



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



REACT EU



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE, FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA
SPERIMENTALE – XXXVII CICLO PON
SSD BIOS-05/A

Produzione di biomassa microalgale e metaboliti in condizioni di illuminazione artificiale (LED) e loro potenzialità biotecnologiche

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Eleonora Agostino

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Concetta Gugliandolo

Co-Tutor:

Chiar.mo Prof. Vincenzo Zammuto

Coordinatore del corso di Dottorato:
Chiar.ma Prof.ssa Emanuela Esposito

Anno Accademico 2023/2024

INDICE	I-IV
RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Le microalghe	3
1.2 Caratteristiche dello spettro elettromagnetico della luce	6
1.2.1 Effetto della luce sulla produzione di biomassa microalgale e carotenoidi	6
<i>Effetto dello spettro della luce sulla produzione di biomassa microalgale</i>	8
<i>Effetto dell'intensità della luce sulla produzione di biomassa microalgale</i>	9
<i>Effetto dello spettro della luce sulla produzione di carotenoidi</i>	11
<i>Effetto dell'intensità della luce sulla produzione di carotenoidi</i>	11
1.2.2 Vantaggi dell'utilizzo di <i>Lighting Emitting Diode</i> (LED) per la coltivazione di microalghe	12
1.3 Metaboliti microalgali ad alto valore aggiunto	14
1.3.1 I carotenoidi	14
1.3.2 Metaboliti secondari estratti in etanolo	15
1.4 Utilizzo della biomassa microalgale nella <i>bioremediation</i> da metalli pesanti	17
 2. SCOPO DELLA TESI	 20
 3. MATERIALI E METODI	 22
3.1 Area di campionamento e raccolta dei campioni	22
3.2 Isolamento dei ceppi microalgali	22
3.3 Caratteristiche di crescita dei ceppi microalgali isolati	24
3.4 Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi microalgali isolati	25
3.4.1 Caratteristiche fenotipiche	25
3.4.2 Caratteristiche genotipiche	25
<i>Estrazione del DNA</i>	25
<i>Amplificazione del DNA</i>	26
3.5 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla crescita dei ceppi microalgali isolati	26
3.5.1 Lunghezze d'onda della luce: LED bianchi, blu e rossi	26
3.5.2 Intensità luminosa dei LED	27

3.5.3 Cinetica di crescita dei ceppi microalgali esposti a differenti condizioni di illuminazione	28
3.6 Valutazione della quantità di biomassa microalgale prodotta e del tasso di fissazione della CO ₂	29
3.7 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla produzione e composizione dei carotenoidi	29
3.7.1 Valutazione della presenza di carotenoidi mediante analisi spettroscopica <i>Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared</i> (ATR-FTIR)	29
3.7.2 Valutazione della produzione di carotenoidi mediante analisi spettrofotometrica	30
3.7.3 Estrazione dei carotenoidi	30
3.7.4 Caratterizzazione dei carotenoidi estratti mediante analisi cromatografica	31
3.8 Valutazione dell'attività biologica (antibatterica ed antibiofilm) di metaboliti secondari estratti in etanolo dalla biomassa microalgale ottenuta con differenti condizioni di illuminazione	32
3.8.1 Metaboliti secondari estratti in etanolo	32
3.8.2 Ceppi batterici patogeni	32
3.8.3 Valutazione dell'attività antibatterica dei metaboliti secondari estratti in etanolo	33
3.8.4 Valutazione dell'attività antibiofilm dei metaboliti secondari estratti in etanolo	33
3.9 Valutazione della capacità della biomassa microalgale secca di adsorbire e ridurre la tossicità di arsenico, mercurio e vanadio	34
3.9.1 Preparazione delle soluzioni	34
3.9.2 Valutazione dell'adsorbimento di As ^{III} , As ^V , Hg ^{II} e V ^V , da parte della biomassa mediante Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS)	35
3.9.3 Determinazione del potenziale Zeta	36
3.9.4 Valutazione dei cambiamenti nella struttura chimica della biomassa in presenza di As ^{III} , As ^V , Hg ^{II} e V ^V mediante analisi spettroscopica <i>Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared</i> (ATR-FTIR)	36

3.9.5 Valutazione della riduzione della tossicità di As ^{III} , As ^V , Hg ^{II} e V ^V da parte della biomassa	37
<i>Test di inibizione della bioluminescenza di Vibrio harveyi</i>	37
<i>Test di vitalità di Phaeodactylum tricornutum</i>	37
3.10 Analisi statistica	38
 4. RISULTATI	 39
4.1 Caratteristiche di crescita dei ceppi microalgali isolati	39
4.2 Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi microalgali selezionati	40
4.2.1 Caratteristiche fenotipiche	40
4.2.2 Caratteristiche genotipiche	41
4.3 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla crescita dei ceppi microalgali selezionati	42
4.4 Valutazione della quantità di biomassa microalgale prodotta e del tasso di fissazione di CO ₂	47
4.5 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla produzione e composizione dei carotenoidi	48
4.5.1 Valutazione della presenza di carotenoidi mediante analisi spettroscopica <i>Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared</i> (ATR-FTIR)	48
4.5.2 Valutazione della produzione di carotenoidi di <i>Monoraphidium</i> sp. E10 mediante analisi spettrofotometrica	49
4.5.3 Caratterizzazione dei carotenoidi estratti da <i>Monoraphidium</i> sp. E10 mediante analisi cromatografica	51
4.6 Valutazione dell'attività biologica (antibatterica ed antibiofilm) dei metaboliti secondari estratti in etanolo dalla biomassa microalgale ottenuta con differenti condizioni di illuminazione	52
4.6.1 Valutazione dell'attività antibatterica dei metaboliti secondari estratti in etanolo	52
4.6.2 Valutazione dell'attività antibiofilm dei metaboliti secondari estratti in etanolo	53
<i>Valutazione dell'attività antibiofilm dei metaboliti secondari estratti in etanolo dalla biomassa di Desmodesmus abundans Z59 esposto a differenti condizioni di illuminazione</i>	53

4.7 Valutazione della capacità della biomassa microalgale secca di adsorbire e ridurre la tossicità di arsenico, mercurio e vanadio	55
4.7.1 Valutazione dell'adsorbimento di As ^{III} , As ^V , Hg ^{II} e V ^V da parte della biomassa mediante Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS)	55
4.7.2 Determinazione del potenziale Zeta	56
4.7.3 Valutazione dei cambiamenti nella struttura chimica della biomassa di <i>Monoraphidium</i> sp. E10 in presenza di As ^{III} e Hg ^{II} mediante analisi spettroscopica <i>Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared</i> (ATR-FTIR)	57
4.7.4 Valutazione della riduzione della tossicità di As ^{III} e Hg ^{II} da parte della biomassa di <i>Monoraphidium</i> sp. E10	59
<i>Test di inibizione della bioluminescenza di Vibrio harveyi</i>	59
<i>Test di vitalità di Phaeodactylum tricornutum</i>	60
5. DISCUSSIONI	61
6. CONCLUSIONI	69
7. FONDI	70
8. RINGRAZIAMENTI	70
9. BIBLIOGRAFIA	70

RIASSUNTO

Nell'ambito delle Biotecnologie Blu, la ricerca è rivolta all'esplorazione delle microalghe considerate candidate promettenti per la produzione di **metaboliti** di interesse commerciale alternativi a prodotti di sintesi chimica per la salute dell'uomo e degli animali e la valorizzazione della loro **biomassa** per la riduzione dell'impatto antropico.

La crescita delle microalghe, i cambiamenti metabolici e la conseguente sintesi di metaboliti secondari sono influenzati dalla composizione spettrale della luce e dall'intensità luminosa. In questo contesto, è stato valutato l'effetto dello spettro e dell'intensità della luce artificiale emessa da componenti elettroniche chiamate diodi (*Lighting Emitting Diode*, LED), sulla crescita e sulla produzione di biomassa e di metaboliti ad alto valore aggiunto, quali carotenoidi e metaboliti secondari solubili in etanolo, da parte dei tre ceppi microalgali *Monoraphidium* sp. E10, (famiglia delle *Selenastraceae*) e *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 (famiglia delle *Scenedesmaceae*), isolati dal Lago Maulazzo (Alcara li Fusi, Messina). La loro biomassa è stata inoltre valutata per la capacità di adsorbire e ridurre la tossicità di metalli pesanti da ambienti acquatici contaminati.

Per valutare gli effetti delle condizioni di illuminazione sulla crescita microalgale, misurata spettrofotometricamente, ogni coltura è stata esposta per dieci giorni a differenti **spettri luminosi**: lunghezze d'onda di 400-700 nm (LED bianchi), 450 nm (LED blu), 660 nm (LED rossi) ed una combinazione di LED blu e rossi, ed a crescenti **intensità della luce** (IL) (27, 100, 400, 600 e 800 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Le condizioni ottimali di **crescita** dei tre ceppi erano diverse alle differenti esposizioni di illuminazione, i ceppi M42 e Z59 hanno mostrato maggiore crescita dopo esposizione a LED rossi con IL 100, mentre il ceppo E10 dopo esposizione a LED bianchi con IL 600.

I **carotenoidi** sono stati estratti dalle biomasse e caratterizzati mediante cromatografia. Il ceppo E10 ha prodotto la maggiore quantità di carotenoidi (3 $\mu\text{g/mL}$) sia dopo esposizione a LED blu-rossi con IL 400, che a LED bianchi con IL 600, ma con differente proporzione tra caroteni (es. β -carotene) e xantofille (es. astaxantina), indicando che la produzione del tipo di carotenoidi può essere modulata utilizzando differenti condizioni di illuminazione.

Allo scopo di ricercare prodotti con attività biologica, i **metaboliti secondari**, estratti dalle biomasse di ciascun ceppo esposto alle diverse condizioni di illuminazione, sono stati saggiati per le loro attività antibatterica e antibiofilm contro batteri patogeni dell'uomo e dei pesci. Sebbene nessun estratto abbia mostrato capacità antibatterica, gli estratti (1 mg/mL) ottenuti (complessi lipidici e lipopeptidi) dalle biomasse di Z59 hanno mostrato elevate capacità di inibire (di circa l' 80%) la formazione di biofilm di batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213), ma non quella di batteri Gram-negativi (*Photobacterium piscicida*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G).

La **biomassa** ottenuta è stata infine valutata per la capacità di adsorbire e di ridurre la tossicità dei metalli pesanti (arsenico, mercurio e vanadio) in soluzione acquose, per prospettare un utilizzo alternativo ai metodi tradizionali nella **bioremediation** di ambienti acquatici contaminati. Nessuna delle biomasse ha mostrato la capacità di adsorbire il vanadato e l'arseniato e solo la biomassa prodotta da E10 ha adsorbito più efficacemente il mercurio (52%) e l'arsenito (22%). La biomassa di E10, fortemente elettronegativa (potenziale Zeta = -36mV), è capace di adsorbire il mercurio tramite interazioni elettrostatiche, mentre meccanismi differenti sembrano essere coinvolti nell'adsorbimento dell'arsenito. L'analisi spettroscopica *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR) ha confermato che l'adsorbimento del mercurio avveniva mediante il coinvolgimento di gruppi funzionali carichi negativamente, attribuiti ai carboidrati ed ai lipidi (tra cui i carotenoidi) della biomassa di E10, mentre i gruppi attribuiti alla componente proteica e lipidica sono coinvolti nella complessazione dell'arsenito.

La scelta delle condizioni di illuminazione influenza la crescita e la sintesi di metaboliti secondari con un alto valore commerciale nella nutraceutica e cosmeceutica. La luce blu-rossa con IL 400 consente al ceppo *Monoraphidium* E10 di produrre oltre all'astaxantina, la luteina ed il β -carotene, rispondendo a maggiori richieste industriali. La sua biomassa rappresenta inoltre una risorsa biotecnologica rilevante con potenziali applicazioni nella **bioremediation** di ambienti acquatici contaminati da metalli pesanti. In adeguate condizioni di illuminazione, il ceppo *Desmodesmus abundans* Z59 ha prodotto composti con attività antibiofilm utili nel contrastare batteri patogeni dell'uomo e dei pesci, con potenziali applicazioni nell'industria farmaceutica, alimentare ed in acquacoltura.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le microalghe

Le microalghe comprendono un vasto gruppo di microrganismi eucarioti fotoautotrofi che costituiscono il più grande gruppo di produttori primari, responsabili di circa il 32% della fotosintesi globale e sono ampiamente distribuiti in habitat acquatici, tra cui laghi, stagni, fiumi, oceani e persino acque reflue (Khan et al., 2018), e terrestri. Questi organismi possiedono un'alta versatilità metabolica, essendo capaci di attuare anche un metabolismo fotoeterotrofico, eterotrofico o mixotrofico e possono tollerare un'ampia gamma di temperature, salinità, valori di pH e diverse condizioni di luce (Khan et al., 2018). Negli habitat naturali, le condizioni di irradiazione sono determinate dalla latitudine dell'area geografica, dai cambiamenti giornalieri e stagionali, dalla dispersione della luce da parte dell'atmosfera e dalla colonna d'acqua, di conseguenza, le microalghe sono adattate a varie condizioni di illuminazione. Nello specifico, vi sono specie che si trovano in habitat molto ombreggiati, ad esempio, nel terreno sotto piante superiori con una fitta chioma (Maltseva et al., 2017; Maltsev e Maltseva, 2018), grotte sopra e sottomarine, in strati di acque profonde (Mayer et al., 2016; Popović et al., 2020), mentre altre specie sono adattate alla crescita sotto la luce solare diretta, ad esempio, nei deserti polari e tropicali (Davey et al., 2019; Remias et al., 2005), nelle saline e in altre superfici aperte (Maltseva e Maltsev, 2021; Mendez e Maier, 2008), dove l'intensità della luce può raggiungere livelli molto alti. L'approccio più comune per coltivare le microalghe è rappresentato dalla fotoautotrofia, in cui la luce rappresenta la fonte di energia e l'anidride carbonica (CO_2) la fonte di carbonio, con l'ossigeno (O_2) come sottoprodotto del processo metabolico. Questo approccio utilizza il rifiuto principale del maggior numero delle attività antropiche, ossia la CO_2 , come materia prima per la produzione di biomassa algale da cui è possibile estrarre metaboliti cellulari, quali carboidrati, proteine, vitamine, pigmenti e lipidi, che per le loro proprietà rappresentano **prodotti ad alto valore aggiunto**, trovando ampia applicazione nell'industria farmaceutica/nutraceutica, alimentare/mangimistica e cosmeceutica e nell'ambito della produzione di biodiesel (Tabella 1).

Tabella 1. Metaboliti ad alto valore aggiunto estratti dalla biomassa microalgale.

Composti estratti e molecole di interesse commerciale		Microalga	Applicazioni principali	Riferimenti Bibliografici
Pigmenti	Caroteni (β -carotene)	<i>Desmodesmus</i> sp., <i>Spirulina</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Dunaliella</i> sp., <i>Haematococcus</i> sp.	Coloranti; antiossidanti; precursore della vitamina-A	Yadav et al. (2023); Wang et al. (2022)
	Xantofille (astaxantina, luteina, violaxantina)	<i>Monoraphidium</i> sp., <i>Haematococcus</i> sp., <i>Chlorella</i> sp.	Antiossidanti; antinfiammatori; prodotti farmaceutici (per prevenzione e trattamento del diabete-2 e protezione da disfunzione cardiaca); coloranti; cosmetici	Cichoński e Chrzanowski (2022); Novoveská et al. (2019)
Lipidi	Acidi grassi saturi (SFA)	<i>Tetrademus obliquus</i> , <i>Chlorella</i> sp., <i>Isochrysis</i> sp., <i>Tetraselmis</i> sp.	Biodiesel	Jin et al. (2024)
	Acidi grassi mono (MUFA) e polinsaturi (PUFA): acido γ -linoleico, acido eicosapentaenoico (EPA), acido docosaesaenoico (DHA)	<i>Phaeodactylum</i> sp., <i>Tetrademus</i> sp., <i>Monoraphidium</i> sp., <i>Desmodesmus</i> sp.	Integratori alimentari (riduzione rischio o insorgenza di diabete-2 e cardiopatologie); mangimi; cosmetici	Sharma et al. (2020)
Polisaccaridi	Fruttosio, fucosio, galattosio, glucosio, mannosio, ramnosio, ribosio, xilosio	<i>Chlorella</i> sp., <i>Porphyridium</i> sp., <i>Arthrospira platensis</i> .	Attività antibatterica ed antibiofilm; biostimolanti per piante; cosmetici (prodotti idratanti); bioetanolo	Costa et al. (2021) López e Soto (2019)
Polifenoli	Flavonoidi e acidi fenolici	<i>Scenedesmus</i> sp., <i>Dunaliella salina</i> .	Attività antimicrobica, antibiofilm, antitumorale ed antinfiammatoria	Cichoński e Chrzanowski (2022); López e Soto (2019).
Proteine	Peptidi	<i>Scenedesmus</i> sp., <i>Desmodesmus</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Spirulina</i> sp.	Attività antiossidante, antimicrobica ed antibiofilm	Hayes et al. (2017); López e Soto (2019)
Vitamine	Vitamina B ₁₂ , acido pantotenico	<i>Monoraphidium</i> sp. GK12, <i>Dunaliella salina</i> , <i>Chlorella</i> sp., <i>Spirulina</i> sp.	Attività antiossidante, antimicrobica ed antibiofilm	Fujii et al. (2010); López e Soto (2019); Lucakova et al. (2022)

Le microalghe sono considerate una delle fonti più comuni di **carotenoidi**, come il β -carotene, l'astaxantina e la luteina, nonché di acidi grassi polinsaturi a catena lunga (PUFA) del gruppo omega-3 (Maltsev et al., 2021). Tuttavia, anche la biomassa

microalgale tal quale, in quanto ricca di diversi metaboliti, trova ampia applicazione come mangime nell'acquacoltura, fertilizzante in agricoltura, o per la produzione di biogas (Nagappan et al., 2021; Nayak et al., 2019). Inoltre, per le sue capacità adsorbenti, la **biomassa microalgale secca** può trovare applicazione nella **bioremediation di acque reflue industriali e agricole** contaminate da metalli pesanti, coloranti ed altre sostanze inquinanti (Kumar et al., 2015).

Le microalghe rappresentano una fonte di biomassa e prodotti ad alto valore aggiunto più vantaggiosa, competitiva ed ecosostenibile delle piante terrestri:

- ✓ presentano tassi di crescita molto più rapidi, consentendo una produzione più elevata di biomassa in un'area più piccola. L'efficienza della conversione dell'energia solare in chimica tramite la fotosintesi algale (4%-10%) è maggiore di quella delle piante superiori (0,5-2,2%) (Sun et al., 2022);
- ✓ non richiedono spazi (ad esempio i terreni arabili) né fonti d'acqua altrimenti utilizzabili, riducendo la pressione sulle risorse naturali e rendendole attraenti per lo sfruttamento industriale (Sun et al., 2018);
- ✓ possono essere coltivate in ambienti controllati, come bioreattori, che permettono di ottimizzare le condizioni di crescita e di produrre biomassa di alta qualità in modo continuo;
- ✓ non producono lignina o sostanze complesse simili, in quanto non necessitano di protezione dall'essiccamento e in questo modo possono investire maggiore energia nella crescita o per produrre composti di interesse industriale (Singh and Saxena, 2015; Vergara-Fernández et al., 2008).

La messa a punto di un sistema di coltivazione microalgale su larga scala offre numerosi vantaggi per la sostenibilità ecologica e la creazione di un'economia circolare virtuosa (Khan et al., 2018).

1.2 Caratteristiche dello spettro elettromagnetico della luce

La luce è una forma di energia che si propaga nello spazio come onda elettromagnetica trasmessa sotto forma di pacchetti separati **chiamati fotoni** (o quanti) e l'energia (E) di un singolo fotone è il prodotto della costante di Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34}$ Js) e della sua frequenza (ν), ovvero $E = h\nu$ (Masojídek et al., 2013). Le componenti della luce possono essere suddivise in funzione della loro lunghezza d'onda, espressa in nanometri (nm). La parte visibile dello spettro elettromagnetico della luce varia dal violetto (400 nm) al rosso lontano (700 nm) (Figura 1) (Masojídek et al., 2013). La lunghezza d'onda della luce è inversamente proporzionale all'energia di ciascun fotone, infatti, un fotone di luce rossa (circa 700 nm) ha un più basso contenuto energetico di quello di luce blu (circa 450 nm). L'intensità della luce si definisce come il flusso di energia radiante (fotoni) incidente su una superficie posta perpendicolarmente alla fonte luminosa per unità di tempo.

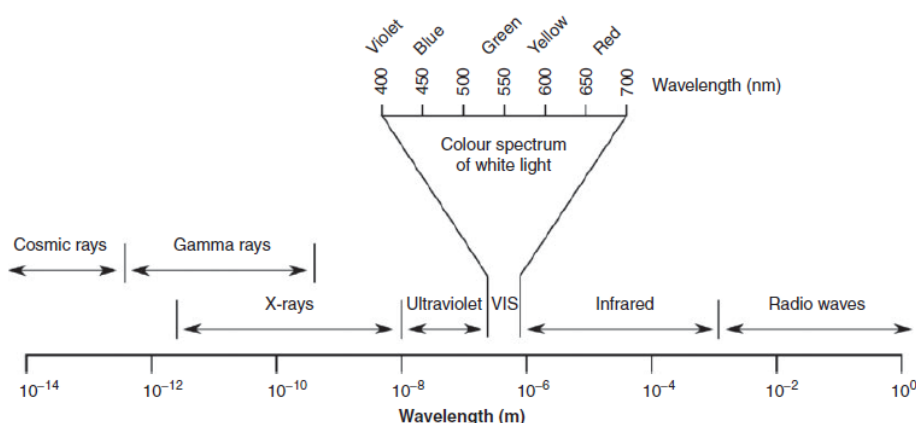


Figura 1. Rappresentazione grafica dello spettro della radiazione elettromagnetica.

1.2.1 Effetto della luce sulla produzione di biomassa microalgale e carotenoidi

Le microalghe, durante il processo fotosintetico, utilizzano solo una determinata porzione dello spettro elettromagnetico della luce corrispondente alla regione del visibile (lunghezze d'onda comprese tra 400 nm e 700 nm) chiamata **radiazione fotosinteticamente attiva (PAR)** (Zarmi et al., 2020).

La quantità di luce (intensità) che raggiunge le cellule microalgali nella regione PAR o il numero di fotoni fotosinteticamente attivi che cadono su una data superficie ogni secondo

è espresso come densità del flusso di fotoni fotosintetici (PPFD) (μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Ge et al., 2011) (Figura 2).

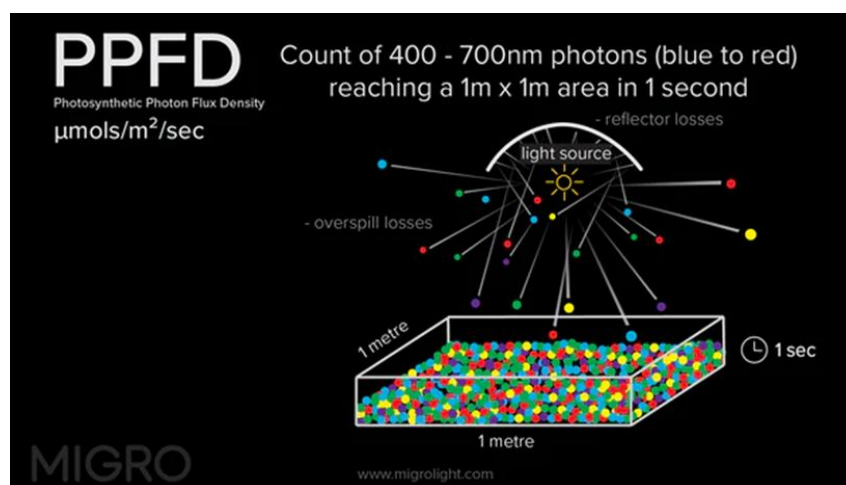


Figura 2. Densità del flusso di fotoni fotosintetici (PPFD) incidenti per unità di superficie (m^2) e tempo (s) (<https://migrolight.com/blogs/grow-light-news/what-is-the-best-par-intensity-for-plants-optimum-ppfd-and-dli>).

L'assorbimento dei fotoni avviene tramite i **pigmenti fotosintetici** distribuiti a livello del complesso “antenna” dei fotosistemi. Questi trasferiscono l'energia assorbita dai fotoni al centro di reazione dei fotosistemi, costituiti da molecole di pigmenti disposti in modo da circondare una molecola di clorofilla *a* detta "trappola", la quale fornisce direttamente l'energia utilizzata per la reazione della fotosintesi (Senge et al., 2014). Ogni fotosistema, a livello della cellula microalgale, contiene un set distintivo di pigmenti “antenna” capaci di assorbire l'energia della luce con differente lunghezza d'onda (Masojídek et al., 2013). Esistono tre classi principali di pigmenti: clorofille e carotenoidi. Tutte le clorofille hanno due picchi di assorbimento principali: blu o blu-verde (450–475 nm) e rosso (630–675 nm) (Maltsev et al., 2021) (Figura 3). I carotenoidi, capaci di assorbire la luce con lunghezza d'onda compresa tra i 400 e i 500 nm, fanno parte di un grande gruppo di pigmenti detti “accessori” (Ladygin, 2014) (Figura 3).

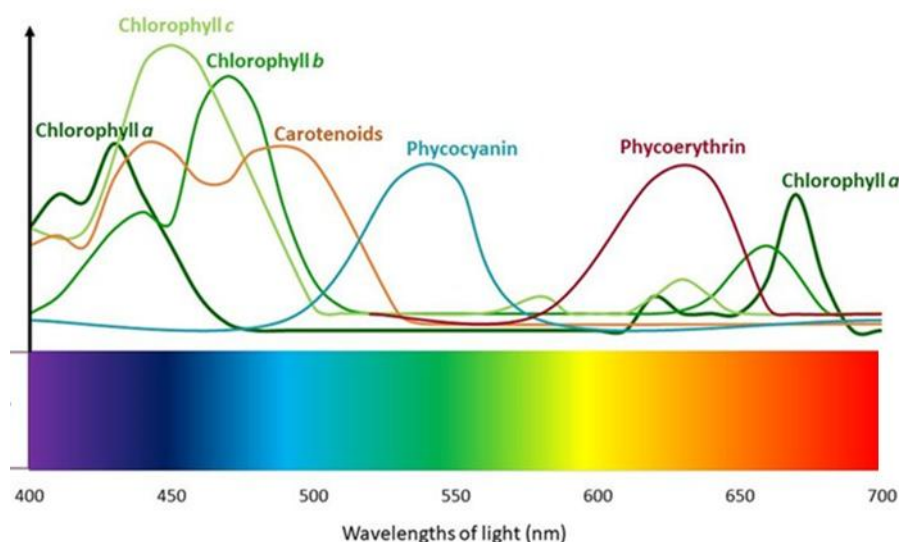


Figura 3. Picchi di assorbimento dei principali pigmenti, tra cui clorofilla *a*, *b*, *c* e carotenoidi, nello spettro della radiazione fotosintetica attiva (PAR).

