato in Figura 15. Si può dedurre che l'ipoclorito non abbia avuto alcun effetto.

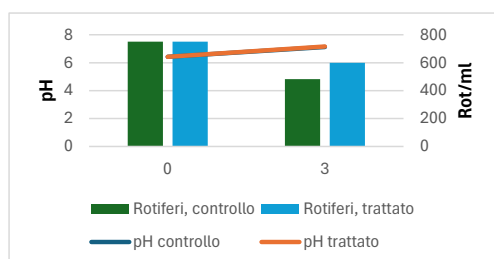


Figura 14. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con ipoclorito di sodio (rotiferi trattati) e andamento del pH nel controllo e trattato.

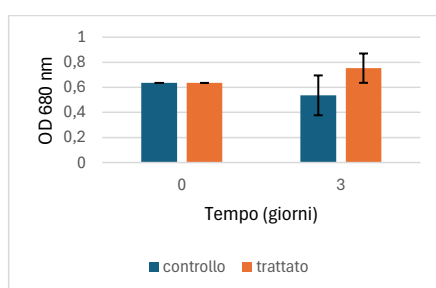


Figura 15. Andamento della densità algale nel tempo nel controllo rispetto ai campioni trattati con ipoclorito di sodio.

Nella prima prova eseguita sulla sospensione algale prelevata dal raceway con aggiunta di ipoclorito di sodio, i rotiferi sono variati lievemente in diminuzione nei controlli e in aumento nei trattati, ma senza differenze significative in quelle in presenza della sostanza testata, mentre il pH è aumentato, come riportato in Figura 16. Anche la densità algale è rimasta sostanzialmente invariata (Figura 17)

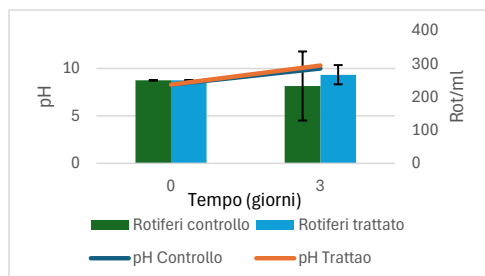


Figura 16. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con ipoclorito di sodio (rotiferi trattati) e andamento del pH nel controllo e trattato.

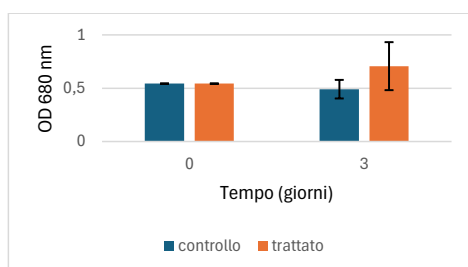


Figura 17. Andamento della densità algale nel tempo nel controllo rispetto ai campioni trattati con ipoclorito di sodio.

Nella seconda prova eseguita sulla sospensione algale prelevata dal raceway con aggiunta di ipoclorito di sodio in tutti i reattori i rotiferi sono aumentati dopo 1 giorno e diminuiti dopo 3 giorni fino ad una quasi totale scomparsa nei trattati. Il pH è aumentato, come riportato in Figura 18, da 8,3 a 10,17 dopo 1 giorno nei controlli e da 8,3 a 10,14 nei trattati. Dopo 3 giorni, il pH è aumentato a 11,47 nei controlli e 11,8 nei trattati. La densità algale è aumentata, pur senza variazioni significative (Figura 19).

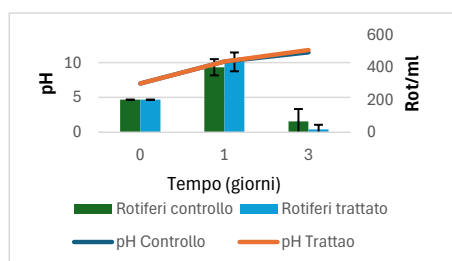


Figura 18. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con ipoclorito di sodio (rotiferi trattati) e andamento del pH nel controllo e trattato.

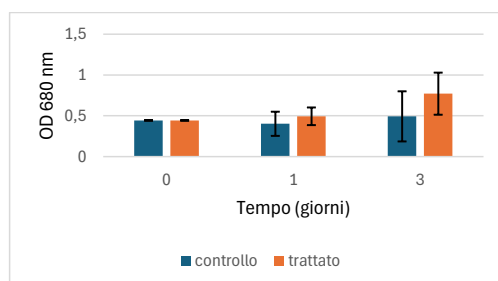


Figura 19. Andamento della densità algale nel tempo nel controllo rispetto ai campioni trattati con ipoclorito di sodio.

Nell'ultima prova eseguita sulla sospensione algale prelevata dal raceway con aggiunta di ipoclorito di sodio, dopo 4 giorni i rotiferi sono scomparsi nei controlli e aumentati nei trattati. In verità l'aumento è stato contenuto ma è aumentata moltissimo la variabilità tra le repliche (Figura 20). La densità algale è rimasta sostanzialmente invariata (Figura 21), ma anche in questo caso è aumentata la variabilità tra le repliche e il pH è aumentato in misura maggiore nei controlli (partendo da un pH 7 è arrivato a 12,37) che nei trattati (anche loro sono partiti da un pH 7 e al quarto giorno il valore è stato di 11,37).

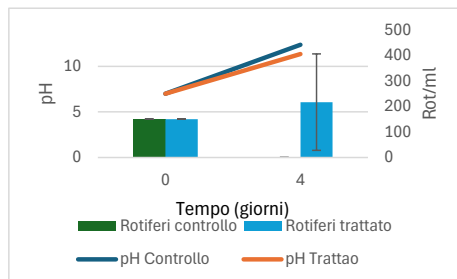


Figura 20. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con ipoclorito di sodio (rotiferi trattati) e andamento del pH nel controllo e trattato

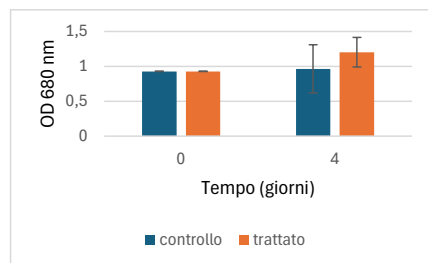


Figura 21. Andamento della densità algale nel tempo nel controllo rispetto ai campioni trattati con ipoclorito di sodio.

4.2.2 Urea

I risultati delle prove condotte con l'urea sono riportati in Figura 22 in termini di velocità del tasso di crescita dei rotiferi nei controlli e nei trattati. Il numero di rotiferi è infatti aumentato nei tre giorni di prova.

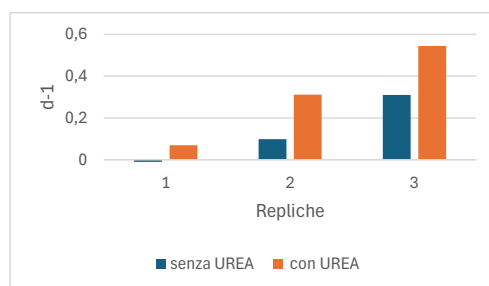


Figura 22. Velocità di crescita dei rotiferi nel controllo rispetto a quelli trattati con l'urea

4.2.3 Soda

Dati gli esiti delle prove con ipoclorito di sodio, in cui l’effetto sui rotiferi sembrava attribuibile più alla variazione di pH (legata all’attività fotosintetica) che all’aggiunta del disinfettante si è deciso di allestire una serie di prove in cui il pH veniva innalzato mediante aggiunta di NaOH nelle alghe provenienti sia dalla sospensione algale del Raceway e sia dalla sospensione algale MHT. In quest’ultima i rotiferi aggiunti provenivano dall’allevamento presso il laboratorio del DISAT dell’Università di Milano Bicocca. Le prime prove sono state effettuate con alghe provenienti dal MHT in beuta e successivamente sono stati utilizzati i fotobioreattori.

