

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

Scuola di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Composizione biochimica di diverse specie microalgali
e prove di *feeding* su *Ruditapes philippinarum***

Tesi di Laurea in Botanica Marina Applicata

Relatrice:

Prof. ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:

Luna Ardondi

Correlatrice:

Dott. ssa Nicolè Caputo

Il sessione

Anno Accademico 2019/2020

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Microalghe	1
1.1.1. Lipidi e acidi grassi da microalghe	2
1.2. Biotecnologie blu	4
1.2.1. Le microalghe nella strategia <i>Blue Growth</i>	5
1.3. Crescita delle microalghe in sistemi industriali	5
1.4. Tecniche per la coltivazione di microalghe	8
1.4.1. Sistemi di coltivazione industriale	10
1.5. Diatomee	14
1.6. Molluschicoltura	16
1.6.1. Utilizzo di microalghe per l'alimentazione dei molluschi bivalvi	18
2. SCOPO DELLA RICERCA	20
3. MATERIALI E METODI	22
3.1. Microalghe utilizzate	22
3.2. Allestimento delle colture	24
3.2.1. Terreno di coltura	24
3.3. Valutazione della crescita	25
3.3.1. Misura della torbidità	25
3.3.2. Valutazione del peso secco	26
3.3.3. Conta cellulare	26
3.3.3.1. Tasso di crescita specifico	28
3.4. Caratterizzazione biochimica	28
3.4.1. Estrazione e determinazione della frazione proteica	28
3.4.2. Estrazione e determinazione della frazione polisaccaridica	29
3.4.3. Estrazione e determinazione della frazione lipidica	30
3.4.3.1. Determinazione degli acidi grassi totali	31
3.5. Prove di <i>feeding</i> su <i>Ruditapes philippinarum</i>	31
3.5.1. <i>Ruditapes philippinarum</i>	32
3.5.2. <i>Feeding</i> larvale	34
3.6. Efficienza di alimentazione di novellame	38
3.6.1. Tasso di <i>clearance</i>	39

3.6.2. Efficienza di assorbimento del cibo	41
3.7. Analisi dati	42
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	44
4.1. Crescita e composizione delle microalghe rilevanti	44
4.1.1. Valutazione della crescita	44
4.1.2. Composizione biochimica	46
4.1.3. Acidi grassi	49
4.2. Prove di <i>feeding</i> su larve di <i>R. philippinarum</i>	56
4.3. Tasso di <i>clearance</i> ed efficienza di assorbimento del	62
5. CONCLUSIONI	73
6. BIBLIOGRAFIA	77

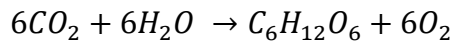
1. INTRODUZIONE

1.1. Microalghe

Le microalghe sono un ampio gruppo di organismi, unicellulari o coloniali, estremamente diversificati. In genere per microalghe si intendono organismi eucarioti, tuttavia con questo termine a volte si indicano anche i cianobatteri che sono organismi procarioti, una volta noti come alghe azzurre. In realtà l'unica somiglianza consiste nel fatto che entrambi gli organismi compiono la fotosintesi ossigenica e per il fatto che spesso condividono gli stessi habitat (Singh et al., 2015). In ambito biotecnologico sono usati allo stesso modo per cui la descrizione che segue tenderà ad accomunarli. Le dimensioni cellulari di questi organismi variano da 0,5 μm a 1 mm e possono avere flagelli o esserne privi. Questi microrganismi dissimili per dimensione, forma, ciclo vitale, pigmenti e metabolismo, possono crescere in molteplici ambienti, dai più comuni come quello marino e dulciacquicolo a quelli più ostili come ghiaccio e sorgenti termali, ma anche suolo e atmosfera. Alcune specie possono resistere a elevata siccità, in ambienti ad elevata salinità (Mar Morto, saline) e in presenza di valori di pH molto variabili (estremofile).

Le microalghe hanno un ruolo fondamentale nella produzione globale di ossigeno e nell'utilizzo della CO_2 attraverso la fotosintesi, che avviene nei cloroplasti, ovvero organelli costituiti da un sistema di sacchetti membranosi impilati, i tilacoidi, e da una sostanza acquosa, lo stroma. All'interno dei tilacoidi sono anche presenti i pigmenti (clorofille, carotenoidi, ficobiliproteine) responsabili dell'assorbimento della luce grazie alla presenza nella molecola di numerosi doppi legami coniugati. I pigmenti sono organizzati in complessi detti antenne o *light harvesting complex* (LHC), a ciascuno dei quali è associato un centro di reazione: l'insieme antenna-centro di reazione è detto fotosistema (PS). All'interno dei tilacoidi si trovano quindi i PSII e PSI (o P680 e P700), i quali assorbono luce di diverse lunghezze d'onda, rispettivamente 680 e 700 nm (Tanaka et al., 2015).

Attraverso la fotosintesi le microalghe sintetizzano composti organici primari e rilasciano O_2 , secondo la seguente equazione generale:



Il glucosio prodotto contribuirà, entrando nelle diverse vie metaboliche, alla produzione dei principali composti biochimici.

Le microalghe sono prevalentemente fotoautotrofe¹ ma possono essere anche eterotrofe o mixotrofe. Le prime assumono solo sostanza organica come fonte di energia e possono nutrirsi di altri organismi (fagotrofia), mentre le seconde possono sia compiere la fotosintesi sia nutrirsi di sostanza organica (Tebbani et al., 2014).

Circa la metà della produzione di carbonio organico sul pianeta avviene ad opera del fitoplancton. Grazie a questo processo, i vegetali sono alla base della rete trofica, producono ossigeno, utilizzano l'anidride carbonica e partecipano ad alcuni cicli biogeochimici (Tanaka et al., 2015). Molti cianobatteri sono in grado di utilizzare l'azoto atmosferico (N₂) e sono gli unici organismi in grado di combinare la capacità della produzione di ossigeno attraverso la fotosintesi e la fissazione di azoto. La fissazione dell'azoto, ad opera dell'enzima nitrogenasi, è infatti particolarmente sensibile alla presenza di ossigeno, ma alcune di queste alghe hanno sviluppato delle strategie per far fronte a questo problema grazie alla presenza delle eterocisti (Benemann, 1979).

1.1.1. Lipidi e acidi grassi da microalghe

Le alghe comprendono, come detto, un gruppo diversificato di organismi con forme e dimensioni differenti, che abitano diversi ecosistemi acquatici ed estremi. Il risultato del loro prosperare in ambienti così diversi, consiste in un metabolismo molto diversificato inclusa la produzione di una serie unica di lipidi e acidi grassi (FA), che non sono generalmente presenti nelle piante terrestri.

I lipidi algali sono importanti per gli organismi animali dal punto di vista nutrizionale e hanno pertanto un grande valore commerciale come fonte alternativa di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) ω-3; sono già ampiamente impiegati non solo nell'acquacoltura ma anche per la nutraceutica e altro. I lipidi

¹ Fotoautotrofe: utilizzano la luce come fonte di energia e la CO₂ come fonte di carbonio, compiendo così solo la fotosintesi.

algali consistono in fosfolipidi, glicolipidi e glicerolipidi non polari (lipidi neutri) e lunghezza delle catene e grado di insaturazione risultano essere significativamente più alti di quelli delle piante superiori (Kumari et al., 2013).

Il triacilglicerolo (TAG) è il più diffuso lipide neutro accumulato nelle alghe come prodotto di stoccaggio e riserva di energia. I lipidi algali sono per lo più caratterizzati da FAs saturi e monoinsaturi, ma molte alghe accumulano PUFAs a catena lunga. I PUFAs vengono classificati in ω -3 e ω -6 a seconda della posizione del doppio legame: i primi possiedono un ruolo di assoluta rilevanza nella nutrizione umana, infatti non sono sintetizzati dall'uomo e devono essere introdotti attraverso la dieta.

I PUFAs rappresentano dal 10 al 70% del totale dei FA nelle diverse specie ma le catene più lunghe ($> C18$) si ritrovano in particolare nelle specie marine e sono indispensabili per la corretta crescita e per lo sviluppo degli organismi. Gli ω -3 sono un gruppo specifico di PUFAs dove il primo doppio legame si ritrova tra il terzo e il quarto atomo di carbonio rispetto al gruppo metile, e ne esistono a catena lunga e corta. Tra i più importanti si trovano l'acido docosaesaenoico ($C22:6$ n-3, DHA) e l'acido eicosapentenoico ($C20:5$ n-3, EPA) (**Fig. 1**) i quali risultano essere benefici per la prevenzione di malattie cardiovascolari e altre croniche come il diabete, l'ipertensione e le malattie autoimmuni, per la vista e la salute neurologica, oltre ad essere precursori di molecole bioregolatrici che influenzano i processi di infiammazione e le reazioni immunitarie (Kumari et al., 2013; Ohse et al., 2015; Ryckeboesch et al., 2014).

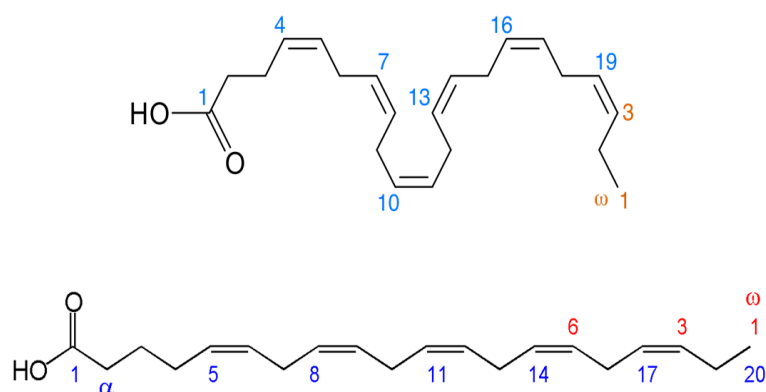


Figura 1 - Struttura chimica di DHA (in alto) ed EPA

1.2. Biotecnologie blu

Il più grande ecosistema sul pianeta Terra è l'oceano. Più dell'80% degli organismi viventi si trovano negli ecosistemi acquatici e il mondo marino è considerato una ricca sorgente di composti bioattivi (Irigoien et al., 2004; Steele, 1985). Nel corso del tempo sono state date diverse definizioni del termine "Biotecnologie", tra le tante se ne riporta una specifica della FAO (*Food and Agricultural Organization*):

“Qualsiasi applicazione tecnologica che utilizzi sistemi biologici, organismi viventi, o loro derivati, per realizzare o modificare prodotti o processi per specifici usi.”

La Biotecnologia in ambito marino promette progressi in diversi settori quali acquacoltura, nutraceutica, farmaceutica, cosmesi, biomateriali, bioenergia e biorimedio (**Fig. 2**) (Kim, 2015).

Ad oggi, tutto il mondo rivolge lo sguardo verso un obiettivo comune: lavorare in maniera coesa al fine di garantire benefici ecosistemici e sociali attraverso la scienza oceanica. Le Nazioni Unite hanno infatti istituito un "Decennio di Scienza Oceanica per lo Sviluppo Sostenibile" (*United Nations Decade of Ocean Science for Sustainable Development*) dove, a partire dal 2021, verranno sfruttati, incoraggiati e coordinati gli sforzi di ricerca a tutti i livelli, al fine di sostenere lo scambio di informazioni, azioni e soluzioni necessarie a raggiungere l'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile (oceandecade.org).

Secondo l'Unione Europea, con il termine *Blue Growth* ci si riferisce ad una strategia a lungo termine che mira a supportare la crescita sostenibile nel settore marino e marittimo nel suo complesso (ec.europa.eu). La *Blue Growth* comprende diversi settori: *blue energy*, pesca e acquacoltura, sorveglianza marittima, turismo e biotecnologie.

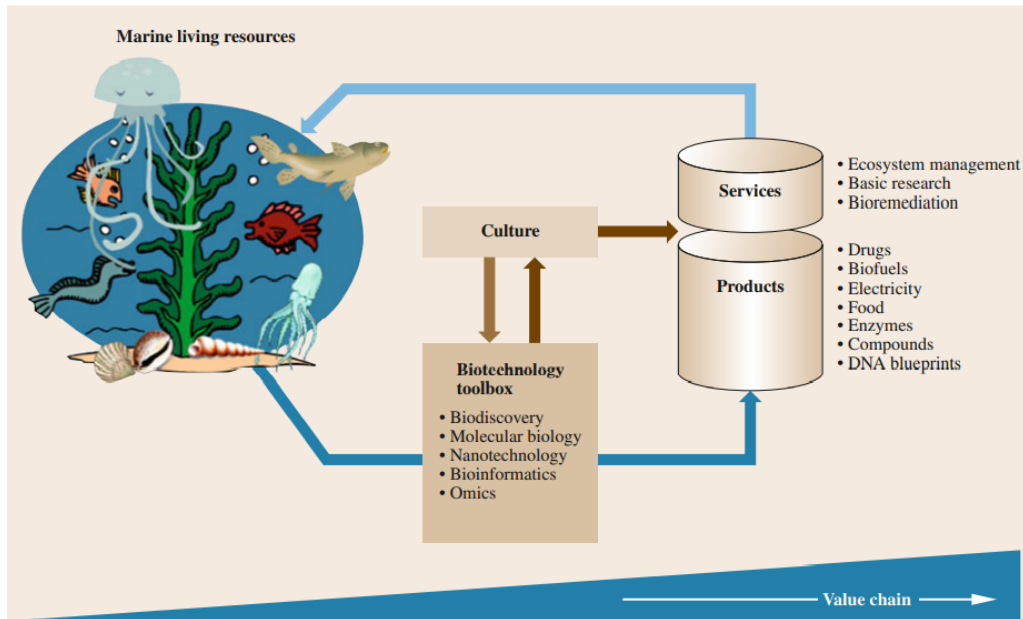


Figura 2 - Esempi di prodotti e servizi sviluppati da applicazioni tecnologiche tramite l'utilizzo di risorse marine (Kim, 2015).

1.2.1 Le microalghe nella strategia *Blue Growth*

Negli ultimi anni l'interesse per le microalghe è aumentato grazie alle loro potenziali applicazioni nei diversi settori economici (Borowitzka, 2013; Simonazzi et al., 2019). Questi organismi infatti trovano applicazione in diversi campi sopracitati (paragrafo 1.2.) e i prodotti e servizi forniti dalle microalghe rappresentano un'alternativa sostenibile alle attuali risorse e tecnologie attuali, offrendo benefici non solo ambientali ma anche economici (Olaizola et al., 2019). La sfida chiave nella coltivazione di massa di microalghe, è quella di trovare ceppi tramite i quali sia possibile ottenere prodotti commerciabili, ma che allo stesso tempo crescano efficacemente in condizioni controllate come quelle industriali (Varshney et al., 2015) al fine di ottenere grandi quantità di biomassa.

1.3. Crescita delle microalghe in sistemi industriali

Nella coltivazione in sistemi industriali, che operano su larga scala e per periodi lunghi, i fattori più importanti da considerare per la crescita delle microalghe sono:

- Nutrienti, principalmente inorganici: azoto e fosforo;
- Luce e fotoperiodo;
- Temperatura;

- Salinità;
- Concentrazione di CO₂ ed O₂;
- pH;
- *Mixing*: necessario per la distribuzione di tutti i nutrienti, anidride carbonica, luce;
- Assenza di contaminanti e di *competitors*: virus, batteri, alghe diverse da quella coltivata e che consumerebbero le stesse risorse, zooplancton.

Tutti questi fattori sono importanti per la crescita ma possono anche causare stress alle colture stesse.

Ogni organismo ha il suo optimum di crescita (**Tab. 1**): la maggior parte rientra in range caratteristici di ambienti non estremi.

Tabella 1 - Parametri generali per la coltivazione di microalghe (Coutteau, 1996)

Parametri	Intervallo	Optimum
Temperatura (°C)	16-27	18-24
Salinità (g l ⁻¹)	12-40	20-24
Intensità luminosa (mmol/m ² /s)	15-135 (in base a volume e densità)	40-70
pH	7-9	8,2-8,7

▪ **Nutrienti**

La variabilità nell'uptake e nell'efficienza dell'utilizzo dei nutrienti è diversa tra i vari gruppi fitoplanctonici e dipende da tratti evolutivisti, ecologici e funzionali. In una coltura industriale, è di fondamentale importanza osservare le preferenze dell'organismo da coltivare poiché i nutrienti e la loro disponibilità sono indispensabili per il corretto metabolismo delle microalghe.

Carbonio, idrogeno e ossigeno sono elementi fondamentali per la crescita microalgale. Il carbonio, in particolar modo, partecipa alla composizione di tutte le molecole organiche e quindi a tutte le attività metaboliche della cellula derivando esclusivamente dalla CO₂ (Chisti, 2007). Altri macronutrienti richiesti sono azoto, fosforo, zolfo, potassio e magnesio. L'azoto risulta essere di fondamentale importanza per i processi fotosintetici, per la sintesi di proteine e di

acidi nucleici, e può essere reso disponibile sotto forma di nitrati, nitriti, ammoniaca o urea.

In un sistema dove sono presenti in ugual concentrazione ammonio e nitrato, la maggior parte degli organismi tende ad utilizzare prima l'ammonio e successivamente il nitrato. Questo perché assumere nitrato comporta la necessità di una reazione di riduzione, quindi di un dispendio energetico. Tuttavia, alte concentrazioni di ammonio inibiscono la crescita di alcune microalghe, nonostante la risposta sia variabile tra le diverse specie. Alcune variazioni fisiologiche indotte tramite riduzione di nutrienti, possono essere utilizzate per applicazioni biotecnologiche come ad esempio la *N-starvation* (fame da azoto), generalmente connessa all'aumento di accumulo di lipidi (Rodolfi et al., 2009); al contrario, il contenuto di lipidi tende a diminuire con una limitazione di fosforo: quest'ultimo, infatti, riduce la formazione di fosfolipidi.

La limitazione di azoto, oltre alla limitazione di fosforo, induce un aumento dei carotenoidi non fotosintetici, come ad esempio l'astaxantina in *Haematococcus pluvialis* o il β -carotene in *Dunaliella bardawil*. In generale, la limitazione dei nutrienti influisce negativamente sulla fotosintesi e sui tassi di crescita delle microalghe.

Lo zolfo è un importante componente strutturale di alcuni aminoacidi e vitamine, oltre che importante nella formazione dei cloroplasti (Barsanti et al., 2014); il potassio è necessario per diversi enzimi ed è implicato nella sintesi delle proteine oltre alla regolazione osmotica; il magnesio è presente nella clorofilla, pigmento fondamentale implicato nella fotosintesi.

Micronutrienti quali ferro, manganese, cobalto, zinco, rame e molibdeno sono richiesti in minima quantità (Pires, 2015).