Effetto dello spettro della luce sulla produzione di biomassa microalgale

La produzione di biomassa delle microalghe è notevolmente influenzata dalla qualità della luce (lunghezza d'onda) utilizzata per la loro coltivazione. La biomassa di numerose microalghe è stata riportata essere inferiore quando cresciute con la sola luce verde (500-630 nm) rispetto a quella ottenuta dopo esposizione alla luce blu (430-470 nm) o rossa (660 nm), le quali sono vicine ai picchi di assorbimento delle clorofille (Abiusi et al., 2020; Erickson et al., 2015; Levasseur et al., 2020; Maltsev e Maltseva, 2021; Metsoviti et al., 2019). Tra queste ultime tipologie di luce, quelle con lunghezze d'onda più lunghe (ad esempio, nel rosso), rilasciano solitamente più fotoni, con conseguenti rapporti PPFD/biomassa secca più elevati rispetto a lunghezze d'onda più corte come nel blu che quindi appaiono come più efficienti (Liu, J. e Van Iersel, 2021). Tuttavia, a causa della diversa composizione dei pigmenti fotosintetici, l'effetto della lunghezza d'onda della luce sulla produzione di biomassa è specie-specifico. Infatti, *Monoraphidium* sp. (*Selenastraceae*) ha prodotto più biomassa in presenza di luce bianca o rossa (Helamieh et al., 2024), mentre Raqiba e Sibi (2019) hanno riportato come le microalghe appartenenti al genere *Scenedesmus* producano più biomassa in presenza di luce rossa. Differentemente, Niizawa et al. (2017) hanno riportato che *S. quadricauda* ha prodotto più biomassa dopo esposizione con luce blu mentre *S. obliquus* CNW-N e *S. obliquus* FSP-3 quando esposti a luce bianca o verde (Ho et al., 2014).

Effetto dell'intensità della luce sulla produzione di biomassa microalgale

L'intensità della luce sfruttata dalle microalghe è relativamente ridotta in quanto non tutta l'energia luminosa assorbita dall'apparato fotosintetico delle microalghe può essere utilizzata per le reazioni fotosintetiche. L'effetto dell'intensità della luce sulla produzione di biomassa da parte di diverse microalghe è stato studiato in range molto ampi che vanno da 5 a 3500 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Pal et al., 2011; Sforza et al., 2012; Treves et al., 2013; Van Wageningen et al., 2012; Virtanen et al., 2021). Quando l'intensità supera un determinato valore soglia che secondo quanto valutato da Edwards et al. (2016) va da 20 a 1000 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, il flusso luminoso in eccesso continua a essere assorbito dalla cellula e ciò porta ad una diminuzione della velocità di fotosintesi e della crescita delle microalghe (Cointet et al., 2019; Fan, 2017; Nzayisenga et al., 2020; Wu et al., 2020). Tuttavia, diversi gruppi tassonomici e specie di microalghe hanno mostrato valori di intensità di luce ottimali compresi tra i 26 ed i 400 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ad esempio, *Monoraphidium dybowskii* Y2 (*Selenastraceae*), *Desmodesmus abundans* (*Scenedesmaceae*) e *Isochrysis galbana* (*Isochrysidaceae*) hanno mostrato una crescita ottimale ad un'intensità pari rispettivamente a 400, 138 e 325 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (He et al., 2018; Maltsev et al., 2021; Mandotra et al., 2016). Solo poche specie hanno mostrato la capacità di crescere ad intensità elevate di luce tra cui *Dunaliella salina* (*Dunaliellaceae*) che presenta una crescita massima sotto l'influenza di luce ad un'intensità pari a 1000 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Xu et al., 2018).

Il tasso fotosintetico, che esprime l'efficienza fotosintetica, in funzione dell'intensità della luce è stato modellizzato dalla curva mostrata in Figura 4, dove l'asse delle ordinate rappresenta la variazione del tasso fotosintetico mentre l'asse delle ascisse l'intensità della luce a cui è sottoposta una generica coltura microalgale (Benedetti et al., 2018).

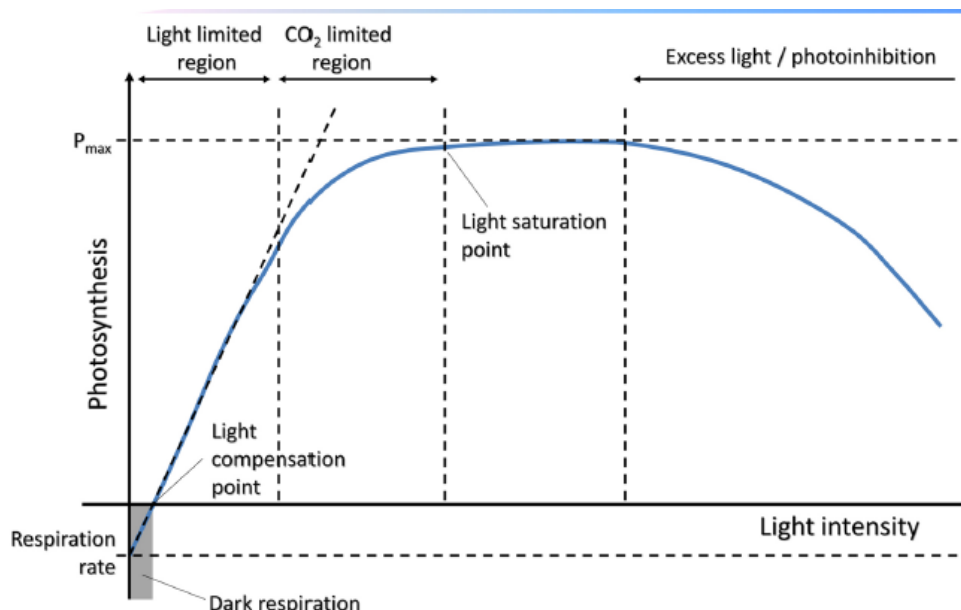


Figura 4. Variazione del tasso fotosintetico in funzione dell'intensità della luce. Il tasso fotosintetico netto mostra un aumento lineare in risposta all'aumento della luce. A livelli di luce più elevati, si verifica la saturazione poiché l'efficienza del meccanismo fotosintetico è ridotta a causa dell'attivazione di processi di fotoinibizione (Benedetti et al., 2018).

In questa curva è possibile distinguere tre regioni: nella prima regione il tasso fotosintetico aumenta esponenzialmente ed in maniera proporzionale all'intensità della luce (luce limitante); nella seconda regione il tasso fotosintetico non varia al variare dall'intensità della luce (luce saturante); nella terza regione l'aumento dell'intensità della luce induce la riduzione del tasso fotosintetico (luce inibente). L'intensità elevata della luce provoca danni foto-ossidativi, con una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), all'apparato fotosintetico, comportando una diminuzione dell'efficienza e del tasso della fotosintesi, fenomeno definito come fotoinibizione (Airs et al., 2014; Erickson et al., 2015; Khan et al., 2018; Wong et al., 2016) (Figura 4). In risposta allo stress ossidativo le microalghe cambiano la struttura dei loro fotosistemi, la composizione, il rapporto dei componenti del complesso "antenna" ed inoltre viene indotto l'accumulo di metaboliti quali carotenoidi e lipidi (Sforza et al., 2012; Van Wagonen et al., 2012; Vecchi et al., 2020). Tuttavia, se il tasso di fotodanneggiamento supera le capacità dei meccanismi protettivi messi in atto dalla cellula microalgale, si osserva una notevole diminuzione delle prestazioni fotosintetiche e quindi della crescita.

In *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetrademus obliquus*, sono state osservate saturazione e successiva fotoinibizione quando esposti ad un'intensità di luce superiore rispettivamente a 100 e 150 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Nzayisenga et al., 2020; Remmers et al., 2017).

Effetto dello spettro della luce sulla produzione di carotenoidi

La lunghezza d'onda della luce (qualità della luce) influenza l'accumulo di carotenoidi nelle microalghe (Abiusi et al., 2014). Poiché queste molecole sono coinvolte nei meccanismi fotoprotettivi neutralizzando le specie reattive dell'ossigeno (Schulze et al., 2014), luci a bassa lunghezza d'onda e quindi a più alta energia come quella blu (420-490 nm), stimolano l'accumulo di carotenoidi. Un esempio è l'accumulo di astaxantina in *Haematococcus pluvialis* (*Haematococcaceae*) e luteina e β -carotene in *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmaceae*) (Fu et al., 2013; Ho et al., 2014; Sánchez-Saavedra e Voltolina, 2002) quando esposti a luce blu (Ma et al., 2018; Xi et al., 2016). Tuttavia, è stato riportato che le microalghe del genere *Scenedesmus* hanno la capacità di accumulare più carotenoidi sotto l'influenza della combinazione di luce rossa e verde (Gonçalves et al., 2019).

Effetto dell'intensità della luce sulla produzione di carotenoidi

Il processo di sintesi dei carotenoidi è altamente influenzato dall'intensità della luce (Raqiba e Sibi, 2019). L'esposizione ad intensità della luce elevate aumenta generalmente la produzione di carotenoidi in quanto essi esplicano una funzione fotoprotettiva. I carotenoidi accettano l'energia in eccesso dalla clorofilla e la dissipano, proteggendo quindi la clorofilla dai danni fotogenici tramite diversi processi, tra cui il *non-photochemical quenching* della fluorescenza della clorofilla *a*. Come riportato in Figura 5, in condizioni di elevata intensità luminosa, le clorofille vengono eccitate in uno stato noto come clorofille singoletto (1Chl^*) tramite assorbimento diretto di energia (EA), 1Chl^* dà origine a clorofille tripletto (3Chl^*) tramite un processo di interconversione privo di energia denominato incrocio intersistema (ISC) (Markou e Nerantzis, 2013; Sun et al., 2014; Varela et al., 2015; Wobbe et al., 2016). In condizioni di elevata intensità luminosa l' O_2 molecolare viene prodotto in abbondanza (Jahns e Holzwarth, 2012; Markou e Nerantzis, 2013; Wang et al., 2014). L'estinzione dell'energia di 3Chl^* (TSEQ) da parte dell'ossigeno molecolare allo stato fondamentale (3O_2) genera ossigeno singoletto (1O_2^*), che è la specie di ossigeno più reattiva (ROS) (Jahns e Holzwarth, 2012; Markou e Nerantzis, 2013; Sun et al., 2014). I ROS fotossidano rapidamente i componenti del fotosistema II e ostacolano la fotosintesi inibendo in modo reversibile il centro di reazione della clorofilla P680, portando a danni cellulari (Markou e Nerantzis, 2013; Sun et al., 2014; Wang et al., 2014; Wobbe et al., 2016). I carotenoidi (Car, in Figura 5) prevengono i danni cellulari mediante i) spegnimento dell'ossigeno singoletto (SOQ) e ii) disattivando

3Chl* tramite TSEQ. Entrambi i processi creano carotenoidi a triplo stato (3Car*), che tornano allo stato fondamentale dissipando il calore in eccesso (Jahns e Holzwarth, 2012; Varela et al., 2015; Wobbe et al., 2016).

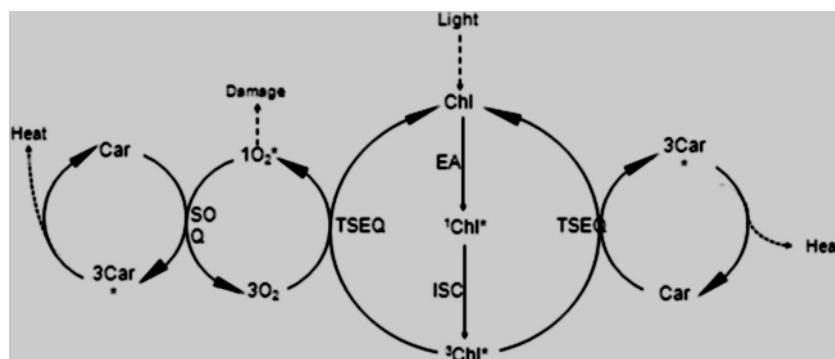


Figura 5. Schema del meccanismo *non-photochemical quenching* nelle microalghe (Varela et al., 2015).

L'effetto dell'intensità della luce nelle microalghe è specie-specifico e si riflette anche nella composizione dei carotenoidi che si accumulano sotto l'azione di un determinato flusso luminoso (Shi et al., 2020; Solovchenko, 2015). *Desmodesmus* sp. e *Tetradasmus obliquus* FSP-3 (entrambi appartenenti alla famiglia delle *Scenedesmaceae*) producono un'elevata quantità di carotenoidi in particolare di luteina, quando esposte ad un'intensità di luce pari rispettivamente a 600 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Xie et al., 2013) e 300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ho et al., 2014) mentre *Haematococcus pluvialis* (*Haematococcaceae*) raggiunge la massima produzione di astaxantina quando esposta ad un'intensità di luce pari a 200-300 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'aumento dell'intensità luminosa promuove l'accumulo di β -carotene in *Dunaliella salina* (*Dunaliellaceae*) mentre *Phaeodactylum tricornutum* (*Phaeodactylaceae*) produce il massimo contenuto di fucoxantina quando esposto a luce con intensità di 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ diminuendo la capacità di produrla con l'aumento dell'intensità luminosa (Zarekarizi et al., 2023).

1.2.2 Vantaggi dell' utilizzo di *Lighting Emitting Diode* (LED) per la coltivazione di microalghe

L'illuminazione naturale e quella artificiale vengono comunemente utilizzate nella coltivazione di microalghe. La luce naturale viene utilizzata per la coltivazione di microalghe in sistemi aperti e non può essere controllata intenzionalmente. Nei sistemi di coltivazione chiusi o **fotobioreattori**, l'illuminazione artificiale consente un controllo

rigoroso della crescita delle microalghe e della produzione di biomolecole, aumentando l'affidabilità dei processi industriali (Schulze et al., 2017). Tuttavia, l'illuminazione artificiale richiede un costo energetico che determina in larga misura il costo finale dei prodotti microalgali e ridurlo rappresenta uno dei fattori economicamente più importante (Liyanaarachchi et al., 2020). L'illuminazione nei sistemi di coltivazione chiusi viene fornita da **lampade fluorescenti o LED** (Lighting Emitting Diode) ovvero componenti elettroniche, chiamate diodi, che a contatto con la corrente elettrica generano una luce brillante e intensa priva di raggi infrarossi e UV (Schulze et al., 2014). La luce di una lampada fluorescente ha massimi nella parte blu-viola dello spettro, preziosa nel garantire l'attività fotosintetica, ma a differenza delle lampade fluorescenti, l'uso di LED presenta diversi vantaggi sia con ricadute dal punto di vista di produzione di biomassa e prodotti ad alto valore aggiunto, sia in termini di ricadute economiche che questi comportano. Nello specifico i LED presentano i seguenti vantaggi:

- ✓ controllo preciso della luce. I LED possono essere utilizzati per fornire una luce di intensità e qualità specifica, consentendo di creare un' illuminazione monocromatica o un'illuminazione con una composizione spettrale appositamente selezionata (Schulze et al., 2014), adattandosi alle esigenze di diverse specie di microalghe e alla produzione di specifici metaboliti. Inoltre, una caratteristica dei LED è la capacità di produrre un flusso luminoso ad alta intensità, che è simile nella composizione spettrale al sole (Morgunov e Vasiliev, 2017);
- ✓ i LED hanno un'uscita spettrale ristretta che si sovrappone allo spettro di assorbimento fotosintetico. L'emissione di luce a lunghezze d'onda inutilizzabili può essere eliminata nei LED regolando l'alimentazione, il che consente di ridurre al minimo il consumo di energia. Inoltre, i LED richiedono meno della metà dell'energia elettrica utilizzata dalle lampade fluorescenti per produrre la stessa intensità di luce (Richmond e Hu, 2013);
- ✓ lunga durata. I LED hanno una durata di vita molto più lunga (50.000 ore) (Schulze et al., 2014), di conseguenza non devono essere sostituiti frequentemente, riducendo i costi di manutenzione;
- ✓ sostenibilità. I LED sono una tecnologia sostenibile che non contiene sostanze pericolose come il mercurio presente nelle lampade fluorescenti (Schulze et al., 2014);

- ✓ flessibilità. I LED sono disponibili in una varietà di forme, dimensioni e colori, che li rende flessibili per l'utilizzo in diversi sistemi di coltivazione.

1.3 Metaboliti microalgali ad alto valore aggiunto

1.3.1 I carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti derivati dai tetraterpeni, i quali sono costituiti da 8 unità di isoprene (C₅) che comprendono una struttura polienica a 40 atomi di carbonio, costituita da doppi legami coniugati, responsabili della pigmentazione dei carotenoidi e della loro capacità di assorbire fotoni nelle lunghezze d'onda dello spettro visibile (Novoveská et al., 2019). I terpeni sono la più grande famiglia di prodotti organici naturali e metaboliti e vi sono oltre 1100 carotenoidi presenti in natura prodotti da più di 600 organismi, tra cui piante, alghe, funghi, microalghe, batteri e archeae (Yabuzaki et al., 2017). I carotenoidi possono essere classificati in due gruppi: xantofille contenenti ossigeno (ad esempio, astaxantina e luteina) e caroteni che sono idrocarburi puri privi di ossigeno (ad esempio, β -carotene e licopene). Inoltre, le microalghe, possono sintetizzare una varietà di pigmenti aggiuntivi come l'astaxantina, la fucoxantina, la diatoxantina, la diadinoxantina specifici solo per esse, i cianobatteri e diverse specie di lieviti (Ambati et al., 2014; Jin et al., 2003). I carotenoidi possono essere suddivisi in due categorie: i) carotenoidi primari che sono componenti dell'apparato fotosintetico (sia strutturale che funzionale) e quindi, sono essenziali per la sopravvivenza e ii) carotenoidi secondari prodotti solo quando le cellule sono esposte a condizioni ambientali specifiche, quali alta intensità luminosa o shock osmotico. (Jin et al., 2003). Mentre i carotenoidi primari sono associati alle membrane, i carotenoidi secondari si trovano nelle vescicole lipidiche a livello dello stroma dei plastidi o del citosol, tuttavia, alcuni carotenoidi sintetizzati nei cloroplasti possono essere esportati nel citoplasma (Rabbani et al., 1998). I carotenoidi svolgono importanti funzioni durante il processo fotosintetico, tra cui la raccolta della luce e la fotoprotezione grazie alla loro alta capacità antiossidante (paragrafo 1.2.1). Queste proprietà antiossidanti proteggono le cellule delle microalghe e conferiscono loro potenziali applicazioni commerciali per il consumo umano. Infatti, trovano applicazione in numerosi settori industriali, come il settore mangimistico, nutraceutico, farmaceutico e cosmeceutico (Cezare-Gomes et al., 2019). Nello specifico, i carotenoidi sono tradizionalmente utilizzati nell'industria alimentare e dei mangimi per le loro proprietà nutrizionali e come coloranti, infatti, sono

considerati un colorante naturale sicuro e, come tali, vengono aggiunti ad una varietà di prodotti per migliorarne il colore (ad esempio succhi, yogurt, dolciumi, uova). Analogamente, in acquacoltura, i carotenoidi sono stati aggiunti alla dieta degli organismi acquatici per promuovere il tipico colore rosa/rosso dei crostacei, salmonidi e altri pesci d'allevamento (Lorenz et al., 2000). Oltre a fornire colore e nutrizione, i carotenoidi come potenti antiossidanti vengono utilizzati come principi attivi nella formulazione di cosmetici (ad esempio, creme e lozioni) con alto valore nutrizionale per la pelle ed i capelli. Nello specifico, sono sempre più richiesti come principi attivi nel settore cosmetico ma anche farmaceutico e nutraceutico, in quanto proteggono gli esseri umani dai danni provocati dalla luce ultravioletta attraverso applicazione esterna sulla pelle (come trattamento topico) (Smeriglio et al., 2023) nonché tramite l'alimentazione. Radicali liberi, stress ossidativo e squilibrio redox cellulare sono stati identificati come i principali responsabili di una vasta gamma di malattie umane, comprese le malattie neurodegenerative (Cho et al., 2018) e, in quanto antiossidanti, i carotenoidi neutralizzano i radicali liberi e prevengono o possono rallentare le malattie quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Cho et al., 2018), il danno cellulare e l'invecchiamento (Griffiths et al., 2016). In particolare, è stato segnalato che i carotenoidi riducono il rischio di tumore, infiammazione, cardiopatie (Griffiths et al., 2016), diabete di tipo 2 (Sluijs et al., 2015), malattie croniche dell'occhio e della macula (Eggersdorfer e Wyss, 2018), obesità (Gammone e D'Orazio, 2015), e potrebbero servire anche come agenti terapeutici contro le malattie mentali (Fernández et al., 2019).

1.3.2 Metaboliti secondari estratti in etanolo

Le microalghe coesistono con altri organismi creando relazioni competitive che le spingono a sintetizzare o secernere diverse sostanze e/o molecole al fine di ostacolare gli organismi competitori. Infatti, è stato riportato che alcuni di questi metaboliti secondari come lipidi, alcaloidi, terpenoidi, peptidi e composti alogenati, presentano attività antimicrobica e antibiofilm (López e Soto, 2019). Una fase importante nei metodi di estrazione di questi composti attivi dalle microalghe è la scelta del solvente. Gli estratti grezzi di microalghe sono una miscela eterogenea di composti polari e non polari ed i solventi comunemente utilizzati per la loro estrazione sono esano, cloroformio (solventi non polari) e acetato di etile, metanolo, acetone e diclorometano (solventi polari) (López e Soto, 2019). Tuttavia, per l'estrazione di sostanze con attività antibatteriche dalle

biomasse microalgali, secondo Jusidin et al. (2022), l'etanolo rappresenta uno dei migliori solventi, poiché estratti etanolic hanno mostrato la più ampia inibizione di batteri patogeni quali *Vibrio harveyi*. Inoltre, sulla base di ricerche precedenti, l'estratto etanolic da biomassa di *Spirulina* sp. ha anche dimostrato una maggiore efficacia contro due specie di *Vibrio* (Pradhan et al., 2012). Oltre ad un'attività antibatterica, gli estratti etanolic microalgali, secondo quanto riportato da Lòpez e Soto (2019), sono capaci di ridurre drasticamente il biofilm formato da ceppi batterici patogeni, ad esempio gli estratti etanolic di *Chlorella vulgaris* hanno mostrato la capacità di inibire l'85% di biofilm prodotto da *P. aeruginosa* (Gayatri et al., 2019).

Il biofilm è una comunità organizzata di cellule batteriche racchiuse in una matrice extracellulare da essi prodotta, composta principalmente da esopolisaccaridi (EPS) (40–95%), proteine (1–60%), DNA extracellulare (1–10%) e lipidi (1–40%) (Zammuto et al., 2023). In quasi tutti i tipi di superfici, sia abiotiche che biotiche, oltre il 90% dei microrganismi forma biofilm, con la funzione di sfuggire a condizioni sfavorevoli, come la presenza di predatori, inibitori microbici (ad esempio antibiotici, disinfettanti e difese dell'ospite), la mancanza di nutrienti e ulteriori fattori di stress (Zammuto et al., 2022). La formazione del biofilm inizia con un iniziale adesione dei batteri liberi e l'adesione alle superfici abiotiche e biotiche diventa irreversibile quando le cellule secernono esopolimeri con il successivo sviluppo e stabilizzazione dell'architettura del biofilm (Monds e O'Toole, 2009). I biofilm batterici sono considerati una grande preoccupazione per la salute umana e ambientale (Zammuto et al., 2023) con un elevato impatto economico in diversi settori, tra cui medicina, industria alimentare o dei mangimi, agricoltura e acquacoltura, in quanto sono notoriamente difficili da sradicare e potrebbero anche rappresentare un serbatoio di patogeni, causando infezioni croniche e malattie ricorrenti (Zammuto et al., 2022). Di conseguenza, l'esplorazione di nuove strategie volte alla ricerca di nuovi composti per prevenire la formazione del biofilm, potrebbe essere essenziale per la salute umana per la quale infezioni batteriche, legate principalmente alla formazione di biofilm, attualmente rappresentano una grande preoccupazione.