Nella prima prova rotiferi sono aumentati nelle repliche in assenza di NaOH, mentre in quelle contenenti NaOH i rotiferi sono rimasti assenti fintanto che il pH è rimasto superiore a 12, partendo da un valore di 9. Il terzo giorno il pH è diminuito da 12 a 10,3 nei trattati e salito da 9 a 9,7 nei controlli, probabilmente perché nei controlli sia la densità algale e sia l’assorbanza hanno avuto valori maggiori rispetto ai trattati; infatti, la conta algale nei controlli al terzo giorno era di 4,13E+06, mentre nei trattati di 2,52E+06. L’Assorbanza nei controlli è stata misurata a 2,48, a fronte del valore 1,721 nei trattati. La conta dei rotiferi ha mostrato una maggior variabilità tra le repliche, come riportato in Figura 23. La velocità di crescita delle alghe è aumentata ma non ha mostrato una significativa differenza tra i controlli e le trattati.

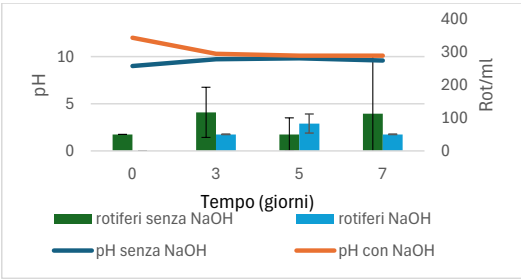


Figura 23. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con NaOH (rotiferi trattato) e andamento del pH nel controllo e trattato.

Nella seconda prova il pH, inizialmente pari a 9, è stato innalzato a 12 con aggiunta di NaOH nei trattati. Dopo 10 minuti, è stata aggiunta CO₂ per neutralizzare il pH. I rotiferi sono scomparsi non appena il pH è salito a 12 ma una volta riportato al valore di 7 hanno ripreso a proliferare (Fig. 24). Come nella prova precedente la velocità di crescita algale è aumentata senza una significativa differenza tra le beute in assenza e in presenza di NaOH.

ha formattato: Tipo di carattere: (Predefinito) Times New Roman, 12 pt, Colore carattere: Automatico, Legature: Standard + Contestuali

Commentato [VM1]: il grafico riporta dati diversi

Commentato [AG2R1]: Per vedere il ph iniziale bisogna guardare i controlli. I trattati sono passati al t0 in 10 minuti da ph 9 a 12 e poi 7

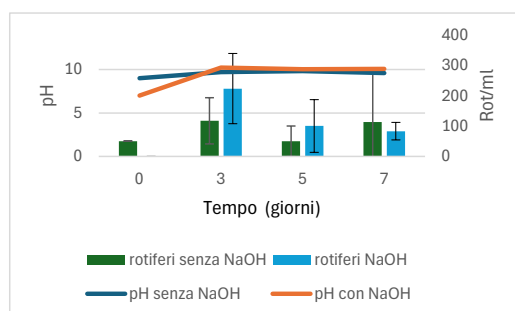


Figura 24. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con NaOH (rotiferi trattato) e andamento del pH nel controllo e trattato.

La prova è stata ripetuta una terza volta, ma il pH, inizialmente pari a 8 è stato portato a 12,5 e mantenuto tale per 3 ore, senza aggiungere altro NaOH. La velocità di crescita algale alla fine di questa prova non ha mostrato una significativa differenza tra i controlli e i trattati. Come mostrato in Figura 25, fintanto che il pH è rimasto alto, quindi pari al valore di 12,5, i rotiferi sono rimasti significativamente più bassi rispetto alle repliche senza NaOH, ma non appena il valore del pH è sceso a 10,81 al secondo giorno, fino al valore di 10,47 l'ultimo giorno della prova, i rotiferi sono tornati a proliferare.

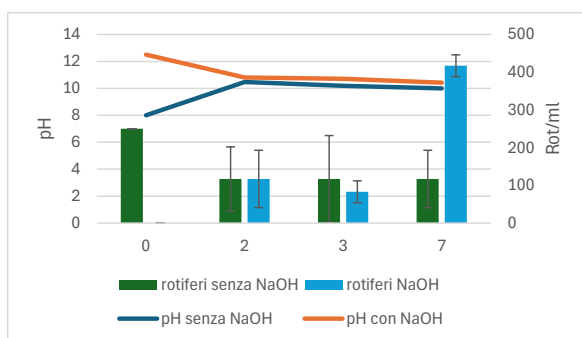


Figura 25. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con NaOH (rotiferi trattato) e andamento del pH nel controllo e trattato

È stata poi effettuata un'ultima prova in beuta mantenendo per 2 ore il pH, originariamente pari a 9,41, a 12,5. La velocità di crescita algale alla fine di questa prova non ha mostrato una significativa differenza tra i controlli e i trattati.

Come mostrato in Figura 26, nella coltura algale senza NaOH il valore del pH è sceso da 9,41 a 7,78, mentre in quella in cui l'NaOH è presente il valore del pH è passato da 12,5 a 8,89; i rotiferi sono scomparsi quando il pH nei trattati è stato innalzato a 12,5, in seguito i hanno incominciato a proliferare non appena il valore del pH è sceso a 11,24. In entrambe le colture algali la diminuzione del valore del pH ha portato alla proliferazione dei rotiferi.

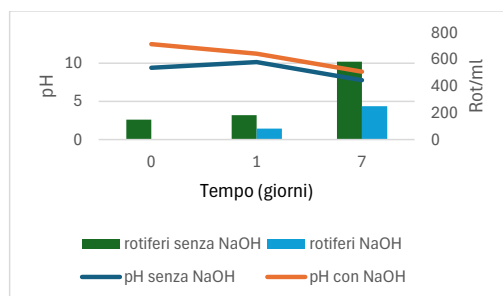


Figura 26. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con NaOH (rotiferi trattati) e andamento del pH nel controllo e trattato

Si è infine sperimentato l'innalzamento del pH mediante aggiunta di NaOH in volumi maggiori, nei fotobioreattori da banco descritti nel paragrafo 3.2. Sono state utilizzate alghe provenienti sia dalla sospensione algale del Raceway e sia dalla sospensione algale MHT e la sospensione algale stata inoculata con rotiferi, in quest'ultima i rotiferi aggiunti provengono dall'allevamento presso il laboratorio del DISAT.

Nella prima prova il pH, inizialmente pari a 7, è stato innalzato a 11,5 tramite l'aggiunta di 45 ml di NaOH e mantenuto a tale livello fino al nono giorno della prova, quando la coltura algale ha dato segni di sofferenza (flocculazione) sebbene la conta cellulare fosse rimasta elevata (Fig. 27). Quando il pH è tornato a valore neutro le alghe si sono riprese (Fig. 28)

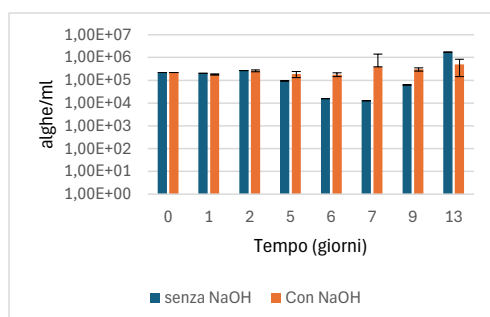


Figura 27. Andamento della concentrazione algale nei controlli rispetto a quella nei trattati con NaOH

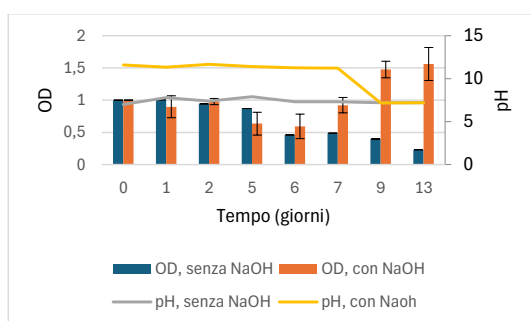


Figura 28. Densità algale nel controllo rispetto a rotiferi trattati con NaOH (rotiferi trattato) e andamento del pH nel controllo e trattato

I rotiferi sono rimasti assenti fintanto che il pH è rimasto al valore di 11,6 (Fig. 29) e hanno incominciato a profilare non appena il valore del pH è sceso al valore neutro.