▪ **Luce**

La luce è un fattore estremamente importante per la crescita microalgale. Un'irradianza limitata influenza l'*uptake* dei nutrienti e il grado di saturazione dei lipidi mentre, al contrario, alti livelli di luce (es. colture all'aperto) possono essere dannosi per le cellule, traducendosi in fotoinibizione, riduzione della resa quantica massima e dell'assorbimento di CO₂. Nel caso in cui i valori di luce fornita non siano ottimali, le cellule vanno incontro a fenomeni di adattamento. In caso di limitazione produrranno quindi più centri di

reazione, o più antenne, ma questi tra loro potranno auto-ombreggiarsi quindi la luce non verrà ulteriormente utilizzata. La luce è un fattore estremamente variabile, soprattutto per colture mantenute in ambiente esterno dove essa dipende dalla posizione geografica, dal periodo dell'anno, dall'ora del giorno e dagli eventi atmosferici (Olaizola et al., 2019).

▪ **pH e scambi gassosi**

Il pH è un fattore estremamente variabile poiché in ambiente acquatico, successivamente al consumo di CO₂, aumenta. Se alla coltura viene fornita CO₂ in eccesso, con lo scopo di stimolare la crescita, si rischia di acidificare l'ambiente con pessime conseguenze quali la precipitazione del fosfato che diventerà meno disponibile e meno utilizzabile dalle cellule.

Il supplemento di CO₂ e la rimozione di O₂ sono fondamentali per il mantenimento della coltura algale: l'integrazione di CO₂ provvede a fornire elementi carboniosi e a modulare i livelli di pH (Goldman et al., 1972), mentre l'eliminazione di O₂ è necessaria poiché alte concentrazioni di quest'ultimo possono causare stress ossidativo e diminuire la produttività della coltura (Olaizola et al., 2019; Raso et al., 2012).

1.4. Tecniche per la coltivazione di microalghe

Esistono quattro principali tipologie di coltivazione:

- Le **colture batch** consistono in un singolo inoculo di cellule all'interno di un terreno di coltura, seguito da un periodo di crescita della durata di diversi giorni durante il quale aumenta la biomassa e vengono consumati i nutrienti. Una volta raggiunta la densità massima, la biomassa viene raccolta. Generalmente, il volume dell'inoculo iniziale corrisponde al 2-10% del volume di coltura finale. La classica curva di una coltura *batch* (**Fig. 3**) indica quattro fasi principali: *lag* o di induzione, esponenziale, stazionaria e di declino.

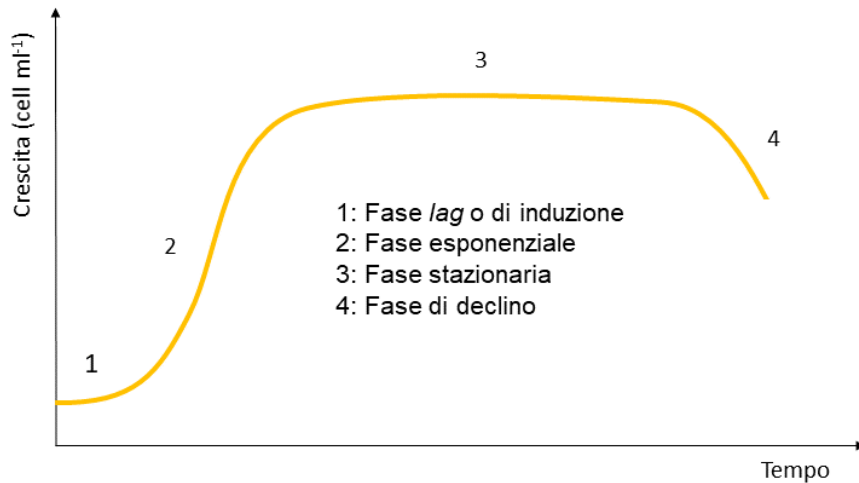


Figura 3 - Curva tipica di una coltura batch all'interno della quale è possibile individuare 4 fasi di andamento della crescita.

- Quello delle **colture continue** è un metodo che permette il mantenimento delle stesse molto vicino al tasso di crescita massimo e risulta particolarmente efficace nella depurazione delle acque. Se ne distinguono due diverse tipologie:
 - i. Con chemostato: il chemostato è un sistema le cui condizioni chimiche interne sono costanti e all'interno del quale viene conservata la coltura nel quale viene pompato, regolarmente, un certo volume di terreno (*media reservoir*): al contempo, un secondo sistema di pompaggio raccoglie dal chemostato un eguale volume di coltura algale e lo trasferisce in un contenitore adibito;
 - ii. "a torbidostato": la concentrazione algale viene mantenuta ad un livello predefinito diluendo la coltura con terreno fresco mediante sistema automatico che determina livelli costanti di torbidità (Coutteau et al., 1996).

- La tecnica delle **colture semi-continue** prevede una gestione in cui la coltura viene mantenuta per lungo tempo e, periodicamente, solo parzialmente raccolta. Una volta raccolta una frazione della coltura, viene prontamente fornito terreno fresco, o lo stesso terreno utilizzato in precedenza se contiene ancora nutrienti, rabboccando così il contenitore fino al volume iniziale. Generalmente le colture semi-continue possono essere allestite sia in fotobioreattori che in vasche e possono essere poste in ambienti interni che esterni; la durata è imprevedibile e sicuramente è importante periodicamente farla ripartire da un inoculo (Coutteau et al., 1996). La tipica curva di crescita di una coltura mantenuta tramite metodo semi-continuo prevede una serie di picchi che indicano il continuo aumento della biomassa e una coltura che non entra mai in fase stazionaria. Il rapido declino successivo ad ogni picco indica l'immediata raccolta nella fase di maggiore densità (**Fig. 4**).

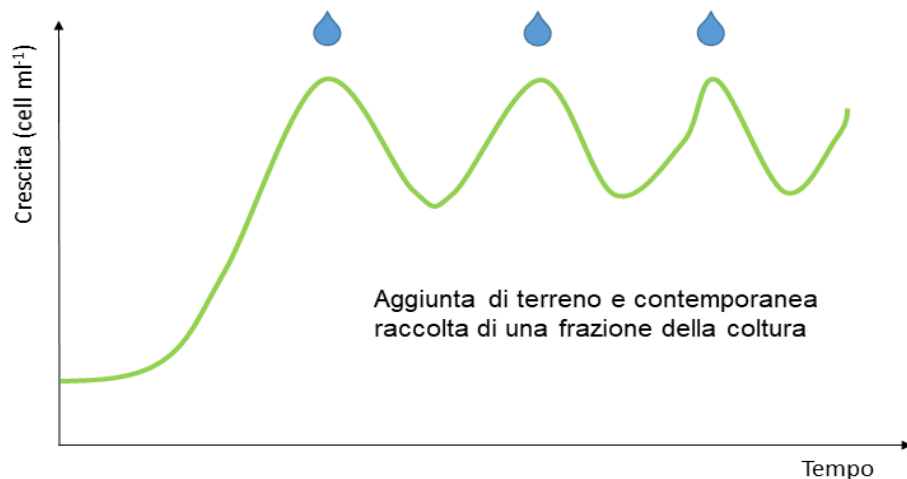


Figura 4 – Curva tipica di una coltura semi-continua. La goccia indica il momento in cui viene aggiunto nuovo terreno.

- Infine, per le **colture immobilizzate** vengono utilizzati supporti come resine o gel naturali o sintetici sui quali far aderire le microalghe. Le microalghe verdi si prestano di più a questa particolare tecnica. Si possono utilizzare gel polisaccaridi o polimeri sintetici (Shen et al., 2009).

1.4.1. Sistemi di coltivazione industriale

Le microalghe possono essere coltivate in ambienti sia aperti che chiusi. In quest'ultimi, i fattori che regolano la crescita delle microalghe possono essere

attentamente controllati e monitorati, diversamente dagli ambienti aperti dove risultano essere altamente variabili, rendendo così difficile mantenere alti tassi di crescita sul lungo periodo (López-Elías et al., 2005; Masojídek et al., 2003; Molina et al., 2001). Inoltre, i sistemi chiusi permettono di controllare più efficacemente le contaminazioni, cosa pressoché impossibile nei sistemi aperti (Pires, 2015; Ruiz-Marin et al., 2010).

I due principali sistemi di coltivazione di massa sono *Open Ponds* e fotobioreattori (PBRs, *Photobioreactors*), rispettivamente sistemi aperti e chiusi. In entrambi i casi, lo scopo è quello di esporre la maggior frazione di biomassa cellulare alle migliori condizioni di crescita possibili ad un costo ridotto (Olaizola et al., 2019). Le *Open Ponds* sono strutture costituite da vasche di diversa grandezza e tra i diversi design proposti i principali sono le vasche circolari (*Circular ponds*, **Fig. 5a**) e le vasche lineari (*Raceways*, **Fig. 5b**), ciascuno caratterizzato da una superficie variabile e una profondità che non oltrepassa i 70 e i 30 cm rispettivamente, al fine di garantire un'adeguata esposizione della coltura alla luce (Pires, 2015) e consentire un adeguato rimescolamento. Il *mixing* è garantito da un braccio meccanico (**Fig. 5c**) o una pala (**Fig. 5d**) motorizzati, con lo scopo di evitare la sedimentazione della biomassa e favorire gli scambi gassosi (Molina et al., 2001; Shen et al., 2009).

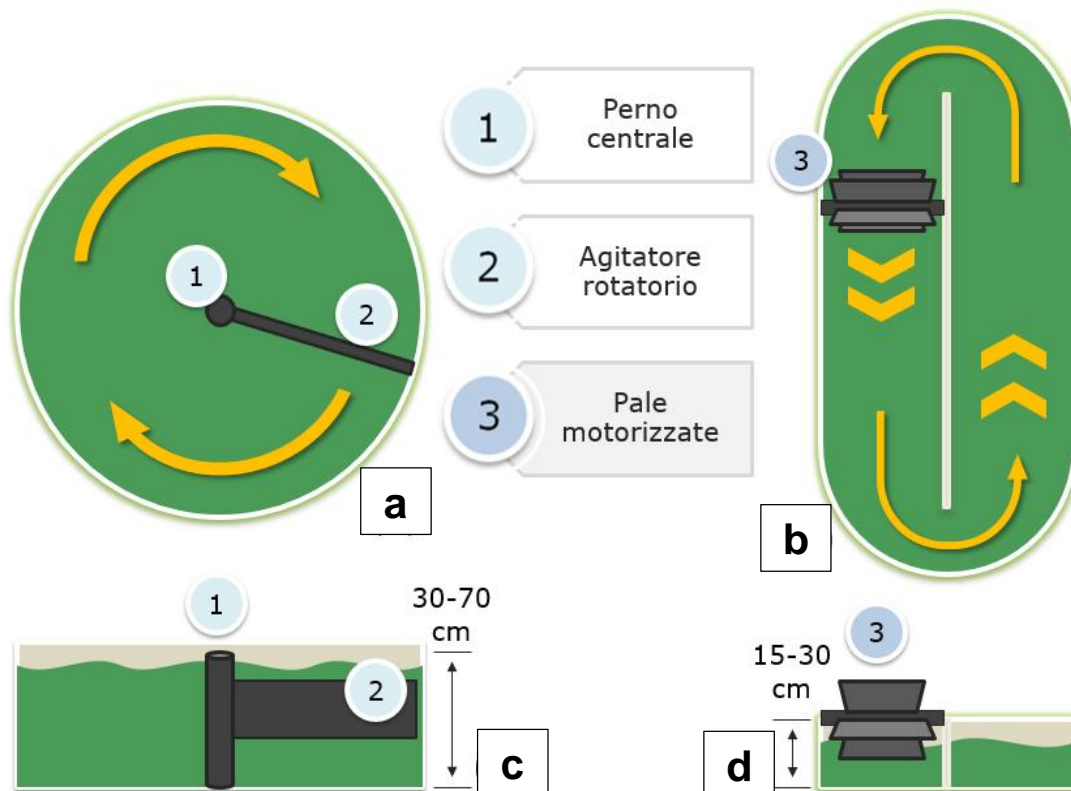


Figura 5 - Principali tipologie di sistemi di coltivazione aperti: *Circular ponds* (a) e *Raceway* (b) e rispettivi sistemi di rimescolamento (c e d) (Tesi di Laurea di Mara Simonazzi).

I PBRs permettono la crescita di diverse microalghe, ognuna coltivata singolarmente, per un tempo prolungato (Molina et al., 2001). Possono avere differenti forme (tubulari, colonnari, piatti, anulari), essere diversamente orientati ed essere composti da materiali diversificati (Plexiglas®, vetro, plastica ecc.). Queste strutture possono essere mantenute sia esternamente, sfruttando l'illuminazione naturale, sia internamente, necessitando quindi di illuminazione artificiale.

Nei sistemi industriali ma anche a scopo di ricerca, i più comuni risultano essere i *Bubble Column Photobioreactors* (BC-PBR) (**Fig. 6a e b**): costituiti da un cilindro trasparente orientato verticalmente, questi PBRs prevedono la presenza di un sistema di aerazione posto alla base del reattore. Le bolle che fuoriescono creano un flusso di turbolenza che assicura il rimescolamento della coltura e fornisce, al contempo, i gas necessari per il metabolismo (Khoo et al., 2016). Le ricerche in campo biotecnologico sono volte ad un continuo miglioramento dell'efficienza di questi sistemi (Naira et al., 2020).

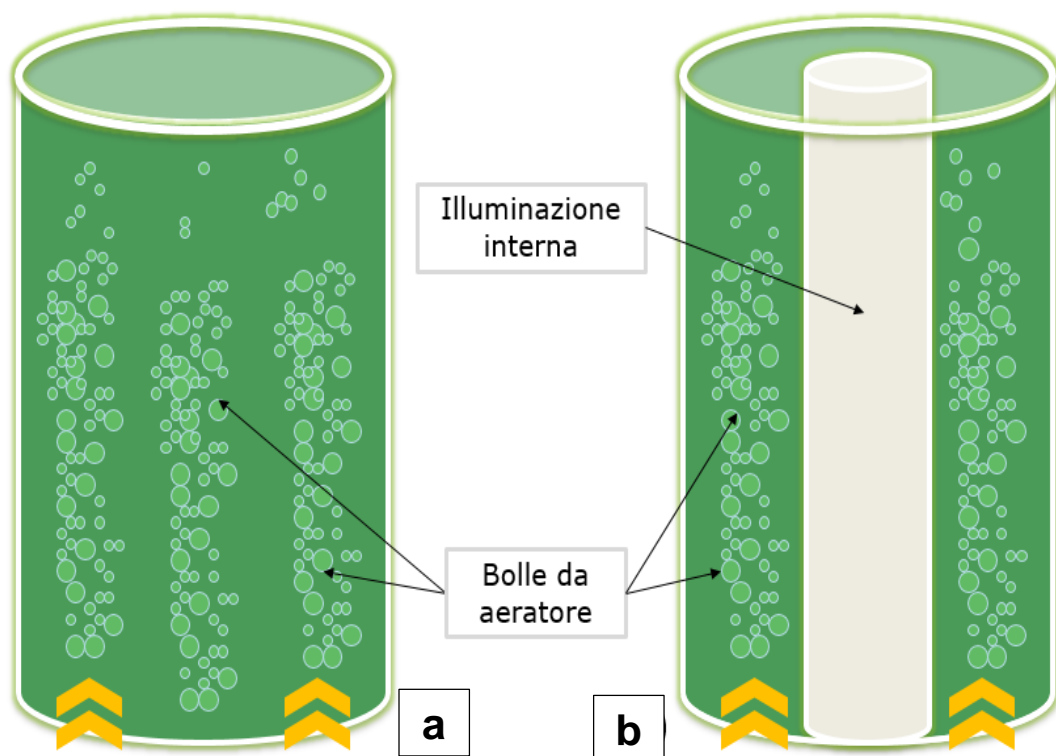


Figura 6 - Differenti design di *Bubble Column Photobioreactors* (BC-PBRs): semplice (a) e anulare (b) (Tesi di Laurea di Mara Simonazzi)

Entrambi possiedono rispettivi vantaggi e svantaggi (riassunti in **Tabella 2**), ma ad oggi, il sistema più utilizzato per la produzione commerciale di microalghe continua ad essere quello delle *Open Ponds*, grazie ai bassi costi di investimento e manutenzione.

Tabella 2 - Confronto tra sistemi aperti e chiusi per la produzione di microalghe (contenuti rielaborati da Olaizola et al., 2019; Pires 2015; Shen et al., 2009)

	Parametri	Sistemi aperti	Sistemi chiusi
Impatto ambientale	Impatto sul terreno	Alto	Basso
	Impatto sull'acqua	Alto	Basso
	Perdita di CO ₂	Alto	Basso
Parametri biologici	Specie algali	Limitate	Variabili
	Contaminazione	Alto rischio	Basso rischio
	Produttività	Basso	Alto
	Composizione della biomassa	Variabile	Rigenerabile
	Concentrazione di biomassa	0,25 g L ⁻¹	1-1,5 g L ⁻¹
Parametri operativi	Controllo fattori abiotici	Difficile	Possibile
	Condizioni meteo	Vincolato	Non vincolato
	Richiesta di energia	Basso	Alto
	Richiesta di spazio	Alta	Bassa
	Utilizzo di acque reflue	Possibile	Possibile
Costi	Pulizia	Non richiesta	Richiesta
	Allestimento	Basso	Alto
	Operativi	Basso	Alto
	Raccolta	Basso	Alto

1.5. Diatomee

Le diatomee costituiscono la parte più ricca e abbondante del fitoplancton, infatti si stima che vi siano oltre 100.000 specie appartenenti a questa classe. Possono essere planctoniche, bentoniche o epifite e contribuiscono largamente alla produzione primaria oceanica e globale. Appartenenti al phylum delle Bacillariophyta, le diatomee sono principalmente unicellulari sebbene alcune siano coloniali, e sono distribuite ubiquitariamente dagli habitat marini a quelli d'acqua dolce e dalle regioni ipersaline a quelle subantartiche (Bhattacharjya et al., 2020; Heimann et al., 2015). Contribuiscono al 40% della produzione primaria globale negli oceani e partecipano ai cicli biogeochimici del carbonio e del silicio (Bhattacharjya *et al.*, 2020).

Caratteristica chiave delle diatomee è la parete di biosilice che ricopre la cellula, detta frustulo o teca (Santos-Sánchez et al., 2016), che viene prodotta dalle cellule stesse e la morfologia della quale varia in base alla disponibilità di silice nel mezzo (Heimann et al., 2015). Tutte le diatomee hanno la stessa struttura di base, che consiste in due parti: un'epiteca e una più piccola ipoteca; quest'ultima si adatta perfettamente all'interno della più grande, come una scatola con un coperchio. Ognuna di queste inoltre, è costituita da una parte piatta (valva) e una laterale (cingolo) (**Fig. 7**). Il cingolo consiste in una serie di bande, il cui numero e la morfologia stessa possono essere importanti per l'identificazione della specie (Kraberg et al., 2010).