1.4 Utilizzo della biomassa microalgale nella *bioremediation* da metalli pesanti

L'inquinamento da metalli pesanti, come ad esempio arsenico (As), mercurio (Hg) e vanadio (V), rappresenta un grave problema per l'ambiente e la salute umana, a causa della loro tossicità per gli organismi viventi e della loro non degradabilità, che li rende inquinanti persistenti nel suolo e nell'acqua (Mishra et al., 2019). Sebbene la maggior parte dei metalli pesanti si trovi in natura, la loro crescente contaminazione è dovuta principalmente al rilascio improprio nell'ambiente di effluenti industriali e all'acqua di scolo degli impianti di trattamento delle acque. Nonostante i metalli possano presentarsi in una varietà di forme chimiche (ioni liberi, complessi all'interno di leganti organici/organici e adsorbiti su fasi particellari) nelle acque reflue, gli ioni metallici liberi nella soluzione sono la forma più tossica per gli organismi viventi in generale (Kumar et al., 2015), sebbene questo dipenda sempre dalla concentrazione e dalla speciazione di ciascun metallo pesante (Babuji et al., 2023; Tchounwou et al., 2012). A contatto con sedimenti acquatici, ad esempio, il mercurio (Hg) si converte nel metilmercurio altamente tossico (Gworek et al., 2020), che può entrare nel corpo umano attraverso l'ingestione di frutti di mare contaminati e può causare danni al sistema nervoso centrale (Rice et al., 2014). Un altro metallo pesante molto diffuso nell'ambiente e pericoloso per la salute umana è l'arsenico (As), il quale proviene sia da fonti geogeniche che antropiche come arsenito (As^{III}), forma più tossica e prevalente nei sistemi acquosi in condizioni anossiche o ridotte, e arseniato (As^{V}) prevalente nei suoli e nelle acque superficiali ossigenate (Casentini et al., 2019; Smedley et al., 2014). Il vanadio (V) è naturalmente abbondante (principalmente di origine vulcanica) e, grazie alle sue proprietà fisico-chimiche, è ampiamente utilizzato in diversi settori industriali, tra cui quello metallurgico, petrolchimico e nelle operazioni di estrazione mineraria, (Dsikowitzky et al., 2013; Villares et al., 2007). Il vanadio nelle soluzioni acquose è presente principalmente in due diversi stati di ossidazione (V^{IV} e V^{V}), con V^{V} più persistente nell'ambiente e tossico per l'uomo rispetto a V^{IV} (Fang et al., 2017; Sankhla et al., 2016). La presenza in generale di metalli pesanti nell'acqua spesso ne limita l'uso come acqua potabile, infatti, la direttiva europea 2020/2184 (*European Union Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the Quality of Water Intended for Human Consumption. Off. J. Eur. Union 2020, 435, 1–62*) ha stabilito i limiti di Hg, As e V nell'acqua potabile rispettivamente ad 1, 10 e 50 $\mu\text{g/L}$. Le tecniche convenzionali e moderne per la rimozione di metalli pesanti dall'acqua e dal suolo

includono coagulazione, flocculazione, precipitazione e filtrazione, tutte con diversi svantaggi, come l'elevato costo di input energetico e la generazione di fanghi tossici, che, a loro volta, richiedono ulteriori attività di rimozione e possono causare inquinamento secondario (Ratnasari et al., 2022). Pertanto, nel bonificare suoli e acque dai metalli pesanti c'è un crescente interesse nell'uso di strategie eco-friendly, come la biotrasformazione o il bioadsorbimento attraverso l'utilizzo, ad esempio, della biomassa microalgale morta. Infatti, i requisiti di crescita poco costosi (luce solare e CO₂) ed il vantaggio di essere utilizzati simultaneamente per più scopi (ad esempio, mitigazione del carbonio, produzione di metaboliti ad alto valore aggiunto e biocarburanti) rendono le microalghe candidate idonee per diverse strategie di bonifica delle acque reflue da metalli pesanti, in particolare biomasse microalgali morte appartenenti al genere *Scenedesmus* e *Chlorella*, nonostante ancora pochi generi siano stati testati, sembrano le più predisposte a questo tipo di utilizzo. Le microalghe hanno sviluppato un ampio spettro di meccanismi (extracellulari e intracellulari) per far fronte alla tossicità dei metalli pesanti insieme a meccanismi molecolari che consentono loro di distinguere i metalli non essenziali da quelli essenziali per la loro crescita (Perales-Vela et al., 2006). Nello specifico ad avere una rilevante importanza nel legame di metalli pesanti da parte della biomassa microalgale morta è la loro parete cellulare in quanto, come interfaccia tra il citoplasma cellulare e l'ambiente esterno, rappresenta la prima barriera tra la cellula ed i metalli pesanti. La parete cellulare microalgale è composta principalmente da carboidrati, proteine e lipidi, la cui composizione e quantità può essere influenzata dallo spettro e dall'intensità della luce utilizzati per la produzione della biomassa microalgale (Ramanna et al., 2017). Quest'ultima, offre gruppi funzionali con carica sulla propria superficie che possono catturare e quindi rimuovere ioni metallici dall'ambiente circostante tramite il fenomeno noto come "adsorbimento" ovvero un legame rapido e dinamico di ioni da soluzioni acquose e gruppi funzionali presenti sulla superficie della biomassa (Faruque et al., 2024) (Figura 6). Questo meccanismo di adsorbimento di metalli pesanti rapido e reversibile può essere eseguito in un'ampia gamma di condizioni sperimentali ed è una tecnica semplice, efficiente ed ecosostenibile. (Javanbakht et al., 2014). Studi spettroscopici hanno dimostrato che i gruppi funzionali, tra cui carbossile, idrossile, solfato, solfidrile (tiolo), fosfato, amminico, ammidico, immina, tioetere, fenolo, carbonile, imidazolo, fosfonato e fosfodiesteri hanno le proprietà per essere coinvolti nel legame dei metalli pesanti (Figura 6) (Javanbakht et al., 2014). Il gruppo carbossilico è stato segnalato come uno dei principali attori nell'adsorbimento dei metalli pesanti, in quanto le frazioni carbossiliche possono

legare i metalli pesanti in due modi diversi, sostituendo H^+ nel gruppo carbossilico (tipo I) o, dopo un'esposizione più prolungata, formando carbossilati (tipo II) (Doshi et al., 2007). Il coinvolgimento di questi gruppi è stato confermato da una serie di tecniche, ad esempio l'*Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR), metodo utilizzato per determinare la struttura chimica della biomassa ed eventuali cambiamenti in essa dovuti all'esposizione a metalli pesanti (Liu et al., 2022).

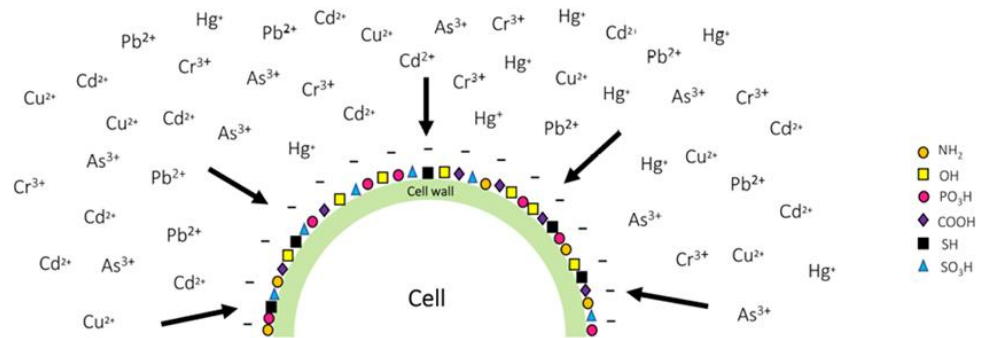


Figura 6. Rappresentazione schematica del processo di adsorbimento degli ioni metallici da parte dei gruppi funzionali presenti sulla parete cellulare delle microalghe (Spain et al., 2021).

2. SCOPO DELLA TESI

Le microalghe offrono una serie di proprietà utili per raggiungere gli Obiettivi di Sviluppo sostenibile proposti dall'Agenda 2030 delle Nazioni Unite. Esse contribuiscono a ridurre la CO₂ dall'atmosfera, a produrre metaboliti naturali destinati a vari campi d'applicazione che spaziano dal settore farmaceutico, nutraceutico e cosmetico alla produzione di biocarburanti, ed a ridurre gli inquinanti provenienti da acque reflue industriali.

La crescita delle microalghe, i cambiamenti metabolici e la conseguente sintesi di metaboliti secondari sono principalmente influenzati dalla composizione spettrale della luce e dall'intensità luminosa. In questo contesto, è stato valutato l'effetto dello spettro e dell'intensità della luce artificiale emessa da componenti elettroniche chiamati diodi (*Lighting Emitting Diode*, LED), sulla crescita e sulla produzione di biomassa e di metaboliti ad alto valore aggiunto, quali **carotenoidi** e metaboliti secondari solubili in etanolo, da parte di ceppi microalgali isolati dal Lago Maulazzo (Alcara li Fusi, Messina). Con la prospettiva di individuare molecole con attività biologica, i metaboliti secondari estratti dalle biomasse sono stati saggiati per la loro **attività antibatterica e antibiofilm** contro batteri patogeni dell'uomo e dei pesci. Inoltre, per investigare il potenziale utilizzo nella **bioremediation** di ambienti acquatici contaminati da metalli pesanti, le biomasse sono state valutate per la capacità di adsorbire e ridurre la tossicità dell'arsenico, del mercurio e del vanadio.

Gli obiettivi della seguente tesi sono stati:

- 1) **isolare e caratterizzare fenotipicamente e genotipicamente i ceppi microalgali;**
- 2) **valutare la crescita microalgale, la produzione di biomassa ed il tasso di fissazione della CO₂ in differenti condizioni di illuminazione**, utilizzando differenti lunghezze d'onda ($\lambda = 400\text{-}700\text{ nm}$, LED bianchi; $\lambda = 450\text{ nm}$, LED blu; $\lambda = 660\text{ nm}$, LED rossi; $\lambda = 450 + 660\text{ nm}$, mediante combinazione di LED rossi e blu) ed intensità della luce (27, 100, 400, 600, 800 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$);
- 3) **valutare la presenza e la produzione di carotenoidi di ciascun ceppo in differenti condizioni di illuminazione**, ed analizzarli chimicamente per valutare le loro possibili applicazioni biotecnologiche;
- 4) **valutare l'attività biologica (antibatterica e antibiofilm) di metaboliti secondari** estratti in etanolo dalle biomasse microalgali, prodotte in differenti condizioni di illuminazione, contro batteri patogeni umani e dei pesci (*Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G), per il loro potenziale utilizzo nel settore farmaceutico, alimentare ed in acquacoltura;

- 5) valutare la capacità delle biomasse microalgali di adsorbire e ridurre la tossicità di arsenico mercurio e vanadio**, mediante spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) e spettroscopia ATR FTIR, per il loro potenziale utilizzo nella *bioremediation* di ambienti contaminati da metalli pesanti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Area di campionamento e raccolta dei campioni

Il Lago Maulazzo (37°56'31" N, 14°40'18" E) è localizzato a 1400 m dal livello del mare nell'area naturale protetta del Parco dei Nebrodi, nel comune di Alcara Li Fusi (Figura 7). Nel giugno 2022 sono stati individuati due siti di campionamento nel centro del lago ed i parametri chimico-fisici (temperatura, pH e salinità) (Tabella 2) sono stati rilevati tramite una sonda multiparametrica (Professional Plus, ProPlus, YSI, USA) e termometro digitale (Hanna Instrument, Milano, Italia). I due campioni di acqua sono stati raccolti manualmente ad una profondità di 1 m nel centro del lago, mediante bottiglie sterili in Pirex. I campioni di acqua sono stati trasportati in laboratorio mantenuti al buio alla temperatura di 4°C.



Figura 7. Lago Maulazzo (area naturale protetta del Parco dei Nebrodi, Alcara li Fusi; Messina).

Tabella 2. Caratteristiche chimico-fisiche del sito di campionamento.

Temperatura	pH	Salinità
20,8 ± 4 C°	7,11 ± 0,4	10,88 ± 0,3 PSU

3.2 Isolamento di ceppi microalgali

I campioni di acqua sono stati combinati e omogeneizzati asetticamente agitandoli per dieci minuti per ottenere un campione rappresentativo. Per concentrare la frazione

microalgale, il campione di acqua è stato prefiltrato su una membrana sterile in cellulosa con pori da 64 μm (47 mm di diametro; Millipore, Burlington, MA, USA) per rimuovere le frazioni di dimensioni maggiori, e successivamente ogni sospensione è stata filtrata su una membrana da 3 μm (47 mm di diametro; Millipore, Burlington, MA, USA). Ogni membrana è stata posta su una piastra contenente terreno BG11 agarizzato (BG11A) (Rippka et al., 1979) (Tabella 3), utilizzato per la coltivazione di microalghe di acqua dolce, ed incubata a 25°C sotto illuminazione continua con LED bianchi ad un'intensità (IL) pari a 100 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (IL 100) per sette giorni.

Tabella 3. Composizione del terreno BG11.

COMPOSTO	g/L
NaNO_3 1,76 M	1,50
K_2HPO_4 0,17 M	0,04
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M	0,075
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,24 M	0,036
Acido citrico 31 mM/ Ferro	0,006
Ammonio Citrato 23 mM	0,006
EDTA sale disodico 2,68 mM	0,001
Na_2CO_3 0,188 M	0,02
Soluzione Micronutrienti:	
a) H_3BO_3	2,86
b) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
c) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
d) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,390
e) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079
f) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494
pH	7,4

Le singole colonie sono state isolate per strisciamento su piastre di BG11A. Ciascun ceppo isolato è stato inoculato in provette da 50 mL (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia) contenenti 30 mL di brodo BG11 (BG11B), e mantenuto alla temperatura di 25°C, sotto illuminazione continua con LED bianchi IL 100 ed insufflazione continua di aria pre-filtrata, tramite pompa (HAILEA, Giappone) (Figura 8). Per una conservazione a lungo termine, le colture di ciascun ceppo in BG11B sono state addizionate di glicerolo al 20% e congelate a -80°C.



Figura 8. Pompa di insufflazione di aria pre-filtrata (potenza: 5W; pressione: > 0.012 Mpa; output: 7.2 L/min; HAILEA, Giappone).

3.3 Caratteristiche di crescita dei ceppi microalgali isolati

I ceppi isolati sono stati studiati per le loro caratteristiche di crescita in BG11B incubati con esposizione continua a LED bianchi con IL 100, alla temperatura di 25°C per sette giorni.

Un'aliquota di ciascuna coltura è stata centrifugata a $8000 \times g$ per 10 minuti (centrifuga Hermle-Z 366 K), il pellet ottenuto è stato risospeso in 10 mL di terreno BG11B ed utilizzato per inoculare ($OD_{750nm} = 0,1$) colture da 30 mL in provette da 50 mL (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia). Aliquote (1 mL) sono state prelevate asetticamente da ciascuna coltura dopo sette giorni e la crescita di ciascun ceppo è stata misurata tramite spettrofotometro (UV-21 ONDA) alla densità ottica (OD) di 750 nm per ridurre al minimo l'errore nelle stime della concentrazione di biomassa microalgale, come descritto da Griffiths et al., (2011). La crescita microalgale è stata valutata come segue: valori di $OD_{750 nm} \leq 0,5$ "nessuna crescita" (-), $OD_{750 nm}$ compresi tra 0,5 e 2 "media" (+), e $OD_{750 nm} \geq 2$ "elevata" (++)

3.4 Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi microalgali isolati

3.4.1 Caratteristiche fenotipiche

Gli isolati microalgali selezionati sono stati studiati per le seguenti caratteristiche morfologiche: colore, forma, dimensioni, presenza di flagelli/pili/spine, secondo quanto riportato da Bellinger e Sigee (2011). In breve, un'aliquota (10 µl) di ogni coltura di ciascun isolato selezionato è stata prelevata in fase stazionaria e le caratteristiche morfologiche sono state osservate mediante microscopio a contrasto di fase (Olympus BX60, Tokyo, Giappone).

3.4.2. Caratteristiche genotipiche

Estrazione del DNA

La lisi cellulare e l'estrazione del DNA sono state effettuate secondo quanto riportato da Jagielski et al. (2017) con alcune modifiche. In particolare, 2 mL di ciascuna coltura in fase stazionaria sono stati centrifugati a $8000 \times g$ per 10 minuti ed i pellet (cellule microalgali) sono stati risospesi in 500 µL di buffer per l'estrazione del DNA (2% Triton-X 100, 1% SDS, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Successivamente, i campioni sono stati incubati a 65°C per 10 minuti, miscelati mediante vortex per 5 minuti e centrifugati a $10000 \times g$ per 10 minuti a temperatura ambiente. Al surnatante è stato aggiunto un egual volume di una soluzione di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:25:1) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e centrifugato a $14000 \times g$ per 20 minuti a temperatura ambiente. La fase acquosa è stata nuovamente centrifugata con un egual volume di una soluzione di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:25:1) a $14000 \times g$ per 20 minuti a temperatura ambiente e 0.7 vol di isopropanolo (Shelton Scientific, Shelton, USA) sono stati aggiunti. Dopo centrifugazione a $14000 \times g$ per 20 minuti a temperatura ambiente, il pellet è stato trattato con etanolo al 70%, e centrifugato a $14000 \times g$ per 20 minuti a temperatura ambiente. Infine, il pellet così ottenuto è stato risospeso in 50 µL di buffer TE 1x (Promega, Madison, WI, USA).

Amplificazione del DNA

La quantità e purezza del DNA estratto sono state valutate spettrofotometricamente tramite nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™).

Il gene 18S rRNA è stato amplificato mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando il My Taq HS DNA Polymerase PCR Kit (Bioline, Camarillo, CA, USA) e i seguenti primer: forward AF (5'-AACCTGGTGATCCTCCTGCCAG-3') (Ballesteros et al., 2021) e reverse: SSUinR1 (5'-CACCAGACTTGCCCCCTCCA-3') (Lee et al., 2010). Le condizioni di reazione sono state le seguenti: 94° C per 3 min, 40 cicli di 94° C per 30 s, 55° C per 30 s e 72° C per 1 min, con estensione finale di 72° C per 7 min. Il sequenziamento dei prodotti PCR è stato eseguito da BioFab (Roma, Italia) e la ricerca di similarità con le sequenze note è stata eseguita mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le sequenze assegnate agli isolati e le sequenze di riferimento selezionate sono state utilizzate per la costruzione di un albero filogenetico, utilizzando il metodo *neighbor-joining* (NJ) e l'algoritmo *Kimura-2parameters*. Per la costruzione delle matrici di distanza è stata utilizzata la correzione di *Felsenstein*, software PAUP 4.0B (Sinauer, Sunderland, MA, USA). Il calcolo NJ è stato sottoposto ad analisi bootstrap (1000 repliche).

3.5 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla crescita dei ceppi microalgali isolati

3.5.1 Lunghezze d'onda della luce: LED bianchi, blu e rossi

LED monocromatici (Iperlux, Catania, Italia) capaci di emettere luce ad una specifica lunghezza d'onda sono stati montati su supporti delle dimensioni di 30x60 cm. I LED avevano le seguenti caratteristiche: bianchi ($\lambda = 400-700$ nm) (Figura 9a); blu ($\lambda = 450$ nm) (Figura 9b); rossi ($\lambda = 660$ nm) (Figura 9c) (Tabella 4). Inoltre, è stato valutato l'effetto della simultanea esposizione a LED blu e LED rossi (LED blu-rossi) sulle colture microalgali.

Tabella 4. Caratteristiche dei LED montati sui pannelli (30x60cm).

n° LED/m	Colore	Tipo e Modello	Watt
180	Bianco (3050 K $\pm$ 150 K)	SMD 2835/ IPS156524W	15 W/M
60	Rosso (1000 K $\pm$ 150 K)	SMD 5050/ IPS126524RGB	12 W/M
60	Blu (7000 K $\pm$ 150 K)	SMD 5050/ IPS126524RGB	12 W/M

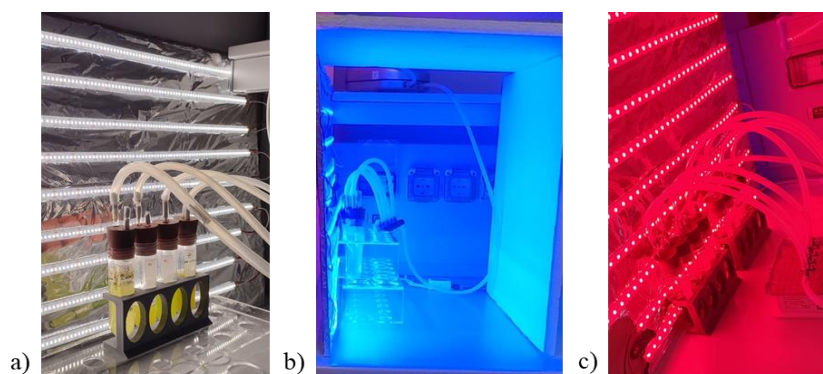


Figura 9. Sistemi di illuminazione con LED **a)** bianchi, **b)** blu e **c)** rossi, utilizzati in questo studio.

3.5.2 Intensità luminosa dei LED

Sono state impiegate le seguenti intensità luminose (IL): 27, 100, 400, 600 o 800 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, come riportato da Teo et al. (2014) e da Maltsev et al. (2021). L'intensità luminosa di ciascun LED monocromatico (bianco, blu e rosso) è stata regolata da un LED *controller* e misurata da un luxmetro (*quantum meter*) (rispettivamente Figura 10 a e b).

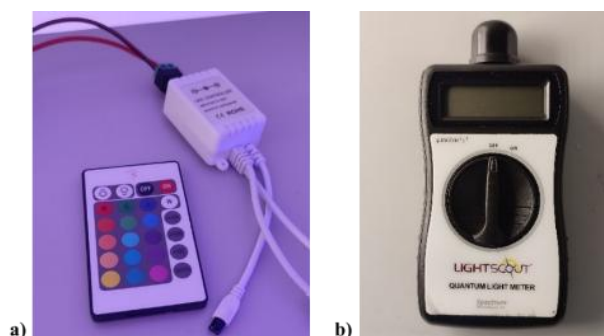


Figura 10. a) LED *controller* (modello: IPC1224W o RGB, watt: <144, input voltaggio: DC24V. Iperlux); b) *quantum meter* (Field Scout®; Spectrum Technologies, Inc.).

3.5.3 Cinetica di crescita dei ceppi microalgali esposti a differenti condizioni di illuminazione

Per valutare l'effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla crescita microalgale, i ceppi sono stati coltivati per dieci giorni nel loro terreno BG11B, alla temperatura di 25°C, con gli scambi gassosi assicurati da un sistema di insufflazione d'aria pre-filtrata tramite pompa (Figura 8).

In particolare, il preinoculo è stato preparato come segue: un'aliquota di una coltura in fase stazionaria in BG11B di ciascun ceppo, incubato a 25°C ed esposto a illuminazione continua con LED bianchi con IL 100 è stata centrifugata a $8000 \times g$ per 10 min. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 30 mL di BG11B ($OD_{750nm} = 0,1$) in provette da 50 mL (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia; indice di rifrazione della luce pari a 1,54-1,56) alle seguenti condizioni di illuminazione: qualità (4 lunghezza d'onda) e quantità (5 intensità) per dieci giorni.

La crescita dei ceppi microalgali esposti alle differenti condizioni di illuminazione (lunghezza d'onda ed intensità) è stata valutata spettrofotometricamente ogni 48h per 10 giorni (paragrafo 3.3).

Inoltre, **il tasso di crescita** specifico (μ) è stato calcolato come segue:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{OD_f}{OD_i} \right)}{tf - ti}$$

dove OD_i e OD_f rappresentano rispettivamente i valori di densità ottica al tempo iniziale (ti) e al tempo finale (tf); ti indica il giorno di inizio della crescita e tf in cui la crescita è stata interrotta (Paredes-López et al., 1976).

3.6 Valutazione della quantità di biomassa microalgale prodotta e del tasso di fissazione della CO₂

Ciascun ceppo è stato coltivato in cilindri in borosilicato da 250 mL (Biosigma, Venezia, Italia; indice di rifrazione pari a 1,51–1,52) contenenti 250 mL di BG11B, alle condizioni di illuminazione ottimali. Dopo dieci giorni di crescita, ciascuna coltura è stata centrifugata a $8000 \times g$ per 10 min, il pellet risultante è stato posto a $-80^{\circ}C$ e successivamente liofilizzato (Liofilizzatore *5Pascal*, Milano, Italia) e pesato (Bilancia analitica *Bel Engineering* s.r.l., Monza, Italia). La **biomassa secca** è stata espressa in g/L.

Il **tasso di fissazione della CO₂** (P_{CO_2} , g/L $\times$ giorno) è stato calcolato (Nayak et al., 2016), utilizzando la seguente equazione:

$$P_{CO_2} = 1,88 \times P_B$$

dove P_B indica la **produttività della biomassa** (g/L $\times$ giorno) calcolata come:

$$P_B = C_B / t$$

dove C_B rappresenta la biomassa secca (g/L) e t è la durata della coltivazione (dieci giorni).

3.7 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla produzione e composizione dei carotenoidi

3.7.1 Valutazione della presenza di carotenoidi mediante analisi spettroscopica *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR)

Per valutare la presenza di carotenoidi nella biomassa liofilizzata di ciascun ceppo microalgale, ottenuta dopo esposizione alle condizioni di illuminazione di mantenimento della coltura (LED bianchi con IL 100), è stata utilizzata la spettroscopia *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR). Gli spettri della biomassa microalgale secca sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro ATR-FTIR Vertex 70 V (Bruker Optics), che utilizza Platinum diamond ATR. I dati degli spettri, ottenuti raccogliendo 48 scansioni con una risoluzione di 4 cm^{-1} nell'intervallo di lunghezze d'onda da 4000 a 400 cm^{-1} , sono stati elaborati utilizzando le seguenti procedure: (i) una correzione della linea di base, al fine di ridurre le dissimilarità tra gli spettri dovute allo spostamento della linea di base; (ii)

un trattamento di *smoothing* per ridurre il rumore strumentale; (iii) un primo trattamento derivato per correggere insieme lo spostamento della linea di base e un secondo trattamento derivato per discriminare meglio le caratteristiche associate agli spettri; (iv) una normalizzazione spettrale per correggere la variazione della lunghezza del percorso e ridurre le differenze tra le singole misurazioni (Caccamo et al., 2020).

3.7.2 Valutazione della produzione di carotenoidi mediante analisi spettrofotometrica

La produzione di pigmenti fotosintetici è stata determinata attraverso analisi spettrofotometrica degli estratti metanolici (Singh et al., 2022) dalla biomassa ottenuta alle differenti condizioni di illuminazione.

Aliquote (2 mL) della coltura microalgale al decimo giorno di crescita, sono state centrifugate a $10000 \times g$ per 5 minuti ed il pellet è stato sospeso in metanolo 99,9% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) ed incubato a 4°C al buio per una notte. Dopo centrifugazione a $10000 \times g$ per 5 minuti, l'assorbanza (A) del surnatante, ovvero della porzione metanolica che contiene i pigmenti, è stata misurata alle seguenti lunghezze d'onda: 470, 652,4 e 665,2 nm, utilizzando uno spettrofotometro ultravioletto-visibile UV-21 ONDA.

Il contenuto in pigmenti fotosintetici, clorofille *a* (Chl_a) e *b* (Chl_b) e carotenoidi, è stato calcolato usando la seguente formula (Lichtenthaler, 1987):

$$\text{Dove: Chl}_a (\mu\text{g/mL}) = 16.72 A_{665,2} - 9.16 A_{652,4}$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g/mL}) = 34.09 A_{652,4} - 15.28 A_{665,2}$$

$$\text{Carotenoidi } (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 1.63 \text{ Chl}_a - 104.9 \text{ Chl}_b) / 221$$

3.7.3 Estrazione dei carotenoidi

I carotenoidi sono stati estratti dalla biomassa microalgale liofilizzata, mediante il metodo di estrazione chimica bifasica, in acqua e acetato di etile (Smeriglio et al., 2023). In breve, la biomassa secca (100 mg) è stata immersa in 1 mL di etanolo assoluto (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 24 ore a temperatura ambiente per estrarre i pigmenti fotosintetici. All'estratto etanolico è stato aggiunto carbone attivo enologico (1:100, p/p) (HyperCarboFast-Sicce Italia S.r.l., Vicenza, Italia) per eliminare le clorofille. La miscela è stata quindi agitata per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente filtrata attraverso carta da filtro per rimuovere il carbone

e l'eventuale biomassa di scarto. Dopo aver fatto evaporare l'etanolo a temperatura ambiente, l'estratto è stato disciolto in una miscela di acqua ed acetato di etile (1:1, v/v) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La soluzione bifasica ottenuta è stata agitata per 30 minuti a 150 rpm e lasciata sedimentare per 30 minuti, con lo scopo di rimuovere i sali e consentire la separazione della frazione apolare di acetato di etile. Quest'ultima frazione è stata prelevata ed il processo è stato ripetuto due volte. Dopo il lavaggio finale, la frazione di acetato di etile ricca di carotenoidi è stata evaporata sottovuoto a 40°C ed è stata infine risospesa in etanolo 90% per ottenere la formulazione finale costituita da estratto/etanolo 70:30 (p/v). Quest'ultimo è stato conservato a 4°C fino al momento della caratterizzazione del contenuto di carotenoidi.