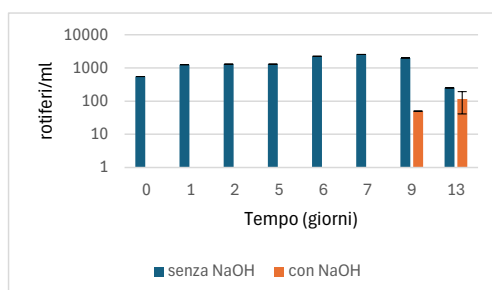


Figura 29. Andamento dei rotiferi nei controlli e nei trattati con NaOH

La velocità di crescita delle alghe è stata superiore nei controlli che nei trattati (Fig. 30).

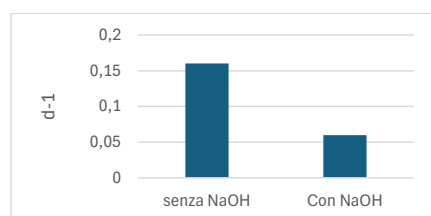


Figura 30. Velocità di crescita algale nei controlli e nei trattati con NaOH

La misura dell'attività fotosintetica (Fig. 31) mostra un aumento sia nei controlli che nei trattati dopo 2 giorni e un drastico calo nei controlli dopo 7 giorni

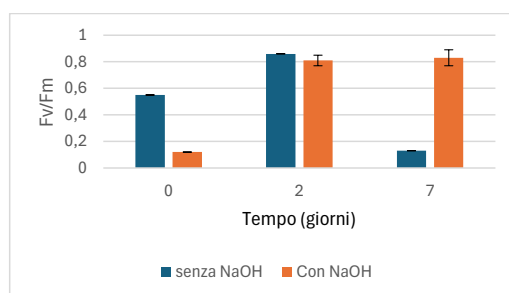


Figura 31. Andamento dell'attività fotosintetica nei controlli e in quelli trattati con NaOH.

Nella seconda prova nei reattori con l'NaOH, il pH è stato mantenuto costante a 11,5 per 7 giorni mediante l'aggiunta di 65 ml di NaOH totali, venivano aggiunti 5 ml in maniera costante ogni 5 minuti. L'assorbanza è rimasta costantemente superiore nei controlli rispetto ai trattati nei quali, inoltre, è aumentata fortemente la variabilità tra le repliche (Figura 32). La conta algale è rimasta elevata e sostanzialmente analoga nei controlli e nei trattati (Figura 33)

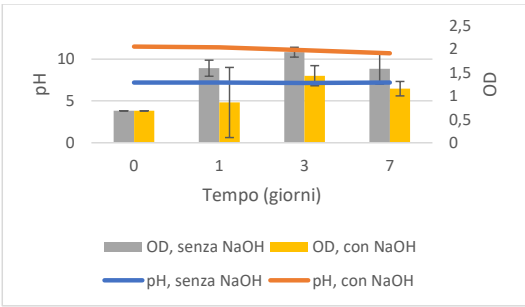


Figura 32. Concentrazione di rotiferi nel controllo rispetto a rotiferi trattati con NaOH (rotiferi trattato) e andamento del pH nel controllo e trattato

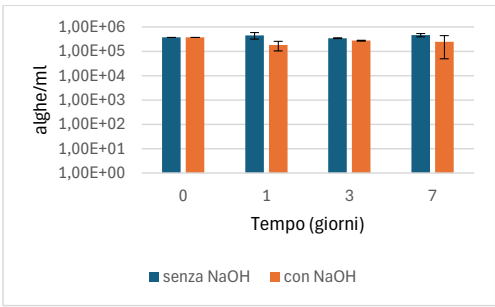


Figura 33. Andamento della concentrazione algale nei controlli e nei trattati

In Figura 34 si può notare come i rotiferi siano rimasti assenti nei reattori a pH 11,5

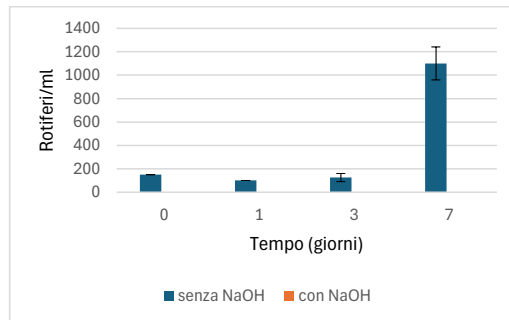


Figura 34. Andamento dei rotiferi nei controlli e in quello in presenza di NaOH.

In Figura 35 sono riportati i dati della regressione sui risultati ottenuti con l'ipoclorito di sodio e l'NaOH.

Per quanto riguarda la prova con l'ipoclorito di sodio la correlazione di Pearson ha ottenuto un valore di -0,96 mentre il p-value ($< 0,05$) del test di regressione ha ottenuto un valore di $9,77E-06$.

Nel test di regressione nella prova con NaOH la correzione di Pearson ha ottenuto un valore di -0,76 e il valore del p-value ($< 0,05$) pari a 0,0037.

L'indice di correlazione di Pearson, calcolato per entrambe le prove, evidenzia una forte correlazione negativa tra il valore del pH e il numero di rotiferi, suggerisce a priori che all'aumentare del valore del pH il n numero dei rotiferi diminuisca, secondo i dati ottenuti la correlazione negativa è più forte tra i rotiferi e l'ipoclorito di sodio, rispetto a quella con i rotiferi e l'NaOH. Tale supposizione viene poi confermata dall'analisi per regressione, la quale indica che i modelli rappresentati risultano entrambi statisticamente significativi (p-value $< 0,05$), ma maggiormente significativo per la prima correlazione rispetto a quella tra rotiferi e la soda. Le variazioni del pH possono spiegare la variabilità osservata nel numero di rotiferi.

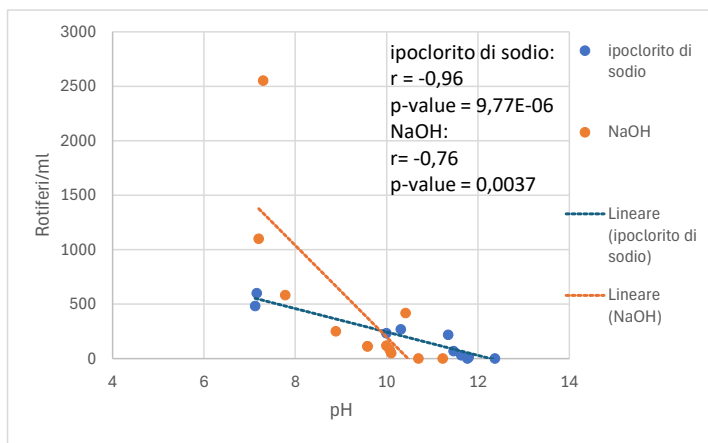


Figura 35. Regressione tra i rotiferi e l'ipoclorito di sodio (linea blue), e regressione tra rotiferi e la soda (linea arancione)

4.2.4 Acido peracetico

Infine, è stato testato l'acido peracetico (PAA) a diverse concentrazioni. La prima prova ha previsto concentrazioni di: 30 mg/L, 15 mg/L, 4mg/L e 2 mg/L. Come si osserva in Figura 36 (conta algale) e in Figura 37 (densità ottica) le alghe hanno risentito lievemente del trattamento dopo 1 giorno, ma dopo 4 giorni le dosi più elevate ne hanno determinato la morte.