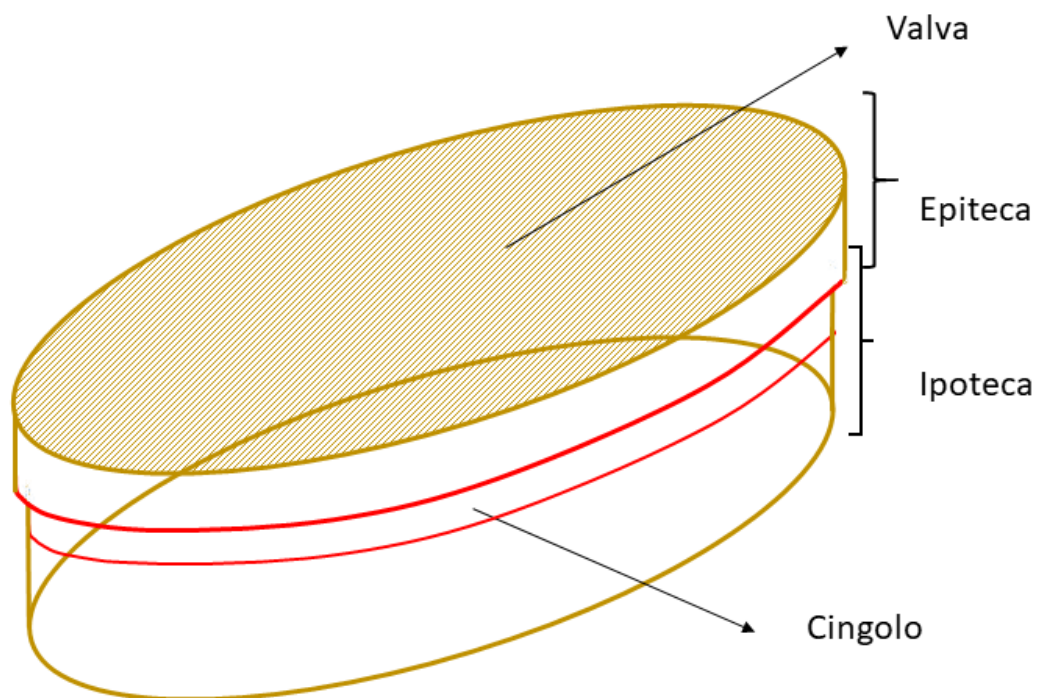


Figura 7 - Struttura generale di una diatomea (contenuto rielaborato da Kraberg et al., 2010)

Le diatomee sono responsabili della produzione di composti bioattivi di assoluta rilevanza come il carotenoide fucoxantina, PUFAs quali EPA e DHA, steroli, idrocarburi, terpenoidi, fenoli e flavonoidi.

Lauritano e colleghi (2016) hanno evidenziato alcune proprietà derivanti da molecole bioattive prodotte da diatomee quali antiossidanti, antinfiammatorie, antitumorali, antidiabetiche, antiobesità e antimicrobiche che rappresentano solo alcune delle grandi potenzialità derivanti da questi organismi, largamente

impiegati in diversi settori economici e sociali (Borowitzka, 2013; Venkatesan et al., 2015).

1.6. Molluschicoltura

L'acquacoltura (d'acqua dolce e marina) produce, ad oggi, maggiori risorse rispetto alla pesca selvatica e si prevede un raddoppio della produzione entro la metà del secolo. Il settore risulta essere di sempre maggior rilevanza anche al fine di raggiungere obiettivi importanti come quello di sostenibilità proposto dalle Nazioni Unite, poiché potenzialmente in grado di contribuire ad alimentare la popolazione umana in modo sostenibile (Gibbs, 2007; Turolla et al., 2020)

L'Italia è il primo produttore europeo di vongole veraci e il secondo a livello mondiale, secondo solo a Cina e Korea (Abbiati et al., 2017). Questo eccellente traguardo è stato raggiunto grazie all'introduzione, nel 1983, della vongola verace filippina (*Ruditapes philippinarum*, Adams and Reeve, 1850) nella laguna di Venezia mediante la liberazione di 200.000 giovanili ottenuti da riproduzione controllata (Boscolo Brusà et al., 2011), conseguentemente al collasso delle popolazioni selvatiche della vongola verace europea (*Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758) (Bartoli et al., 2016; Turolla, 2008).

Gli allevamenti di vongole possono essere situati direttamente in mare o presso stabilimenti. Quest'ultimi si propongono di allevare i molluschi in diverse vasche artificiali, ognuna deputata ad una diversa fase del ciclo di crescita dell'animale. Tali allevamenti sono generalmente localizzati in aree lagunari o marittime in modo da sfruttare comodamente l'acqua per l'allevamento previa filtrazione ed eventuale depurazione.

Ruditapes philippinarum è tra le specie più diffuse e coltivate, con un totale di 4.139,2 migliaia di tonnellate di pescato nell'anno 2018, che rappresenta circa il 24% di produzione mondiale di molluschi per il suddetto anno (FAO, 2020a). L'Italia, è responsabile della produzione di 30.991 tonnellate nello stesso anno (FAO, 2020b). Le principali zone di produzione sono localizzate sul versante adriatico della penisola, essenzialmente in Veneto, Emilia Romagna e Puglia (Prioli, 2008). Una delle più importanti e antiche aree dedicate alla

molluschicoltura in Italia è la Sacca di Goro (**Fig. 8**), situata nel nord del Mare Adriatico. Con un'estensione di circa 26 km² e una profondità media di 1,5 metri, la Sacca di Goro è la laguna a sud del delta del Po.

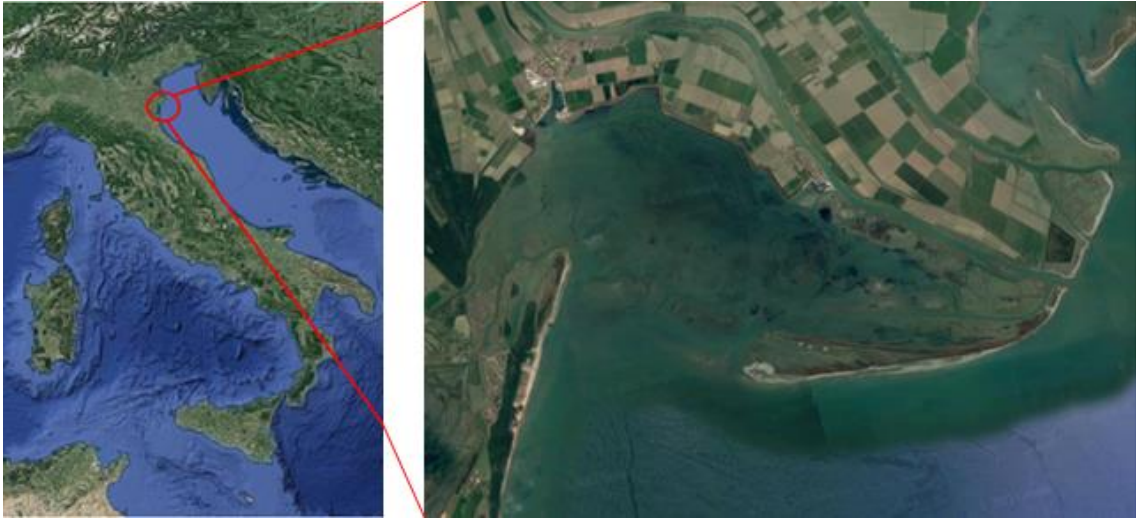


Figura 8 - Immagini satellitari della Sacca di Goro, sulle coste del Mar Adriatico nel nord-est d'Italia (44°51'06.48"N 12°17'45.24"E).

Oltre ad essere zona di interesse naturalistico comunitario, è anche annoverata tra le zone umide di importanza internazionale ai sensi della convenzione di Ramsar. Per le attività di molluschicoltura, la Regione Emilia-Romagna rilascia in concessione circa 13 km² di aree all'interno della Sacca, alle cooperative dedite alla coltivazione di vongole (Turolla et al., 2019a). Le vongole veraci sono specie fossorie che occupano fondali che si trovano tra la zona subtidale e intertidale e che non presentano grandi pendenze. Questi molluschi sopportano bene variazioni anche notevoli di temperatura, salinità, ossigenazione e torbidità, tipiche di ambienti lagunari o comunque prossimi alle foci dei fiumi. Ecco perché i migliori siti di allevamento si localizzano generalmente a riparo dal forte moto ondoso (Paesanti et al., 2000).

Tra le diverse realtà presenti all'interno della Sacca di Goro, spicca l'azienda Naturedulis Srl che tra le molteplici attività vanta esperienza decennale nell'acquacoltura di molluschi bivalvi. Grazie al moderno schiuditoio avviato all'interno della struttura, Naturedulis è in grado di produrre novellame delle principali specie di molluschi bivalvi di allevamento tra cui *Ruditapes philippinarum*. Questo novellame viene utilizzato da diverse Cooperative come "seme" da porre in ambiente dove poi le vongole terminano il loro accrescimento nutrendosi di cibo naturale. Oltre all'attività principale, Naturedulis è anche centro

accreditato di ricerca e collabora con Enti e Università del territorio al fine di incrementare non solo la loro esperienza ma anche le conoscenze riguardanti il mondo dell'acquacoltura. La ricerca verte anche sul miglioramento continuo nella produzione di microalghe, al fine di assicurare il giusto apporto di nutrienti nelle diverse fasi di vita dei molluschi poiché la giusta combinazione dei diversi ceppi algali può fare la differenza durante l'accrescimento larvale², aumentando la resistenza delle larve stesse durante il loro delicato sviluppo (naturedulis.com).

1.6.1. Utilizzo di microalghe per l'alimentazione dei molluschi bivalvi

Le microalghe sono ricche di sostanze ad alto valore aggiunto come lipidi, polisaccaridi, proteine e pigmenti: sono quindi un eccellente fonte di alimentazione per diversi molluschi bivalvi, per ogni stadio del loro ciclo vitale (**Fig. 9**) (Cheng et al., 2020; Khan et al., 2018). L'allevamento di giovanili sani e vitali è di fondamentale importanza per il successo della produzione e, per il raggiungimento di tale scopo, vengono quindi utilizzate microalghe vive che forniscono elementi nutritivi al fine di soddisfare le esigenze metaboliche di crescita e riproduzione (Liu et al., 2010; Marquez et al., 2019). La formulazione delle diete varia in base alle capacità delle singole specie animali di intrappolare, ingerire, digerire e assimilare le diverse specie microalgali che hanno morfologie, dimensioni e apporti nutrizionali differenti (Marquez et al., 2019). Combinazioni di flagellate e diatomee forniscono una dieta bilanciata che generalmente accelera il tasso di sviluppo larvale a metamorfosi rispetto alle diete monospecifiche (Coutteau et al., 1996). Grazie alle loro caratteristiche biochimiche, alla loro dimensione e alla facilità di coltivazione, le specie microalgali maggiormente coltivate e utilizzate negli schiudatoi e allevamenti di molluschi bivalvi appartengono ai generi: *Isochrysis*, *Pavlova*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* e *Chlorella* (Cheng et al., 2020; Saucedo et al., 2013).

L'alimentazione inizia non appena le larve fuoriescono dall'uovo e gli organi, compreso l'apparato digerente, sono sviluppati. Prima di questo momento, le riserve depositate dalle femmine all'interno dell'uovo durante lo sviluppo

² Larva: stadio di un bivalve che va da quello embrionale alla metamorfosi (Helm, Bourne, Lovatelli, & FAO, 2004)

sopperiscono alla mancanza di alimentazione. Una volta sviluppato il *velum* allo stadio D, il movimento delle ciglia dirige le particelle di cibo verso la bocca, oltre a fornire la forza motrice per l'attività natatoria (Helm et al., 2004).

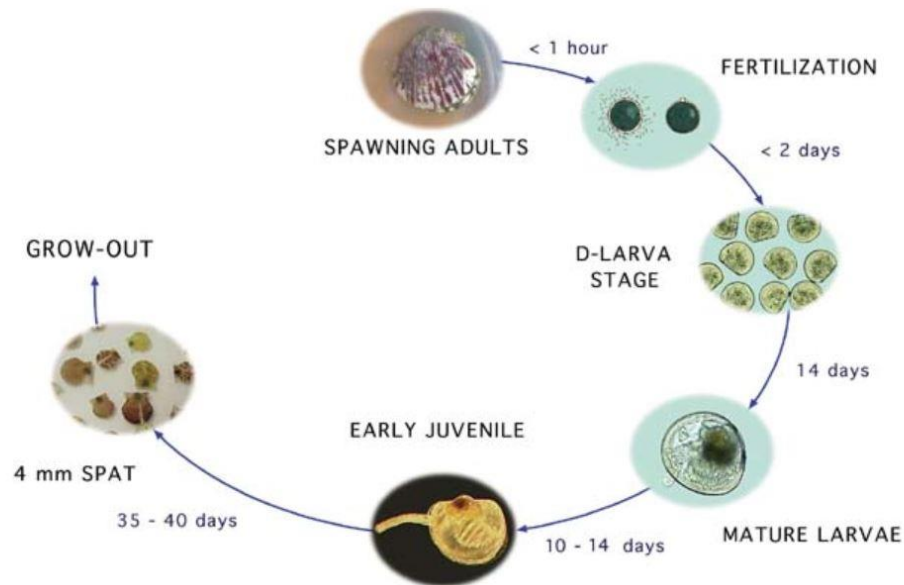


Figura 9 - Rappresentazione dei diversi stadi di sviluppo del mollusco bivalve *Agropentem gibbus* (Helm et al., 2004).

I lipidi, in particolare TAG, sono stati identificati come maggiore fonte energetica per le larve di molluschi bivalvi in diversi esperimenti, seguiti dalle proteine e dai carboidrati che sembrano contribuire scarsamente all'apporto energetico; gli acidi grassi essenziali (EFAs), in particolare ω -3 come EPA e DHA, sono importanti per la crescita e lo sviluppo; inoltre, gli acidi grassi ω -6 quali l'acido docosapentenoico (DPA, 22:5n-6) e l'acido arachidonico (AA, 20:4n-6), sono stati identificati come potenzialmente significativi per la crescita e la sopravvivenza sia in stadio larvale che post-larvale. La capacità di sintesi degli EFAs nei bivalvi è molto limitata e inadeguata per il supporto delle loro richieste nutrizionali, per questo motivo dev'essere garantita e fornita da fonti esterne (Marshall et al., 2010).

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'importanza delle diverse specie microalgali e dei loro molteplici utilizzi è sempre più affermata e il settore dedicato alle biotecnologie blu è in forte espansione. I benefici ottenibili da questi microrganismi sono molteplici e grandi sforzi in termini di studio e ricerca sono necessari.

Nel 2018 sono state prodotte, globalmente, 17,7 milioni di tonnellate di molluschi bivalvi (prevalentemente d'acqua salata) grazie all'acquacoltura e il 23,6% è rappresentato proprio dalla vongola verace filippina (FAO, 2020a). L'implemento sostenibile di questa attività risulta essere fondamentale per la sicurezza alimentare globale, rappresentando un metodo sostenibile per fornire cibo nutriente alla popolazione umana, oltre che a prezzi accessibili. Per la crescita dell'industria, l'ottenimento di novellame negli schiuditoi è essenziale poiché il reclutamento di larve e novellame dall'ambiente naturale risulta insufficiente per fronteggiare le grandi richieste di mercato, infatti diversi molluscoltori devono acquistarli all'estero (Turolla et al., 2019b). L'allevamento dei primi delicati stadi dello sviluppo di *R. philippinarum* è possibile solo grazie ad un'alimentazione ottimale (Willer et al., 2019).

Le microalghe finora impiegate nel settore dell'acquacoltura si sono rivelate utili, ma la scoperta di nuove specie e lo studio approfondito di quest'ultime potrebbe rivelare nuovi vantaggi per questo settore che ricopre un ruolo fondamentale nell'economia e nel commercio nonché nell'industria del cibo. Non sempre gli allevatori di novellame hanno a disposizione nuove specie algali né la possibilità di coltivare più specie contemporaneamente per cui studi specifici richiedono la collaborazione di diverse competenze, come quelle che sono state messe in gioco in questo studio che mostra degli aspetti innovativi.

Lo scopo della seguente ricerca è stato quello di confrontare diverse combinazioni di microalghe come dieta per la crescita di diversi stadi di vongola filippina, valutando i risultati come sopravvivenza delle larve, successo di metamorfosi, efficienza di utilizzo di cibo, inoltre di caratterizzare la composizione ovvero il valore nutrizionale delle specie utilizzate, anche in diversa fase di crescita, quindi di valutare i risultati sulla base della diversa composizione. Il lavoro si è così strutturato:

- Caratterizzazione e composizione biochimica delle microalghe utilizzate:
-

in una prima fase le microalghe sono state fatte crescere singolarmente in colture *batch* e n'è stata monitorata la crescita. È stata poi raccolta la biomassa e sono state effettuate diverse analisi con l'obiettivo di descriverne la composizione biochimica, sia in fase esponenziale che stazionaria.

- Esperimento di *feeding* su larve di *R. philippinarum*:
-

su larve di *R. philippinarum* sono stati eseguiti esperimenti di *feeding* fornendo diete mono e plurispecifiche al fine di indagare quali fossero le specie più adatte e le quantità migliori da fornire agli animali al fine di assicurare il raggiungimento della metamorfosi.

- Esperimento di *feeding* su novellame di *R. philippinarum*:
-

Infine stati effettuati esperimenti di *feeding* su seme di *R. philippinarum* basati su diete monospecifiche di quattro diverse microalghe, somministrate in seguito a raccolta in fase esponenziale che stazionaria. È stato calcolato il tasso di *clearance* degli animali e l'efficienza di assorbimento del cibo, grazie al quale viene valutata l'efficienza con cui il materiale organico viene assorbito tramite particelle alimentari ingerite (Widdows et al., 2006). Tutto questo al fine di valutare quale, tra le quattro diverse alghe testate nelle due diverse fasi, fosse quella maggiormente idonea nell'alimentazione dei molluschi bivalvi.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Microalghe utilizzate

Per effettuare lo studio sono state scelte 4 diverse microalghe: tre diatomee e un'alga verde, nello specifico due diversi ceppi di *Thalassiosira* spp. (Cleve, 1873) e uno di *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898), tra le diatomee, e *Tetrasemis chui* (Butcher, 1959) come alga verde. Durante lo studio è stata utilizzata una quinta microalga, *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) (Haptophyta) per diversi scopi che verranno descritti successivamente.