3.7.4 Caratterizzazione dei carotenoidi estratti mediante analisi cromatografica

Gli estratti di carotenoidi sono stati caratterizzati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa con un'interfaccia di ionizzazione chimica a pressione atmosferica (LC-APCI-MS) utilizzando un HPLC serie 1200 (Agilent technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). La separazione cromatografica è stata effettuata a 25 °C utilizzando una colonna analitica Luna C18(2) 100 Å 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) ed una fase mobile costituita da metanolo – metil-t-butil etere (MTBE) – acqua (90:7:3, v/v/v) (solvente A) e metanolo –MTBE (10:90, v/v) (solvente B), secondo il seguente programma di eluizione: 0 min, 0% B; 20 min, 30% B; 35 min, 50% B; 45 min, 80% B; 50 min, 100% B; 60 min, 100% B; 62 min, 0% B; 70 min, 0% B. Il flusso è stato settato a 0,8 mL/min, mentre il volume di iniezione è stato settato a 10 µL. I parametri dello spettrometro di massa, nella fattispecie una trappola ionica modello 6320 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sono stati impostati come segue: modalità di ionizzazione positiva, tensione capillare -3,5 kV, pressione del gas di nebulizzazione 60 psi, temperatura del gas di essiccazione 350 °C, temperatura del vaporizzatore 400 °C, flusso del gas di essiccazione 5 L/min e corrente della corona 4000 nA. L'acquisizione è stata effettuata in modalità full-scan (90–2000 m/z). I dati sono stati acquisiti mediante il software Agilent ChemStation versione B.01.03 e il software di controllo della trappola ionica Agilent versione 6.2. L'identificazione è stata effettuata confrontando

i tempi di ritenzione e gli spettri di massa di ciascun analita con i dati di letteratura e gli spettri di massa contenuti in diverse librerie *open source*.

3.8 Valutazione dell'attività biologica (antibatterica ed antibiofilm) di metaboliti secondari estratti in etanolo dalla biomassa microalgale ottenuta con differenti condizioni di illuminazione

3.8.1 Metaboliti secondari estratti in etanolo

A 100 mg di ciascuna biomassa microalgale secca è stato aggiunto 1 mL di etanolo assoluto (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e dopo incubazione a 25°C per 48 ore, ciascuna miscela è stata centrifugata a $4000 \times g$ per 10 minuti (Genovese et al., 2012). I metaboliti secondari estratti in etanolo (ME) sono stati essiccati con un Rotavapor® a bassa temperatura (35 °C) per preservare i composti volatili dall'evaporazione.

3.8.2 Ceppi batterici patogeni

Per valutare l'attività antibatterica ed antibiofilm dei ME dalla biomassa microalgale, sono stati utilizzati i ceppi batterici patogeni umani *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (acquistati dall'*American Type Culture Collection - LGC Promochem, Teddington, Regno Unito*) ed i ceppi patogeni rilevanti in acquacoltura: *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi* G5 e *Vibrio parahaemolyticus* L12G (appartenenti alla collezione ceppi del laboratorio di "Ecologia microbica", presso l'Università degli Studi di Messina). *P. aeruginosa* è stato mantenuto sia in brodo Luria Bertani (LB, Sigma Aldrich) che in LB solidificato con agar al 2% (LA) (Difco, Baltimora, MD, USA); *Ph. piscicida*, *S. aureus*, *V. harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G sono stati mantenuti in *Tryptic Soy Broth* e *Tryptic Soy Agar* modificato con l'aggiunta di NaCl 1% (p/v) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (rispettivamente TSB1 e TSA1). I ceppi sono stati mantenuti congelati a -80 °C in glicerolo al 20% (v/v) per la conservazione a lungo termine.

3.8.3 Valutazione dell'attività antibatterica dei metaboliti secondari estratti in etanolo

Per valutare l'attività antibatterica dei ME è stato utilizzato il metodo standard di diffusione su disco (test di Kirby Bauer) (National Committee for Clinical Laboratory Standard, NCCLS 2000), come riportato in Zammuto et al. (2022).

I ceppi batterici sono stati incubati per una notte in piastre di TSA1, ad eccezione di *P. aeruginosa* che è stato incubato su piastre di LA, a 25°C (*Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi* G5 e *Vibrio parahaemolyticus* L12G) e 37°C (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*). Una colonia di ciascun ceppo è stata risospesa in 3 mL di soluzione di NaCl allo 0,9% ($OD_{600nm} = 0,1$) e aliquote di ogni sospensione (100 µl) sono state inoculate su piastre di LA per *P. aeruginosa* e su piastre di TSA1 per i restanti ceppi batterici.

I ME (1 mg) sono stati disciolti in 1 mL di etanolo assoluto e 20 µl di ciascuna sospensione sono stati utilizzati per imbibire dischi sterili (diametro di 6 mm, Oxoid). I dischi sono stati posizionati sulle piastre inoculate e le piastre di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono state incubate a 37°C per 24 ore, mentre le piastre di *Ph. piscicida*, *V. harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G sono state incubate a 25°C per 24 ore. In ciascuna piastra sono stati usati come controllo i dischi contenenti etanolo e quelli contenenti tetraciclina (30 µg) (Oxoid) ad eccezione di *V. parahaemolyticus* L12G per il quale sono stati utilizzati dischi contenenti streptomicina (10 µg) (Oxoid). Dopo l'incubazione, il diametro della zona di inibizione completa è stato misurato (mm) e sono state calcolate le medie e le deviazioni standard (n = 3).

3.8.4 Valutazione dell'attività antibiofilm dei metaboliti secondari estratti in etanolo

L'attività antibiofilm dei ME contro *Photobacterium piscicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi* G5 e *Vibrio parahaemolyticus* L12G, è stata valutata in micropiastre di polistirene a 96 pozzetti (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia), come precedentemente riportato da Zammuto et al. (2023). Colture (180 µL) incubate per una notte di *P. aeruginosa* coltivato in LB e *Ph. piscicida*, *S. aureus*, *V. harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G coltivati in TSB1 sono state distribuite nei micropozzetti (3 repliche, $OD_{600nm} = 0,1$ equivalente a 4,5

10⁷ CFU/mL, come determinato sperimentalmente) e sono stati aggiunti 20 µL di solo etanolo o 20 µL di ciascuna sospensione in etanolo di ME (1 mg/mL).

Per valutare l'effetto dei ME sulla formazione del biofilm dei ceppi batteri patogeni testati, le micropiastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore (*S. aureus*) e 48 ore (*P. aeruginosa*) ed a 25 °C per 48 ore (*Ph. piscicida*, *V. harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G) senza agitazione. Ciascuna coltura è stata interamente prelevata dai pozzetti ed i batteri non aderenti sono stati rimossi lavando cinque volte con soluzione di NaCl allo 0,9%. Le cellule fermamente adese sono state colorate per 20 minuti con una soluzione di cristal violetto 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Il colorante in eccesso è stato rimosso tramite aspirazione, quindi le piastre sono state lavate 5 volte con soluzione di NaCl allo 0,9% e asciugate all'aria per 45 minuti. Il colorante trattenuto nel biofilm è stato dissolto utilizzando etanolo assoluto e la quantità del biofilm è stata determinata spettrofotometricamente (OD_{585nm}) dal livello di cristallvioletto presente nella soluzione di decolorazione, utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham; MA, USA). La riduzione della formazione di biofilm di ciascun ceppo è stata espressa come attività antibiofilm (%) applicando la seguente formula:

$$\text{Riduzione del biofilm (\%)} = \frac{\text{OD}_{585\text{nm}} \text{ controllo} - \text{OD}_{585\text{nm}} \text{ campione}}{\text{OD}_{585\text{nm}} \text{ controllo}} \times 100$$

3.9 Valutazione della capacità della biomassa microalgale secca di adsorbire e ridurre la tossicità di arsenico, mercurio e vanadio

3.9.1 Preparazione delle soluzioni

La biomassa microalgale secca (ottenuta come descritto nel paragrafo 3.6) è stata sospesa in 10 mL di acqua ultrapura a pH 7 per ottenere soluzioni con una concentrazione finale di 1000 µg/mL.

I sali dei metalli pesanti (MP) arsenico, mercurio e vanadio, NaAsO₂ (As^{III}) o Na₂HAsO₄ 7H₂O (As^V) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), o HgCl₂ (Hg^{II}) (Carlo Erba, Milano, Italia) o NH₄VO₃ (V^V) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono stati disciolti in acqua ultrapura a pH 7 per ottenere soluzioni stock (100x) e raggiungere una concentrazione finale di 200 µg/mL.

3.9.2 Valutazione dell'adsorbimento di As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V da parte della biomassa mediante Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS)

L'adsorbimento di As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V (MP) da parte di ciascuna biomassa microalgale è stato valutato mediante spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) (Naveed et al., 2020) con alcune modifiche. Un'aliquota di ciascuna soluzione di MP (200 µg/mL) è stata aggiunta a ciascuna sospensione di biomassa microalgale (1000 µg/mL). Le sospensioni così ottenute sono state incubate a 30 °C per 30 min in un agitatore (125 rpm) per consentire il processo di adsorbimento da parte delle biomasse. Le sospensioni sono state centrifugate a 8.000 g × 10 minuti e i MP rimasti nel surnatante (MP non legati alla biomassa microalgale) sono stati rilevati utilizzando la spettroscopia di adsorbimento atomico (AAS). Soluzioni di MP senza biomassa microalgale e le soluzioni di biomassa microalgale senza MP sono state utilizzate come controllo.

Le determinazioni di As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V sono state eseguite mediante lo spettrofotometro AA Varian modello 220/Zeeman (Varian Australia, Mulgrave, Victoria, Australia), dotato di lampade a catodo cavo a elemento singolo e software Spectra AA 220/Zeeman per l'elaborazione elettronica dei risultati. L'As^{III}, As^V ed il V^V sono stati rilevati con il metodo del forno di grafite secondo il metodo EPA 1639 (<https://nepis.epa.gov>) utilizzando un autocampionatore Varian PSD, mentre il Hg^{II} è stato rilevato da un VGA 77 adattato a uno spettrofotometro Varian AA-220/Zeeman utilizzando la tecnica di generazione di vapore freddo secondo il metodo EPA 245.1 Revisione 3.0 (<https://nepis.epa.gov>). Le soluzioni madre di metalli pesanti sono state preparate diluendo in acqua il reagente ACS per analisi ultra-traccia gli standard di riferimento As, V e Hg (1000 µg/mL in 5% HNO³, Agilent technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Le analisi sono state eseguite seguendo le buone pratiche di laboratorio (GLP) analizzando contestualmente i controlli (blank) procedurali. I dati sulle prestazioni dei metodi analitici vengono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Dati sulle prestazioni dei metodi analitici.

Prestazioni	As ^{III} /As ^V	Hg ^{II}	V ^V
Limite di rilevamento assoluto (µg/L)	0.5	0.1	0.8
Linearità (R ²)	0.9998	0.9996	0.9992

Intervallo di calibrazione (µg/L)	20-100	1-10	4-40
Recupero (%)	97	96	95

I risultati sono stati espressi come percentuale di MP adsorbiti dalla biomassa microalgale secondo la seguente formula:

$$\text{MP adsorbito (\%)} = 100 - (\text{MP}_t / \text{MP}_{nt} \times 100)$$

dove MP_t rappresenta la concentrazione finale di MP nelle soluzioni trattate con la biomassa e MP_{nt} rappresenta la concentrazione di MP nelle soluzioni prima del trattamento con la biomassa. Per ulteriori analisi sono state prese in considerazione le biomasse che hanno mostrato una capacità di adsorbimento degli MP $\geq 20\%$.

3.9.3 Determinazione del potenziale Zeta

Per indagare i meccanismi di interazione biomassa–MP è stato determinato il potenziale Zeta di ciascun MP e delle biomasse microalgali capaci di interagire con i MP, mediante uno Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd., Inghilterra) a 25 °C. Per l'analisi sono state utilizzate le soluzioni di ciascun MP (concentrazione finale 200 µg/mL) e le sospensioni di ciascuna biomassa microalgale (concentrazione finale 1000 µg/mL) preparate come descritto nel paragrafo 3.9.1. Il pH di ciascuna soluzione è stato aggiustato a 7, aggiungendo 0,1 M di soluzione di NaOH o di HCl (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

3.9.4 Valutazione dei cambiamenti nella struttura chimica della biomassa in presenza di As^{III} , As^{V} , Hg^{II} e V^{V} mediante analisi spettroscopica *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR)

Per valutare i cambiamenti molecolari e conformazionali delle biomasse microalgali in presenza di ciascun MP, ciascuna biomassa, dopo esposizione a ciascun MP, è stata liofilizzata e analizzata mediante ATR-FTIR (Spanò et al., 2023) come descritto nel paragrafo 3.7.1. Per ciascun spettro ottenuto sono state messe in evidenza eventuali modifiche come la comparsa, la scomparsa di picchi e gli spostamenti dei picchi, che indicano cambiamenti nella struttura chimica della biomassa correlati all'eventuale adsorbimento di ciascun MP.

3.9.5 Valutazione della riduzione della tossicità di As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V da parte della biomassa

Per determinare la tossicità delle soluzioni di MP e la riduzione della loro tossicità in presenza di ciascuna biomassa microalgale sono stati utilizzati il test di inibizione della bioluminescenza del batterio *Vibrio harveyi* (Parvez et al., 2006) ed il test di vitalità della diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (in accordo con ISO10253).

Test di inibizione della bioluminescenza di *Vibrio harveyi*

Il test di inibizione della bioluminescenza di *Vibrio harveyi* è stato eseguito come riportato da Spanò et al. (2023). Brevemente, Il ceppo bioluminescente *Vibrio harveyi* G5 è stato coltivato in provette contenenti 20 mL del terreno di coltura *Sea Water Complete* (triptone 5 g/L, estratto di lievito 3 g/L, glicerolo 3 mL, 750 mL/L di acqua di mare e 250 mL/L di acqua distillata, pH 7.5) ed incubato 18 ore a temperatura ambiente. Aliquote (180 µL) della coltura batterica (OD_{600nm} = 0,5 equivalente a 5×10⁸ cellule/mL) sono state distribuite in ciascun pozzetto di micropiastre di polistirene a 96 pozzetti (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia) (3 repliche) e sono state aggiunte le soluzioni seriali (1:10) di ciascun metallo pesante (20 µL) o soluzioni seriali (20 µL) contenenti i metalli pesanti non legati alle biomasse (ottenuto come descritto nel paragrafo 3.9.2). L'aggiunta di acqua ultrapura sterile alla coltura è stata utilizzata come controllo negativo. La luminescenza della sospensione cellulare è stata valutata dopo 15 minuti di incubazione a 25 °C ed è stata espressa come unità di luminescenza relativa (RLU), calcolata come segue:

$$RLU = \text{Luminescenza} / OD_{600nm}$$

La tossicità è stata calcolata come concentrazione effettiva alla quale si è verificata una riduzione del 50% dell'emissione luminosa (EC₅₀), rispetto al controllo negativo.

Test di vitalità di *Phaeodactylum tricornutum*

Per valutare la capacità della biomassa microalgale di ridurre la tossicità di ciascun MP, la vitalità del ceppo *Phaeodactylum tricornutum* NIVA BAC 2, acquistato presso il Norwegian Institute for Water Research (Oslo, Norvegia), è stata valutata come riportato in Zammuto et al. (2024). In breve, *P. tricornutum* è stato coltivato in provette contenenti 30 mL del terreno f/2 (Guillard, 1975) ed incubato per 72 ore a temperatura ambiente, irradiato con LED bianchi con IL 100. Aliquote della coltura

di *P. tricornutum* (1,8 mL, 10^4 cellule/mL) sono state distribuite in ciascun pozzetto di piastre di polistirene a 24 pozzetti (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia) (3 repliche) e sono state aggiunte le soluzioni seriali (1:10) di ciascun metallo pesante (200 µL) o soluzioni seriali (200 µL) contenenti i metalli pesanti non legati alle biomasse (ottenuto come descritto nel paragrafo 3.9.2). L'aggiunta di acqua ultrapura sterile alla coltura è stata utilizzata come controllo negativo. La piastra da 24 pozzetti è stata incubata a 20 ± 2 °C per 72 ore ed irradiata con LED bianchi con IL 100. Dopo 72 ore di esposizione, la misura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 670 nm ha consentito di determinare la densità delle cellule di *P. tricornutum*. La riduzione della tossicità è stata calcolata, come concentrazione alla quale è stato inibito il 50% della crescita (IC_{50}), rispetto al controllo.

3.10 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i dati sono stati espressi come medie e deviazioni standard. Per confrontare i diversi gruppi sperimentali, i dati sono stati analizzati tramite ANOVA a due vie o t-test e dove appropriato è stato effettuato il test di Tukey per l'analisi *post hoc* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Tutti i valori statistici sono stati considerati significativi a $p \leq 0,05$ (*) o altamente significativi a $p \leq 0,01$ (**).

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche di crescita dei ceppi microalgali isolati

Dieci ceppi microalgali (E10, E11, E12, E13, M40, M41, M42, Z58, Z59, Z60) sono stati isolati da campioni di acqua prelevati presso il Lago Maulazzo (Alcara li Fusi; Messina). La capacità di crescita dei 10 ceppi microalgali è stata valutata dopo sette giorni di incubazione in terreno BG11B a 25°C esposti a LED bianchi con IL100 ed è riportata nella Tabella 6.

Tabella 6. Crescita (OD_{750nm}) dei ceppi microalgali E10, E11, E12, E13, M40, M41, M42, Z58, Z59, Z60 cresciuti in BG11B a 25°C esposti a LED bianchi con IL100 per sette giorni. I valori di $OD_{750nm} \leq 0,5$ sono indicativi di "nessuna crescita" (–), OD_{750nm} compresi tra 0,5 e 2 "media" (+), e $OD_{750nm} \geq 2$ "elevata" (++)

Crescita (OD_{750})									
E10	E11	E12	E13	M40	M41	M42	Z58	Z59	Z60
++	–	–	+	+	–	++	+	++	–

Tra i ceppi coltivati in BG11B a 25°C, tre hanno mostrato la capacità “media” (E13,M40, Z58) e tre la capacità “elevata” (E10, M42 e Z59), questi ultimi sono stati selezionati per gli esperimenti successivi.

4.2 Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi microalgali selezionati

4.2.1 Caratteristiche fenotipiche

Le caratteristiche morfologiche dei ceppi microalgali selezionati E10, M42, Z59 sono riportate nella Tabella 7.

Tabella 7. Caratteristiche fenotipiche dei ceppi microalgali selezionati.

Isolato	Colore	Forma	Dimensioni	Presenza flagelli/pili/spine	Capacità di formare colonie
E10	verde	falciforme	Lunghezza 8–10 μm ; Larghezza 1–2 μm	no	no
M42	verde	fusiforme	Lunghezza 3–4 μm Larghezza 1–3 μm	no	Cenobi (cellule solitamente in gruppi di 2–4, unite lungo alcune, se non tutte, le pareti laterali)
Z59	verde	sferica	Diametro 2–3 μm	no	no

I tre ceppi microalgali selezionati sulla base del loro colore possono essere classificati tra le microalghe verdi (*Chlorophyta*). L'osservazione microscopica delle cellule ha evidenziato che quelle dell'isolato E10 (Figura 11a) hanno una morfologia cellulare a falce, peculiare, secondo quanto riportato da Bellinger e Sigee (2011), del genere *Monoraphidium* mentre quelle dell'isolato M42 (Figura 11b), presentano un'organizzazione tetraedrica (gruppi da due o quattro cellule, cenobi), caratteristica di alcune specie microalgali appartenenti al genere *Scenedesmus*. Diversamente le cellule dell'isolato Z59 (Figura 11c) hanno mostrato una morfologia cellulare comune a diversi generi microalgali come *Chlorella* e *Coccomyxa*.

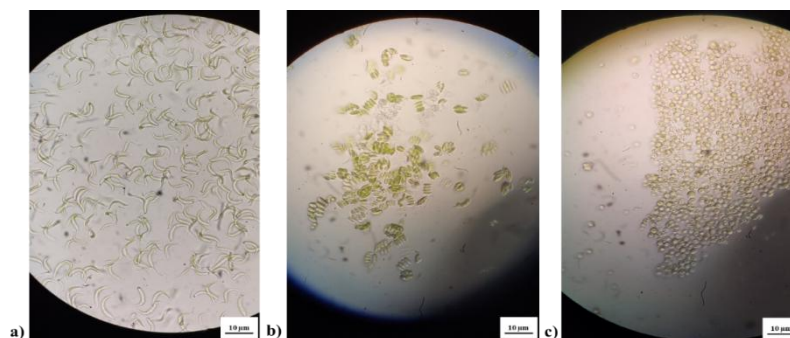


Figura 11. Micrografia (60 $\times$) dei ceppi microalgali selezionati: a) E10, b) M42 e c) Z59.

4.2.2 Caratteristiche genotipiche

L'identificazione dei ceppi microalgali selezionati E10, M42 e Z59 è stata preliminarmente determinata utilizzando una sequenza parziale del 18S rRNA. L'albero filogenetico dei ceppi microalgali E10, M42 e Z59 è riportato in Figura 12.

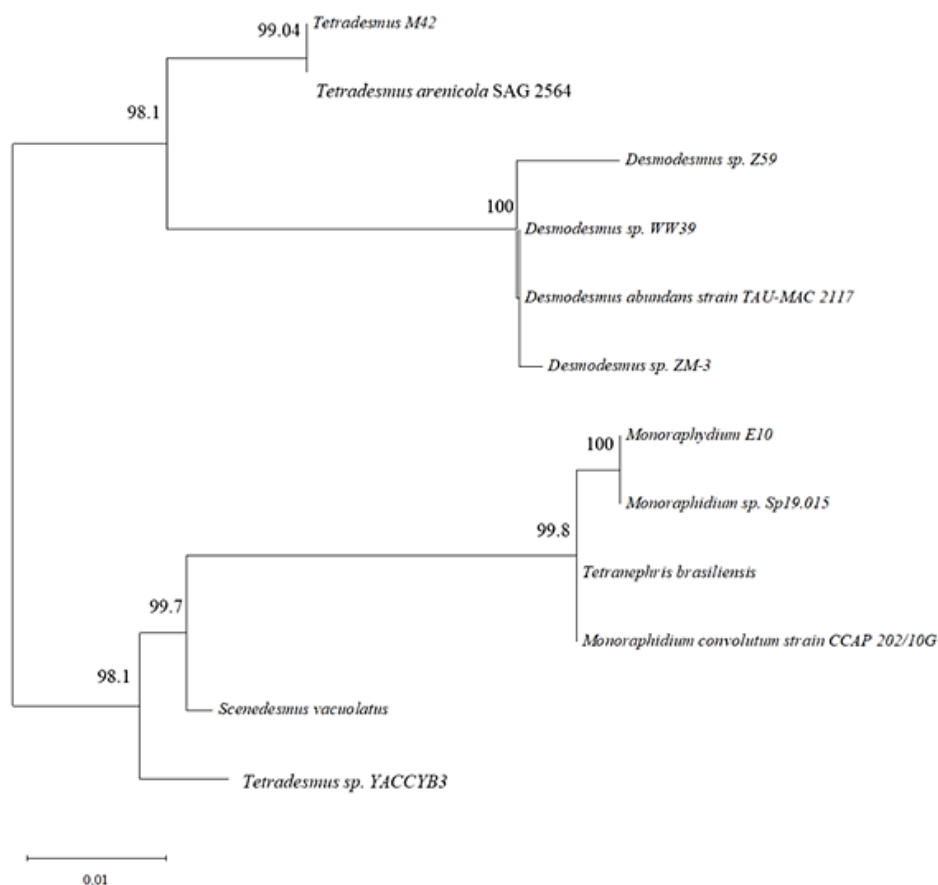


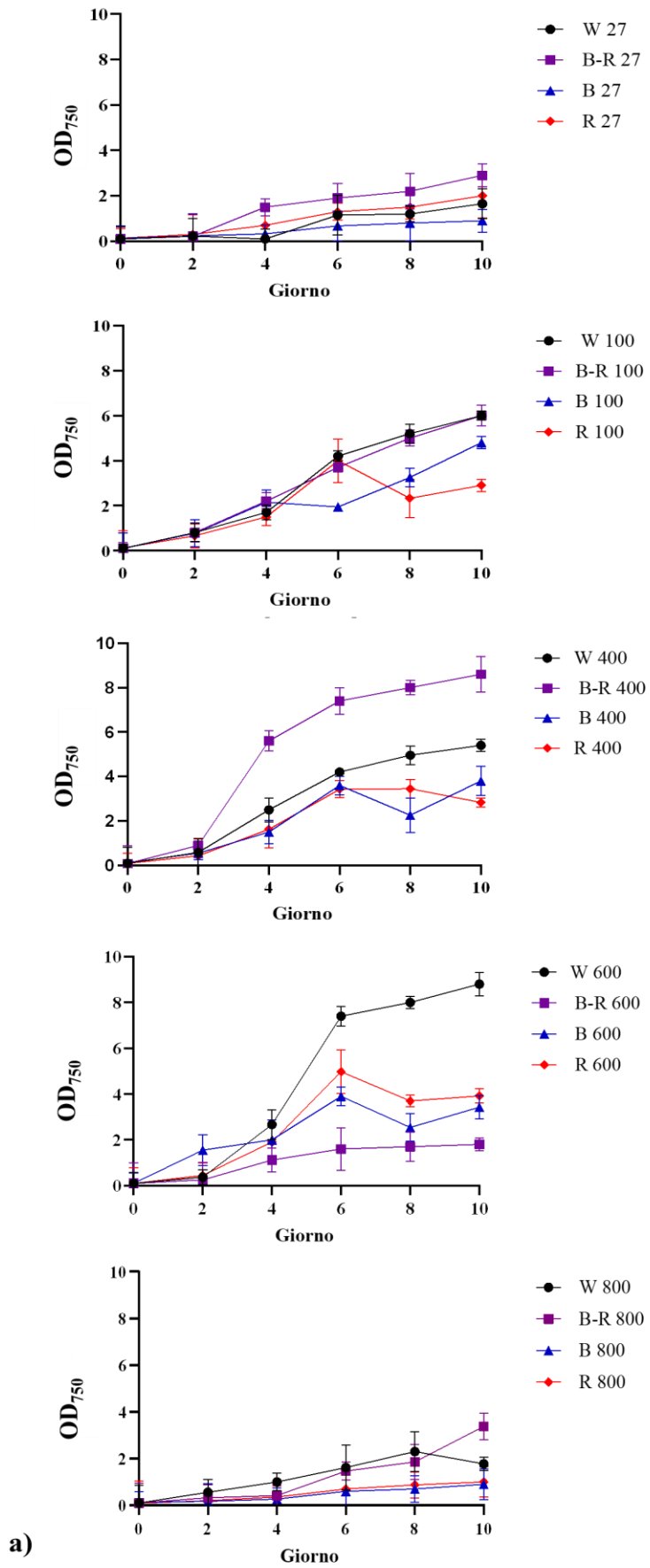
Figura 12. Albero filogenetico dei ceppi microalgali selezionati M42, Z59 e E10 basato su una sequenza parziale del 18S rRNA costruito con il metodo *neighbor-joining* utilizzando l'algoritmo *Kimura-2parameters*.