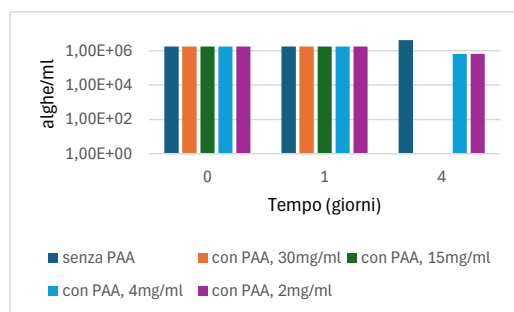


Figura 36. Andamento della coltura algale nei controlli rispetto a quelli trattati con PAA

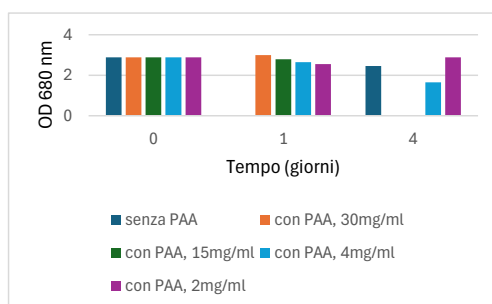


Figura 37. Andamento della densità algale nei controlli rispetto a quelli trattati con PAA

Le dosi più elevate (15 e 30 mg/L) hanno portato all'acidificazione, mentre quelle più basse, non influenzando sull'attività delle alghe, hanno consentito l'aumento del pH (Figura 38)

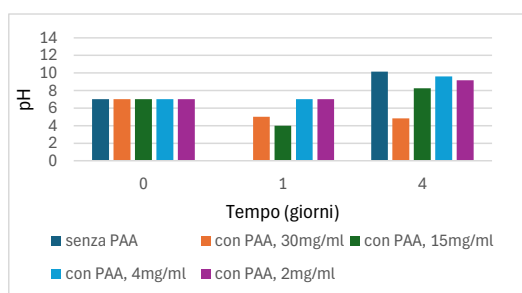


Figura 38. Andamento del pH nei controlli rispetto ai trattati con PAA

I rotiferi sono diminuiti con tutte le dosi ma scomparsi solo con le dosi più elevate che sono risultate tossiche per le alghe (Figura 39).

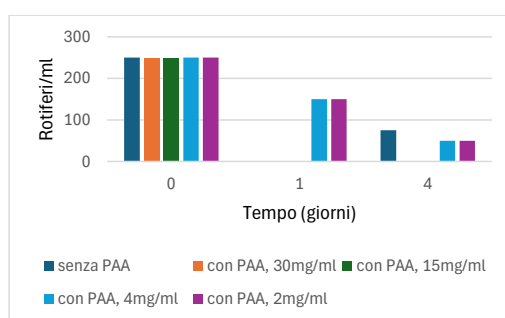


Figura 39. Andamento dei rotiferi nei trattati rispetto a quelli con PAA

È stata condotta un'ultima prova con il PAA diminuendo drasticamente le dosi, che sono state: 0,19 mg/L, 0,38mg/L e 0,77 mg/L. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti.

Il numero complessivo di alghe è rimasto invariato (Figura 40) e il pH è aumentato (Figura 41) per via dell'attività fotosintetica delle alghe (Figura 42)

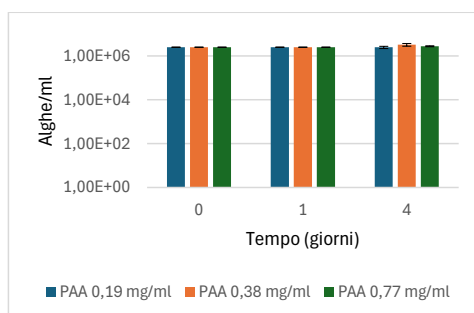


Figura 40. Andamento della coltura algale dei controlli rispetto a quelli contenuti PAA

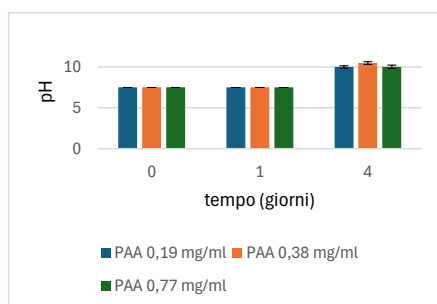


Figura 41. Andamento del pH dei controlli rispetto a quelli trattati con PAA

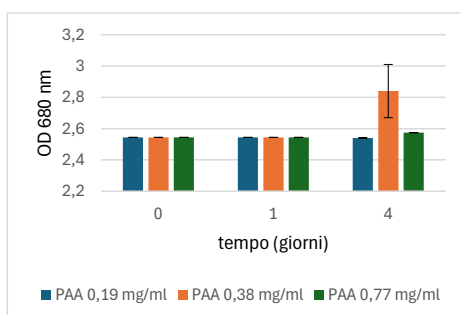


Figura 42. Andamento della densità algale nei controlli rispetto a quelli trattati con PAA

Infine, i rotiferi sono aumentati (Fig. 43). Si può dedurre che il PAA a queste concentrazioni sia inefficace contro i rotiferi e che non faccia nulla alla coltura algale.

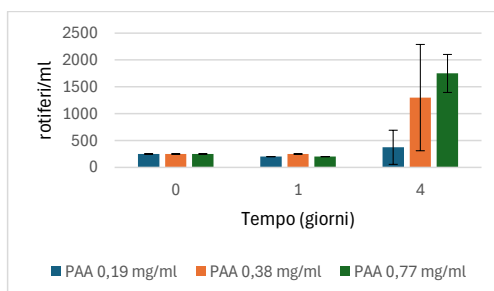


Figura 43. Andamento dei rotiferi nei controlli rispetto a quelli con PAA

4.3 DETERMINAZIONE DELLA SOGLIA CRITICA ALGHE/ROTIFERI

L'ultima parte dell'analisi si è incentrata sulla valutazione della soglia critica di crescita in concentrazioni diverse della coltura algale in presenza di differenti concentrazioni di predatori.

La prima prova ha previsto un'iniziale coltura algale di 10^6 alghe/ml. In due reattori sono stati aggiunti 100 rotiferi/ml, determinando un rapporto alghe/rotiferi di $1 \cdot 10^4$, mentre nei controlli i rotiferi non sono stati aggiunti.