- *Thalassiosira* spp.: diatomee marine appartenenti al genere *Thalassiosira* (classe Mediophyceae). Per distinguerle sono state identificate come ceppo A (**Fig. 10a**) e ceppo B (**Fig. 10b**). Del genere *Thalassiosira* sono note più di 100 specie, la maggior parte presenti in acque marine, con dimensioni che vanno da 3 a 30 μm . Le cellule di queste microalghe hanno forma discoidale o cilindrica e possono presentarsi singolarmente o unite in lunghe catene, connesse tramite filamenti chitinosi, spesso immerse in una densa mucillagine (Horner et al., 2002). Entrambi i ceppi A e B sono stati isolati all'interno del laboratorio di Biologia delle Alghe dell'Università di Bologna presente nel Campus di Ravenna (RA) da campioni naturali prelevati nella Sacca di Goro nelle stagioni autunnali ed estiva del 2020, rispettivamente, nell'ambito di una collaborazione precedente con Naturedulis nel progetto "Alte competenze" della Regione Emilia-Romagna. I due organismi utilizzati, come si può vedere nelle figure, presentano diverse caratteristiche morfologiche ed è in corso la caratterizzazione a livello di specie tramite microscopio a scansione.
- *Phaeodactylum tricornutum*: diatomea marina appartenente al *phylum* Bacillariophyta (*incertae sedis*). Le cellule possono presentare tre diversi morfotipi: ovale (bentonico), fusiforme e triradiato (planctonici) (Borowitzka et al., 1978): gli ultimi due morfotipi sono osservabili in **fig. 10c**. Il morfotipo ovale è caratterizzato da una singola valva in silice perfettamente incorporata nella parete organica della cellula (Willis et al., 2013). Grazie all'alto contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) ω -3 (Simonazzi et al.,

2019), *P. tricornutum* risulta essere di particolare rilevanza in diversi settori d'impiego, oltre a quello dell'acquacoltura in cui viene utilizzata da tempo.

- *Tetraselmis chui* (**Fig. 10d**): le cellule di questa microalga verde, appartenente al phylum Chlorophyta (classe Chlorodendrophyceae), hanno una forma che può essere ellittica od obovata, con una dimensione tra 12 e 16 μm . Appare evidente una fossa flagellare il cui fondo risulta essere coperto di peli (Hori et al., 1986). Di particolare interesse per l'alto contenuto di PUFAs (Banskota et al., 2019; Ohse et al., 2015), questa microalga viene spesso utilizzata in acquacoltura, sia viva sia concentrata sottoforma di liofilizzato, di pasta o congelata (Aji, 2011).

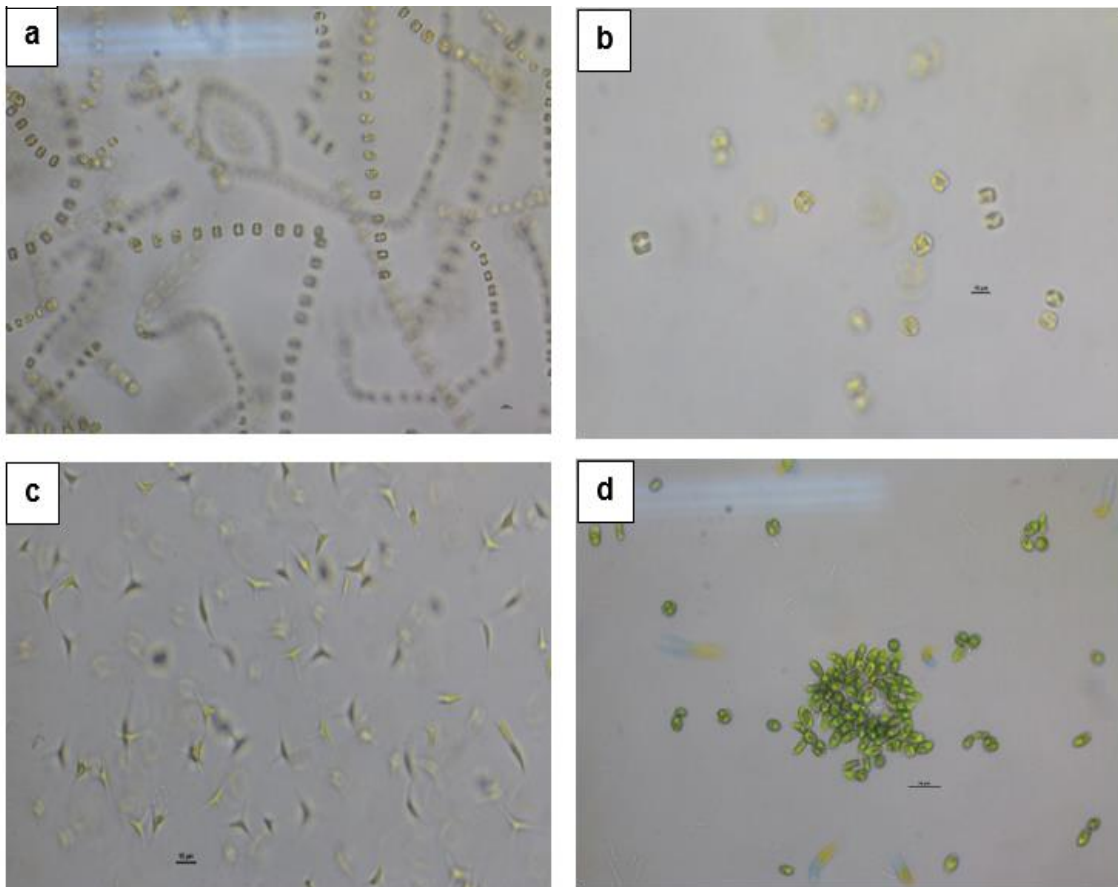


Figura 10 – Fotografie di due specie non identificate di *Thalassiosira* ceppo A (a) e ceppo B (b), *Phaeodacylum tricornutum* (c) e *Tetraselmis chui* (d), effettuate con microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con obiettivo 32x

Durante gli esperimenti su larve di *R. philippinarum* è stata utilizzata anche *Isochrysis galbana* (T-Iso) poiché ampiamente studiata nel corso degli anni e

notoriamente idonea per il *feeding* larvale (Yan et al., 2006). T-Iso non è stata tuttavia oggetto di studio ma è stata utilizzata come confronto.

3.2. Allestimento delle colture

Nel corso della ricerca sono state allestite diverse colture e in diversi tempi, ognuna dedicata a specifici utilizzi. Ciascuna di queste colture è stata realizzata all'interno del laboratorio di Biologia delle Alghe.

Partendo da colture mono-specifiche mantenute in provette, in terreno F2 modificato, sono state allestite colture in beute di quattro microalghe, ovvero i due ceppi A e B di *Thalassiosira* sp., *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis chui* (Fig. 11) in volumi calcolati in base alla specifica necessità. Le beute sono state mantenute all'interno della camera di coltura con illuminazione 90-120 μmol fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ad una temperatura di 20 ± 1 °C, con un ciclo L:D di 16:8h.



Figura 11 – Beute contenenti diverse colture microalgali mono-specifiche e mantenute all'interno della camera di coltura situata nel laboratorio di Biologia delle Alghe

3.2.1. Terreno di coltura

Tutte le microalghe sono state fatte crescere in beute di misura variabile tra i 250 e i 2000 ml con terreno sintetico F2 di Guillard e Ryther (1962), ampiamente impiegato per la crescita di diverse microalghe e diatomee.

La composizione del terreno di coltura F2 è riportata in **tabella 3**.

Tabella 3 - Composizione del terreno di coltura F2

Macronutrienti	[M]
NaNO ₃	8,82 x 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,62 x 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	1,06 x 10 ⁻⁴
Metalli in traccia	[M]
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,17 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1,17 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9,10 x 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7,65 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ · 6H ₂ O	4,20 x 10 ⁻⁸
CuSO ₄ · 5H ₂ O	3,93 x 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2,60 x 10 ⁻⁸
Vitamine	[M]
Tiamina · HCl (vitamina B1)	2,96 x 10 ⁻⁷
Biotina (vitamina H)	2,05 x 10 ⁻⁹
Cianocobalamina (vitamina B12)	3,69 x 10 ⁻¹⁰

3.3. Valutazione della crescita

La crescita di tre microalghe, ovvero i due ceppi A e B di *Thalassiosira* e *Tetraselmis chui*, è stata valutata durante tutto lo studio mediante misura di torbidità o assorbanza (*Abs*) ad una lunghezza d'onda di 750 nm, determinazione del peso secco (DW) e conta cellulare.

3.3.1. Misura della torbidità

La determinazione della torbidità della coltura è avvenuta mediante misurazione spettrofotometrica a doppio raggio (Jasco, V-650). Da ciascuna coltura sono stati prelevati, a giorni alterni, 5 ml di campione e trasferiti in provette di plastica pulite. Prima di effettuare la misurazione spettrofotometrica, ciascun campione è stato agitato delicatamente per favorire omogeneità cellulare. Circa 3 ml di campione

sono stati posti in una cuvetta di vetro con cammino ottico pari ad 1 cm e letture spettrofotometriche sono state effettuate ad una lunghezza d'onda (λ) pari a 750 nm. A partire dalla torbidità di ciascun campione è stata sottratta quella misurata sull'acqua distillata con funzione di bianco.

Le analisi sono state ripetute ogni due giorni per le colture *batch*, al fine di costruire una curva di crescita associata alla torbidità per ciascuna specie microalgale da confrontare poi con le misure di conteggio cellulare.

3.3.2. Valutazione del peso secco

Le misurazioni del peso secco (g L^{-1}) sono state effettuate prelevando un'aliquota di campione dalla coltura madre. La filtrazione è avvenuta su appositi filtri in microfibra di vetro (GF/C Whatman, $\text{Ø} = 47 \text{ mm}$, porosità $1.2 \text{ }\mu\text{m}$). I filtri prima dell'analisi sono stati lavati con acqua distillata, seccati in stufa e disposti all'interno di un foglio in alluminio a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ per almeno 2 ore. Per eseguire le determinazioni del peso secco sono stati posti in navicelle di alluminio numerate per l'identificazione. Trascorso il tempo sono stati chiusi all'interno di un essiccatore per 10 minuti con sali di silice al fine di evitare contatto con aria, sorgente di umidità e pesati con bilancia di precisione per valutarne la tara. Dopo la filtrazione del campione, i filtri contenenti le cellule sono stati lavati con un volume doppio, rispetto al filtrato, di formiato d'ammonio $0,5 \text{ M}$ al fine di eliminare i sali residui del terreno. Sono stati quindi inseriti all'interno dei relativi piattini di alluminio e riposti in stufa per l'asciugatura per un tempo di almeno 60 minuti. Dopo asciugatura sono stati introdotti in essiccatore per 10 minuti e nuovamente pesati su bilancia di precisione per valutarne il peso secco, calcolandolo come differenza tra il peso del filtrato algale e il peso della tara iniziale, in rapporto al volume filtrato. Il risultato è stato ottenuto in g/L dividendo il netto per il volume filtrato.

3.3.3. Conta cellulare

Per ogni campione di coltura *batch* raccolto per la misurazione dell'*Abs*, è stato effettuato anche il conteggio cellulare. Questo, al fine di poter rapportare ad ogni valore di *Abs* un numero di cellule. Il conteggio delle cellule è stato effettuato in rapporto ad uno specifico volume di campione (cell ml^{-1}).

Successivamente a lettura allo spettrofotometro, i campioni sono stati fissati con due gocce di reattivo di Lugol (soluzione fissativa iodio-iodurata) e diluiti con terreno ove necessario (1:10, 1:50 o 1:100). 1 ml di campione è stato quindi prelevato e posto all'interno di una camera di sedimentazione per 30 minuti, prima di effettuare il conteggio. È stato quindi effettuato il conteggio tramite microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con obiettivo 32x, utilizzando il metodo Utermöhl (1958) per lo studio del fitoplancton.

- Conteggio per campi: prevede l'osservazione di circa 20 campi scelti casualmente dall'operatore. Il numero di cellule viene stimato tramite la seguente equazione:

$$C = \left[F \left(\frac{N}{n} \right) \right] V$$

dove:

C = densità cellulare del campione (cell ml⁻¹);

F = fattore ottenuto dal rapporto fra l'area del pozzetto e l'area dell'oculare utilizzato;

N = totale delle cellule contate su ogni campo;

n = numero di campi sui quali si è effettuato il conteggio;

V = volume (ml) del campione sedimentato.

- Conteggio per transetti: prevede l'osservazione di tutte le cellule presenti in un transetto di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione e di larghezza pari all'ampiezza dell'oculare. Il numero di transetti varia in base alla densità cellulare e generalmente il numero minimo è due. Il numero di cellule viene stimato utilizzando la stessa equazione usata per la stima secondo campi casuali, dove N è pari al numero totale di cellule contate su tutti i transetti, n è pari al numero di transetti sui quali si è effettuato il conteggio e, infine, il fattore F si ottiene mediante rapporto tra l'area del pozzetto e l'area del transetto.

In caso di diluizione del campione, il valore ottenuto è stato moltiplicato per il corretto fattore di diluizione. Il risultato finale è espresso in cell ml⁻¹.

3.3.3.1. Tasso di crescita specifico

Dai dati di conta cellulare è stato ottenuto il tasso di crescita specifico o *specific growth rate* (μ) espresso come day^{-1} . Il tasso di crescita specifico si ottiene applicando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln(N_1) - \ln(N_2)}{(t_1 - t_0)}$$

dove N_0 e N_1 indicano il numero di cellule rispettivamente al tempo t_0 e t_1 . L'intervallo di tempo considerato è espresso in giorni.

Il tasso di crescita specifico è stato calcolato considerando un lasso di tempo all'interno della fase esponenziale, lungo la curva di crescita dell'alga.

3.4. Caratterizzazione biochimica

Per tre specie microalgali è stata effettuata la caratterizzazione della composizione biochimica cellulare, nello specifico per i due ceppi di *Thalassiosira* e per *Tetraselmis chui*. A tal fine, sono stati raccolti rispettivamente 1,5 L di coltura in due diverse fasi, esponenziale e stazionaria, successivamente sottoposti a centrifuga per sedimentare le cellule (Beckerman Coulter, modello Avanti J-26S XP): i due ceppi di *Thalassiosira* sono stati centrifugati a 7000 rpm per 20 minuti a 8 °C mentre *Tetraselmis chui* a 6000 rpm per 15 minuti sempre a 8 °C. La biomassa ottenuta è stata poi congelata e liofilizzata.

3.4.1. Estrazione e determinazione della frazione proteica

L'estrazione della frazione proteica è stata eseguita applicando il metodo di Lowry (1951), il quale si basa su una reazione colorimetrica data dal reattivo di Folin Ciocalteu (costituito principalmente da fosfomolibdato, fosfotungstato e sali rameici) con gli amminoacidi che contengono anelli aromatici.

È stata pesata un'aliquota di campione liofilizzato di circa 10 mg, ponendo ognuna in distinte provette da 15 ml alle quali sono stati aggiunti 3 ml di NaOH (0,5 M). Successivamente è stata favorita la sospensione agitando i campioni su vortex in modo tale da agevolare la rottura cellulare. I campioni sono stati incubati a 90°C per 8 minuti e fatti raffreddare in ghiaccio per 2 minuti. Dopo il raffreddamento i campioni sono stati centrifugati a 2550 rpm per 10 minuti a 4°C.

Il sovranatante è stato prelevato e raccolto all'interno di provette da 15 ml, mantenute in ghiaccio. L'operazione è stata ripetuta altre 3 volte per ottimizzare l'estrazione. Gli estratti sono stati tenuti al buio e in ghiaccio a 4°C per evitare la degradazione della componente proteica. Ogni campione è stato portato ad un volume pari a 10 ml mediante aggiunta di NaOH (0,5 M).

Sono state successivamente preparate 3 soluzioni:

	Soluzione 1	Soluzione 2	Soluzione 3
NaOH (0,5 M)	5 g di Na ₂ CO ₃ in 50ml di NaOH 0.5 M	0,5 g di NaK tartrato in 50 ml di H ₂ O	50 mg di CuSO ₄ in 10 ml di "soluzione 2"

Subito prima dell'analisi sono state preparate:

Soluzione alcalina di Rame	Reagente Folin diluito
10 ml di soluzione 1 con 1 ml di soluzione 3	3 ml di reattivo di Folin con 27 ml di acqua distillata

In tubi di vetro è stata inserita una aliquota di ciascun campione (diluito opportunamente con acqua) fino a un volume finale di 1 ml; a questo è stato aggiunto 1 ml di soluzione alcalina di Rame. Dopo agitazione su vortex ed un tempo di 10 minuti di reazione sono stati aggiunti, negli stessi, 3 ml di reagente di Folin. I campioni sono stati analizzati in triplicato. Dopo 30 minuti di incubazione sono state effettuate le misurazioni spettrofotometriche ad una lunghezza d'onda di 750 nm. La curva di calibrazione usata come riferimento è stata ottenuta mediante uno standard di albumina sierica bovina (BSA). Uno stock di BSA (1 mg/mL) è stato opportunamente diluito (1:2) in modo da avere una concentrazione massima di 500 mg/L (ppm) e, di seguito, concentrazioni inferiori.

3.4.2. Estrazione e determinazione della frazione polisaccaridica

Per l'estrazione dei polisaccaridi cellulari è stato utilizzato il metodo di Myklestad (1792).

10 mg di campione in forma liofilizzata sono stati posti all'interno di provette di plastica provviste di tappo e sono stati incubati con 1 ml di H₂SO₄ (12 M) a 37°C per 60 minuti. Successivamente, ogni campione è stato portato ad un volume totale di 11 ml tramite l'aggiunta di acqua distillata; i campioni sono stati poi agitati su vortex per 30 secondi e posti ad incubare in bagno termostatico a 100 °C per 120 minuti. Sono poi stati posti in ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C, per separare il sovrnatante contenente i polisaccaridi estratti dai residui cellulari rimasti nel pellet. Sul sovrnatante è stata poi effettuata la caratterizzazione.

Il metodo si basa su una reazione colorimetrica data da fenolo e acido solforico la cui intensità nella colorazione gialla viene messa in relazione lineare con la quantità di polisaccaridi attraverso analisi spettrofotometrica. Tale metodo è stato descritto da Dubois e collaboratori (1956) ed è stato applicato al surnatante. Sono stati prelevati 0,1 ml di sovrnatante ponendolo all'interno di tubi di vetro. Sono state effettuate 3 repliche analitiche per ciascun campione. Nei tubi di vetro sono stati aggiunti 1 ml di soluzione di fenolo al 2,5% e 2,5 ml di H₂SO₄ al 96%. Successivamente ad incubazione di 30 minuti è stata effettuata una misurazione spettrofotometrica. La lettura di assorbanza è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 490 nm. La concentrazione dei polisaccaridi nel campione è stata ricavata sulla base di una curva di calibrazione precedentemente costruita con uno standard di glucosio, dove una soluzione stock di glucosio (5000 mg/L) è stata opportunamente diluita (1:2) in modo da avere una concentrazione massima di 2500 mg/L (ppm) e successive concentrazioni inferiori.

3.4.3. Estrazione e determinazione della frazione lipidica

L'estrazione della frazione lipidica è stata effettuata applicando il metodo di Bligh e Dyer (1959) seppur con qualche modifica.