I ceppi E10, e Z59 sono stati attribuiti (100% di similarità) rispettivamente al genere *Monoraphidium* sp. Sp19.015, appartenente alla famiglia delle *Selenastraceae* (ordine: *Sphaeropleales*, classe: *Chlorophyceae*) e *Desmodesmus abundans* TAU-MAC 2117 appartenente alle *Scenedesmaceae* (ordine: *Sphaeropleales*, classe: *Chlorophyceae*), mentre la sequenza parziale del ceppo M42 ha mostrato una similarità del 99.04% al ceppo di collezione *Tetradasmus arenicola* SAG 2564 (*Scenedesmaceae*).

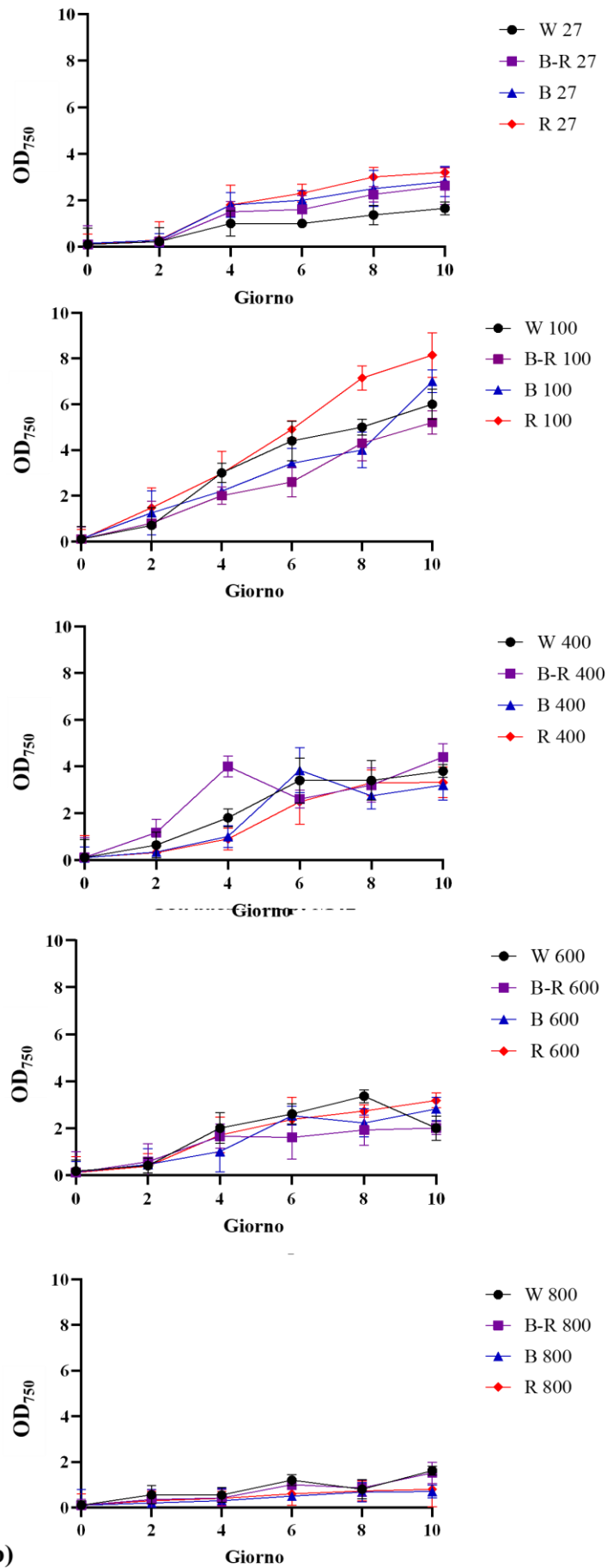
4.3 Effetto di differenti condizioni di illuminazione sulla crescita dei ceppi microalgali selezionati

Gli effetti dei LED bianchi, blu-rossi, blu e rossi a crescenti IL (27, 100, 400, 600, 800 $\mu\text{moli di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dopo dieci giorni di esposizione, sulla crescita di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59, sono mostrati rispettivamente in Figura 13 e Tabella 8.

Monoraphidium sp. E10



Tetrademus sp. M42



b)

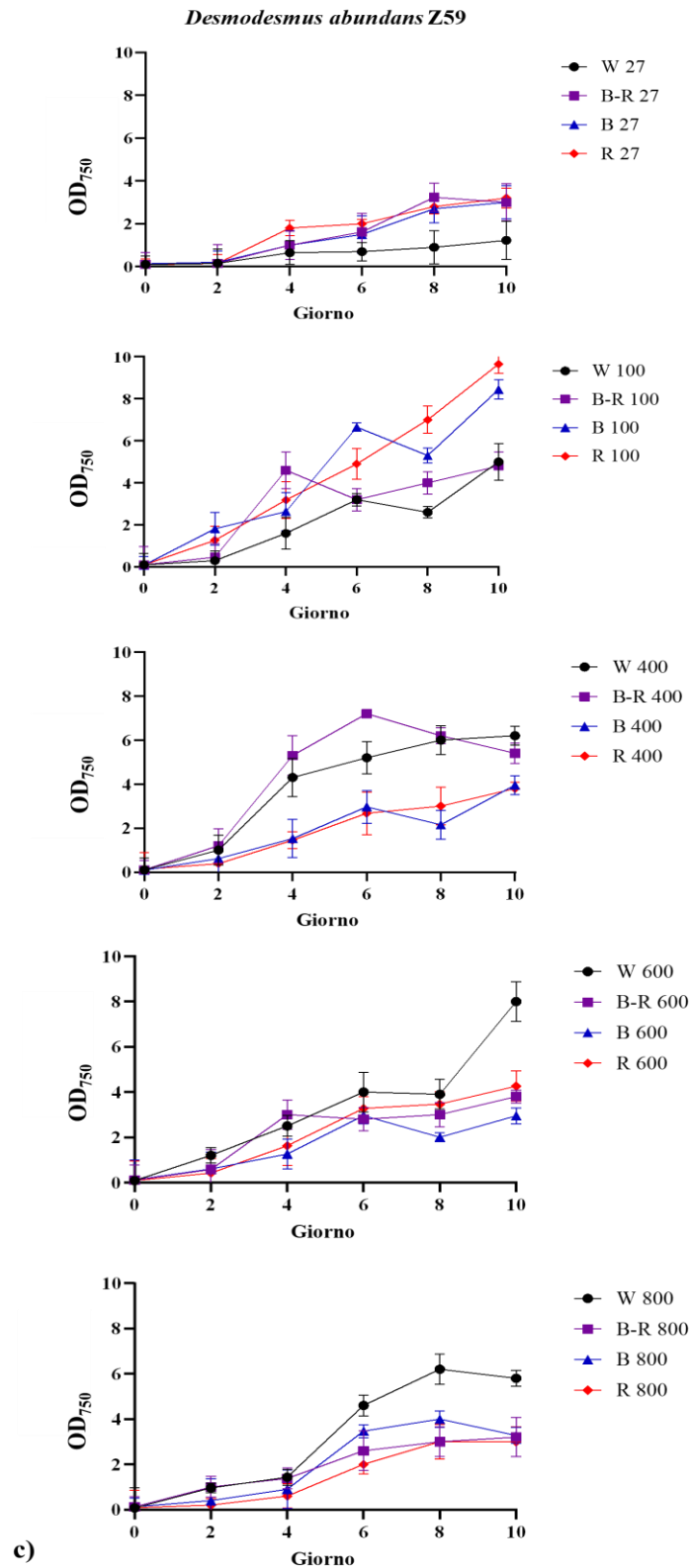


Figura 13. Crescita (OD_{750nm}) di *Monoraphidium* sp. E10 (a), *Tetradismus* sp. M42 (b) e *Desmodesmus abundans* Z59 (c) esposti per dieci giorni a LED bianchi (W), blu-rossi (B-R), blu (B) e rossi (R) a crescenti IL (27, 100, 400, 600, 800). Ciascun punto rappresenta la media di tre misure sperimentali mentre la barra rappresenta la deviazione standard (media $\pm$ DS).

Tabella 8. Valori del tasso specifico di crescita (μ) di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 esposti per dieci giorni a LED bianchi, blu-rossi, blu e rossi a crescenti IL (27, 100, 400, 600, 800). Dati da esperimenti in triplicato (media $\pm$ DS).

Intensità ($\mu\text{mol di fotoni}$ $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	LED	Tasso specifico di crescita (μ)		
		<i>Monoraphidium</i> sp. E10	<i>Tetradasmus</i> sp. M42	<i>Desmodesmus</i> <i>abundans</i> Z59
27	Bianchi	0,28 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,028	0,25 $\pm$ 0,04
	Blu-rossi	0,33 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,07
	Blu	0,18 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,065	0,30 $\pm$ 0,07
	Rossi	0,26 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,04
100	Bianchi	0,4 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,07	0,39 $\pm$ 0,07
	Blu-rossi	0,4 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,06
	Blu	0,38 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,04
	Rossi	0,32 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,04
400	Bianchi	0,38 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,04
	Blu-rossi	0,44 $\pm$ 0,08	0,37 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,05
	Blu	0,34 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,04
	Rossi	0,34 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,028
600	Bianchi	0,447 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,07
	Blu-rossi	0,29 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,03
	Blu	0,35 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,035
	Rossi	0,37 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,032	0,38 $\pm$ 0,06
800	Bianchi	0,28 $\pm$ 0,028	0,27 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,036
	Blu-rossi	0,35 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,046	0,32 $\pm$ 0,08
	Blu	0,19 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,028	0,32 $\pm$ 0,035
	Rossi	0,23 $\pm$ 0,065	0,20 $\pm$ 0,07	0,35 $\pm$ 0,065

Dopo dieci giorni di esposizione alle diverse condizioni di illuminazione, i ceppi E10, M42 e Z59 hanno mostrato ognuno una diversa condizione di illuminazione (lunghezza d'onda ed IL) di crescita ottimale. E10 ha mostrato il più alto tasso di crescita in presenza di LED bianchi con IL 600 ($\mu = 0,447 \pm 0,05$) con un valore finale di $\text{OD}_{750} = 8,8 \pm 0,52$.

M42 e Z59, a differenza di E10, hanno presentato una maggiore capacità di crescere quando esposti a LED rossi con IL pari a 100 ($\mu = 0,44 \pm 0,06$ e $0,45 \pm 0,04$ rispettivamente) con un valore finale di OD_{750} rispettivamente = $8,15 \pm 0,97$ e $9,65 \pm 0,43$.

4.4 Valutazione della quantità di biomassa microalgale prodotta e del tasso di fissazione di CO₂

La quantità di biomassa (g/L) ed il tasso di fissazione della CO₂ (P_{CO2}) ottenuti da colture in 250 mL di BG11B di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59, dopo dieci giorni di esposizione alle specifiche condizioni di illuminazione ottimali (identificate nel paragrafo 4.3), rappresentate da LED bianchi con IL 600 per E10 e LED rossi con IL 100 per M42 e Z59 (Figura 14) sono riportati in Tabella 9.

Tabella 9. Biomassa finale (g/L), produttività (P_B, g/L × giorno) e tasso fissazione della CO₂ (P_{CO2}, g/L × giorno) di E10 dopo esposizione a LED bianchi con IL 600 e M42 e Z59 dopo esposizione a LED rossi con IL 100. I dati mostrano risultati da esperimenti in triplicato (media ± DS).

Ceppi microalgali	Biomassa finale (g/L)	P _B (g/L × giorno)	P _{CO2} (g/L × giorno)
E10	0,56 ± 0,01	0,056 ± 0,001	0,1 ± 0,001
M42	0,64 ± 0,009	0,064 ± 0,0009	0,12 ± 0,0009
Z59	0,74 ± 0,02	0,074 ± 0,002	0,14 ± 0,002

I ceppi microalgali selezionati, in condizione di illuminazione ottimale, hanno mostrato differenti capacità di produrre biomassa, con Z59 più performante (0,074 ± 0,002 g/L × giorno) seguito da M42 (0,064 ± 0,0009 g/L × giorno) e E10 (0,056 ± 0,001 g/L × giorno). La più alta efficienza nella produzione di biomassa dopo dieci giorni da parte del ceppo Z59, è confermata dal tasso di fissazione della CO₂, calcolato in termini di CO₂ consumata giornalmente da questa microalga (P_{CO2} = 0,14 ± 0,02 g/L × giorno).

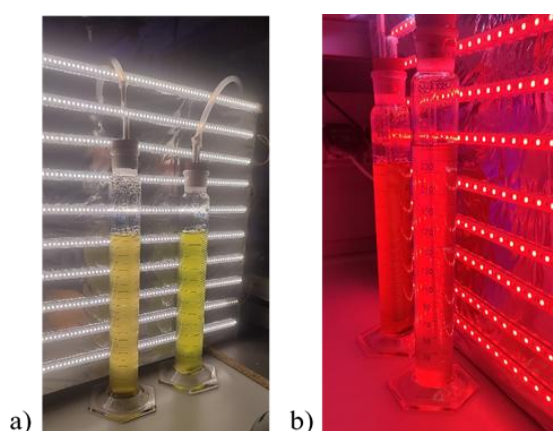


Figura 14. Colture in 250 mL di BG11B di a) E10 esposto a LED bianchi con IL 600 e b) M42 e Z59 esposti a LED rossi con IL 100.

4.5 Effetto delle differenti condizioni di illuminazione sulla produzione e composizione dei carotenoidi

4.5.1 Valutazione della presenza di carotenoidi mediante analisi spettroscopica *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR)

La presenza di carotenoidi nelle biomasse secche di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetrademus* sp. M42, *Desmodesmus abundans* Z59, ottenute da colture esposte a LED bianchi con IL 100 è stata valutata mediante l' *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR). I valori delle lunghezze d'onda (cm^{-1}) e l'assegnazione ai diversi gruppi funzionali specifici dei carotenoidi (astaxantina, β -carotene e luteina) degli spettri delle biomasse (Figura 15) sono riportati nella Tabella 10.

Tabella 10. Valori delle lunghezze d'onda (cm^{-1}) ATR-FTIR e la loro assegnazione ai diversi gruppi funzionali dei carotenoidi.

Lunghezza d'onda (cm^{-1})	Assegnazione	Referenza
2855, 1740, 1650, 1075	Astaxantina	Liu e Huang (2016)
2855	β -carotene	Liu e Huang (2016)
1021	Luteina	Mora-Gutierrez et al. (2022)

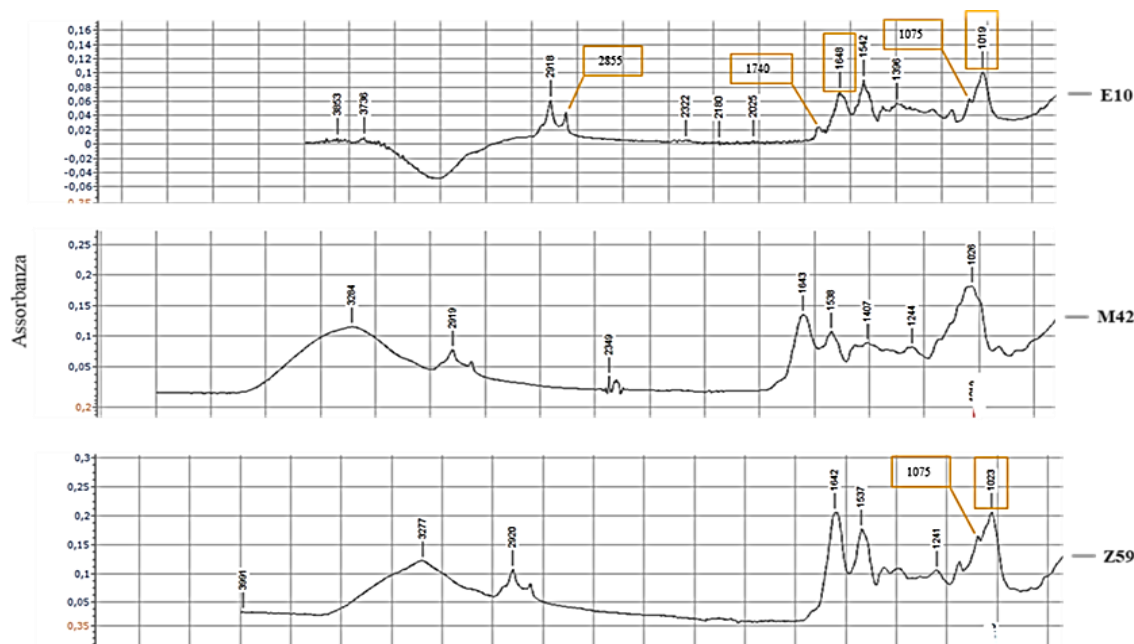


Figura 15. Spettri ATR-FTIR delle biomasse di E10, M42 e Z59 dopo esposizione a LED bianchi con IL 100. La presenza di picchi specifici dei carotenoidi è indicata dai riquadri di colore giallo.

Gli spettri delle biomasse dei ceppi E10, M42 e Z59 hanno mostrato differenze rilevanti riguardo la presenza di picchi relativi ai carotenoidi quali astaxantina (2855, 1740, 1650, 1075 cm^{-1}), β -carotene (2855 cm^{-1}) e luteina (1021 cm^{-1}). Lo spettro di E10 ha mostrato tutti i picchi sopraelencati indicando una presenza maggiore di carotenoidi. Differentemente, lo spettro di M42 non ha mostrato nessun picco relativo all'astaxantina, al β -carotene ed alla luteina, mentre in quello di Z59 sono presenti solo i picchi 1075 e 1023 cm^{-1} relativi rispettivamente all'astaxantina ed alla luteina.

4.5.2 Valutazione della produzione di carotenoidi di *Monoraphidium* sp. E10 mediante analisi spettrofotometrica

Il contenuto di carotenoidi estratti dalle biomasse di *Monoraphidium* sp. E10 ottenute dopo dieci giorni di esposizione a LED bianchi, blu-rossi, blu e rossi a crescenti IL (27, 100, 400, 600 ed 800 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sono mostrati in Figura 16.

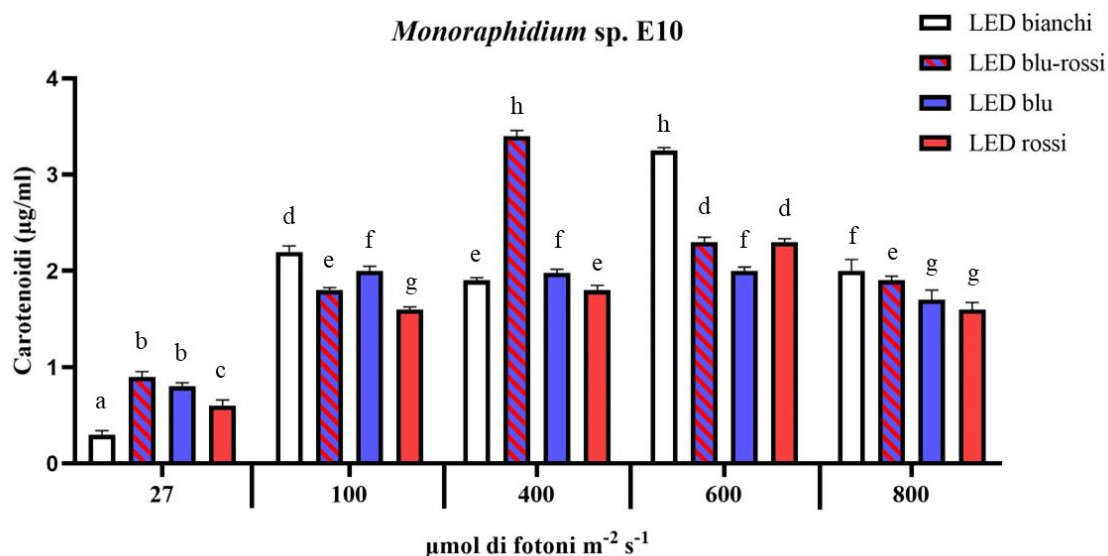


Figura 16. Contenuto di carotenoidi ($\mu\text{g/mL}$) prodotti da *Monoraphidium* sp. E10 dopo esposizione per dieci giorni a differenti condizioni di illuminazione. Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. Le lettere rappresentano i gruppi significativamente diversi ($p \leq 0.05$).

Monoraphidium sp. E10 ha prodotto la quantità più elevata di carotenoidi quando esposto a LED blu-rossi IL 400 e LED bianchi IL 600 (rispettivamente 3,4 e 3,25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 16 e 17).

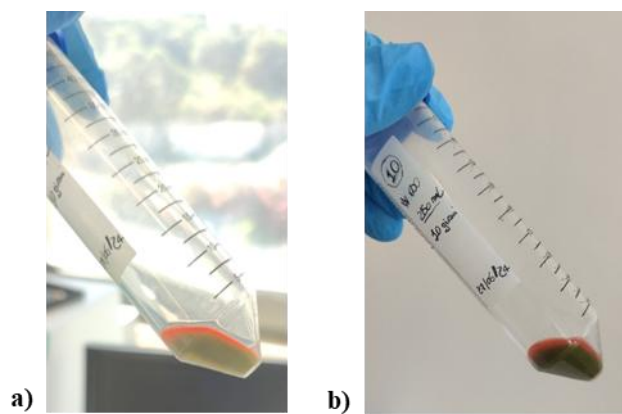


Figura 17. Carotenoidi (porzione color arancio) evidenti dopo centrifugazione ad $8000 \times g$ per 10 minuti della coltura di E10 ottenuta con **a)** LED blu-rossi con IL 400 e **b)** LED bianchi con IL 600.

4.5.3 Caratterizzazione dei carotenoidi estratti da *Monoraphidium* sp. E10 mediante analisi cromatografica

La caratterizzazione dei carotenoidi prodotti da *Monoraphidium* sp. E10 esposto a LED blu-rossi con IL 400 e LED bianchi con IL 600, è stata confrontata con la caratterizzazione dei carotenoidi prodotti da E10 esposto alle condizioni di LED bianchi con IL100. I profili dei carotenoidi ottenuti mediante analisi cromatografica liquida (LC-APCI-MS), sono riportati nella Tabella 11.

Tabella 11. Profili dei carotenoidi prodotti da *Monoraphidium* sp. E10 rispettivamente dopo esposizione a LED bianchi IL 100 (W100) ed IL 600 (W 600) e LED blu-rossi IL 400 (B-R 400), ottenuti mediante analisi LC-APCI-MS. TR: tempo di ritenzione; “presente” (+), “assente” (–).

Composto	Classe di carotenoide	TR	[M+H]	E10 W 100	E10 W 600	E10 B-R 400
(E)-Fucoxantina	xantofilla	3.3	650	+	+	+
β -Zeacarotene	carotene	4.2	540	+	–	+
Astaxantina	xantofilla	4.5	554	+	+	+
3'-Idrossiechinone	xantofilla	4.6	568	–	–	–
Echinone	xantofilla	4.7	552	+	+	+
7,8-Dideidroastaxantina	xantofilla	5.0	596	–	+	–
Vaucheriaxantina	xantofilla	5.1	604	–	–	+
Criptoxantina α	xantofilla	5.3	554	+	+	+
Criptoxantina β	xantofilla	5.6	554	+	+	+
Luteina	xantofilla	6.1	570	–	–	+
α -Carotene	carotene	6.4	538	+	+	+
Norbixina	carotene	7.0	382	–	–	+
Apocarotenale	carotene	8.0	418	+	+	+
Bixina	carotene	8.1	396	–	–	–
Astaxantina acetato 5,6/5,8-epossido	xantofilla	8.5	698	–	+	+
Diatoxantina	xantofilla	9.1	568	–	–	+
Vaucheriaxantina 3-acetato 19'-octanoate	xantofilla	9.2	786	+	–	–
β -Carotene	carotene	9.5	538	–	–	+
Astaxantina diacetato	xantofilla	9.7	682	–	+	+
Astaxantina acetato 5,6-endoperossido	xantofilla	10.8	714	–	+	+
Neoxantina	xantofilla	11.5	602	–	–	+
Astaxantina acetato 5,8-endoperossido	xantofilla	12.9	714	–	+	+
Adonirubina	xantofilla	16.1	582	–	–	+
Zeaxantina	xantofilla	17.4	570	+	+	+
Fitoene 1,2-epossido	carotene	21.7	562	–	–	+
Mixol 2'-fucoside	xantofilla	25.1	734	–	–	–

Etil etere dell'acido apo-8'-carotenoico	carotene	64.8	462	+	+	+
---	----------	------	-----	---	---	---

La caratterizzazione dei carotenoidi estratti dal ceppo E10 ha rilevato la presenza di 27 differenti carotenoidi tra cui 19 xantofille e 8 caroteni, mostrando interessanti differenze tra i profili di carotenoidi prodotti dopo esposizione di E10 a LED bianchi con IL 100 ed IL 600 e LED blu-rossi con IL 400 (Tabella 11). In particolare, il profilo di carotenoidi estratti da E10 esposto a LED bianchi con IL 600 rispetto all'esposizione con IL 100 ha mostrato differenze riguardanti un solo carotenoide (β -zeacarotene) prodotto solo con LED bianchi IL 100, mentre ha mostrato differenze riguardanti cinque xantofille rappresentate tutte da forme differenti e derivati dell'astaxantina (rispettivamente 7,8-dideidroastaxantina, astaxantina acetato 5,6/5,8-epossido, astaxantina diacetato, astaxantina acetato 5,6-endoperossido, astaxantina acetato 5,8-endoperossido) tutte prodotte dopo esposizione a LED bianchi IL 600. Diversamente i profili dei carotenoidi estratti da E10, dopo esposizione a LED bianchi con IL 600 e LED blu-rossi con IL 400, hanno mostrato differenze riguardanti quattro caroteni (β -zeacarotene, norbixina, β -carotene e fitoene 1,2-epossido) e sei xantofille (luteina, 7,8-dideidroastaxantina, vaucheriaxantina, diatoxantina, neoxantina e adonirubina) prodotti solo con LED blu-rossi ed IL 400, ad eccezione della 7,8-dideidroastaxantina prodotta solo con LED bianchi ed IL 600.

4.6 Valutazione dell'attività biologica (antibatterica ed antibiofilm) dei metaboliti secondari estratti in etanolo dalla biomassa microalgale ottenuta con differenti condizioni di illuminazione

4.6.1 Valutazione dell'attività antibatterica dei metaboliti secondari estratti in etanolo

I metaboliti secondari estratti in etanolo (ME) (1 mg/mL) dalla biomassa di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 (100 mg), ottenuta dopo 10 giorni di esposizione a LED bianchi con IL 100, non hanno indotto la formazione di aloni di inibizione sui ceppi batterici patogeni testati (*Photobacterium piscicida*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Vibrio harveyi* G5 e *Vibrio parahaemolyticus* L12G), indicando che non posseggono attività antibatterica.