L'andamento delle conte algali e della densità ottica è stato lo stesso in presenza e in assenza dei rotiferi (Figure 44 e 45)

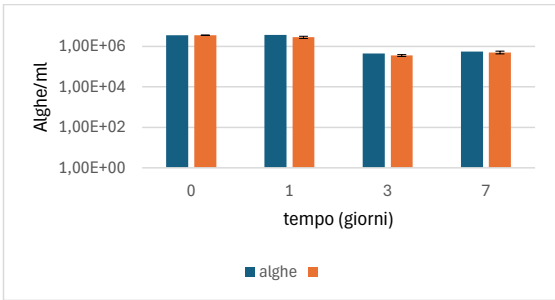


Figura 44. Andamento della coltura algale nei controlli rispetto a quelli con rotiferi

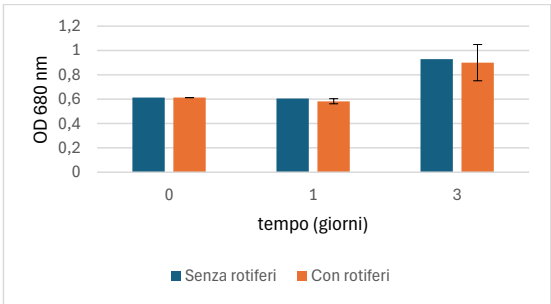


Figura 45. Andamento dell'assorbanza nei controlli rispetto a quelli con rotiferi

In Figura 46 è mostrato come il pH sia aumentato e contemporaneamente i rotiferi siano scomparsi. Ancora una volta si osserva come un aumento del pH porti alla scomparsa dei rotiferi. La presenza dei rotiferi non ha comunque inciso sulla coltura algale.

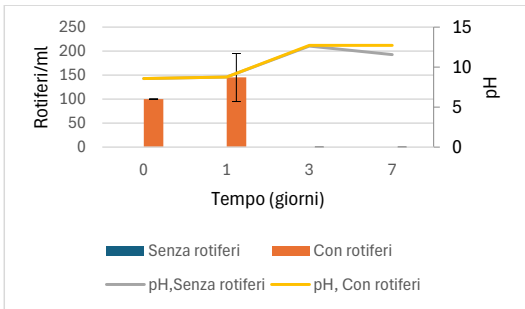


Figura 46. Andamento nel tempo nel controllo rispetto alle repliche con rotiferi e andamento del pH nel controllo e trattato

La seconda prova è iniziata con 10^6 alghe/ml alghe in presenza di 300 rotiferi/ml, con un rapporto alghe/rotiferi di $3,3 \cdot 10^3$.

Il numero delle alghe è rimasto invariato (Fig 47), a fronte di una velocità di crescita algale maggiore nei controlli, senza rotiferi

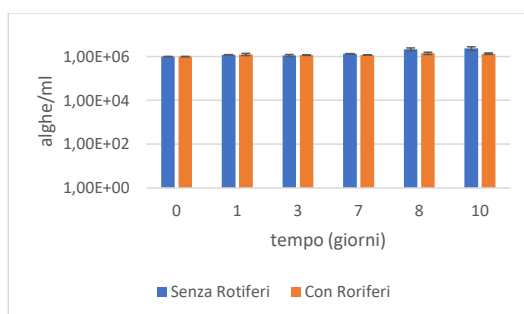


Figura 47. Andamento della crescita algale nei controlli rispetto a quelli in presenza di rotiferi

Il pH è aumentato in entrambi i casi così come l'assorbanza (Fig. 47 e Fig. 48). L'attività fotosintetica è anch'essa aumentata, segno di uno buono stato di salute delle alghe (Fig. 49).

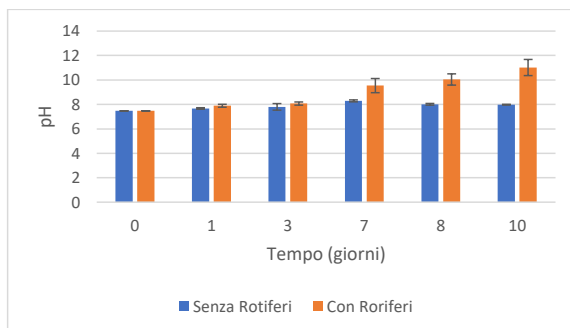


Figura 47. Andamento del pH nei controlli rispetto a quelli con rotiferi

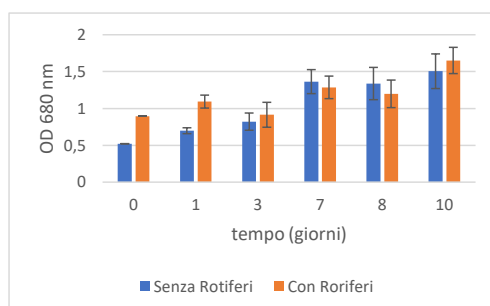


Figura 48. Andamento dell'assorbanza nei controlli rispetto a quelli con rotiferi

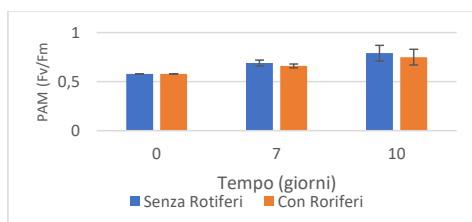


Figura 49. Andamento dell'attività fotosintetica nei controlli rispetto a quelli in presenza di rotiferi

I rotiferi sono rimasti assenti nei controlli e sono aumentati ove presenti a inizio prova (Fig. 50), fino a determinare un valore massimo del rapporto alghe/rotiferi $1,25 \cdot 10^3$. Senza che questo incidesse sulla coltura algale

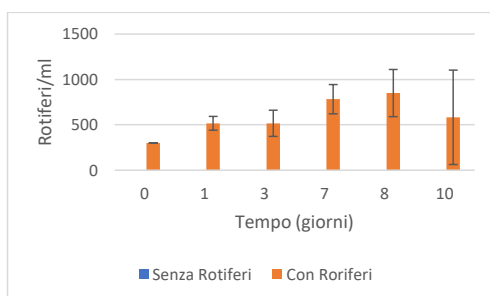


Figura 50. Andamento della crescita dei rotiferi nei controlli rispetto a quelli con rotiferi.

L'ultima prova della valutazione della soglia critica ha previsto una concentrazione iniziale di alghe pari a 10^4 alghe/ml a cui sono stati aggiunti 150 rotiferi/ml, che ha determinato un rapporto iniziale di $6,7 \cdot 10^1$ alghe/rotiferi.

La crescita algale è stata maggiore in presenza di rotiferi (Fig. 51). Anche il numero delle alghe è aumentato alla fine di questa prova (Figura 52).

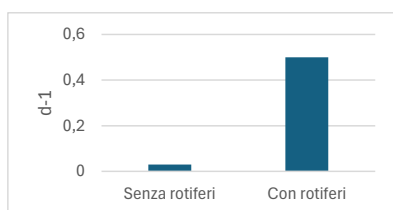


Figura 51. Tasso giornaliero di crescita algale nelle repliche senza rotiferi rispetto a quelle senza.

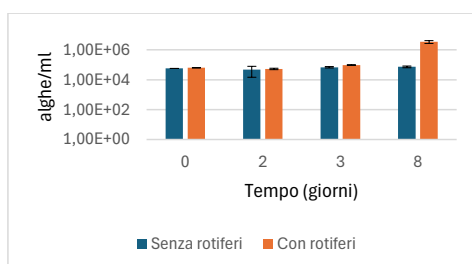


Figura 52. Andamento della coltura algale nelle repliche senza rotiferi rispetto a quelle con rotiferi

Il valore del pH è aumentato nelle repliche senza rotiferi, mentre in quelle con i rotiferi non ha mostrato variazioni (Fig. 53). L'assorbanza è stata generalmente molto bassa per tutta la prova, in relazione alla bassa densità cellulare; si è infine verificato un aumento sia nella conta algale sia nell'assorbanza (Figura 54) dopo 8 giorni in presenza di rotiferi.