Un'aliquota di 50 mg di biomassa algale liofilizzata è stata posta in vials di vetro pyrex. Sono stati aggiunti ai campioni 3 ml di una miscela 2:1 composta rispettivamente da diclorometano (DCM) e metanolo (MeOH). Successivamente i campioni sono stati posti in un bagno termostatico ad acqua, ad una temperatura di 60°C per 90 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare per qualche minuto, i campioni hanno subito centrifugazione al fine di separare la frazione lipidica e la biomassa algale. Il sovrnatante è stato raccolto in vials di vetro

precedentemente pesati. Tale procedura è stata ripetuta altre 2 volte. Ogni volta è stato recuperato il surnatante, che è stato seccato sotto flusso di azoto (N₂) in vials di vetro; al termine dell'estrazione è stato pesato il vial contenente tutto l'estratto lipidico. La quantità di lipidi è stata calcolata per differenza tra il peso del vial finale e la tara iniziale, e la concentrazione dei lipidi è stata determinata in rapporto percentuale al peso secco del campione.

3.4.3.1. Determinazione degli acidi grassi totali

Dai campioni estratti e seccati sotto N₂ è stata prelevata un'aliquota di circa 2-4 mg e posta poi in vials di vetro. Sono stati quindi aggiunti 0,4 ml di dimetil carbonato (DMC), 0,1 ml di 2,2-dimetossipropano e 0,1 ml di metossido di sodio. Il campione è stato poi agitato e posto ad una temperatura di 70°C per 30 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 0,7 ml di boro trifluoruro-metanolo (MeOH-BF₃), 20 µl di uno standard interno (C19, metil nonadecanoato), 1 ml di esano e 2 ml di una soluzione satura di NaCl; in seguito a ciò, i campioni sono stati nuovamente agitati e posti su piastra ad una temperatura di 70°C per 30 minuti. Una volta raffreddati, i campioni mostrano una separazione liquido/liquido in cui la frazione lipidica estratta in solvente organico risulta occupare la porzione superiore della vials, che è stata quindi prelevata e trasferita in vials pulite idonee all'analisi con gascromatografia accoppiata a spettrofotometria di massa (GC-MS). Il cromatogramma ottenuto presenta le concentrazioni di acidi grassi calcolate in relazione all'area del picco dello standard interno inserito a concentrazione nota nei campioni ed il valore finale è stato convertito ed espresso in percentuale su peso secco dell'estratto lipidico.

3.5. Prove di *feeding* su *Ruditapes philippinarum*

Un'altra parte dello studio ha riguardato l'allestimento di esperimenti di *feeding* sulla vongola verace filippina, con lo scopo di fornire diverse microalghe come diete per l'allevamento di larve e seme di *R. philippinarum*. I test sulle larve si sono svolti interamente presso l'azienda Naturedulis Srl (Goro, FE) durante tutto il mese di settembre e parte del mese di ottobre 2020, mentre le prove sul seme sono state effettuate presso il Laboratorio di Biologia delle Alghe presso l'Università di Bologna – Campus di Ravenna (RA) durante i mesi di novembre,

dicembre 2020 e gennaio 2021. In entrambi i casi, i molluschi sono stati gentilmente forniti dall'azienda Naturedulis Srl, così come parte del materiale utilizzato.

3.5.1. *Ruditapes philippinarum*

Le larve di *R. philippinarum* utilizzate per questo studio sono state ottenute da *spawning* avvenuto in data 22.09.20 presso lo schiuditoio di Naturedulis Srl. Le larve sono organismi di dimensioni variabili tra 0,07 e 0,3 mm che allo stadio iniziale detto stadio D (**Fig. 12a e b**), successivo alla larva trocofora, possiedono due valve, un apparato digerente sviluppato e un organo ciliato chiamato *velum*, di forma circolare, che sporge tra le valve. Il *velum* consente alla larva di nuotare lungo la della colonna d'acqua e raccogliere il fitoplancton.

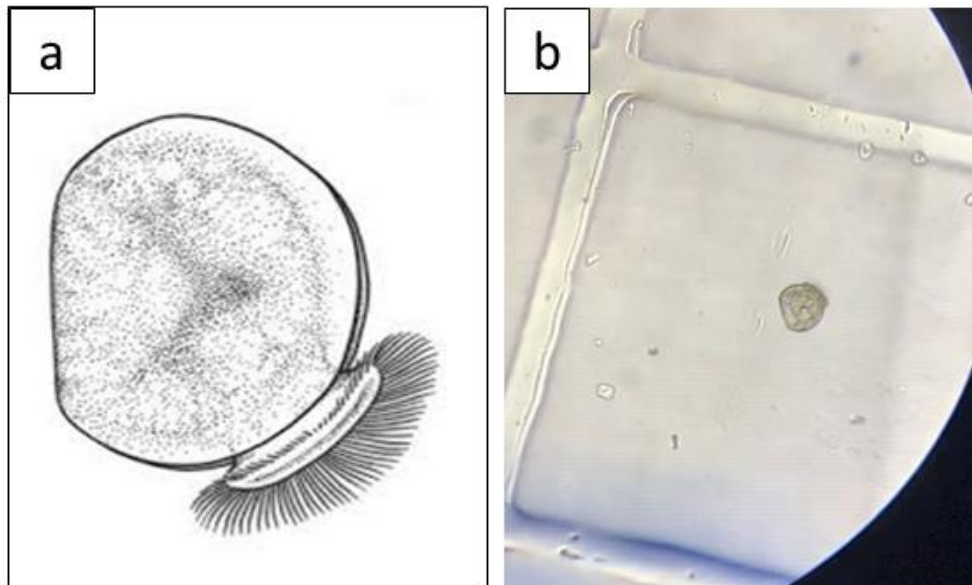


Figura 12 –Illustrazione (a) e fotografia al microscopio ottico (b) di larva di *R. philippinarum*. In entrambe le immagini si può notare il *velum* ciliato e la caratteristica forma a D

In poco più di due settimane il *velum* si ritira, le larve si avvicinano alla maturità e si sviluppano il piede e le branchie che diventano evidenti; a questo punto smettono di nuotare e si depositano sul fondo. Il piede presenta ciglia e numerosi recettori sensoriali, che le larve utilizzeranno per spostarsi strisciando sul substrato. All'interno del piede si trova la ghiandola del bisso la quale produce un filamento che attacca temporaneamente l'animale al substrato. La ricerca di un substrato adatto all'insediamento comincia quando le larve raggiungono una misura tra i 220 e i 240 μm : una volta trovato, comincia la metamorfosi. La

metamorfosi è un momento critico nello sviluppo dei bivalvi, durante il quale l'animale passa dall'essere planctonico all'essere bentonico, ed è la fase in cui si registrano i più alti tassi di mortalità (Helm et al., 2004).

La taglia massima del seme, stabilita dal Decreto 7 agosto 1995, è pari a 15 mm. Le taglie piccolo, medio e grande corrispondono circa ad esemplari di lunghezza di 5, 10 e 15 mm. Durante i test di *feeding* su novellame, sono state selezionate vongole di misura inferiore ai 3000 μm , selezionate mediante l'uso di un setaccio. In **figura 13**, il ciclo vitale della specie *R. philippinarum*.

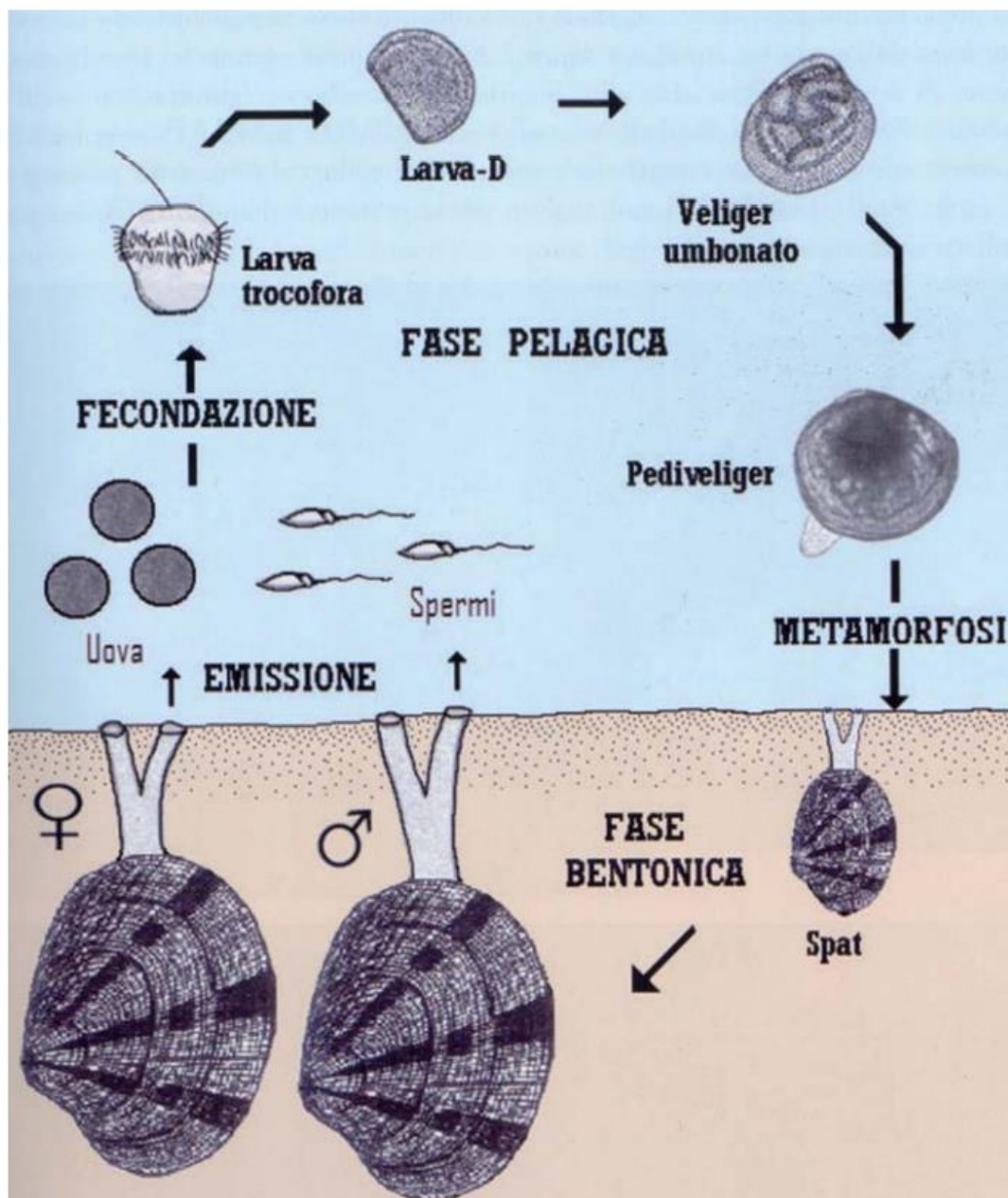


Figura 13 - Ciclo vitale di *Ruditapes philippinarum*

3.5.2. Feeding larvale

Per valutare il possibile utilizzo di diete plurispecifiche nella molluschicoltura di larve di *R. philippinarum*, è stata osservata la sopravvivenza delle stesse dopo un periodo di 15 giorni in cui venivano regolarmente somministrate le diete, adottando il seguente disegno sperimentale (Fig. 14):

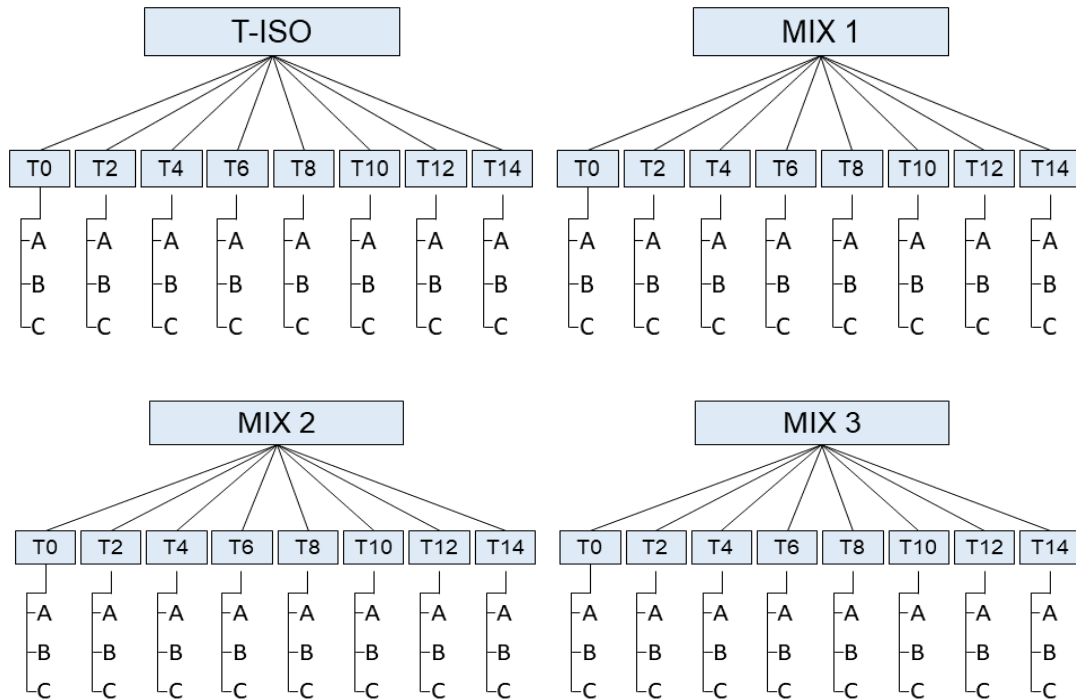


Figura 14 – Disegno sperimentale adottato per il *feeding* larvale. Le immagini sono state separate per ragioni spaziali ma si tratta di un unico disegno.

Il trattamento (fattore fisso), ovvero le diete plurispecifiche, sono state confrontate con un controllo, ovvero una dieta monospecifica a base di T-Iso. Il tempo è invece un fattore random nel disegno sperimentale.

In un primo periodo sono stati effettuati alcuni test per riuscire a standardizzare l'intero esperimento e soprattutto per capire quali fossero le migliori condizioni per la crescita e nutrizione delle larve. Sono state escluse specifiche microalghe che fin da principio non hanno mostrato buoni risultati per il *feeding* larvale, come ad esempio *P. tricornutum*, poiché larve nutrite con diete mono o plurispecifiche a base di quest'alga morivano dopo al massimo quattro giorni.

L'esperimento vero e proprio si è quindi concretizzato come segue:

alle larve sono state fornite tre diverse tipologie di dieta plurispecifica, basata su due diverse microalghe: T-Iso e il ceppo A di *Thalassiosira* sp., con una densità cellulare di 100.000 cell ml⁻¹, da rapportare poi a ciascun mix (**Tab. 4**).

Tabella 4 – Diete mono e plurispecifiche adottate per l'esperimento di *feeding* larvale. In tabella sono anche indicate le percentuali di ciascun mix.

Controllo -	Controllo	Mix 1	Mix 2	Mix 3
/	T-Iso	75% T-Iso 25% T. sp.	50% T-Iso 50% T. sp.	25% T-Iso 75% T. sp.

Il gruppo di controllo è stato alimentato con T-Iso mentre un secondo gruppo di larve non è stato alimentato, fungendo così da controllo negativo (**Fig. 15**).

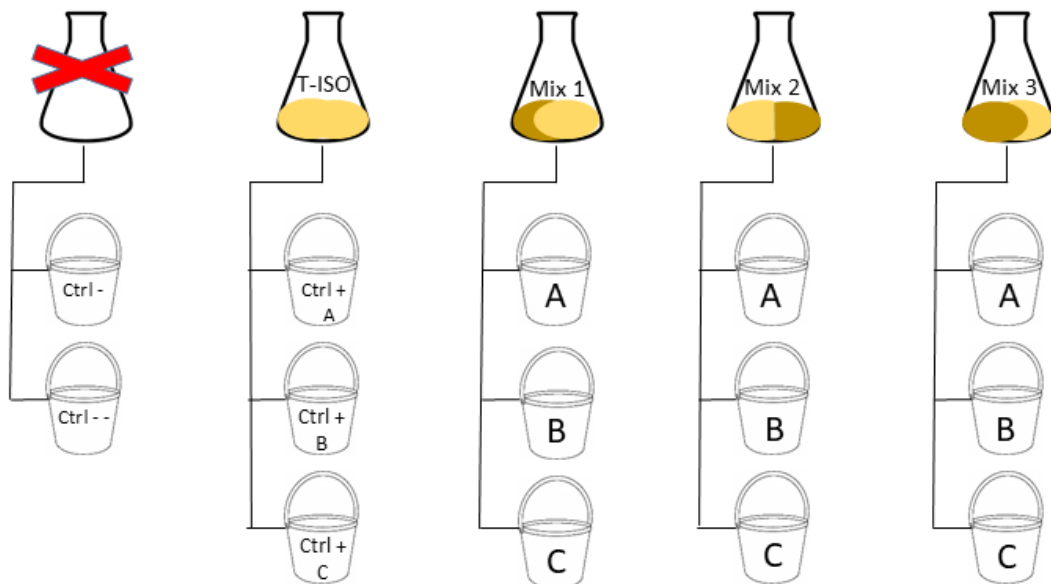


Figura 15 – Schema esplicativo del test di *feeding* su larve di vongola verace filippina alimentate con tre mix che presentano diverse percentuali di due specie microalgali

Il controllo negativo è servito per il confronto con i Mix 2 e 3, i quali risultavano essere i più critici: era quindi necessario assicurarsi che, fornire alle larve queste due tipologie di dieta, non equivalesse a non fornire cibo.

Sono stati utilizzati secchielli in PVC trasparente (**Fig. 16a**) di volume di 1 L, riempiti con acqua prelevata dalla Sacca di Goro e preventivamente filtrata a 1 µm e sterilizzata con UV presso Naturedulis Srl, con una densità larvale iniziale di circa 20 larve ml⁻¹ per ciascun secchiello, ad una temperatura di 18±1°C. All'interno di ogni secchiello è stato inoltre posizionato un aeratore per favorire il

continuo movimento del mezzo e delle larve al suo interno. Al termine di ciascun giorno di analisi, i secchielli venivano coperti con un telo ombreggiante per evitare un'eccessiva illuminazione dovuta anche alla vicinanza con i fotobioreattori presenti all'interno dello schiuditoio. Le alghe utilizzate sono state dapprima coltivate presso il Laboratorio di Biologia delle Alghe e successivamente trasportate e mantenute all'interno della camera di coltura dell'azienda Naturedulis Srl (**Fig. 16b**).

A giorni alterni, per 14 giorni, è stato prelevato 1 ml da ciascun contenitore ed effettuato il conteggio in triplicato delle larve allo stereomicroscopio (Labcenter Exacta+Optech, LFZ), mediante l'utilizzo di camere di conta Sedgewick Rafter³. È stata inoltre cambiata l'acqua utilizzando dei setacci, appositamente costruiti per tale scopo (di seguito chiamati "tamisetti"), con rete a maglie di 30 μm (**Fig. 16c**) ed è stato fornito cibo fresco agli animali.