4.6.2 Valutazione dell'attività antibiofilm dei metaboliti secondari estratti in etanolo

I ME (1 mg/mL) dalla biomassa di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 (100 mg), ottenuti dopo 10 giorni di esposizione a LED bianchi con IL 100, hanno mostrato la capacità di ridurre il biofilm del ceppo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 come riportato in Figura 18.

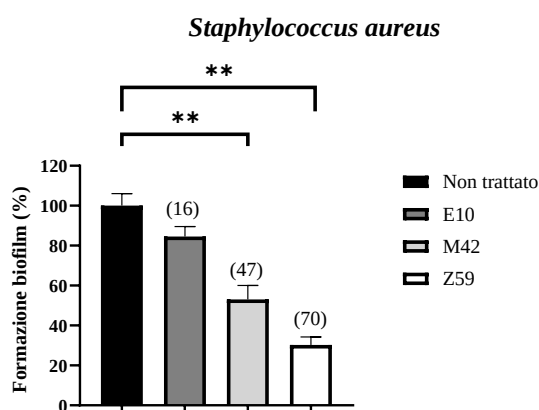


Figura 18. Formazione del biofilm (%) di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dopo 24 ore di trattamento con i ME (1 mg/mL) dalla biomassa di E10, M42 e Z59. Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. La riduzione del biofilm espressa in percentuale è riportata tra parentesi. Significativamente differenti secondo analisi ANOVA a due vie * ($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$).

I ME da ogni ceppo hanno mostrato una differente attività antibiofilm. I ME dal ceppo Z59 hanno mostrato la miglior capacità di ridurre, dopo 24 ore, la formazione di biofilm (70 %) di *S. aureus* seguiti dai ME dal ceppo M42 (47%), mentre quelli estratti da E10 hanno mostrato una scarsa capacità di ridurre la produzione di biofilm (16%).

Valutazione dell'attività antibiofilm dei metaboliti secondari estratti in etanolo dalla biomassa di Desmodesmus abundans Z59 esposto a differenti condizioni di illuminazione

La capacità di inibire dopo 24 ore la formazione del biofilm di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 da parte dei ME (1 mg/mL) dalle biomasse di *Desmodesmus abundans* Z59, ottenute dopo esposizione per dieci giorni a LED bianchi, blu-rossi, blu e rossi a crescenti IL (27, 100, 400, 600 ed 800 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sono mostrati in Figura 19.

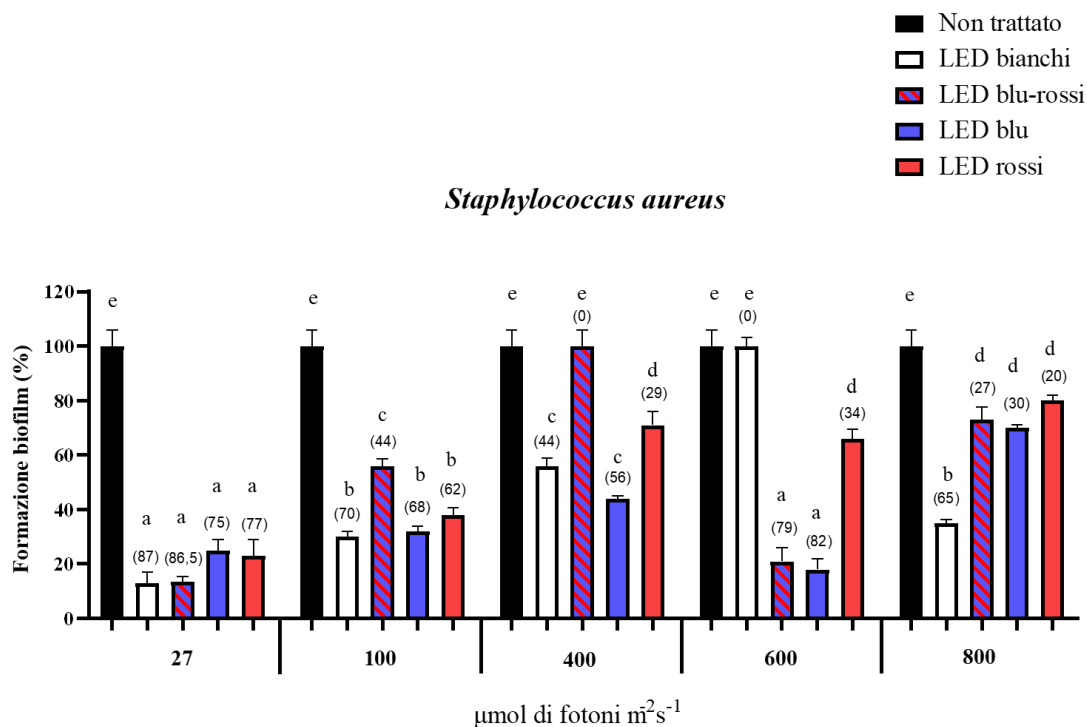


Figura 19. Formazione del biofilm (%) di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dopo 24 ore di trattamento con i ME (1 mg/mL) dalle biomasse del ceppo Z59 ottenute dopo dieci giorni di esposizione a differenti condizioni di illuminazione. Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. La riduzione del biofilm espressa in percentuale è riportata tra parentesi. Le lettere rappresentano i gruppi significativamente diversi ($p \leq 0.05$).

I ME dalle biomasse di Z59, ottenute dopo esposizione a differenti condizioni di illuminazione, hanno mostrato differenti capacità di ridurre la formazione del biofilm di *S. aureus*, in particolare i ME dalle biomasse ottenute dopo esposizione a LED bianchi o blu-rossi con IL 27 hanno ridotto rispettivamente dell' 87 e 86,5 % il biofilm di *S. aureus*, seguiti da quelli ottenuti dalla biomassa esposta a LED blu-rossi o blu con IL 600 (rispettivamente 79 e 82 %). Questi dati suggeriscono che i ME che inibiscono la formazione del biofilm di *S. aureus*, possono essere indotti da stress dettati da IL bassa ($27 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ed alta ($600 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) di specifiche lunghezze d'onda.

4.7 Valutazione della capacità della biomassa microalgale secca di adsorbire e ridurre la tossicità di arsenico, mercurio e vanadio

4.7.1 Valutazione dell'adsorbimento di As^{III} , As^{V} , Hg^{II} e V^{V} da parte della biomassa mediante Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS)

La capacità delle biomasse secche di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradismus* sp. M42, *Desmodesmus abundans* Z59 (1000 $\mu\text{g/mL}$), ottenute dopo 10 giorni di esposizione a LED bianchi con IL 100, di adsorbire dopo 30 minuti As^{III} , As^{V} , Hg^{II} o V^{V} (MP) (200 $\mu\text{g/mL}$) è riportata in Figura 20.

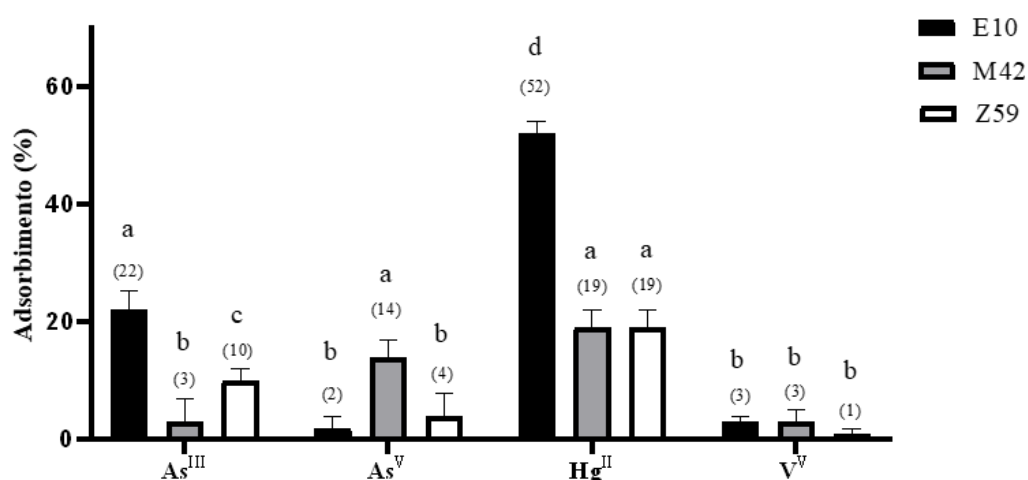


Figura 20. Adsorbimento (%) di As^{III} , As^{V} , Hg^{II} e V^{V} (200 $\mu\text{g/mL}$) dopo 30 min di trattamento con le biomasse (1000 $\mu\text{g/mL}$) di E10, M42 o Z59 ottenute dopo esposizione a LED bianchi con IL 100. Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. La percentuale di ciascun metallo adsorbito è riportata tra parentesi. Le lettere rappresentano i gruppi significativamente diversi ($p \leq 0.05$).

La biomassa di E10 ha legato Hg^{II} più efficacemente (52%) rispetto alla biomassa di M42 e Z59 (rispettivamente, 19 e 19%) mentre la capacità di adsorbimento di As^{III} , As^{V} e V^{V} è risultata trascurabile per tutte e tre le biomasse, ad eccezione di E10 che se pur bassa ha presentato una maggiore capacità di legare As^{III} (22%).

Sulla base di questi dati preliminari, è stata valutata la capacità di legare MP della biomassa secca di E10 (1000 $\mu\text{g/mL}$) ottenuta dopo dieci giorni di esposizione alla condizione di illuminazione migliore per la produzione di biomassa (LED bianchi con IL 600) (paragrafo 4.3) (Figura 21).

Monoraphidium sp. E10

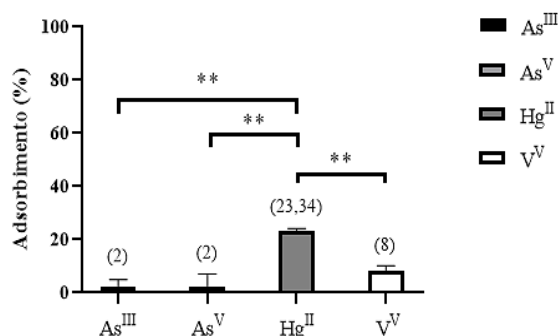


Figura 21. Adsorbimento (%) di As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V (200 µg/mL) dopo 30 min di trattamento con la biomassa (1000 µg/mL) di E10 ottenuta dopo esposizione a LED bianchi con IL 600. Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. La percentuale di ciascun metallo adsorbito è riportata tra parentesi. Significativamente differenti secondo analisi ANOVA a due vie *($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$).

La biomassa si è dimostrata meno efficiente nell'adsorbimento sia di Hg^{II} (23,34%) che di As^{III} (2%) rispetto alla biomassa ottenuta dopo esposizione a LED bianchi con IL 100 (rispettivamente 52 e 22%).

4.7.2 Determinazione del potenziale Zeta

I valori del potenziale Zeta (mV) della biomassa di E10 ottenuta dopo esposizione a LED bianchi con IL 100 e di As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V in soluzioni acquose a pH 7, sono riportati in Figura 22.

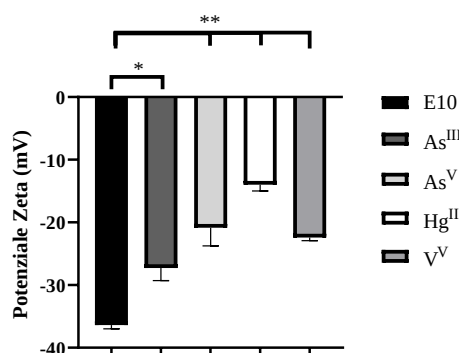


Figura 22. Valori del potenziale Zeta della biomassa di E10 e dei metalli As^{III}, As^V, Hg^{II} e V^V in soluzioni acquose a pH 7. Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. Significativamente differenti secondo analisi ANOVA a due vie *($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$).

La biomassa di E10 ha mostrato il valore più negativo di potenziale Zeta ($-36,4 \pm 0,6$ mV) mentre il meno negativo è stato registrato per il Hg^{II} (-14 ± 1 mV). Il valore del potenziale Zeta della biomassa E10 suggerisce che essa può legare più efficientemente composti carichi positivamente rispetto a composti carichi negativamente.

4.7.3 Valutazione dei cambiamenti nella struttura chimica della biomassa di *Monoraphidium* sp. E10 in presenza di As^{III} e Hg^{II} mediante analisi spettroscopica *Attenuated Total Reflectance-Transformation Infrared* (ATR-FTIR)

L'analisi spettroscopica ATR-FTIR è stata utilizzata per determinare i cambiamenti molecolari e conformazionali della biomassa del ceppo E10, ottenuta dopo esposizione a LED bianchi con IL 100, in presenza di Hg^{II} ed As^{III} . Gli spettri delle biomasse sono mostrati in Figura 23 ed i valori delle lunghezze d'onda e l'assegnazione ai diversi gruppi funzionali degli spettri delle biomasse sono riportati nella Tabella 12.

Tabella 12. Valori delle lunghezze d'onda (cm^{-1}) ATR-FTIR e la loro assegnazione ai diversi gruppi funzionali delle biomasse.

Lunghezza d'onda (cm^{-1})	Assegnazione	Referenza
4000-2500	OH <i>stretching</i>	Lee et al. (2015)
3400-3200	OH/N-H	Xia et al. (2016)
1655	C=O (Amide I)	Giordano et al. (2001); Movasaghi et al. (2008); Murdock and Wetzel (2009)
1390	CH ₂ /CH ₃ (proteici o dei gruppi carbossilici)	Giordano et al. (2001); Movasaghi et al. (2008); Murdock and Wetzel (2009)
1240	P=O (fosfolipidi)	Giordano et al. (2001); Movasaghi et al. (2008); Murdock and Wetzel (2009)
900-1200	<i>stretching</i> (C-O-C) <i>vibrations</i> (polisaccaridi)	Xia et al. (2016)

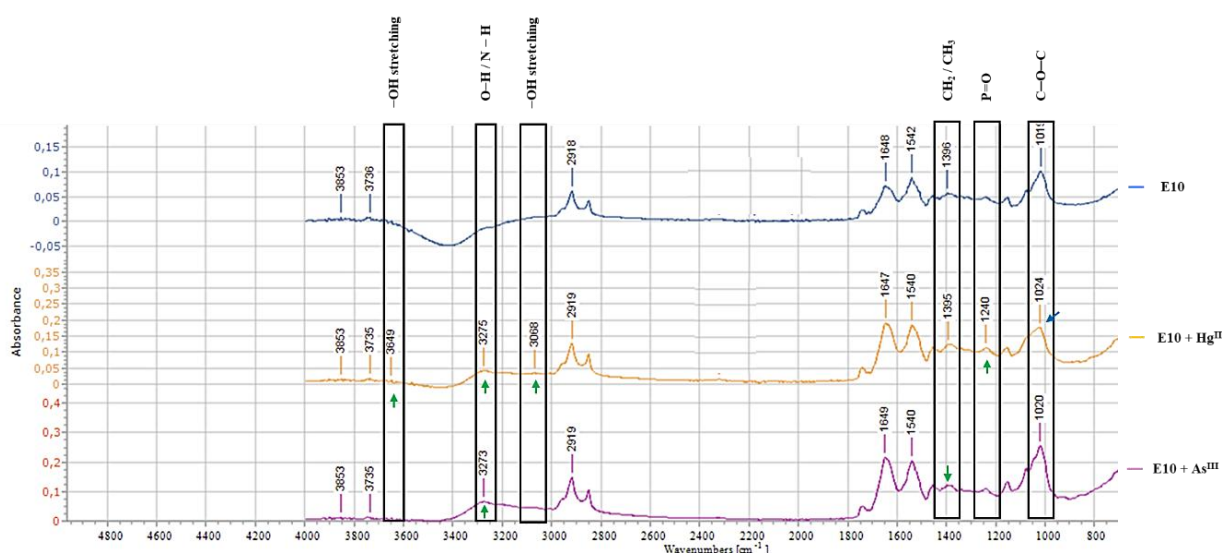


Figura 23. Spettri ATR-FTIR della biomassa di E10, prima e dopo esposizione ad Hg^{II} e As^{III} . I principali cambiamenti negli spettri sono indicati come: comparsa di nuovi picchi (frecche verdi verso l'alto), scomparsa di picchi (frecche verdi verso il basso) o spostamento dei picchi (frecche azzurre verso sinistra o destra).

Lo spettro della biomassa del ceppo E10, in presenza di Hg^{II} , ha mostrato la comparsa dei picchi 3649 cm^{-1} e 3068 cm^{-1} corrispondenti alla regione degli *stretching* dei gruppi -OH attribuiti ai gruppi fenolici, alcolici e carbossilici, del picco 3275 cm^{-1} attribuito ai gruppi funzionali O-H e N-H e del picco 1240 cm^{-1} indicativo del gruppo P=O dei fosfolipidi, suggerendo un coinvolgimento di questi gruppi funzionali nell'adsorbimento del Hg^{II} . Inoltre, è stato osservato lo spostamento del picco 1019 cm^{-1} , corrispondente agli

stretching (C–O–C) *vibrations* dei polisaccaridi, verso valori di frequenza più elevati (1024 cm^{-1}), indicando la possibile formazione di un nuovo legame. Differentemente, lo spettro della biomassa di E10 ha mostrato pochi cambiamenti a livello dei gruppi funzionali dopo esposizione all' As^{III} come la comparsa del picco 3273 cm^{-1} attribuito ai gruppi funzionali O–H e N–H e la scomparsa del picco 1396 cm^{-1} attribuito ai gruppi CH_2/CH_3 proteici o dei gruppi carbossilici, confermando la più bassa capacità di interagire con l' As^{III} rispetto al Hg^{II} .

4.7.4 Valutazione della riduzione della tossicità di As^{III} e Hg^{II} da parte della biomassa di *Monoraphidium* sp. E10

Test di inibizione della bioluminescenza di Vibrio harveyi

Gli effetti di Hg^{II} e As^{III} non trattati e trattati con la biomassa del ceppo E10 ($1000\text{ }\mu\text{g/mL}$), sulla inibizione della luminescenza di *Vibrio harveyi* G5 sono stati espressi in EC_{50} (Figura 24).

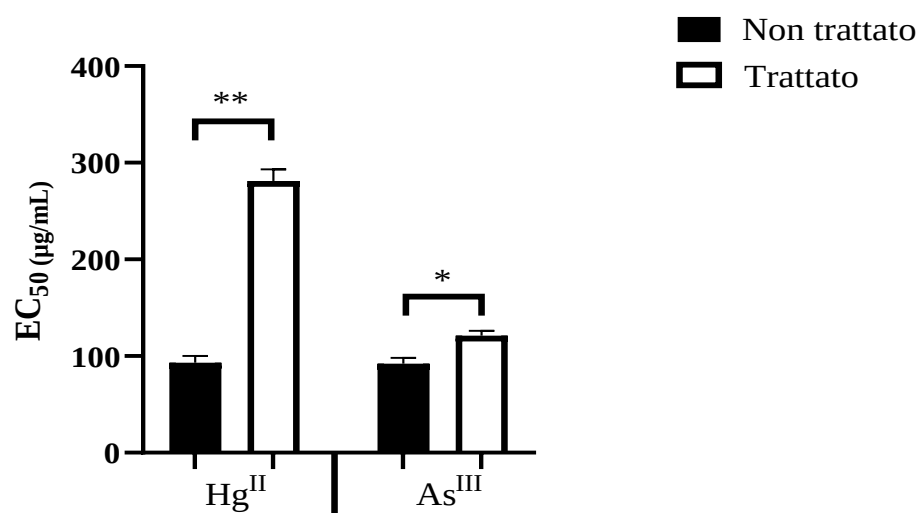


Figura 24. Inibizione della luminescenza di *Vibrio harveyi* G5 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dopo 15 min, espressa come EC_{50} , delle soluzioni di Hg^{II} e As^{III} (da $0,2$ a $200\text{ }\mu\text{g/mL}$) non trattate e trattate con la biomassa di E10 ($1000\mu\text{g/mL}$). Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. Significativamente diversi mediante t-test * ($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$) rispetto al non trattato.

Il trattamento con la biomassa di E10, dopo 30 min, ha aumentando di tre volte il valore di EC_{50} (da 93 ± 7 a $281 \pm 12\text{ }\mu\text{g/mL}$) indicando una riduzione significativa della tossicità del Hg^{II} per *Vibrio harveyi* G5. Similmente anche l' EC_{50} dell' As^{III} è aumentato (da $92 \pm$

6 a $121 \pm 5 \mu\text{g/mL}$) dopo il trattamento con la biomassa di E10, anche se in maniera minore rispetto a quello del Hg^{II} , indicando che l'attività di detossificazione della biomassa è più efficace con il Hg^{II} rispetto all' As^{III} .

Test di vitalità di *Phaeodactylum tricornutum*

Gli effetti inibitori delle soluzioni di Hg^{II} e As^{III} a diverse concentrazioni (da 0,2 a 200 $\mu\text{g/mL}$) non trattate e trattate con la biomassa del ceppo E10 (1000 $\mu\text{g/mL}$) sulla crescita di *Phaeodactylum tricornutum* (espressi come valori IC_{50}), dopo 72 ore di incubazione, sono riportati nella Figura 25.

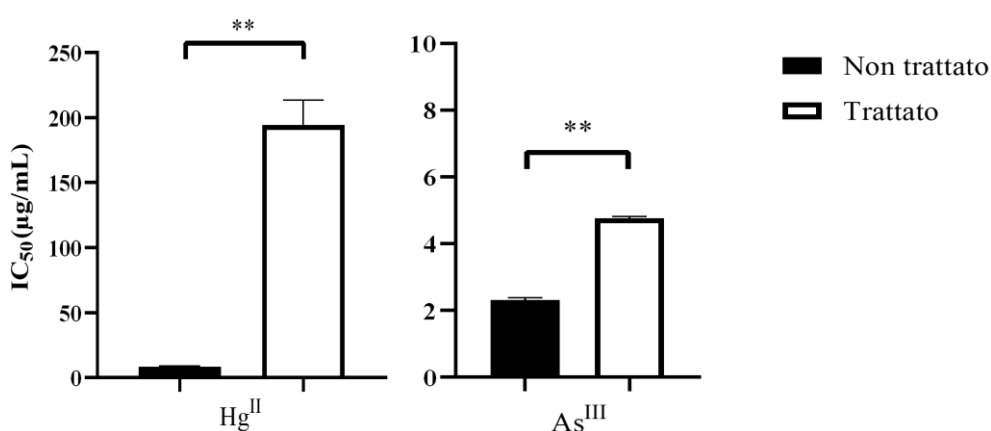


Figura 25. Inibizione della crescita di *Phaeodactylum tricornutum*, incubato a 25 °C per 72 ore, espressa come IC_{50} , da parte delle soluzioni di Hg^{II} e As^{III} (da 0,2 a 200 $\mu\text{g/mL}$) non trattate e trattate con la biomassa di E10 (1000 $\mu\text{g/mL}$). Le barre rappresentano le medie di tre replicati sperimentali. Significativamente diversi mediante t-test * ($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$) rispetto al non trattato.

La biomassa di E10 ha ridotto significativamente la tossicità del Hg^{II} per *P. tricornutum* aumentando di più di 20 volte il valore di IC_{50} (da $8,5 \pm 0,59$ a $194,5 \pm 19 \mu\text{g/mL}$) a differenza dell' As^{III} verso cui la tossicità è stata meno ridotta con un aumento del valore di IC_{50} da $2,32 \pm 0,06$ a $4,77 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$.

5. DISCUSSIONI

La crescita delle microalghe, i cambiamenti metabolici e la conseguente sintesi di metaboliti secondari sono influenzati dalla composizione spettrale della luce e dall'intensità luminosa (IL). In questo contesto, è stato valutato l'effetto dello spettro e dell'intensità della luce artificiale emessa da componenti elettroniche chiamate diodi, (*Lighting Emitting Diode*, LED), sulla crescita e sulla produzione di biomassa e di metaboliti ad alto valore aggiunto, quali carotenoidi e metaboliti secondari solubili in etanolo, da parte di tre ceppi microalgali: *Monoraphidium* sp. E10 (famiglia delle *Selenastraceae*) e *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 (famiglia delle *Scenedesmaceae*), isolati dal Lago Maulazzo (Alcara li Fusi, Messina). La loro biomassa è stata inoltre valutata per la capacità di adsorbire e ridurre la tossicità di metalli pesanti da ambienti acquatici contaminanti.

A conferma della diversità tassonomica dei tre ceppi, i LED bianchi con IL 600 hanno indotto una maggiore crescita di *Monoraphidium* sp. E10, il quale ha mostrato una produttività pari a $0,056 \pm 0,001$ g/L $\times$ giorno (Tabella 9), maggiore della produttività di *Monoraphidium* sp. e *M. tortile* SAG 16.81 i quali hanno raggiunto entrambi una produttività pari a $0,033$ g/L $\times$ giorno dopo esposizione a LED bianchi con rispettivamente IL 200 e IL 400 (Bogen et al., 2013; Yadav et al., 2023). Tuttavia, *M. arcuatum* (SAG 14.81), *M. contortum* (SAG 47.80), *M. dybowski* (SAG 202-7e), *M. griffithii* (SAG 202-13), *M. neglectum* (SAG 48.87), *M. terrestre* (SAG 49.87) e *M. tortile* (SAG 16.81) hanno mostrato la capacità di crescere in maniera ottimale con LED bianchi ad un'intensità inferiore (IL 400) a quella utilizzata per E10 (Bogen et al., 2013). A differenza di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetradasmus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 hanno mostrato una produttività della biomassa più elevata quando esposti per dieci giorni a LED rossi (rispettivamente $0,064 \pm 0,0009$ e $0,074 \pm 0,002$ g/L $\times$ giorno) (Tabella 9) con un'intensità moderata (IL 100). Quanto detto, è probabilmente causato dall'accelerazione del ciclo cellulare indotta dalla luce rossa come descritto per *Scenedesmus quadricauda* (Fettah et al., 2022) e per altre diverse specie come *Chlorella* spp. o *Galdieria sulphuraria* (Lee e Palsson, 1996; Shu et al., 2012; Schulze et al., 2016; Stadnichuk et al., 2011). Alcuni dati di letteratura però sembrano in contrasto con queste evidenze; infatti, è stato riportato che alcuni ceppi quali *S. acutus* f. *alternans* (UTEX B 72) e *S. dimorphus* (UTEX 1237) hanno mostrato la più alta produttività, dopo esposizione per dieci giorni a luce bianca con IL 200 (rispettivamente $0,02$ e $0,005$ g/L $\times$ giorno) (Bohutskyi et al., 2016). Questo ultimo

dato potrebbe essere motivato dalla presenza più equilibrata di fotoni a differente energia (specifici della luce bianca) fornita ai fotosistemi (Bogen et al., 2013). L'effetto differente che lo spettro luminoso ha sulle microalghe può essere correlato alle loro diverse composizioni di pigmenti a livello dei fotosistemi. Infatti, sebbene la clorofilla *a* con picchi di assorbimento a 440, 625 e 680 nm (Kandilian e Pilon, 2013; Owens et al., 1987), può essere trovata in tutte le specie considerate, altri pigmenti come la clorofilla *b*, l' *antheraxantina* e la *violaxantina*, con picchi di assorbimento a circa 650 nm, 460–480 nm e 490 nm che consentono un assorbimento più elevato all'interno di questi intervalli, non vengono sintetizzate da tutte le specie (Owens et al., 1987; Pilon et al., 2011). Tuttavia, una certa diversità di fotoni è necessaria per stimolare i processi metabolici cellulari che dipendono da particolari lunghezze d'onda, come la luce rossa. Sebbene in studi precedenti siano state utilizzate fonti luminose dicromatiche per stimolare i fotorecettori sensibili alla luce blu e rossa, come fototropine e proteine simili al criptocromo (Schulze et al., 2016), nel presente studio la sorgente dicromatica blu-rossa non ha influito positivamente sulla crescita microalgale risultando inferiore a quella ottenuta alle intensità ottimali con LED bianchi per il ceppo E10 e LED rossi per i ceppi M42 e Z59. Questi risultati evidenziano dei limiti nella comprensione della fisiologia dei ceppi microalgali *Monoraphidium* sp. E10, *Tetrademus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59 che dovrà essere approfondita in futuro.