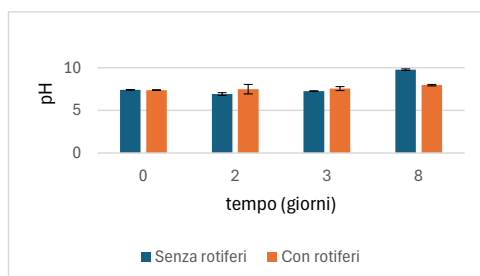


Figura 53. Andamento del pH nelle repliche controllo rispetto a quelle con rotiferi

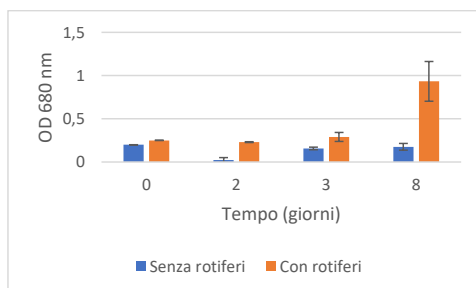


Figura 54. Andamento dell'assorbanza nei controlli e in quelli con rotiferi.

Infine, i rotiferi sono aumentati nelle repliche che già li contenevano, mentre nelle altre sono comparsi solo l'ultimo giorno, probabilmente per contaminazione da parte dei reattori che li contenevano (Fig. 55).

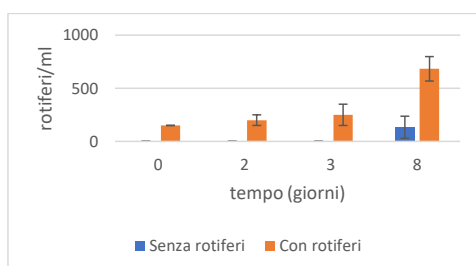


Figura 55. Andamento dei rotiferi

In definitiva, nelle condizioni saggiate non si è individuata una soglia critica del rapporto tra alghe e rotiferi e la presenza di questi ultimi non ha causato problemi alla coltura.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, mostrano che solamente l'innalzamento del pH porta alla scomparsa dei rotiferi nella coltura algale. L'urea non danneggia i rotiferi ma ha effetti negativi sulle alghe e l'acido peracetico è efficace solo a dosi altissime, improponibili anche per motivi tecnico economici, che danneggiano le alghe.

L'effetto del pH è correlato all'aumento effettivo di circa 4 unità di pH e deve essere mantenuto per almeno 3 ore. A seguito del trattamento, i rotiferi sono stati eliminati, mentre la coltura algale ha mantenuto un'elevata densità cellulare e attività fotosintetica.

È peraltro possibile che, quando il pH si riabbassa per qualche ragione, i rotiferi tornino a proliferare, probabilmente perché quelli che riescono a sopravvivere al trattamento formano delle cisti, forme di resistenza, adattate a condizioni ambientali molto variabili, difficili da rilevare ed eliminare. Il quantitativo di NaOH necessario per il trattamento non risulta essere eccessivo sia in laboratorio (45-65 ml di NaOH 1 M in 3 L di coltura) e neanche in sistemi di coltivazioni algali più grandi, in cui il volume di NaOH deve essere rapportato al quantitativo di alghe.

La ricerca della soglia critica per il rapporto alghe/rotiferi ha indicato che anche per valori molto bassi del rapporto alghe rotiferi (dell'ordine di 10) la coltura non mostrava segni di sofferenza. Va tra l'altro osservato che si tratta di condizioni estreme in una coltura algale dove, in genere, la conta algale è almeno di un ordine di grandezza superiori.

In definitiva, sembra che la presenza di predatori abbia effetti negativi solo quando la coltura algale è sofferente per qualche altra ragione (presenza di sostanze tossiche, carenza di nutrienti, temperatura troppo bassa o troppo alta, insufficiente o eccessiva illuminazione).

BIBLIOGRAFIA

- Afi L *et al.* Bacterial degradation of green microalgae: Incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. *Org. Geochem.* 1996; 25, 117–130.
- Álvarez-González A *et al.* Exploring the biostimulant potential of *Scenedesmus* sp. grown in wastewater: impacts on plant growth and photosynthetic activity of lettuce. *Chemosphere.* 2025; 382.
- Amin SA *et al.* Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature.* 2015; 522, 98–101.
- Anderson DM *et al.* Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries.* 2022; 25, 704–726.
- Antón A *et al.* Decoupled effects (positive to negative) of nutrient enrichment on ecosystem services. *Ecol. Appl.* 2011; 21: 991–1009.
- Apel AC e Weuster-Botz D. Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015; 38, 995–1008.
- Arora M e Sahoo D. Growth Forms and Life Histories in Green Algae. *The Algae World. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology.* 2015; vol 26.
- Azeem M *et al.* Harnessing natural colorants from algal species for fabric dyeing: a sustainable eco-friendly approach for textile processing. *J Appl Phycol.* 2019; 31, 3941–3948.
- Balaji-Prasath B *et al.* Methods to control harmful algal blooms: a review. *Environ Chem Lett.* 2022; 20, 3133–3152.
- Bauer L *et al.* Digestate as Sustainable Nutrient Source for Microalgae—Challenges and Prospects. *Applied Sciences.* 2021; 11(3):1056.
- Benderliev KM *et al.* Fungicide effect of Triton-N on *Phlyctidium*. *Biotechnol. Tech.* 1993; 7, 335–338.
- Berry JP *et al.* Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Mar Drugs.* 2008; 15: 117-146.
- Bickford D *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution.* 2007; volume 22, Issue 3, 148 – 155.

Botes M *et al.* Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405, 91–108.

Brabrand A *et al.* Biological control of undesirable cyanobacteria in culturally eutrophic lakes. *Oecologia*. 1983; 60, pp. 1-5.

Brennan L e Owende P. Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010; 14: 557–577.

Brown M R *et al.* Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 1997; 151: 315–331.

Bruning K. Effects of phosphorus limitation on the epidemiology of a chytrid phytoplankton parasite. *Freshw Biol.* 1991; 25:409–417.

Brussaard CPD. Viral control of phytoplankton populations – a review. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2004; 51, 125–138.

Busi *et al* M.V. Starch metabolism in green algae. *Starch*. 2014; 66: 28-40.

Cairns SD. Species richness of recent Scleractinia. 1999: 1-12.

Cardinale BJ *et al.* Perdita di biodiversità e il suo impatto sull'umanità. *Nature*. 2012; 486: 59 – 67.

Carney LT e Lane TW. Parasites in algae mass culture. *Front Microbiol.* 2014; 6: 5:278.

Catalanotti C *et al.* Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Front. Plant Sci.* 2013; 4:150.

Chambouvet A *et al.* Interplay between the parasite *Amoebophrya* sp. (Alveolata) and the cyst formation of the red tide dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea*. *Protist*. 2011, 162, 637–649.

Chen F e Suttle CA. Amplification of DNA polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61.

Chiaiese P *et al.* Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Front. Plant Sci.* 2018; 9:1782.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007; 25, 294–396.

Cooper MB e Smith AG. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015; 26, 147–153.

Cornwall CE *et al.* Inorganic carbon physiology underpins macroalgal responses to elevated CO₂. *Scientific Reports*. 2017; 7, 46297.

Croft MT *et al.* Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 2005; 438: 90–93.

Damiani MC *et al.* Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behavior during cyst germination. *Phycologia*. 2006; 45, 616–623.

Day JG *et al.* Early detection of protozoan grazers in algal biofuel cultures. *Bioresour. Technol.* 2012; 114, 715–719.

Day JG. Grazers: the overlooked threat to the sustained production of future algal biofuels. *Biofuels* 2013; 4, 459–461.

de Souza FA *et al.* PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Accurate and Sensitive Method To Assess Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus *Gigaspora*. *Appl Environ Microbio.* 2004; 170.

Doan TN *et al.* Inhibition of bacterial RNA polymerase by the cyanobacterial metabolites 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 196: 135–139.