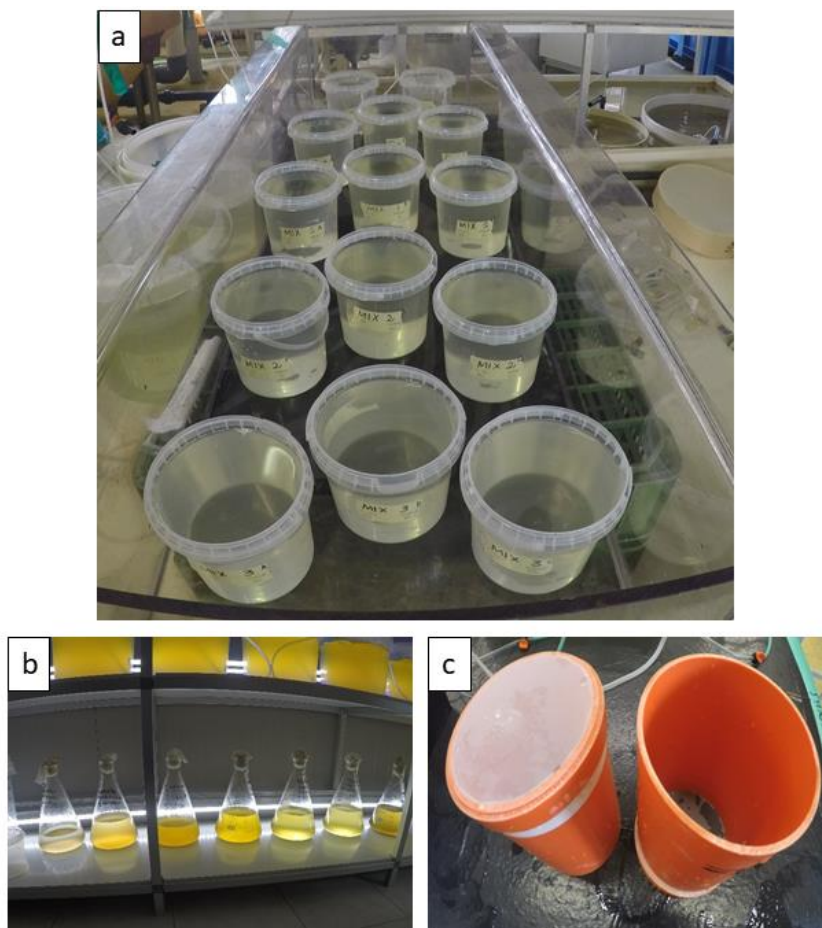


Figura 16 - (a) Camera di coltura presso Naturedulis Srl; (b) tamisetti utilizzati durante l'esperimento; (c) allestimento dei contenitori

³Camere di conta Sedgewick Rafter: la cella della camera di conta misura 50 x 20 mm (= 1 cm³) ed al suo interno si ritrova una griglia di 1 mm che suddivide 1 ml in 1000 μl .

Al termine dei 14 giorni sono stati raccolti alcuni campioni da ciascun contenitore e osservati al microscopio ottico: un numero variabile di larve aveva raggiunto lo stadio di *pediveliger* (**Fig. 17a**) e una taglia prossima alla metamorfosi. Sono stati quindi raccolti, con l'aiuto di un tamisetto con rete a maglie larghe 100 μm , 20 ml di acqua contenente le larve che avevano raggiunto una taglia maggiore di 100 μm . I campioni sono stati fissati con alcool etilico e analizzati in laboratorio. Delle vongole contenute in ciascun campione è stata misurata altezza (dorso-ventrale) e larghezza (antero-posteriore) delle valve (**Fig. 17b**) mediante osservazione al microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con obiettivo 32x.

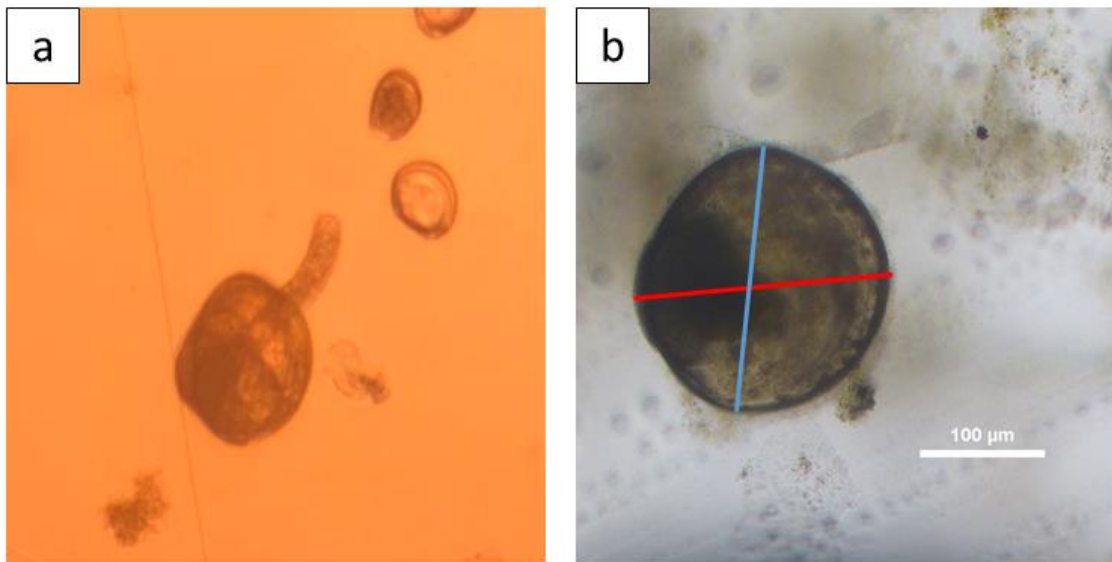


Figura 17 – (a): fotografia di vongola verace filippina al termine dei 14 giorni: il *velum* è stato riassorbito e si ha la comparsa del piede; (b) fotografia di vongola verace filippina contenuta all'interno di uno dei campioni analizzati, ripresa con microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con obiettivo 32x. La linea rossa indica la modalità di misura dell'altezza mentre la linea blu indica la larghezza.

3.6. Efficienza di alimentazione di novellame

Il secondo test di *feeding* è stato svolto su organismi di *R. philippinarum* di taglia inferiore ai 3000 μm . Le vongole sono state lasciate acclimatare in laboratorio e mantenute a digiuno per 24 h, prima dell'esperimento.

L'esperimento è stato allestito come mostrato in **figura 18**.

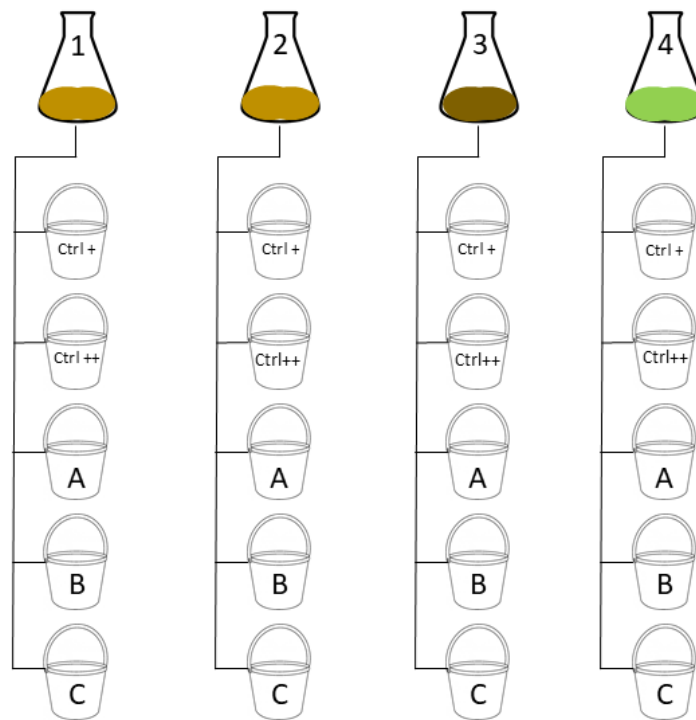


Figura 18 – Schema esplicativo del test di *feeding* su novellame di vongola verace filippina. Beuta 1: *Thalassiosira* A; beuta 2: *Thalassiosira* B; beuta 3: *Phaeodactylum tricornutum*; beuta 4: *Tetraselmis chui*.

Durante la fase preliminare sono stati pesati 10 g di vongole sgocciolate e adagiate su piattini in alluminio con dei piccoli fori alla base; i piattini sono poi stati posizionati sulla superficie di una rete a maglie larghe 3 mm posizionata poi all'interno del contenitore. Questo al fine di poter permettere il movimento di uno stirring magnetico posizionato sul fondo di ciascun contenitore, volto a favorire il continuo movimento del mezzo, il ricircolo dei gas e soprattutto per evitare la sedimentazione di alcune alghe tendenti a sedimentare quali *P. tricornutum*. Le vongole sono state quindi inserite in tre diversi contenitori (repliche: A, B e C), mentre in due contenitori non sono state aggiunte le vongole, fungendo così da controllo. È stata aggiunta acqua di mare filtrata (FSW) ad una salinità di 25 psu e le vongole sono state lasciate acclimatare per 15 minuti, così da permettere l'apertura delle valve e l'estroffessione dei sifoni. Trascorso questo

tempo è stata quindi fornita coltura algale monospecifica ad una densità iniziale di 50.000 cell ml⁻¹, definita successivamente a prove preliminari. È importante definire la giusta densità iniziale al fine di evitare un eccesso di cibo somministrato e quindi la formazione di pseudofeci⁴. L'esperimento è stato ripetuto due volte: la prima, utilizzando le colture algali in fase esponenziale mentre la seconda utilizzando colture in fase stazionaria. I volumi di coltura somministrati sono riassunti in **tabella 5**. In **figura 19**, una fotografia dell'esperimento interamente allestito.

Tabella 5 - Volumi di coltura somministrati durante l'esperimento, nelle due diverse fasi

Fase	<i>Thalassiosira A</i>	<i>Thalassiosira B</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Tetraselmis chui</i>
Esponenziale	30 ml	75 ml	20 ml	35 ml
Stazionaria	15 ml	50 ml	15 ml	25 ml

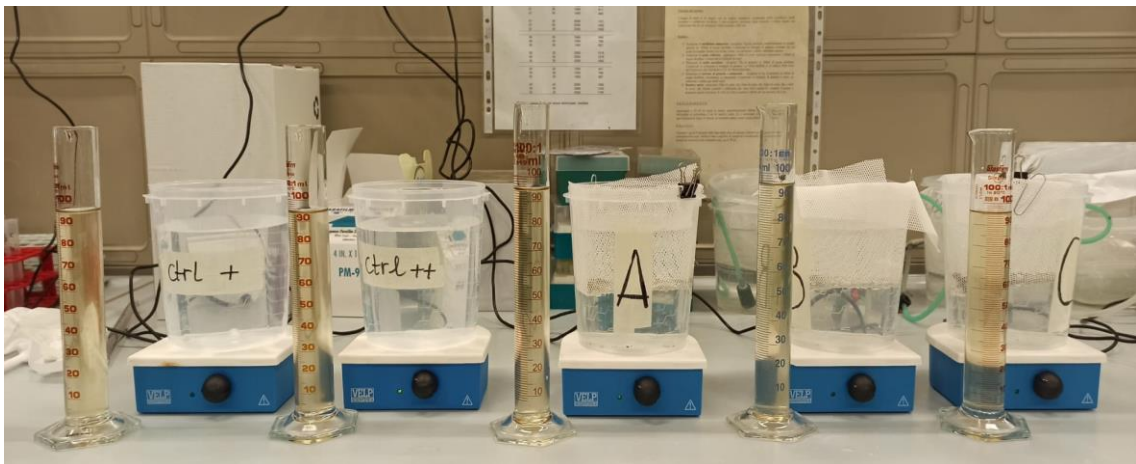


Figura 19 - Allestimento del test di *feeding* su seme di vongola verace filippina. All'interno dei cilindri è contenuto il volume di coltura algale da somministrare

3.6.1. Tasso di *clearance*

Il tasso di *clearance* (CR) è definito come il volume di acqua dal quale vengono sottratte le particelle sospese per ora (Widdows et al., 2006).

Utilizzando un sistema chiuso, il CR è stato calcolato mediante misura del decremento esponenziale della concentrazione di cellule all'interno del

⁴ Pseudofeci: false feci, materiale di scarto non assimilato dal tratto digestivo (Helm et al., 2004).

contenitore, ogni 20 minuti per un periodo di 2 h. La diminuzione della concentrazione cellulare è il risultato della filtrazione dei bivalvi.

Trascorso un tempo di 5 minuti dalla somministrazione di concentrato algale, sono state prelevate tre repliche di 5 ml di campione da ciascun contenitore (A, B e C) e una sola replica da ciascuno dei due contenitori adibiti come controllo (Ctrl+ e Ctrl++).

Ad ogni prelievo i campioni sono stati tempestivamente analizzati allo spettrofotometro ($\lambda=750$ nm) registrando l'assorbanza per ciascun campione in ciascun intervallo di tempo. Le concentrazioni cellulari, espresse come media di tre conteggi, sono state calcolate utilizzando le rispettive curve di correlazione lineare tra assorbanza e numero di cellule precedentemente elaborate.

Il CR è stato calcolato utilizzando la seguente equazione (Coughlan, 1969):

$$CR (L h^{-1}) = \frac{(Vol) \times (\log_e C_1 - \log_e C_2)}{\text{intervallo di tempo in h}}$$

dove Vol indica il volume totale (1 L) e C_1 e C_2 sono le concentrazioni cellulari all'inizio e alla fine di ogni intervallo di tempo (20 min o 0,33 h). Successivamente ad ogni esperimento di CR, è stato rimosso lo stirring magnetico da ciascun contenitore adibito al trattamento (A, B e C) ed è stato sostituito con un aeratore.

Per valutare il tasso di *clearance* è stato adottato il disegno sperimentale mostrato in **figura 20**. La fase di crescita delle microalghe è un fattore fisso, ciascun "T" indicato nell'immagine corrisponde ad un intervallo di tempo di 40 minuti: il tempo è un fattore random; fattore "microalga" è invece un fattore fisso. Ogni prova prevedeva l'allestimento di tre repliche.

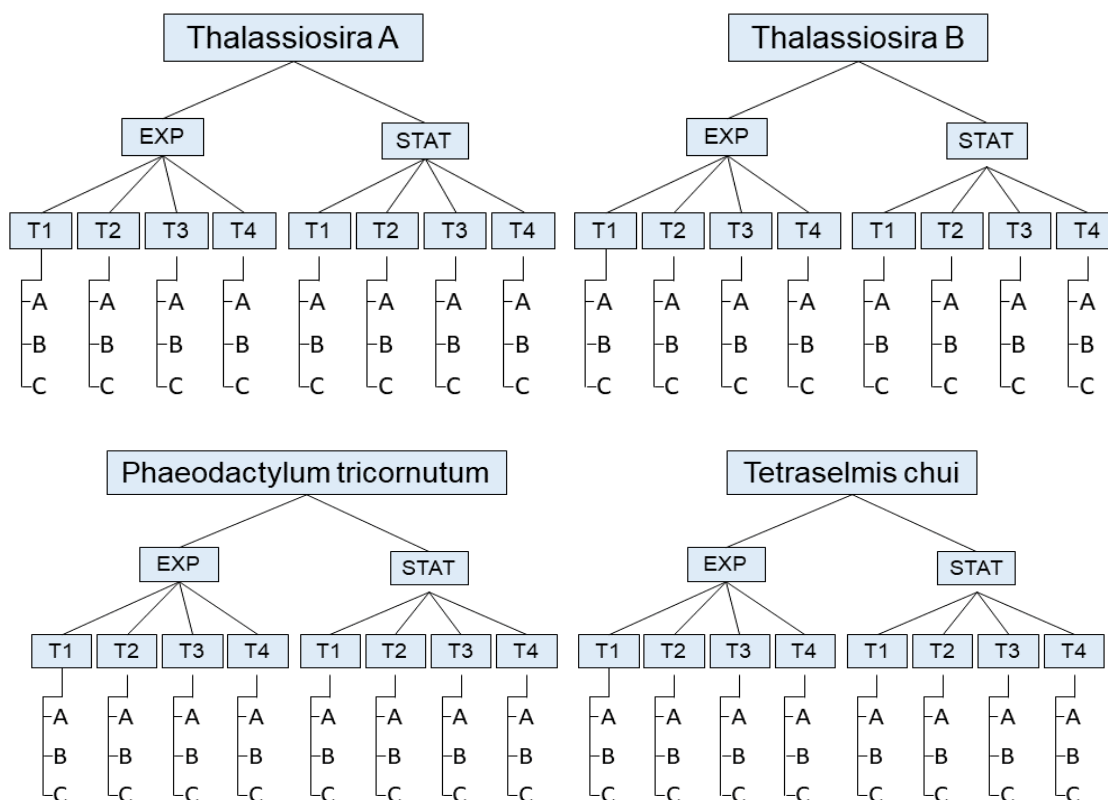


Figura 20 – Disegno sperimentale adottato per il calcolo del tasso di *clearance* misurato durante il *feeding* di novellame. Le sigle “exp” e “stat” indicano le due fasi di crescita esponenziale e stazionaria, rispettivamente.

3.6.2. Efficienza di assorbimento del cibo

L'efficienza di assorbimento del cibo (AE) è stata misurata basandosi sul metodo di Conover (1966). Questo indice rappresenta l'efficienza con la quale il materiale organico viene assorbito dal cibo ingerito.

$$AE = \frac{(F - E)}{[(1 - E)F]} \times 100$$

Dove:

- $F = \frac{\text{peso secco del cibo} - \text{peso delle ceneri}}{\text{peso secco del cibo}}$
- $E = \frac{\text{peso secco delle feci} - \text{peso delle ceneri}}{\text{peso secco delle feci}}$

Il peso secco della biomassa algale è stato realizzato utilizzando il metodo sopradescritto (paragrafo 3.4.2.) con un'eccezione: i filtri sono stati prima seccati

in stufa, a 105 °C per 2 ore e successivamente seccati in muffola, per 1 ora a 450 °C. Questo è stato fatto sia prima che dopo la raccolta di biomassa. Il volume di coltura filtrato è il medesimo della coltura fornita alle vongole durante ciascun esperimento.

Il giorno successivo sono stati rimossi da ciascun contenitore gli aeratori e gli animali. L'acqua contenente le feci è stata filtrata su filtri GF/C Whatman, Ø = 47 mm con porosità 1.2 µm e i campioni sono stati seccati in stufa prima e muffola poi.