La luce oltre ad influenzare la crescita e la produzione di biomassa microalgale, determina anche il metabolismo cellulare e, conseguentemente, la produzione di metaboliti secondari. Gli spettri ATR-FTIR delle biomasse di E10, M42 e Z59, ottenute alle condizioni colturali di mantenimento (LED bianchi con IL 100) (Figura 15), hanno evidenziato la presenza di picchi relativi ai carotenoidi, quali *astaxantina*, β -carotene e *luteina*, nella biomassa secca del ceppo E10, rispetto a quelle di M42 e Z59. Sulla base di ciò, è stata valutata la capacità di E10 di produrre carotenoidi dopo esposizione per dieci giorni a differenti condizioni di illuminazione (LED bianchi, blu-rossi, blu e rossi con IL 27, 100, 400, 600 ed 800) con le migliori rese con LED blu-rossi con IL 400 e LED bianchi con IL 600 (rispettivamente 3,4 e 3,25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 16). La produzione di carotenoidi di E10 è stata inferiore a quella riportata per il ceppo *Monoraphidium* sp. NCIM 5585 (4 $\mu\text{g/mL}$) (Yadav et al., 2023), tuttavia quest'ultimo è stato coltivato per 30 giorni, pertanto, il tasso di produttività dei carotenoidi medio di E10 (0,33 $\mu\text{g/mL} \times \text{giorno}$) era notevolmente superiore a quello del ceppo NCIM 5585 (0,133 $\mu\text{g/mL} \times \text{giorno}$). Le differenti condizioni di illuminazione hanno influito anche sul profilo dei carotenoidi sintetizzati (Tabella 11), infatti, con la

stessa lunghezza d'onda (400-700 nm, LED bianchi) all'aumentare dell'intensità (da IL 100 ad IL 600) il ceppo E10 ha prodotto cinque differenti forme e derivati dell'astaxantina (7,8-dideidroastaxantina, astaxantina acetato 5,6/5,8-epossido, astaxantina diacetato, astaxantina acetato 5,6-endoperossido, astaxantina acetato 5,8-endoperossido). La presenza di queste forme principalmente ossidate dell'astaxantina, è stata correlata con uno stress ossidativo indotto dall'elevata intensità. Diversamente l'illuminazione con LED blu-rossi con IL 400, ha indotto la produzione di carotenoidi, tra cui il β -carotene, il β -zeacarotene, la norbixina, ed il fitoene 1,2-epossido e di xantofille come la luteina, la neoxantina e la diatoxantina, suggerendo che la variazione dello spettro della luce rispetto all'intensità possa indurre una maggiore produzione di carotenoidi. Tuttavia, diversamente da *Monoraphidium* sp. E10, *M. braunii* ha mostrato anche con LED bianchi la produzione di luteina e neoxantina ma non di astaxantina (Helamieh et al., 2024), indicando una differenza specie-specifica dell'effetto della luce sui profili di carotenoidi prodotti. Tra i carotenoidi prodotti, l'astaxantina, carotenoide secondario con una forte attività antiossidante (Nishida et al., 2023), mostra una capacità molto più forte (oltre 100 volte) di contrastare i radicali liberi dell'ossigeno rispetto a quella del tocoferolo (vitamina E) e ad altri carotenoidi, tra cui il β -carotene e la zeaxantina. Per queste sue proprietà, l'astaxantina mostra numerosi effetti benefici sulla salute umana (Guerin et al., 2003) e per questo è un prodotto molto richiesto in diversi settori come quello alimentare, dei mangimi per animali, cosmetico e farmaceutico. Studi in vitro e in vivo hanno dimostrato come l'astaxantina può offrire protezione contro l'osteoartrite e potenzialmente altre condizioni correlate ad uno stato di infiammazione cronica di basso grado, tra cui fragilità, aterosclerosi, morbo di Alzheimer, sarcopenia, osteoporosi e diabete di tipo 2 (Sun et al., 2019). Le diverse proprietà dell'astaxantina suggeriscono una sua applicazione anche nella prevenzione o nel miglioramento di complicazioni fisiche/muscoloscheletriche, stress mentale ed ansia, mancanza di concentrazione o rallentamento cognitivo, affaticamento e scarso sonno (Di Francisco-Donoghue et al., 2019; Pelletier et al., 2020). Alcuni studi hanno riportato anche la capacità dell'astaxantina di alleviare l'infiammazione cronica attiva causata da *Helicobacter pylori*, un batterio noto per essere associato a disturbi gastrici, promuovendola come rimedio benefico nella prevenzione o nel trattamento della dispepsia non ulcerosa, della gastrite cronica attiva e delle ulcere gastriche e duodenali (Andersen et al., 2007; Kupcinskas et al., 2008; Lignell et al., 1999). Infine, l'astaxantina è anche nota per promuovere la guarigione delle ferite mostrando a livello della pelle anche proprietà idratanti, leviganti ed elasticizzanti (Nishida et al., 2023). L'astaxantina,

conosciuta quindi per essere un potente antiossidante ed antinfiammatorio largamente richiesto nell'ambito della salute umana, trova ampia applicazione anche in acquacoltura, in quanto il colore rosso vivo dei gamberi, che è uno dei principali fattori che determinano la qualità ed il loro prezzo di mercato, è attribuito all'accumulo di questo carotenoide (Boonyaratpalin et al., 2001; Chien e Jeng, 1992). I gamberi non sono in grado di sintetizzare astaxantina *de novo* ed i mangimi per l'acquacoltura contenenti questo carotenoide sono quindi essenziali per l'allevamento dei gamberi. Attualmente, *Haematococcus pluvialis* è l'unica microalga ben studiata e riconosciuta come produttrice di alti contenuti di astaxantina che accumula in forma esterificata nelle sue cisti (Goodwin e Jamikorn, 1954; Kobayashi et al., 1991). L'estrazione dell'astaxantina dalle cisti di *H. pluvialis* rappresenta un processo complesso per il quale è necessario applicare metodi chimici o fisici che prevedono l'utilizzo di attrezzature specializzate, solventi e condizioni precise, rendendo questo processo costoso e dispendioso in termini di energia. Di conseguenza, l'astaxantina derivata da *H. pluvialis*, non è in grado di competere economicamente con un'astaxantina sintetizzata petrolchimicamente (astaxantina sintetica) che attualmente domina il mercato. Tuttavia, i consumatori tendono a richiedere prodotti naturali piuttosto che sintetici, in quanto negli Stati Uniti ed in Europa (Fujii et al., 2010; Wikfors e Ohno, 2001) l'utilizzo dell'astaxantina sintetica non è più consentito nella formulazione di mangimi per l'acquacoltura. In questo contesto, l'isolamento di nuove microalghe produttrici di astaxantina come fonti meno costose di questo carotenoide, rappresenta al momento una delle principali sfide ed in tale scenario il ceppo microalgale *Monoraphidium* sp. E10 può rappresentare un potenziale candidato come fonte di astaxantina naturale, rinnovabile, ecosostenibile e meno laboriosa e costosa rispetto ad *H. pluvialis*.

Il β -carotene, anche conosciuto come il precursore della vitamina A (Wang et al., 2022), è utilizzato come colorante e additivo alimentare per esaltare il colore della carne, del pesce e del tuorlo delle uova o per migliorare la salute e la fertilità del bestiame (Borowitzka L. J. e Borowitzka M. A., 1989; Priyadarshani et al., 2012). Il β -carotene naturale, grazie alla sua liposolubilità, è un anticancerogeno e presenta proprietà che inibiscono l'insorgenza di malattie cardiovascolari superiori al β -carotene sintetico, mostrandosi efficace nel controllo dei livelli di colesterolo nel sangue. Inoltre, studi dimostrano come il β -carotene in sinergia con astaxantina, cantaxantina e zeaxantina aiuti a ridurre le dimensioni, il numero di neoplasie epatiche ed il rischio di sviluppare il cancro al colon (Zarezadeh et al., 2021). Un'altra importante proprietà del β -carotene, legata principalmente alla sua

forte attività antiossidante è la capacità di prevenire la formazione di radicali liberi che possono causare un invecchiamento precoce nelle cellule della pelle. Negli strati epidermici e dermici della pelle, infatti, il β -carotene insieme alla luteina hanno dimostrato di proteggere dai danni ossidativi indotti dai raggi UV, specialmente in sinergia con altri sistemi antiossidanti e sostanze immunoprotettive (Wang et al., 2022). La luteina naturale, come il β -carotene, viene utilizzata per intensificare il colore giallo del tuorlo dell'uovo, tramite aggiunta nei mangimi, nonché come colorante alimentare per il consumo umano (Lin et al., 2015). Questa molecola viene utilizzata anche nella formulazione di farmaci, cosmetici, in acquacoltura e come additivo funzionale negli alimenti per l'infanzia in quanto può apportare benefici per la salute, come la riduzione del rischio di malattie cardiovascolari, protezione dallo sviluppo di aterosclerosi precoce, riduzione del rischio di cancro ai polmoni e degenerazione maculare legata all'età (AMD), infatti, bassi livelli di luteina vengono osservati nelle persone con cataratta (Cezare-Gomes et al., 2019). Le numerose proprietà del β -carotene e della luteina naturali rendono questi carotenoidi sempre più preziosi e richiesti in diversi ambiti industriali e *Monoraphidium* sp. E10, come per l'astaxantina, può rappresentare un potenziale candidato come fonte naturale alternativa di questi carotenoidi.

Le microalghe rappresentano una delle fonti più promettenti di molecole/composti dotati di attività biologica, non solo per l'elevata diversità di specie, ma anche per le loro elevate strategie di difesa contro gli organismi competitori, come la sintesi di diversi metaboliti secondari che presentano attività antimicrobica ed antibiofilm (López e Soto, 2024). In tale contesto, è stata valutata l'attività biologica (antibatterica ed antibiofilm) di metaboliti secondari estratti in etanolo (ME) (1 mg/mL) dalle biomasse di *Monoraphidium* sp. E10, *Tetrademus* sp. M42 e *Desmodesmus abundans* Z59, ottenute alle condizioni colturali di mantenimento (LED bianchi con IL 100), contro batteri patogeni umani e dei pesci (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi* G5 e *V. parahaemolyticus* L12G). Tra i ME da tutte e tre le biomasse nessuno ha mostrato attività antibatterica nei confronti dei ceppi batterici patogeni testati, tuttavia, i ME dalla biomassa di Z59, dopo 24 ore di incubazione, hanno mostrato attività antibiofilm (riduzione del 70%) (Figura 18) nei confronti di *S. aureus*. Tale riduzione del biofilm, è stata più bassa rispetto ai metaboliti estratti in metanolo (1 mg/mL) di *Chlorella vulgaris* (riduzione del 88%) (Sridevi et al., 2019) e *Spirulina platensis* (0,0001 mg/mL) che hanno mostrato una riduzione del biofilm di *S. aureus* MTCC96 e *S. aureus* 2940 pari rispettivamente a 84 and 61 % (LewisOscar et al.,

2015) . Attualmente in bibliografia non vi sono notizie riguardanti l'attività antibiofilm di ME da ceppi microalgali appartenenti al genere *Desmodesmus*, inoltre, non vi sono lavori riguardanti l'effetto della luce sulla capacità dei ME da biomassa microalgale, di mostrare attività antibiofilm nei confronti di batteri patogeni. Sulla base di ciò, è stato valutato l'effetto dei ME da biomasse ottenute a seguito dell'esposizione di *Desmodesmus abundans* Z59 a differenti lunghezze d'onda (400-700 nm, LED bianchi; 450 + 660 nm, LED blu-rossi; 450 nm, LED blu; 660 nm, LED rossi) ed intensità della luce crescenti (IL 27, 100, 400, 600, 800), sulla riduzione del biofilm prodotto da *S. aureus*. I ME dalle biomasse ottenute dopo esposizione a LED bianchi o blu-rossi con IL 27, hanno ridotto rispettivamente dell' 87 e 86,5 % il biofilm di *S. aureus*, seguiti da quelli ottenuti dalla biomassa esposta a LED blu o blu-rossi con IL 600 (rispettivamente 82 e 79%) (Figura 19). Questi dati suggeriscono che diverse condizioni di illuminazione possono influire sulla produzione, la quantità e anche l'eventuale attività sinergica dei metaboliti secondari estratti capaci di inibire, dopo 24 ore di esposizione, la formazione del biofilm di *S. aureus*. I ME di microalghe, secondo quanto riportato da Lòpez e Soto (2024), sono una miscela eterogenea di composti polari e non polari, in particolare, ad avere maggiormente attività antibiofilm sono sostanze di natura lipidica, come l'acido docosaesaenoico (DHA) e l'acido eicosapentaenoico (EPA) (Cepas et al., 2019; Sun et al., 2017), i carotenoidi (zeaxantina e violaxantina), i polisaccaridi solfatati ed il silano (Lòpez e Soto, 2024). Nello specifico, la maggiore capacità di riduzione del biofilm dei ME, ottenuti dopo esposizione di Z59 ad intensità della luce bassa (IL 27) e molto alta (IL 600) suggerisce che una condizione di stress dettata da condizioni estreme di intensità della luce solo a specifiche lunghezze d'onda, possa indurre maggiormente la produzione di sostanze capaci di inibire fortemente la formazione di biofilm (ad esempio i composti sopra elencati). Questo mette in evidenza quanto sia importante utilizzare specifiche condizioni di illuminazione per indirizzare ogni ceppo microalgale verso la produzione di determinati metaboliti piuttosto che altri.

Tutte le cellule microalgali presentano sulla superficie molti gruppi funzionali anionici attribuiti ai carboidrati, ai lipidi ed alle proteine che portano carica negativa netta (Tambat et al., 2023). Le biomasse microalgali come quelle delle macroalghe, grazie alla presenza di questi gruppi funzionali carichi, possono essere utilizzate nella *bioremediation* di ambienti contaminati da metalli pesanti, in quanto questi gruppi possono fungere da potenziali siti di legame degli ioni metallici. Le biomasse dei tre ceppi microalgali E10, M42 e Z59, ottenute dopo dieci giorni di esposizione a LED bianchi con IL 100, hanno

mostrato la capacità di adsorbire in maniera differente metalli pesanti quali arsenito (As^{III}), arseniato (As^{V}), mercurio (Hg^{II}) e vanadato (V^{V}) in soluzioni acquose. Nessuna delle biomasse ha mostrato la capacità di adsorbire V^{V} e As^{V} e solo la biomassa prodotta da E10 ha adsorbito più efficacemente Hg^{II} ed As^{III} (rispettivamente 52 e 22%) (Figura 20). In bibliografia non vi sono dati riguardanti la capacità della biomassa di microalghe appartenenti al genere *Monoraphidium* di adsorbire metalli pesanti, tuttavia, secondo quanto riportato da Inthorn et al. (2002), nelle stesse condizioni di adsorbimento ma con biomassa ottenuta dopo 15 giorni di esposizione con lampade fluorescenti, i ceppi *Chlorella vulgaris* BCC 15 e *Scenedesmus acutus* TFRPD 1020 hanno mostrato una più alta capacità di legare il mercurio (rispettivamente 94 e 85%). Inoltre, la biomassa di *Monoraphidium* sp. E10 ottenuta nelle condizioni di illuminazione ottimali per la produzione di un maggior quantitativo di biomassa (LED bianchi con IL 600) si è dimostrata meno efficiente nell'adsorbimento sia del Hg^{II} (23,34%) che dell' As^{III} (2%) (Figura 21) e questo risultato suggerisce come, nonostante un'intensità maggiore comporti una più alta quantità di biomassa finale, l'intensità della luce possa incidere sulla composizione chimica della biomassa microalgale e di conseguenza sul loro possibile utilizzo come bioadsorbenti di metalli pesanti. Il processo di adsorbimento dei metalli pesanti può coinvolgere le interazioni elettrostatiche tra la biomassa e lo ione metallico, le quali possono essere determinate dal valore del potenziale Zeta. Quest'ultimo era più negativo per la biomassa di E10 (ottenuta con LED bianchi ed IL 100) ($-36,4 \pm 0,6$ mV), mentre era il meno negativo per il Hg^{II} (-14 ± 1 mV) (Figura 22) suggerendo che le interazioni tra la biomassa di E10 ed il Hg^{II} siano di tipo elettrostatico. La differenza di potenziale Zeta tra la biomassa di E10 e l' As^{III} ($-27,3 \pm 2$ mV) invece era trascurabile indicando che in questo caso è possibile che siano coinvolti altri meccanismi nel processo di adsorbimento, come la complessazione. Infatti, i cambiamenti degli spettri ATR-FTIR della biomassa E10 prima e dopo trattamento con l' As^{III} (Figura 23) si sono dimostrati modesti ed attribuiti soprattutto ai gruppi amminici delle proteine o dei gruppi carbossilici dei lipidi, mentre dopo esposizione al Hg^{II} lo spettro della biomassa E10 (Figura 23) ha mostrato più cambiamenti in particolare a livello dei picchi attribuiti ai gruppi funzionali dei polisaccaridi (1019 cm^{-1} , 3649 cm^{-1} e 3068 cm^{-1}), che appartengono a cellulosa e glucano (Yalçın et al., 2012), e dei fosfolipidi (1240 cm^{-1}), suggerendo un coinvolgimento di queste molecole nell'interazione con il Hg^{II} . Sulla base dei risultati ottenuti, la biomassa di E10 ottenuta dopo esposizione a LED bianchi con IL 100, può trovare potenziale applicazione come bioadsorbente principalmente del mercurio in quanto, il trattamento di

acque, contaminate da questo metallo pesante, con la biomassa E10, influirebbe anche sulla tossicità sia acuta, valutata tramite il test di bioluminescenza emessa da *Vibrio harveyi*, sia cronica valutata con test di vitalità di *Phaeodactylum tricornutum*. Infatti, sia il valore di EC₅₀ nel caso di *Vibrio harveyi*, che di IC₅₀ nel caso di *Phaeodactylum tricornutum*, dopo trattamento con la biomassa di E10 sono rispettivamente quasi triplicato e più alto di circa venti volte, indicando un significativo abbattimento della tossicità del mercurio (Figure 24 e 25). Tuttavia, la biomassa di E10 si è dimostrata meno efficiente nel detossificare la soluzione acquosa da As^{III} la cui tossicità dopo il trattamento era comunque dimezzata per *P. tricornutum* (Figura 25), suggerendo un potenziale utilizzo della biomassa di E10 come possibile adsorbente per il mercurio ma anche per l'arsenito.

6. CONCLUSIONI

Le microalghe ed i loro metaboliti possono fornire utili contributi nel perseguire gli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (SDGs) proposti dall'Agenda 2030, in quanto: assorbono grandi quantità di CO₂ mitigando i cambiamenti climatici (SDG 13), producono composti bioattivi contribuendo al miglioramento della salute e del benessere dell'uomo e degli animali (SDG 3) e rimuovono e riducono la tossicità di contaminanti dalle acque (SDG 6). In questo studio sono stati valutati gli effetti della variazione dello spettro e dell'intensità della luce (IL) artificiale emessa da LED sulla produzione di biomassa e di metaboliti (carotenoidi ed estratti etanolic) con diverse potenzialità applicative in vari campi biotecnologici. Il ceppo E10, quando esposto a determinate condizioni di illuminazione *i.e.* LED bianchi e blu-rossi rispettivamente ad IL 600 e 400, si è dimostrato produttore di carotenoidi, quali l'astaxantina, la luteina ed il β -carotene, utilizzati nella formulazione di farmaci, integratori, mangimi e creme o lozioni per le loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antitumorali, idratanti e lenitive. Il ceppo Z59 esposto a LED bianchi e blu-rossi a basse intensità (IL 27) e LED blu-rossi e blu e ad alta intensità (IL 600) ha prodotto metaboliti secondari solubili in etanolo capaci di inibire la formazione del biofilm di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, prospettando un loro potenziale sfruttamento nell'industria farmaceutica, alimentare ed in acquacoltura.

La biomassa del ceppo E10 ha adsorbito principalmente il mercurio (52%) e l'arsenico (22%) mostrando potenziale applicazione nella composizione di filtri da utilizzare nei bioreattori industriali adibiti al trattamento di acque di scarico industriali ed agricole contaminate da questi metalli. L'efficacia del trattamento con la biomassa di E10 nella *bioremediation* da metalli pesanti è stata confermata dalla notevole riduzione (più di tre volte) della tossicità sia acuta che cronica del mercurio e dell'arsenito. Pertanto, *Monoraphidium* sp. E10 e *Desmodesmus abundans* Z59 rappresentano una risorsa alternativa rinnovabile, sostenibile ed economica di bioprodotto ad alto valore aggiunto.

7. FONDI

Questa ricerca è stata finanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale “Ricerca e Innovazione” 2014-2020 - Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell’innovazione” e Azione IV.5 “Dottorati su tematiche Green”.

8. RINGRAZIAMENTI

Per il contributo a questa ricerca ringrazio:

- il Prof. Domenico Trombetta e la Prof.ssa Antonella Smeriglio (Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche Ed Ambientali; Università degli studi di Messina) per il supporto per le analisi relative alla Spettrometria di Massa ad Assorbimento Atomico (AAS) e la caratterizzazione tramite analisi cromatografica dei carotenoidi;
- il Prof. Salvatore Magazù e la Prof.ssa Maria Teresa Caccamo (Dipartimento di Scienze Matematiche e Informatiche, Scienze Fisiche e della Terra; Università degli studi di Messina) per il supporto nelle analisi spettroscopiche *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformation Infrared* (ATR-FTIR);
- l’azienda “Plastica Alfa Spa” con sede legale in Caltagirone per il supporto fornito.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abiusi, F., Sampietro, G., Marturano, G., Biondi, N., Rodolfi, L., D'Ottavio, M., Tredici, M. R. (2014). Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnology and bioengineering*, 111(5), 956–964.
- Abiusi, F., Wijffels, R. H., Janssen, M. (2020). Doubling of microalgae productivity by oxygen balanced mixotrophy. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 8(15), 6065–6074.
- Airs, R. L., Temperton, B., Sambles, C., Farnham, G., Skill, S. C., Llewellyn, C. A. (2014). Chlorophyll f and chlorophyll d are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation. *Febs Letters*, 588(20), 3770–3777.

- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine drugs*, 12(1), 128–152.
- Andersen, L. P., Holck, S., Kupcinskis, L., Kiudelis, G., Jonaitis, L., Janciauskas, D., Permin, H., Wadström, T. (2007). Gastric inflammatory markers and interleukins in patients with functional dyspepsia treated with astaxanthin. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(2), 244–248.
- Babuji, P., Thirumalaisamy, S., Duraisamy, K., Periyasamy, G. (2023). Human health risks due to exposure to water pollution: a review. *Water*, 15(14), 2532.
- Ballesteros, I., Terán, P., Guamán-Burneo, C., González, N., Cruz, A., Castillejo, P. (2021). DNA barcoding approach to characterize microalgae isolated from freshwater systems in Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 7(1), 170–183.
- Bellinger, E. G., Sigee, D. C. (2011). Freshwater algae: identification and use as bioindicators. *Environmental Science and Policy*. Wiley-Blackwell.
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., Dall'Osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17, 1–18.
- Bogen, C., Klassen, V., Wichmann, J., La Russa, M., Doebe, A., Grundmann, M., Mussgnug, J. H. (2013). Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresource technology*, 133, 622–626.
- Bohutskyi, P., Kligerman, D. C., Byers, N., Nasr, L. K., Cua, C., Chow, S., Bouwer, E. J. (2016). Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. *Algal research*, 19, 278–290.
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., Schlipalius, L. E. (2001). Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 32, 182–190.
- Borowitzka, L. J., Borowitzka, M. A. (1989). β -carotene (provitamin A) production with algae. In *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 15–26.
- Caccamo, M. T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International journal of biological macromolecules*, 145, 77–83.

- Casentini, B., Gallo, M., Baldi, F. (2019). Arsenate and arsenite removal from contaminated water by iron oxides nanoparticles formed inside a bacterial exopolysaccharide. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102908.
- Cepas, V., López, Y., Gabasa, Y., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Correia, M. J., Soto, S. M. (2019). Inhibition of bacterial and fungal biofilm formation by 675 extracts from microalgae and cyanobacteria. *Antibiotics*, 8(2), 77.
- Cezare-Gomes, E. A., Mejia-da-Silva, L. D. C., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Singh, A. K., de Carvalho, J. C. M. (2019). Potential of microalgae carotenoids for industrial application. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188, 602–634.
- Chien, Y. H., Jeng, S. C. (1992). Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture*, 102(4), 333–346.
- Cho, K. S., Shin, M., Kim, S., Lee, S. B. (2018). Recent advances in studies on the therapeutic potential of dietary carotenoids in neurodegenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018(1), 4120458.
- Cichoński, J., Chrzanowski, G. (2022). Microalgae as a source of valuable phenolic compounds and carotenoids. *Molecules*, 27(24), 8852.
- Cointet, E., Wielgosz-Collin, G., Bougaran, G., Rabesaotra, V., Gonçalves, O., Méléder, V. (2019). Effects of light and nitrogen availability on photosynthetic efficiency and fatty acid content of three original benthic diatom strains. *PLoS ONE*, 14(11), e0224701.
- Costa, J. A. V., Lucas, B. F., Alvarenga, A. G. P., Moreira, J. B., de Moraes, M. G. (2021). Microalgae polysaccharides: an overview of production, characterization, and potential applications. *Polysaccharides*, 2(4), 759–772.
- Davey, M. P., Norman, L., Sterk, P., Huete-Ortega, M., Bunbury, F., Loh, B. K. W., Smith, A. G. (2019). Snow algae communities in Antarctica: metabolic and taxonomic composition. *New Phytologist*, 222(3), 1242–1255.
- DiFrancisco-Donoghue, J., Balentine, J., Schmidt, G., Zwibel, H. (2019). Managing the health of the eSport athlete: an integrated health management model. *BMJ open sport & exercise medicine*, 5(1), e000467.
- Doshi, H., Ray, A., Kothari, I. L. (2007). Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: spectroscopic, kinetics and SEM studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), 1051–1063.