EABA. What are Algae? #1 Position Paper – June 2019.

Falkowski PG e Raven JA. *Aquatic Photosynthesis* (2nd ed.). Princeton University Press, 2007

Faruk UJ *et al.* The Role of Algae in Sustainable Environment: A Review. *J. Algal Biomass Utiln.* 2020; 11(2): 28–34.

Ficara E *et al.* Le microalghe e la loro integrazione negli impianti di digestione anaerobica. Politecnico di Milano, 2015.

Flynn KJ *et al.* Minimising losses to predation during microalgae cultivation. *J Appl Phycol.* 2017; 29, 1829–1840.

Forget N *et al.* Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry. *Journal of Biological Education.* 2010; 44(4), 185–189.

Fott B. *Phlyctidium scenedesmi* spec. nova, a new chytrid destroying mass cultures of algae. *Z. Allg. Mikrobiol.* 1967; 7, 97–102.

Fravel DR. Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2005; 43, 337–359.

Gachon CM *et al.* Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci.* 2010; 15, 633–640.

Gantar M *et al.* Allelopathic activity among cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 64: 55-64.

Garcia-Martinez JB *et al.* The Circular Economy Approach to Improving CNP Ratio in Inland Fishery Wastewater for Increasing Algal Biomass Production. *Water.* 2022; 14,749.

Gerphagnon M *et al.* A double staining method using SYTOX green and calcofluor white for studying fungal parasites of phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79, 3943–3951.

Gleason FH *et al.* The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biol. Rev.* 2008; 22, 17–25.

Gleason FH *et al.* Ecological potentials of species of *Rozella* (Cryptomycota). *Fungal Ecol.* 2012; 5, 651–656.

Granéli E e Flynn KJ. Chemical and physical factors influencing toxin content. *Ecology of harmful algae.* 2006; pp 229–241.

Granéli E *et al.* The ecophysiology and bloom dynamics of *Primnesium spp.* *Harmful Algae.* 2012; 14: 260-270.

Gross EM. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Crit Rev Plant Sci.* 2003; 22: 313-339.

Gurung TB *et al.* Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquat. Microb. Ecol.* 1999; 17, 27–35.

Gutman J *et al.* The host range of *Paraphysoderma sedebokerensis*, a chytrid that infects *Haematococcus pluvialis*. *Eur. J. Phycol.* 2009; 44, 509–514.

Hagmann L *et al.* A Novel Photosystem-II-inhibiting Allelochemical of the Cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. *Tetrahedron Lett.* 1996; 37 (36): 6539-6542.

Halim R *et al.* Cell Walls of Lipid-Rich Microalgae: A Comprehensive Review on Characterisation, Ultrastructure, and Enzymatic Disruption. *Fermentation.* 2024; 10, 608.

Harun R *et al.* Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2010; 14: 1037–1047.

- Harwood JL e Guschina IA. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*. 2009; 91(6):679-84.
- He Q *et al*, Critical assessment of protozoa contamination and control measures in mass culture of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresour Technol*. 2022; 359:127460.
- Hegewald EH. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. *Algae*. 1997; 12(4), 235–246.
- Herrero M *et al*. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*. 2006; 98: 136–148.
- Hess S *et al*. Shedding light on vampires: the phylogeny of Vampyrellid amoebae revisited. *PLoS ONE*. 2012; 7, e31165.
- Holm ER *et al*. Sonication of bacteria, phytoplankton and zooplankton: application to treatment of ballast water. *Mar. Pollut. Bull*. 2008; 56, 1201–1208.
- Hu Q *et al*. Effects of light intensity, light path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Eur J Phycol*. 1998; 33: 165-171.
- Ianora A *et al*. The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: an emerging field. *Mar Drugs*. 2011; 9: 1625-1648.
- Jacquet S *et al*. First description of a cyanophage infecting the cyanobacterium *Arthrospira platensis* (Spirulina). *J. Appl. Phycol*. 2013; 25, 195–203.
- John D *et al*. The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae. Cambridge University Press. 2011.
- Jones AC *et al*. New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Curr Opin Chem Biol*. 2009; 13: 216-223.
- Juárez-Franco M e Sarma N. Population dynamics of *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Ostracoda, Cyprididae) in relation to diet type (algae and organic waste) and amount of food. *Crustaceana*. 2009; 82, pp. 743-752.
- Jüttner F e Wu JT. Evidence of allelochemical activity in subtropical cyanobacterial biofilms of Taiwan. *Archiv für Hydrobiologie*. 2000; 147: 505-517.
- Kaloudas D *et al*. Phycoremediation of wastewater by microalgae: a review. *Environ Chem Lett*. 2021; 19, 2905–2920.

Kazamia E *et al.* Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ. Microbiol.* 2012; 14, 1466–1476.

Kearns KD e Hunter MD. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microb Ecol.* 2001; 42: 80-86.

Kim BH *et al.* Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass Bioenerg.* 2014; 69, 95–105.

Kim MK *et al.* Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresour Technol.* 2007; 98(11):2220-8.

Klein-Marcuschamer D *et al.* A matter of detail: assessing the true potential of micro-algal biofuels. *Biotechnol Bioeng.* 2013; 110 (9): 2317-2322.

Koch M *et al.* Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology.* 2013; 19(1), 103–132.

Kroeker KJ *et al.* Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters.* 2010; 13(11), 1419–1434.

Leliaert F *et al.* DNA-based species delimitation in algae. *Phycologia*, 2014; 53(4), 319-332.

Letcher PM *et al.* Characterization of *Amoeboaphelidium protococcarum*, an algal parasite new to the *Cryptomycota* isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel. *PLoS ONE.* 2013; 8: e56232.

Li W *et al.* *Oomycetes* and fungi: important parasites on marine algae. *Acta. Oceanol. Sin.* 2010; 5, 74–81.

Liebich V *et al.* Re-growth of potential invasive phytoplankton following UV-based ballast water treatment. *Aquat. Invasions.* 2012; 7, 29–36.

Liu ZG e Lu GL. The sterilizing studies of flagellate and ciliate in marine unicellular algae liquid. *Zhanjiang Aquacult. Coll.* 1990; 2: 36-41.

Lutzoni F *et al.* Lichens. *Current Biology*, 2009; volume 19, 13, R502 - R503.

Lytle CD e Sagripanti JL. Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *J. Virol.* 2005; 79, 14244–14252.

Macias FA *et al.* Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biol Sci Space.* 2003; 17(1):18-23.

Macías FA *et al.* Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models. *Phytochem Rev.* 2007; 7: 155-178.

Mason CP *et al.* Isolation of chlorine-containing antibiotic from the freshwater Cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. *Science.* 1982; 213 (4531): 400-402.

Mata TM *et al.* Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2010; 14: 217–232.

McDaniel LD. Viruses of cyanobacteria. In: Hurst, C.J. (Ed.), *Studies in Viral Ecology: Microbial and Botanical Host Systems*, vol. 1. 2005, pp. 169–187.

McMahon TA *et al.* Fungicide-induced declines of freshwater biodiversity modify ecosystem functions and services. *Ecol. Lett.* 2012; 15, pp. 714-722.

Mendes LBB e Vermelho AB. Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation. *Biotechnol. Biofuels.* 2013; 6:152.

Metfies K *et al.* An optimized protocol for the identification of diatoms, flagellated algae and pathogenic protozoa with phylochips. *Mol. Ecol. Notes.* 2007; 7, 925–936.

Molina-Grima E *et al.* Pathogens and predators impacting commercial production of microalgae and cyanobacteria. *Biotechnol Adv.* 2022; 55:107884.