Ogni filtro è stato poi accuratamente pesato con bilancia di precisione consentendo l'ottenimento dei dati di DW e ceneri (AW) e il relativo calcolo di AE. L'efficienza di assorbimento del cibo è stata valutata tra le alghe, ovvero le diete somministrate, nelle due diverse fasi, adottando un semplice disegno ortogonale con due fattori fissi, il primo (microalghe) con quattro livelli e il secondo (fase) con due livelli, come mostrato in **figura 21**.

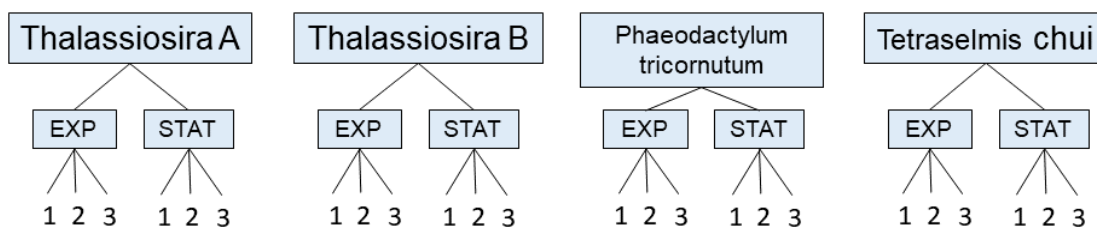


Figura 21 - Disegno sperimentale adottato per il calcolo dell'efficienza dell'assorbimento del cibo. Le sigle exp e stat indicano le due fasi di crescita, esponenziale e stazionaria rispettivamente.

3.7. Analisi dati

Tutti i dati sono stati analizzati per omogeneità della varianza utilizzando test di Cochran. I dati inerenti il *feeding* larvale presentavano omogeneità della varianza e sono stati quindi analizzati tramite Anova a due vie con dieta (trattamento) e tempo come fattori e dieta x tempo come interazione. Laddove sono state trovate differenze per $p < 0,05$, è stato utilizzato SNK test come post hoc, al fine di individuare le differenze osservate. I dati che non soddisfacevano i presupposti di cui sopra sono stati analizzati separatamente per ciascun fattore: l'omogeneità della varianza è stata analizzata con test di Levene e per i dati che soddisfacevano il requisito si è proceduto mediante test Anova ad una via con livello di significatività pari al 95% ($\alpha=0,05$) mentre per quei dati che non

soddisfacevano tale requisito si è ricorso al test non parametrico ad una via di Kruskal-Wallis. Quando sono state trovate differenze ($p < 0,05$), è stato utilizzato test post hoc di Dunn per determinare l'origine delle differenze osservate.

I software utilizzati per l'analisi statistica sono R (R Core Team, 2020) versione 4.0.3 mediante l'utilizzo del pacchetto GAD (Sandrini-Neto et al., 2020), e PAST 3.0 (Hammer et al., 2001). Microsoft Excel® è stato utilizzato per la realizzazione dei grafici.

4. Risultati e Discussione

4.1. Crescita e composizione delle microalghe rilevanti nell'allevamento dei bivalvi

Lo scopo centrale di questa tesi era quello di verificare l'idoneità di una nuova dieta da utilizzare per i primi stadi di sviluppo della vongola *R. philippinarum* in schiuditoio. Gli esperimenti iniziali hanno pertanto riguardato la caratterizzazione delle specie algali da utilizzare. La crescita di due ceppi, A e B, di *Thalassiosira* e quella di *Tetraselmis chui* è stata seguita fino alla fase stazionaria ed è stata valutata mediante misure di torbidità, peso secco e conta cellulare. Le curve ottenute per ciascun parametro d'analisi sono mostrate in **figura 22**.

4.1.1. Valutazione della crescita

La misura della torbidità è stata utilizzata per valutare la corrispondenza tra una misura rapida, come appunto la torbidità, e il numero di cellule per poi poterla utilizzare in seguito come "proxy" dell'abbondanza cellulare. Tale correlazione è risultata essere buona, con un valore di R^2 pari a 0,94, 0,99 e 0,96 per i due ceppi di *Thalassiosira* A e B e *Tetraselmis chui*, rispettivamente.

Osservando i grafici in **figura 22b e c**, relativi alla misura di biomassa come peso secco e al numero di cellule, si evidenzia una rapida crescita di *Thalassiosira* A che in fase stazionaria raggiunge un valore di peso secco 3-4 volte superiore a quello delle altre due specie, le quali si mantengono, su valori piuttosto simili.

Il tasso di crescita specifico calcolato per le tre microalghe è risultato essere 0,208, 0,220 e 0,155 day⁻¹, rispettivamente per i due ceppi A e B di *Thalassiosira* sp. e per *T. chui*, rispecchiando l'andamento generale di crescita.

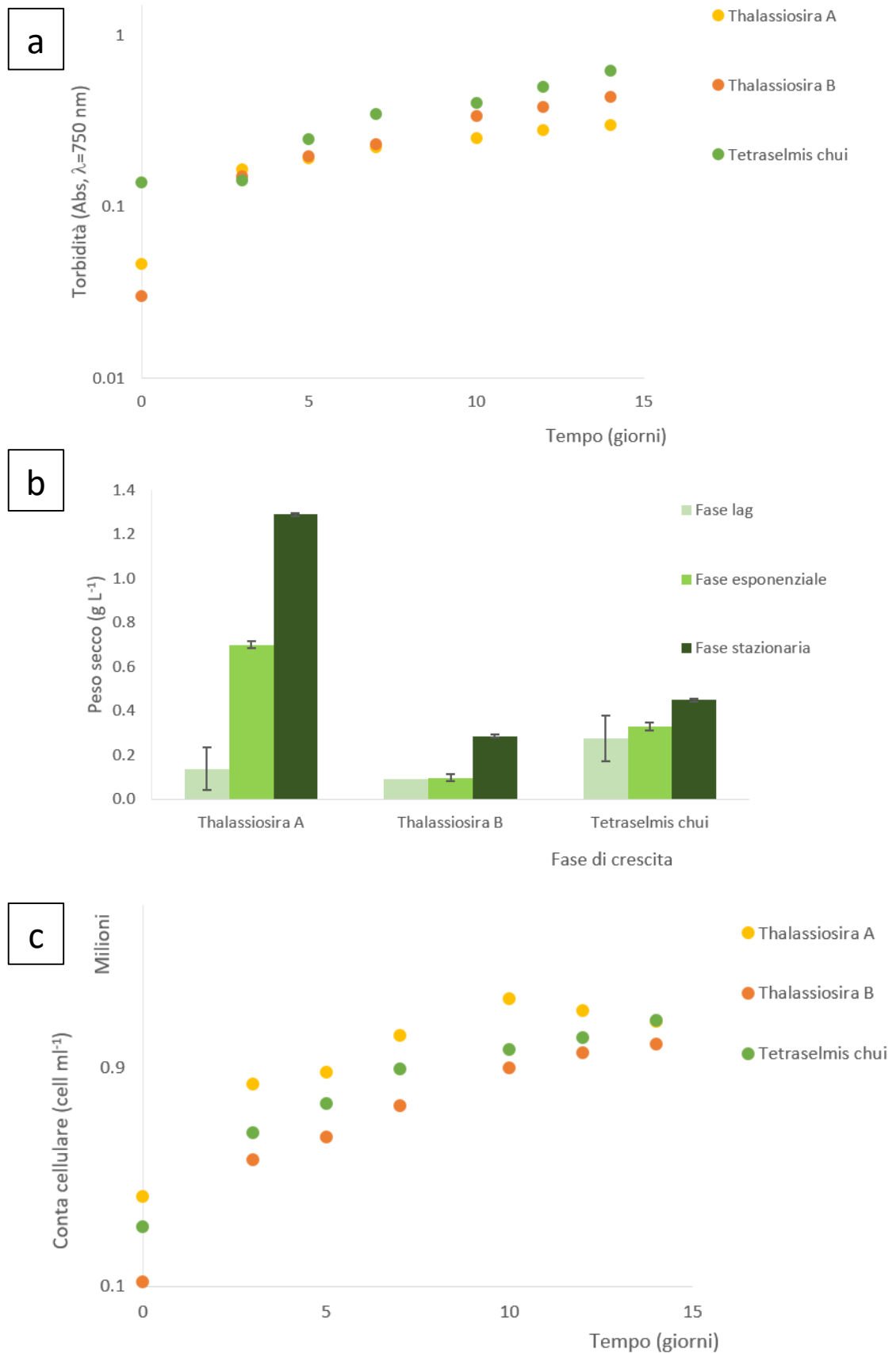


Figura 22 – Valutazione della crescita effettuata mediante torbidità (Abs) (a), peso secco (b) e conta cellulare (c), delle tre microalghe utilizzate. Le curve di torbidità e conta cellulare sono mostrate in scala logaritmica

4.1.2. Composizione biochimica

In **tabella 6** è riportata la composizione biochimica cellulare delle tre microalghe sottoposte ad analisi, valutata in termini di quantità percentuale su peso secco dell'alga (wt%) dei componenti cellulari principali: polisaccaridi, lipidi, separati nella componente degli acidi grassi, e proteine; la tabella è comprensiva di dati su altre due microalghe solitamente usate in acquacoltura: la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* e l'aptofita *Isochrysis galbana* (denominata T-Iso) ottenuti da studi precedenti del laboratorio. Il valore del contenuto di acidi grassi si riferisce alla percentuale su estratto lipidico.

Tabella 6 - Composizione biochimica cellulare (wt%) delle microalghe utilizzate durante lo studio. I dati di *Phaeodactylum tricornutum* e T-Iso sono stati rielaborati da precedenti tesi e analisi effettuate presso il Laboratorio di Biologia delle Alghe

Microalga	Fase	Polisaccaridi	Lipidi	Acidi grassi	Proteine
<i>Thalassiosira A</i>	Exp	42 ± 7,55	21	15	20 ± 0,24
	Stat	34 ± 0,71	19	18	19 ± 0,41
<i>Thalassiosira B</i>	Exp	38 ± 4,62	25	18	27 ± 0,92
	Stat	49 ± 10,79	26	19	27 ± 0,08
<i>T. chui</i>	Exp	42 ± 7,55	20	25	26 ± 0,41
	Stat	43 ± 2,08	17	24	26 ± 0,08
<i>P. tricornutum</i>	Exp	7±1	26	28	42±8
	Stat	10±2,33	26	9	42±0,44
T-Iso	Exp	24±6	27	19	44±8,61
	Stat	31±13	43	15	36±11,64

In **figura 23** le percentuali (wt%) dei diversi composti biochimici cellulari sono riportate in forma di grafico in modo da evidenziare la differenza nelle due diverse fasi di crescita, esponenziale e stazionaria, per le tre principali microalghe trattate in questo studio: come si evince per ciascuna microalga, le varie componenti proteiche, lipidiche e polisaccaridiche, non mostrano grande variabilità tra le due fasi di crescita: per il ceppo A di *Thalassiosira* la quota proteica differisce solo di 1% tra le due fasi di crescita, mentre risulta identica in *Thalassiosira* ceppo B (27% sia in fase esponenziale che stazionaria); anche per *T. chui*, la quota proteica rimane identica tra le due fasi (26%). Nel caso dei lipidi la quota differisce di una percentuale minima tra le due fasi di crescita: per *Thalassiosira* A il contenuto lipidico risulta essere 21% in fase esponenziale e 19% in fase stazionaria, mentre in *Thalassiosira* B si ha una differenza dell'1% (25% in fase esponenziale e 26% in fase stazionaria). I lipidi, principalmente lipidi neutri TAG, sono stati identificati come la principale fonte di energia per le larve di bivalvi in esperimenti di digiuno, seguiti dalle proteine e dai carboidrati, che contribuiscono in minima parte (Marshall et al., 2010). L'unica quota maggiormente variabile tra le due fasi di crescita nelle singole microalghe risulta essere quella polisaccaridica, con differenze anche del 9%, come si osserva ad esempio per *Thalassiosira* B (38% in fase esponenziale e 49% in fase stazionaria). Tuttavia, dall'analisi dei dati non si osserva alcuna differenza significativa tra gli stessi contenuti nelle due fasi di crescita (Anova, $p > 0,05$). Questo fa presupporre che, nella scelta di un'ipotetica dieta per molluschi bivalvi, questa caratteristica non risulti decisiva. Piuttosto potrebbero essere più rilevanti le dimensioni cellulari, la crescita e la composizione in acidi grassi.

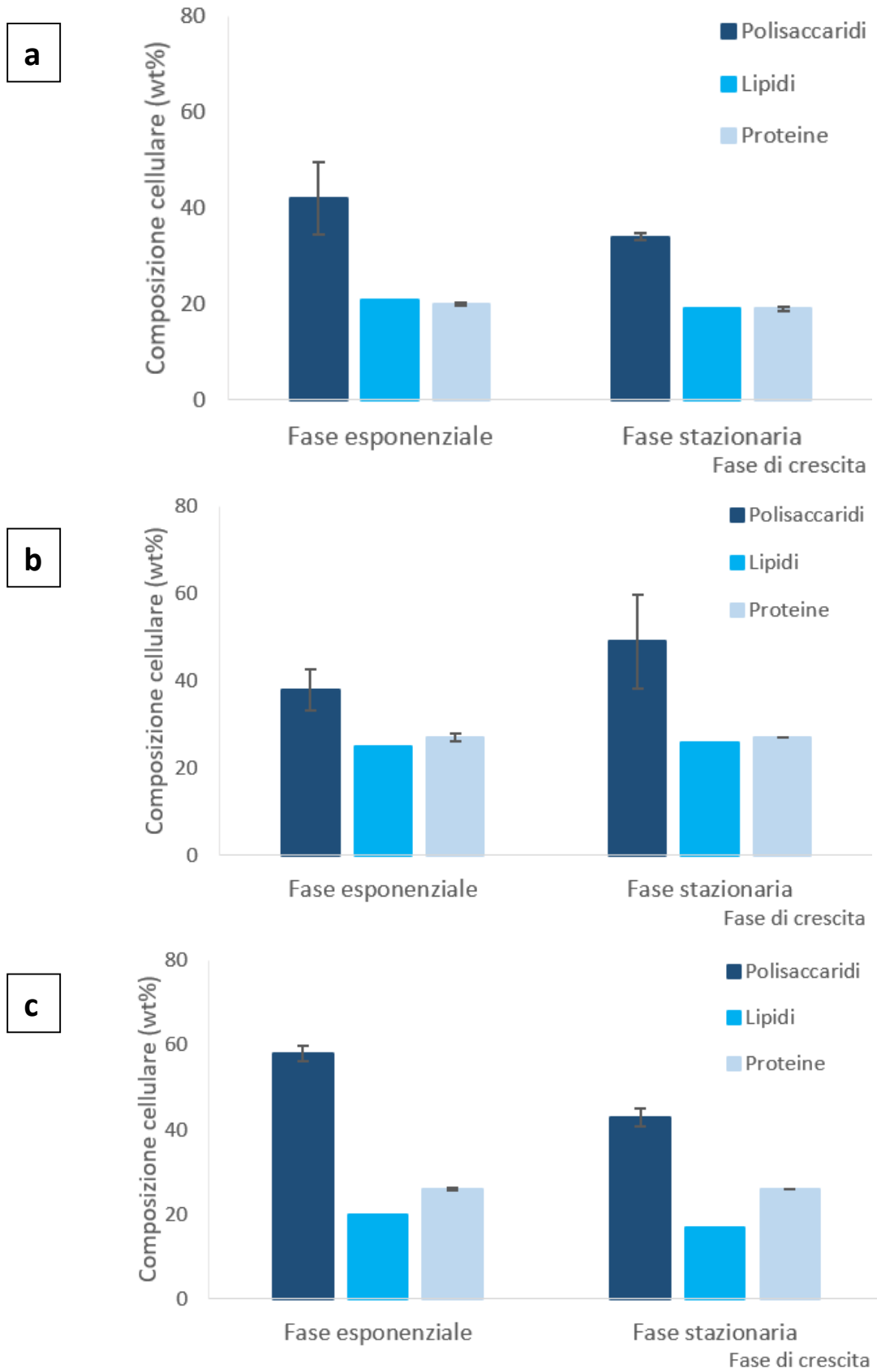


Figura 23 - Composizione biochimica cellulare (wt%) di *Thalassiosira* A (a), *Thalassiosira* B (b) e *Tetraselmis chui* (c), in due fasi di crescita.

4.1.3. Acidi grassi

Particolare rilevanza è stata data al contenuto di acidi grassi, analizzati tramite gascromatografia accoppiata a spettrofotometria di massa (GC-MS) in seguito all'ottenimento di estratto lipidico. Il contenuto di acidi grassi, in particolare di PUFAs ω -3 a catena lunga (come EPA e DHA), possiede un ruolo fondamentale nell'alimentazione dei molluschi bivalvi. La percentuale di acidi grassi totali su estratto lipidico (wt%) è riportata in **tabella 6**. In **tabella 7** sono invece riportate le percentuali su estratto lipidico (wt%) di tutti gli acidi grassi rilevati in ciascuna microalga. In **figura 24 (a, b e c)** è riportato il contenuto in acidi grassi (wt% su estratto lipidico) delle 5 microalghe utilizzate successivamente per le prove di alimentazione.

Tabella 7 - Percentuale di acidi grassi (wt%) determinati dall'analisi dell'estratto lipidico. La dicitura "in C18-ins" indica che la percentuale è stata sommata al contenuto degli acidi C18-insaturi (C18:1, C18:2, C18:3 e C18:4). Tale dicitura si osserva solo per quegli acidi grassi che, in fase di analisi, non è stato possibile discriminare con precisione.