- Dsikowitzky, L., Mengesha, M., Dadebo, E., de Carvalho, C. E. V., Sindern, S. (2013). Assessment of heavy metals in water samples and tissues of edible fish species from Awassa and Koka Rift Valley Lakes, Ethiopia. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 3117–3131.
- Edwards, K. F., Thomas, M. K., Klausmeier, C. A., Litchman, E. (2016). Phytoplankton growth and the interaction of light and temperature: A synthesis at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, 61(4), 1232–1244.
- Eggersdorfer, M., Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of biochemistry and biophysics*, 652, 18–26.
- Erickson, E., Wakao, S., Niyogi, K. K. (2015). Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82(3), 449–465.
- Fan, J. (2017). Acclimation to NaCl and light stress of heterotrophic *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid accumulation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(3), 302–308.
- Fang, D., Zhang, X., Dong, M., Xue, X. (2017). A novel method to remove chromium, vanadium and ammonium from vanadium industrial wastewater using a byproduct of magnesium-based wet flue gas desulfurization. *Journal of hazardous materials*, 336, 8–20.
- Faruque, M. O., Uddin, S., Hossain, M. M., Hossain, S. Z., Shafiquzzaman, M., Razzak, S. A. (2024). A comprehensive review on microalgae-driven heavy metals removal from industrial wastewater using living and nonliving microalgae. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 100492.
- Fernández, M. J., Valero-Cases, E., Rincon-Frutos, L. (2019). Food components with the potential to be used in the therapeutic approach of mental diseases. *Current pharmaceutical biotechnology*, 20(2), 100–113.
- Fettah, N., Derakhshandeh, M., Tezcan Un, U., Mahmoudi, L. (2022). Effect of light on growth of green microalgae *Scenedesmus quadricauda*: influence of light intensity, light wavelength and photoperiods. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 1–10.
- Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésson, Ó. S., Palsson, B. Ø., Brynjólfsson, S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 2395–2403.

- Fujii, K., Nakashima, H., Hashidzume, Y., Uchiyama, T., Mishiro, K., Kadota, Y. (2010). Potential use of the astaxanthin-producing microalga, *Monoraphidium* sp. GK12, as a functional aquafeed for prawns. *Journal of applied phycology*, 22, 363-369.
- Gammone, M. A., D'Orazio, N. (2015). Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Marine drugs*, 13(4), 2196–2214.
- Gayatri, K. V., Soundhari, C., Pavithra, B. P. (2019). Biofilm inhibitory effect of *Chlorella* extracts on *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10, 1966–1971.
- Ge, S., Smith, R. G., Jacovides, C. P., Kramer, M. G., Carruthers, R. I. (2011). Dynamics of photosynthetic photon flux density (PPFD) and estimates in coastal northern California. *Theoretical and Applied Climatology*, 105, 107–118.
- Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spano, A., Morabito, M., Maugeri, T. L. (2012). In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine environmental research*, 73, 1–6.
- Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., McNaughton, D. (2001). Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of phycology*, 37(2), 271–279.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., Simões, M. (2016). Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresource technology*, 200, 279–286.
- Gonçalves, V. D., Fagundes-Klen, M. R., Trigueros, D. E. G., Schuelter, A. R., Kroumov, A. D., Módenes, A. N. (2019). Combination of Light Emitting Diodes (LEDs) for photostimulation of carotenoids and chlorophylls synthesis in *Tetrademus* sp. *Algal Research*, 43, 101649.
- Goodwin, T. W., Jamikorn, M. (1954). Studies in Carotenogenesis. Some observations on carotenoid synthesis in two varieties of *Euglena gracilis*. *The Journal of Protozoology*, 1(4), 216–219.
- Griffiths, K., Aggarwal, B. B., Singh, R. B., Buttar, H. S., Wilson, D., De Meester, F. (2016). Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. *Diseases*, 4(3), 28.

- Griffiths, M. J., Garcin, C., Van Hille, R. P., Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), 119–123.
- Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, 21(5), 210–216.
- Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals: proceedings—1st conference on culture of marine invertebrate animals greenport* (pp. 29–60). Boston, MA: Springer US.
- Gutierrez, A. M, Marquez, S. A., Attaie, R., Maryuri, T., de González, N., Jung, Y., Hayes, M., Skomedal, H., Skjånes, K., Mazur-Marzec, H., Toruńska-Sitarz, A., Catala, M., Hosoglu Isleten, M., García-Vaquero, M. (2017). Microalgal proteins for feed, food and health. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts*, 347–368.
- Gworek, B., Dmuchowski, W., Baczewska-Dąbrowska, A. H. (2020). Mercury in the terrestrial environment: a review. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 128.
- Hayes, M., Skomedal, H., Skjånes, K., Mazur-Marzec, H., Toruńska-Sitarz, A., Catala, M., García-Vaquero, M. (2017). Microalgal proteins for feed, food and health. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts*, 347–368.
- He, Q., Yang, H., Hu, C. (2018). Effects of temperature and its combination with high light intensity on lipid production of *Monoraphidium dybowskii* Y2 from semi-arid desert areas. *Bioresource technology*, 265, 407–414.
- Helamieh, M., Reich, M., Rohne, P., Riebesell, U., Kerner, M., Kümmerer, K. (2024). Impact of green and blue-green light on the growth, pigment concentration, and fatty acid unsaturation in the microalga *Monoraphidium braunii*. *Photochemistry and Photobiology*, 100(3), 587–595.
- Ho, S. H., Chan, M. C., Liu, C. C., Chen, C. Y., Lee, W. L., Lee, D. J., Chang, J. S. (2014). Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource technology*, 152, 275–282.
- Inthorn, D., Sidtitoon, N., Silapanuntakul, S., Incharoensakdi, A. (2002). Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae. *Sci Asia*, 28(3), 253–261.
- ISO 10253:2016; Water Quality–Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. ISO: Geneva, Switzerland, 2016.
- Jagielski, T., Gawor, J., Bakula, Z., Zuchniewicz, K., Żak, I., Gromadka, R. (2017). An optimized method for high quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Methods*, 13, 1–8.

- Jahns, P., Holzwarth, A. R. (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 182–193.
- Javanbakht, V., Alavi, S. A., Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Science and Technology*, 69(9), 1775–1787.
- Jin, E. S., Polle, J. E., Lee, H. K., Hyun, S. M., Chang, M. (2003). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(2), 165–174.
- Jin, Y., Li, Y., Qi, Y., Wei, Q., Yang, G., Ma, X. (2024). A modified cultivation strategy to enhance biomass production and lipid accumulation of *Tetrademus obliquus* FACHB-14 with copper stress and light quality induction. *Bioresource Technology*, 400, 130677.
- Jusidin, M. R., Othman, R., Shaleh, S. R. M., Ching, F. F., Senoo, S., Oslan, S. N. H. (2022). In vitro antibacterial activity of marine microalgae extract against *Vibrio harveyi*. *Applied Sciences*, 12(3), 1148.
- Kandilian, R., Lee, E., Pilon, L. (2013). Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra. *Bioresource technology*, 137, 63–73.
- Khan, M. I., Shin, J. H., Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17, 1–21.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1991). Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(5), 335–339.
- Kumar, K. S., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., Shin, K. H. (2015). Microalgae—a promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, 329–352.
- Kupcinskas, L., Lafolie, P., Lignell, Å., Kiudelis, G., Jonaitis, L., Adamonis, K., Andersen, L. P., Wadström, T. (2008). Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. *Phytomedicine*, 15(6-7), 391–399.
- Ladygin, V. G. (2014). Ways of biosynthesis, localization, metabolism and functions of carotenoids in chloroplasts of different types of algae. *Issues Mod. Algol*, 2.

- Lee, C. G., Palsson, B. Ø. (1996). Photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to red light from light-emitting diodes leads to autospore release following each cellular division. *Biotechnology progress*, 12(2), 249–256.
- Lee, C. M., Kubicki, J. D., Fan, B., Zhong, L., Jarvis, M. C., Kim, S. H. (2015). Hydrogen-bonding network and OH stretch vibration of cellulose: comparison of computational modeling with polarized IR and SFG spectra. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119 (49), 15138–15149.
- Lee, S. R., Oak, J. H., Chung, I. K., Lee, J. A. (2010). Effective molecular examination of eukaryotic plankton species diversity in environmental seawater using environmental PCR, PCR-RFLP, and sequencing. *Journal of applied phycology*, 22, 699–707.
- Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 41, 107545.
- LewisOscar, F., Nithya, C., Bakkiyaraj, D., Arunkumar, M., Alharbi, N. S., Thajuddin, N. (2017). Biofilm inhibitory effect of *Spirulina platensis* extracts on bacteria of clinical significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87, 537–544.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350–382.
- Lignell, A., Surace, R., Bottiger, P., Borody, T. J. (1999, July). Symptom improvement in *Helicobacter pylori*-positive non-ulcer dyspeptic patients after treatment with the carotenoid astaxanthin. In *12th international carotenoid symposium*, cairns, Australia, 18–23.
- Lin, J. H., Lee, D. J., Chang, J. S. (2015). Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 421–428.
- Liu, J., Huang, Q. (2016). Screening of astaxanthin-hyperproducing *Haematococcus pluvialis* using Fourier transform infrared (FT-IR) and Raman microspectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 70(10), 1639–1648.
- Liu, J., Van Iersel, M. W. (2021). Photosynthetic physiology of blue, green, and red light: Light intensity effects and underlying mechanisms. *Frontiers in plant science*, 12, 619987.
- Liu, J., Zhu, C., Li, Z., Zhou, H. (2022). Screening of *Spirulina* strains for high copper adsorption capacity through Fourier transform infrared spectroscopy. *Frontiers in Microbiology*, 13, 952597.

- Liyanaarachchi, V. C., Nishshanka, G. K. S. H., Premaratne, R. G. M. M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., Malik, A. (2020). Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress. *Biotechnology Reports*, 28, e00538.
- López, Y., Soto, S. M. (2019). The usefulness of microalgae compounds for preventing biofilm infections. *Antibiotics*, 9 (1), 9.
- Lorenz, R. T., Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*, 18(4), 160–167.
- Lucakova, S., Branyikova, I., Hayes, M. (2022). Microalgal proteins and bioactives for food, feed, and other applications. *Applied Sciences*, 12 (9), 4402.
- Ma, R., Thomas-Hall, S. R., Chua, E. T., Eltanahy, E., Netzel, M. E., Netzel, G., Yinghua, L., Schenk, P. M. (2018). Blue light enhances astaxanthin biosynthesis metabolism and extraction efficiency in *Haematococcus pluvialis* by inducing haematocyst germination. *Algal research*, 35, 215–222.
- Maltsev, Y., Maltseva, I. (2018). The influence of forest-forming tree species on diversity and spatial distribution of algae in forest litter. *Folia Oecologica*, 45 (2), 72–81.
- Maltsev, Y., Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20, 515–547.
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology*, 10(10), 1060.
- Maltseva, I. A., Maltsev, Y. I. (2021). Diversity of cyanobacteria and algae in dependence to forest-forming tree species and properties rocks of dump. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(3), 545–560.
- Maltseva, I. A., Maltsev, Y. I., Solonenko, A. N. (2017). Soil algae of the oak groves of the steppe zone of Ukraine. *International Journal on Algae*, 19(3).
- Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., Ramteke, P. W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, 201, 222–229.
- Markou, G., Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology advances*, 31(8), 1532–1542.

- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in microalgae. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 21–36.
- Mayer, D., Dubinsky, Z., Iluz, D. (2016). Light as a limiting factor for epilithic algae in the supralittoral zone of littoral caves. *Frontiers in Marine Science*, 3, 18.
- Mendez, M. O., Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments—an emerging remediation technology. *Environmental health perspectives*, 116(3), 278–283.
- Metsoviti, M. N., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. T., Katsoulas, N. (2019). Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, 9(1), 31.
- Mishra, S., Bharagava, R. N., More, N., Yadav, A., Zainith, S., Mani, S., Chowdhary, P. (2019). Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. *Environmental biotechnology: For sustainable future*, 103–125.
- Monds, R. D., O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, 17(2), 73–87.
- Mora-Gutierrez, A., Marquez, S. A., Attaie, R., Núñez de González, M. T., Jung, Y., Woldesenbet, S., Moussavi, M. (2022). Mixed biopolymer systems based on bovine and caprine caseins, yeast β -glucan, and maltodextrin for microencapsulating lutein dispersed in emulsified lipid carriers. *Polymers*, 14(13), 2600.
- Morgunov, D. N., Vasiliev, S. I. (2017). Investigation of the spectral characteristics of electrical light sources. *Bull. Don Agrar. Sci*, 2.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179.
- Murdock, J. N., Wetzel, D. L. (2009). FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(4), 335–361.
- Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Mahata, C., Al-Jabri H., Vatland Ann K., Kumar, G. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, 341, 1–20.
- Naveed, S., Li, C., Zhang, J., Zhang, C., Ge, Y. (2020). Sorption and transformation of arsenic by extracellular polymeric substances extracted from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, 111200.
- Nayak, M., Karemore, A., Sen, R. (2016). Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research*, 16, 216–223.

- Nayak, M., Swain, D. K., Sen, R. (2019). Strategic valorization of de-oiled microalgal biomass waste as biofertilizer for sustainable and improved agriculture of rice (*Oryza sativa* L.) crop. *Science of The Total Environment*, 682, 475–484.
- Niizawa, I., Leonardi, R. J., Irazoqui, H. A., Heinrich, J. M. (2017). Light wavelength distribution effects on the growth rate of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochemical Engineering Journal*, 126, 126–134.
- Nishida, Y., Berg, P. C., Shakersain, B., Hecht, K., Takikawa, A., Tao, R., Kakuta, Y., Uragami, C., Hashimoto, H., Misawa, N., Maoka, T. (2023). Astaxanthin: past, present, and future. *Marine Drugs*, 21(10), 514.
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine drugs*, 17(11), 640.
- Nzayisenga, J. C., Farge, X., Groll, S. L., Sellstedt, A. (2020). Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 1–8.
- Owens, T. G., Gallagher, J. C., Alberte, R. S. (1987). Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (*eustigmatophyceae*). *Journal of Phycology*, 23(1), 79–85.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1429–1441.
- Paredes-Lopez, O., Camargo-Rubio, E., Ornelas-Vale, A. (1976) Influence of specific growth rate on biomass yield, productivity, and composition of *Candida utilis* in batch and continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(4), 487–491.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment international*, 32(2), 265–268.
- Pelletier, V. H., Lessard, A., Piché, F., Tétreau, C., Descarreaux, M. (2020). Video games and their associations with physical health: A scoping review. *BMJ open sport & exercise medicine*, 6(1), e000832.
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1–10.

- Pilon, L., Berberoğlu, H., Kandilian, R. (2011). Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112(17), 2639–2660.
- Popović, S., Krizmanić, J., Vidaković, D., Karadžić, V., Milovanović, Ž., Pečić, M., Subakov Simić, G. (2020). Biofilms in caves: Easy method for the assessment of dominant phototrophic groups/taxa in situ. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1–17.
- Pradhan, J., Das, B. K., Sahu, S., Marhual, N. P., Swain, A. K., Mishra, B. K., Eknath, A. E. (2012). Traditional antibacterial activity of freshwater microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens. *Aquaculture Research*, 43(9), 1287–1295.
- Priyadarshani, I., Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae– A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89–100.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J. V., Hugueney, P., Kleinig, H. (1998). Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 116(4), 1239–1248.
- Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. (2017). Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 765–773.
- Raqiba, H., Sibi, G. (2019). Light emitting diode (LED) illumination for enhanced growth and cellular composition in three microalgae. *Advances in Microbiology Research*, 3(1), 1–6.
- Ratnasari, A., Syafiuddin, A., Zaidi, N. S., Kueh, A. B. H., Hadibarata, T., Prastyo, D. D., Ravikumar, R., Sathishkumar, P. (2022). Bioremediation of micropollutants using living and non-living algae-Current perspectives and challenges. *Environmental Pollution*, 292, 118474.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., Lütz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology*, 40(3), 259–268.
- Remmers, I. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., Lamers, P. P. (2017). Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PloS one*, 12(4), e0175630.
- Rice, K. M., Walker Jr, E. M., Wu, M., Gillette, C., Blough, E. R. (2014). Environmental mercury and its toxic effects. *Journal of preventive medicine and public health*, 47(2), 74.

- Richmond, A. (2013). Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 169–204.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Sánchez-Saavedra, M. P., Voltolina, D. (2002). Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*, 28(3), 273–279.
- Sankhla, M. S., Kumari, M., Nandan, M., Kumar, R., Agrawal, P. (2016). Heavy metals contamination in water and their hazardous effect on human health-a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(10), 759–766.
- Schulze, P. S., Barreira, L. A., Pereira, H. G., Perales, J. A., Varela, J. C. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in biotechnology*, 32(8), 422–430.
- Schulze, P. S., Guerra, R., Pereira, H., Schüller, L. M., Varela, J. C. (2017). Flashing LEDs for microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 35(11), 1088–1101.
- Schulze, P. S., Pereira, H. G., Santos, T. F., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., Perales, J. A., Varela, J. C. (2016). Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal research*, 16, 387–398.
- Senge, M. O., Ryan, A. A., Letchford, K. A., MacGowan, S. A., Mielke, T. (2014). Chlorophylls, symmetry, chirality, and photosynthesis. *Symmetry*, 6(3), 781–843.
- Sforza, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., Huesemann, M. (2012). Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5(3), 731–740.
- Sharma, J., Sarmah, P., Bishnoi, N. R. (2020). Market perspective of EPA and DHA production from microalgae. *Nutraceutical fatty acids from oleaginous microalgae: A human health perspective*, 281–297.
- Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., Huang, H. (2020). Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 610.
- Shu, C. H., Tsai, C. C., Liao, W. H., Chen, K. Y., Huang, H. C. (2012). Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and

- Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(5), 601–607.
- Singh, J., Saxena, R. C. (2015). An introduction to microalgae: diversity and significance. In Handbook of marine microalgae. *Academic Press*, 11–24.
- Singh, R. P., Yadav, P., Kumar, A., Hashem, A., Al-Arjani, A. B. F., Abd_Allah, E. F., Dorantes, A. R., Gupta, R. K. (2022). Physiological and biochemical responses of bicarbonate supplementation on biomass and lipid content of green algae *Scenedesmus* sp. BHU1 isolated from wastewater for renewable biofuel feedstock. *Frontiers in Microbiology*, 13, 839800.
- Sluijs, I., Cadier, E., Beulens, J. W. J., Spijkerman, A. M. W., Van der Schouw, Y. T. (2015). Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(4), 376–381.
- Smedley, P. L., Cooper, D. M., Ander, E. L., Milne, C. J., Lapworth, D. J. (2014). Occurrence of molybdenum in British surface water and groundwater: Distributions, controls and implications for water supply. *Applied Geochemistry*, 40, 144–154.
- Smeriglio, A., Lioni, J., Ingegneri, M., Burlando, B., Cornara, L., Grillo, F., Mastracci, L., Trombetta, D. (2023). Xanthophyll-rich extract of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin as new photoprotective cosmeceutical agent: safety and efficacy assessment on in vitro reconstructed human epidermis model. *Molecules*, 28(10), 4190.
- Solovchenko, A. E. (2015). Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynthesis research*, 125, 437–449.
- Spain, O., Plöhn, M., Funk, C. (2021). The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 526–535.
- Spanò, A., Zammuto, V., Macrì, A., Agostino, E., Nicolò, M. S., Scala, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., Ingegneri, M., Caccamo, M. T., Magazù, S., Martinez, M., Leon, C. G., Guglielmino, S. P. P., Gugliandolo, C. (2023). Arsenic adsorption and toxicity reduction of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* B3-15 of shallow hydrothermal vent origin. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(2), 325.
- Sridevi, N., Dhanusha, V., Rajeswari, M., Santhi, N. (2019). An in-vitro antibiofilm activity of *Chlorella vulgaris*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12, 239–242.
- Stadnichuk, I. N., Bulychev, A. A., Lukashev, E. P., Sinetova, M. P., Khristin, M. S., Johnson, M. P., Ruban, A. V. (2011). Far-red light-regulated efficient energy transfer

- from phycobilisomes to photosystem I in the red microalga *Galdieria sulphuraria* and photosystems-related heterogeneity of phycobilisome population. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(2), 227–235.
- Sun, H., Zhao, W., Mao, X., Li, Y., Wu, T., Chen, F. (2018). High-value biomass from microalgae production platforms: strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnology for biofuels*, 11, 1–23.
- Sun, K., Luo, J., Jing, X., Guo, J., Yao, X., Hao, X., Liang, Y., Lin, S., Wang, J., Guo, F. (2019). Astaxanthin protects against osteoarthritis via Nrf2: A guardian of cartilage homeostasis. *Aging* (Albany NY), 11(22), 10513.
- Sun, M., Dong, J., Xia, Y., Shu, R. (2017). Antibacterial activities of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) against planktonic and biofilm growing *Streptococcus mutans*. *Microbial pathogenesis*, 107, 212–218.
- Sun, Y., Hu, D., Chang, H., Li, S., Ho, S. H. (2022). Recent progress on converting CO₂ into microalgal biomass using suspended photobioreactors. *Bioresource technology*, 363, 127991.
- Sun, Y., Wang, H., Guo, G., Pu, Y., Yan, B. (2014). The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate polymers*, 113, 22–31.
- Tambat, V. S., Patel, A. K., Chen, C. W., Raj, T., Chang, J. S., Singhanian, R. R., Dong, C. D. (2023). A sustainable vanadium bioremediation strategy from aqueous media by two potential green microalgae. *Environmental Pollution*, 323, 121247.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: environmental toxicology*, 133–164.
- Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., Idris, A. (2014). Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource technology*, 162, 38–44.
- Treves, H., Raanan, H., Finkel, O. M., Berkowicz, S. M., Keren, N., Shotland, Y., Kaplan, A. (2013). A newly isolated *Chlorella* sp. from desert sand crusts exhibits a unique resistance to excess light intensity. *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3), 373–380.
- Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., Huesemann, M. (2012). Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5(3), 731–740.

- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis research*, 125, 423–436.
- Vecchi, V., Barera, S., Bassi, R., Dall'Osto, L. (2020). Potential and challenges of improving photosynthesis in algae. *Plants*, 9(1), 67.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., Velasco, A. (2008). Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 338–344.
- Villares, R., Real, C., Fernández, J. Á., Aboal, J., Carballeira, A. (2007). Use of an environmental specimen bank for evaluating the impact of the Prestige oil spill on the levels of trace elements in two species of *Fucus* on the coast of Galicia (NW Spain). *Science of the total environment*, 374(2-3), 379–387.
- Virtanen, O., Khorobrykh, S., Tyystjärvi, E. (2021). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to extremely strong light. *Photosynthesis Research*, 147(1), 91–106.
- Wang, J., Hu, X., Chen, J., Wang, T., Huang, X., Chen, G. (2022). The extraction of β -carotene from microalgae for testing their health benefits. *Foods*, 11(4), 502.
- Wang, S. K., Stiles, A. R., Guo, C., Liu, C. Z. (2014). Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 550–559.
- Wikfors, G. H., Ohno, M. (2001). Impact of algal research in aquaculture. *Journal of phycology*, 37(6), 968–974.
- Wobbe, L., Bassi, R., Kruse, O. (2016). Multi-level light capture control in plants and green algae. *Trends in Plant Science*, 21(1), 55–68.
- Wong, Y. K. (2016). Effects of light intensity. Illumination cycles on microalgae *Haematococcus Pluvialis* for production of astaxanthin. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, 1–6.
- Wu, M., Zhu, R., Lu, J., Lei, A., Zhu, H., Hu, Z., Wang, J. (2020). Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6. *Annals of Microbiology*, 70, 1–9.
- Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J. S., Choi, Y. E. (2016). Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 6231–6238.
- Xia, L., Li, H., Song, S. (2016). Cell surface characterization of some oleaginous green algae. *Journal of Applied Phycology*, 28, 2323–2332.

- Xie, Y., Ho, S. H., Chen, C. N. N., Chen, C. Y., Ng, I. S., Jing, K. J., Chang, J., Lu, Y. (2013). Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource technology*, 144, 435–444.
- Xu, Y., Ibrahim, I. M., Wosu, C. I., Ben-Amotz, A., Harvey, P. J. (2018). Potential of new isolates of *Dunaliella salina* for natural β -carotene production. *Biology*, 7(1), 14.
- Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database*, 2017, bax004.
- Yadav, K., Kumar, S., Nikalje, G. C., Rai, M. P. (2023). Combinatorial effect of multiple variables on carotenoids and lipids up-regulation in *Monoraphidium* sp. for Pharmacological and Nutraceutical Applications. *Applied Sciences*, 13, 6107.
- Yalçın, S., Sezer, S., Apak, R. (2012). Characterization and lead (II), cadmium (II), nickel (II) biosorption of dried marine brown macro algae *Cystoseira barbata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 3118–3125.
- Zammuto, V., Macrì, A., Agostino, E., Ruggeri, L. M., Caccamo, M. T., Magazù, S., Campos, V. L., Aguayo, P., Guglielmino, S., Gugliandolo, C. (2024). Enhancement of biodegradation and detoxification of methylene blue by preformed biofilm of thermophilic bacilli on polypropylene perforated balls. *Journal of Marine Science & Engineering*, 12(8).
- Zammuto, V., Rizzo, M. G., Spanò, A., Genovese, G., Morabito, M., Spagnuolo, D., Capparucci, F., Gervasi, C., Smeriglio, A., Trombetta, D., Guglielmino, S., Nicolò, M. S., Gugliandolo, C. (2022). In vitro evaluation of antibiofilm activity of crude extracts from macroalgae against pathogens relevant in aquaculture. *Aquaculture*, 549, 737729.
- Zammuto, V., Spanò, A., Agostino, E., Macrì, A., De Pasquale, C., Ferlazzo, G., Rizzo, M. G., Nicolò, M. S., Guglielmino, S., Gugliandolo, C. (2023). Anti-bacterial adhesion on abiotic and biotic surfaces of the exopolysaccharide from the marine *Bacillus licheniformis* B3-15. *Marine Drugs*, 21(5), 313.
- Zarekarizi, A., Hoffmann, L., Burritt, D. J. (2023). The potential of manipulating light for the commercial production of carotenoids from algae. *Algal Research*, 71, 103047.
- Zarezadeh, M., Faghfour, A. H., Radkhah, N., Foroumandi, E., Khorshidi, M., Rasouli, A., Zarei, M., Mohammadzadeh Honarvar, N., Hazhir Karzar, N., Ebrahimi Mamaghani, M. (2021). *Spirulina* supplementation and anthropometric indices: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Phytotherapy Research*, 35(2), 577–586.

Zarmi, Y., Gordon, J. M., Mahulkar, A., Khopkar, A. R., Patil, S. D., Banerjee, A., Sapre, A. (2020). Enhanced algal photosynthetic photon efficiency by pulsed light. *Iscience*, 23(5).