Montemazzani *et al.* A review of potential methods for zooplankton control in wastewater treatment High-Rate Algal Ponds and algal production raceways. *Algal Research.* 2015; 211–226.

Montemazzani *et al.* Screening of potential zooplankton control technologies for wastewater treatment High-Rate Algal Ponds. *Algal Research.* 2017; volume 2, pages 1-13.

Montingelli ME *et al.* Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2015; 43, 961–972.

Msanne J *et al.* An assessment of heterotrophy and mixotrophy in *Scenedesmus* and its utilization in wastewater treatment. *Algal Research.* 2020; 48:101911.

Nancy N *et al.* Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science.* 2009; Volume 66, Issue 7, Pages 1528–1537.

Odum EP e Barrett GW. *Fondamenti di ecologia.* 2005; 592 pp.

Peña-Castro JM *et al.* Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresour Technol.* 2004;94(2):219-22.

Codice campo modificato

Piazzì L e d'Archino R. Macroalgal assemblages as indicators of the ecological status of marine coastal systems: A review. *Ecological Indicators*. 2021; 129, 107835.

Pirow R *et al.* The sites of respiratory gas exchange in the planktonic crustacean *Daphnia magna*: an in vivo study employing blood haemoglobin as an internal oxygen probe. *J. Exp. Biol.* 1999; 202, pp. 3089-3099.

Plaisance L *et al.* The Diversity of Coral Reefs: What Are We Missing? *Plos one*. 2011; 6(10).

Porzio L *et al.* Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011; 400 (1-2), 278-287.

Pouneva ID. Effect of abscisic acid and ontogenic phases of the host alga on the infection process in the pathosystem *Scenedesmus acutus*—*Phlyctidium scenenedesmi*. *ACTA Physiol. Plant.* 2006; 28, 395–400.

Prosser CL. *Comparative Animal Physiology*. Saunders. 1973.

Raghukumar C. Fungal parasites of marine algae from Mandapam (South India). *Dis. Aquat. Org.* 1987; 3, 137–145.

Ramanan, R *et al.* Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* 2016; 34, 14–29.

Ranglová K *et al.* Rapid screening test to estimate temperature optima for microalgae growth using photosynthesis activity measurements. *Folia Microbiologica*. 2019; 64(5), 615–625.

Rasconi S *et al.* Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Appl. Env. Microbiol.* 2009; 75, 2545–2553.

Rego D *et al.* Control of predators in industrial scale microalgae cultures with Pulsed Electric Fields. *Bioelectrochemistry*. 2015; volume 103, pages 60-64.

Rommel EJ e Hambright KD. Toxin-assisted micropredation: experimental evidence showsthat contact micropredation rather than exotoxicity is the role of Pymnesium toxins. *Ecol Lett.* 2012; 15: 126-132.

Richards TA *et al.* Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2012; 4, 495–522.

Rossi S. *et al.* Integrating microalgae growth in biomethane plants: Process design, modelling, and cost evaluation. *Heliyon*. 2024; 10(1).

Codice campo modificato

Codice campo modificato

Ruiz–Marin A *et al.* Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi–continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 58–64.

Saber AA *et al.* Cyanoprokaryotes and algae: classification and habitats, *Handbook of Algal Biofuels*. 2022; pages 1-38,

Salomon PS e Imai I. Pathogens of harmful microalgae. *Ecology of Harmful Algae, Ecological Studies*. 2006; pp. 271-282.

Santana CM *et al.* Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New Approaches. *Molecules*. 2009; 14: 298-320.

Sarker NK e Salam PA. Design of batch algal cultivation systems and ranking of the design parameters. *Energy. Ecol. Environ*. 2020; **5**, 196–210.

Sawant SS *et al.* Effect of hydrodynamic cavitation on zooplankton: a tool for disinfection. *Biochem. Eng. J.* 2008; 42, pp. 320-328.

Schnurr PJ e Allen DG. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Review*. 2015; 52, 418–429.

Shurin JB *et al.* All wet or dried up? Real differences between aquatic and terrestrial food webs. *Proc. R. Soc. B*. 2006; 273: pp. 1-9.

Shurin, JB *et al.* Industrial-strength ecology: trade-offs and opportunities in algal biofuel production. *Ecol. Lett.* 2013; 16, 1393–1404.

Sieracki CK *et al.* An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1998; 168, 285–296.

Simkovsky R *et al.* Impairment of O-antigen production confers resistance to grazing in a model amoeba–cyanobacterium predator–prey system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109, pp. 16678 – 16683.

Smol JP *et al.* Climate-driven regime shifts in the biological communities of arctic lakes. *Proc. Natl. Acad.* 2005; 102: 4397–402.

Smith VH e Crews T. Applying ecological principles of crop cultivation in large-scale algal biomass production. *Algal Research* Volume 4. 2014; Pages 23-34.

Stayton CT. What does convergent evolution mean? The interpretation of convergence and its implications in the search for limits to evolution. *Interface Focus*. 2015; 5: 20150039.

Codice campo modificato

Codice campo modificato

Stevenson R J *et al.* Ecological assessment and indicator development in wetlands: the case of algae in the Everglades, USA. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. 2002; 28: 1248–52.

Stevenson RJ *et al.* Assessing ecological conditions in rivers and streams with diatoms. In E. F. Stoermer & J. P. Smol [Eds.] *The Diatoms: Applications to the Environmental and Earth Sciences*. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 2010; pp. 57–85.

Stevenson RJ. Ecological assessments with algae: a review and synthesis, *J Phycol.* 2014; 50 (3): 437-61.

Codice campo modificato

Stoecker D *et al.* Phagotrophy in Harmful Algae. In *Ecological Studies, Ecology of Harmful Algae*. 189th edition. Edited by: Granéli E, Turner JT. Heidelberg. 2006; 177-187.

Suplee, MW *et al.* How green is too green? Public opinion of what constitutes undesirable algae levels in streams. *J. Am. Water Works Assoc.* 2008; 44: 1–18.

Teplitski e Rajamani. Signal and nutrient exchange in the interactions between soil algae and bacteria. *Biocommunication in Soil Microorganisms*. 2011; pp. 413–426.

Tillmann U. Interactions between Planktonic Microalgae and Protozoan Grazers. *J Eukaryot Microbiol.* 2004; 51(2):156-168.

Trainor FR. Reproduction in *Scenedesmus*. *Algae*. 1996;11(2):183-201.

Tran KC *et al.* Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Research*. 2014; 95-102

Tsolaki E e Diamadopoulos E. Technologies for ballast water treatment: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010; 85, 19–32.

Uduman N *et al.* Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 2010; 2: 012701.

Vanderploeg HA e Paffenhof G. Models of algal capture by the freshwater copepod *Diaptomus sicilis* and their relation to food-size selection. *Limnol Oceanogr.* 1985; 30: 871-885.

Van Donk *et al.* Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: a review. *Hydrobiologia*. 2011; 668, 3–19.

Wang B *et al.* CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008; 79: 707–718.

Wang H *et al.* The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresour Technol.* 2013; 128:745-50.

Webb R *et al.* Controlling wildlife fungal disease spread: *in vitro* efficacy of disinfectants against *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Mucor amphibiorum*. *Dis. Aquat. Organ.* 2012; 99, 119–125.

Weber RE e Vinogradov SN. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* 2001; 81, pp. 569-628.

Watson SB. Aquatic taste and odor: a primary signal of drinking-water integrity. *Tox. Environ. Health-Pt a-Curr.* 2004; Issues 67: 1779–1795.

Woo JH e Kamei Y. Antifungal mechanism of an anti-Pythium protein (SAP) from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 62, 407–413.

Zapalski MK. Is absence of proof a proof of absence? Comments on commensalism. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2011; 302, 484–488.