Acidi grassi	Fase	<i>Thalassiosira</i>	<i>Thalassiosira</i>	<i>Tetraselmis</i>	<i>Phaeodactylum</i>	<i>Isochrysis</i>
		A	B	<i>chui</i>	<i>tricornutum</i>	<i>galbana</i>
C24:0	Exp	-	-	-	-	-
	Stat	-	1,8	-	1	-
C22:6	Exp	3,3	4,3	-	-	9,6
	Stat	2,7	2,6	-	-	7,2
C22:1	Exp	-	-	-	-	0,4
	Stat	-	-	-	-	-
C22:0	Exp	-	-	-	-	0,2
	Stat	-	-	-	-	-
C20:5	Exp	18,2	26,8	2,5	18	1,3
	Stat	15	27,2	5	28	-
C20:4	Exp	-	-	0,3	-	-
	Stat	-	-	1,3	1	-
C20:1	Exp	-	-	1,4	-	-
	Stat	-	-	1,6	-	-
C18:4	Exp	5,6	1,2	3,6	-	In C18-ins
	Stat	6,3	0,7	3,8	-	In C18-ins
C18:3	Exp	In C18-ins	In C18-ins	31,6	-	In C18-ins
	Stat	In C18-ins	In C18-ins	16,8	1	In C18-ins
C18-insaturi	Exp	5,6	9,1	11,8	-	40,5
	Stat	6,8	7,1	26,2	3	44,2
C18:0	Exp	2	0,9	4,3	-	2,3
	Stat	2,5	1	4,3	1	2
C16-insaturi	Exp	34,9	28,4	15,2	60	10,6
	Stat	31,8	32,5	15,2	45	10,9
C16:0	Exp	16,5	8,9	29,4	17	14,9
	Stat	16,4	11,3	26,4	13	16,4
C15:0	Exp	1,8	2	-	-	0,6
	Stat	2,9	1,4	-	-	0,6
C14:0	Exp	12,1	18,7	0,3	5	19,5
	Stat	15,7	14,5	-	7	18,7
C12:0	Exp	-	-	-	-	0,2
	Stat	-	-	-	-	-

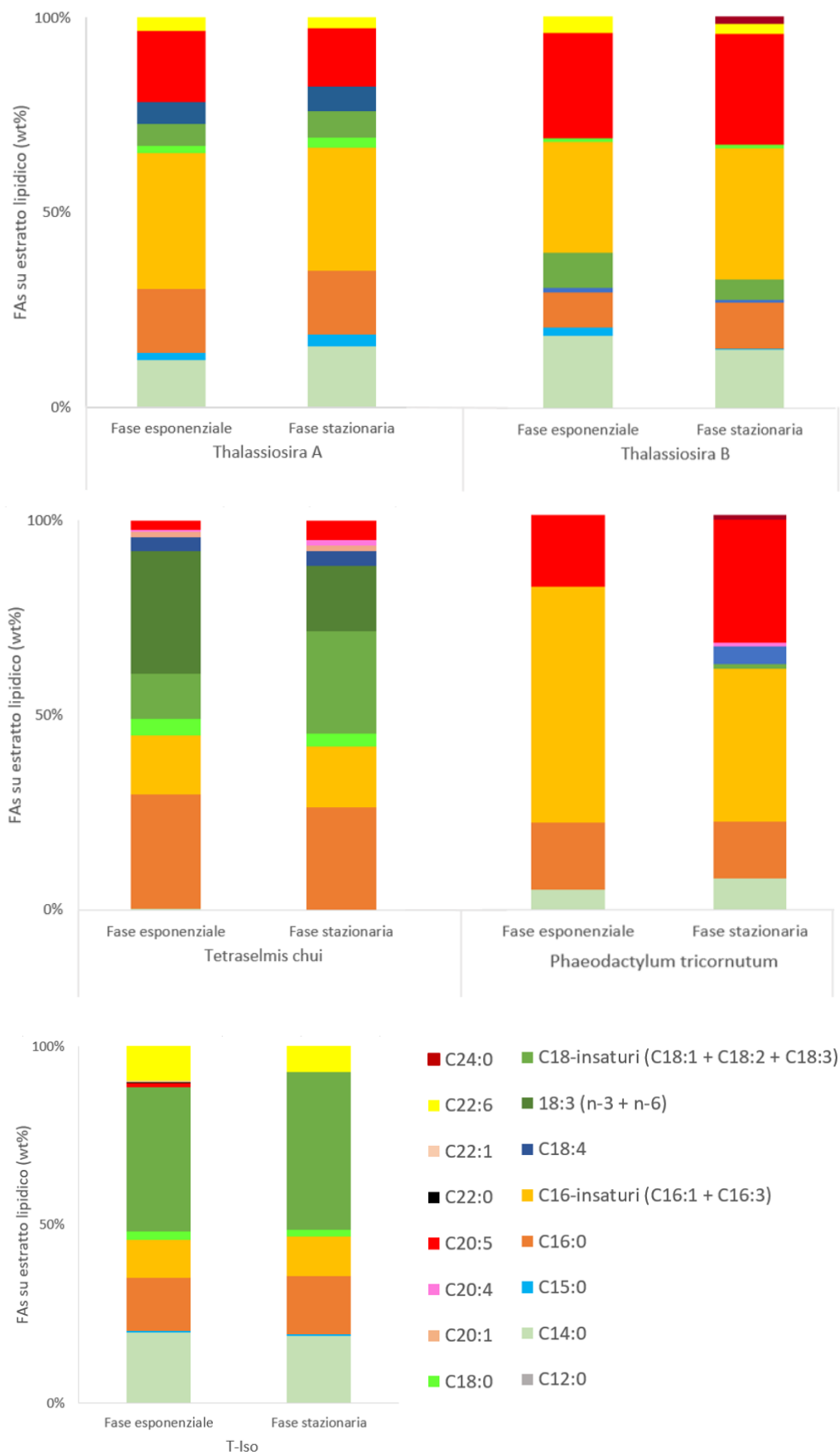


Figura 24 - Contenuto in acidi grassi (wt% su estratto lipidico) delle microalghe oggetto di studio. Ogni etichetta riporta il nome della specie alla quale il grafico si riferisce.

Dai grafici riportati si osserva un preponderante contenuto di acidi grassi C16 e C18 (in giallo ocra e arancione C16, in verde e verde scuro C18) che, come riportato in tabella 7, sono quelli presenti in percentuale maggiore in tutte le microalghe, raggiungendo anche valori particolarmente elevati: un esempio è dato dal contenuto in C16-insaturi (C16:1 e C16:3) di *P. tricornutum* che risulta essere del 60%. Altri valori di C18-insaturi (C18:1, C18:2, C18:3 e C18:4) sono stati rilevati in T-Iso, con percentuali del 41 e 45% tra le due fasi. Tutte le microalghe presentano, seppur in bassa percentuale, un contenuto in acidi grassi a catena lunga C20, C21, C22 e C24. Com'è noto, le microalghe, soprattutto le specie marine, accumulano acidi grassi a catena lunga (> C18) che non sono rinvenibili, ad esempio, nelle piante superiori. Scarsamente presente, e solo in *T. chui* e *P. tricornutum*, risulta essere l'acido arachidonico (C20:4 n-6, AA). Questo FAs ω -6, assieme all'acido docosapentanoico (22:5 n-6, DPA) è stato identificato come potenzialmente significativo per la crescita e la sopravvivenza larvale (Pernet et al., 2005) e post larvale dei bivalvi (Marshall et al., 2010; Milke et al., 2008).

Per la crescita e lo sviluppo dei molluschi bivalvi risultano però fondamentali EPA e DHA (riportati nei grafici in rosso e giallo, rispettivamente): la maggior parte dei molluschi bivalvi, infatti, non è in grado di produrli a partire dai precursori a catena corta. I PUFAs possiedono anche un ruolo fondamentale per lo sviluppo, fin dalle prime fasi di vita: il contenuto di PUFAs all'interno delle uova dipende da un processo a due fasi controllato prima di tutto dalle condizioni ambientali durante la fase di preingrasso e di gametogenesi e, successivamente, dalle condizioni di sviluppo dell'ovocita (Helm et al., 2004). Le riserve endogene depositate nelle uova sono essenziali per fornire energia durante l'embriogenesi e la crescita, fino a quando le larve non saranno in grado di nutrirsi autonomamente. Più della metà del fabbisogno energetico per l'embriogenesi è soddisfatta dai lipidi (PUFAs) mentre la parte rimanente è soddisfatta principalmente dalle proteine (Labarta et al., 1999). Dei due acidi grassi considerati essenziali per i bivalvi, l'EPA è utilizzato principalmente durante lo sviluppo embrionale come fonte di energia, mentre il DHA viene utilizzato come fonte di composti strutturali; la proporzione di larve che raggiunge lo stadio D, fase in cui si sviluppa il primo guscio e le larve cominciano a nutrirsi autonomamente, è positivamente correlata con il contenuto

lipidico iniziale delle uova (Hendriks et al., 2003). Dopo una diminuzione del contenuto lipidico dovuto all'embriogenesi, le riserve delle larve si accumulano nuovamente durante la successiva fase di alimentazione, che avviene autonomamente. Durante questa fase la qualità della dieta larvale è fondamentale al fine di costruire riserve energetiche in vista della metamorfosi, poiché durante questo evento la larva non è in grado di nutrirsi (Whyte et al., 1991; Whyte et al., 1992). EPA e DHA risultano essere rilevanti anche perché componente maggioritaria delle membrane cellulari (Dunstan et al., 1993; Hendriks et al., 2003).

Il contenuto di EPA e DHA delle microalghe oggetto di studio è stato riportato in grafici a parte (**Fig. 25a e b**), per facilitarne il confronto. Dai grafici si osserva un diverso contenuto in EPA tra le singole fasi che risulta essere simile solo per *Thalassiosira* B con una percentuale del 26 e 27% nelle fasi esponenziale e stazionaria; per *P. tricornutum* la quota differisce del 10% tra le due fasi (18 e 28%) raggiungendo il più alto contenuto in fase stazionaria; in *Thalassiosira* A si osserva invece l'opposto, cioè un più alto contenuto in fase esponenziale (21% contro 15% in fase stazionaria). Scarsi contenuti, che non superano il 5%, risultano invece in *T. chui* e T-Iso: in quest'ultima il contenuto di EPA è addirittura assente in fase stazionaria.

Il DHA, assente in *T. chui* e *P. tricornutum*, raggiunge le maggiori percentuali in T-Iso (9,6% in fase esponenziale). Questa microalga ha ricevuto, e riceve tutt'ora, un interesse sempre maggiore proprio per l'abilità di produrre DHA e quindi per il potenziale utilizzo in diversi settori economici. Il contenuto lipidico di quest'alga cambia tra le varie fasi di crescita, soprattutto in base ai fattori abiotici quali temperatura, illuminazione, salinità e pH, che assumono un ruolo rilevante in fase di coltivazione. Il contenuto di lipidi in T-Iso, come mostrato in **tabella 6**, aumenta notevolmente in fase stazionaria: successivamente ad esperimenti volti a determinare il contenuto lipidico nelle diverse fasi di crescita di T-Iso, è stato osservato che questo diminuisce significativamente in campioni raccolti durante le fasi lag ed esponenziale. Questo è giustificato dall'utilizzo dei lipidi da parte dell'alga per la rapida proliferazione cellulare caratteristica di queste fasi. La quantità di lipidi rimane relativamente invariata durante la crescita

immediatamente precedente all'entrata in fase stazionaria, fase in cui il contenuto lipidico aumenta notevolmente come osservato da Nalder e colleghi (2015), ma anche nel presente studio. L'aumento di TAG nella fase stazionaria indica che l'alga sta immagazzinando lipidi per un successivo utilizzo, se e quando necessario, come fonte di energia o per la sintesi di lipidi di membrana. Risulta quindi di fondamentale importanza somministrare diete plurispecifiche che consentano ai bivalvi una crescita e uno sviluppo ottimali grazie all'apporto di molecole ad alto valore nutrizionale (Nalder et al., 2015). Non essendo state effettuate repliche, per l'analisi statistica si è proceduto effettuando un test ANOVA a due vie senza repliche, analisi che assume che non esistano interazioni tra i due fattori. Il risultato, che non consideriamo come esaustivo ma piuttosto preliminare, indica che ci sono differenze tra le microalghe ($p < 0,05$) ma non tra le diverse fasi di crescita ($p > 0,05$).

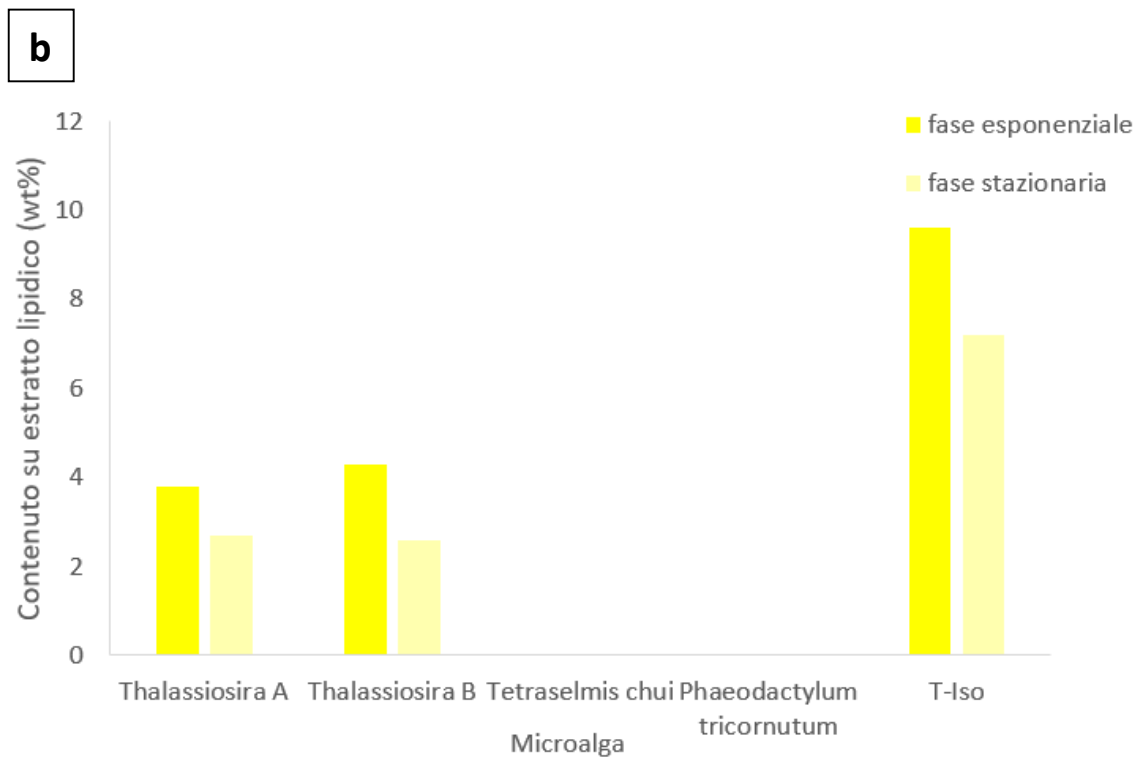
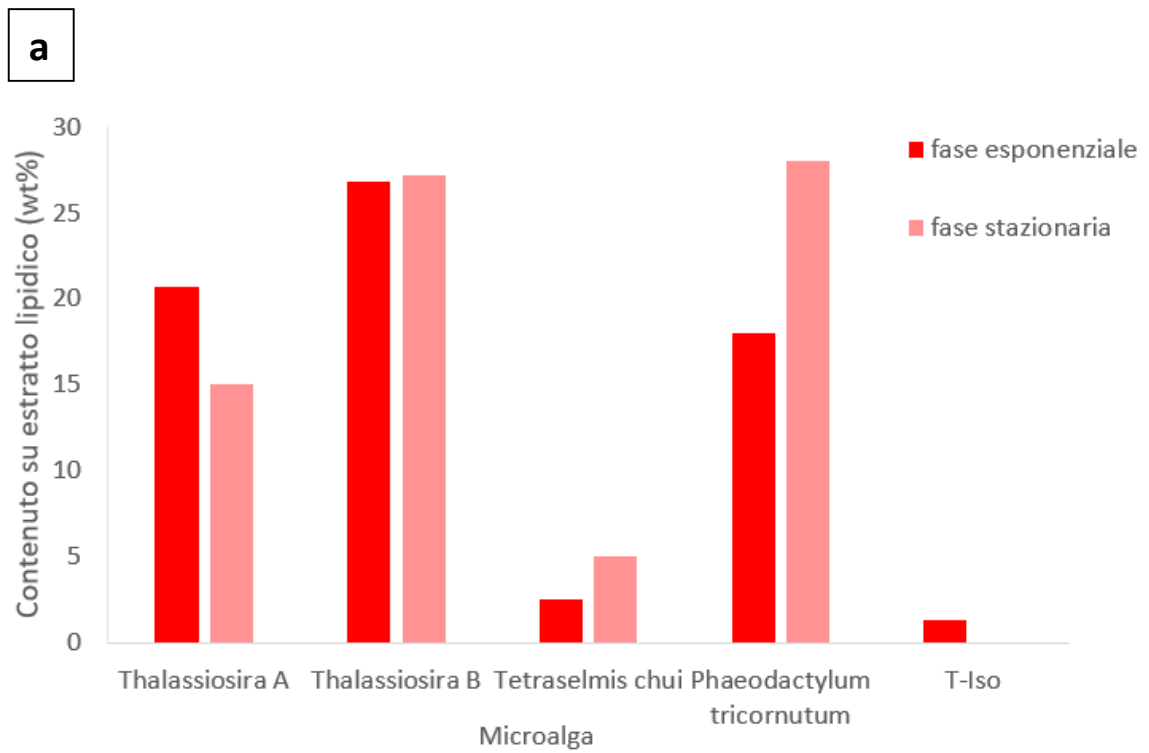


Figura 25 - Contenuto di EPA (a) e DHA (b) (wt% su estratto lipidico) per microalga, nelle due fasi di crescita esponenziale e stazionaria

4.2. Prove di *feeding* su larve di *R. philippinarum*

Larve di *R. philippinarum* sono state alimentate con tre diete plurispecifiche composte da due microalghe (*Thalassiosira* ceppo A e T-Iso) in diversa composizione percentuale (Mix 1 1:2, Mix 2 1:1 e Mix 3 2:1) e con una dieta a base della sola specie T-Iso come controllo.

La dimensione cellulare, la digeribilità della parete, la composizione biochimica e l'assenza di sostanze tossiche, sono fattori che determinano la qualità nutrizionale delle microalghe e la loro utilità e applicabilità come cibo per i molluschi bivalvi. Di questi, la digeribilità della parete e le dimensioni cellulari sono i principali fattori che determinano la crescita e la sopravvivenza delle larve che, essendo ancora sottosviluppate, presentano una bassa efficienza di filtrazione; tuttavia, quando vengono somministrate diete a base di alghe che mostrano un volume e una dimensione cellulare inferiore, il tasso di alimentazione delle larve aumenta. Quando nutrite con microalghe liofilizzate, le larve mostrano tassi di crescita inferiori rispetto a quelli raggiunti quando alimentate con microalghe vive, pertanto è consigliato l'utilizzo di quest'ultime durante l'allevamento. Lo spessore della parete cellulare influenza la digeribilità delle microalghe ed è stato riportato che le larve di molluschi bivalvi, alle volte, sono incapaci di digerire diatomee che presentano spine relativamente lunghe, con conseguente produzione di pseudofeci; questo può essere dovuto alla mancanza, da parte delle larve, di enzimi digestivi adatti a questa tipologia di struttura (Martínez-Fernández et al., 2004; Cheng et al., 2020), come osservato nelle fasi preliminari di questo studio quando alle larve è stata somministrata una dieta a base di *P. tricornutum*, diatomea che risulta più grande della diatomea selezionata (*Thalassiosira* A) e possiede una tipica forma "a tre spine" che la rende difficile da predare dalle larve; Il ceppo A di *Thalassiosira* utilizzato in questo studio è stato selezionato sulla base di queste informazioni, in quanto presenta dimensioni cellulari idonee e una forma maggiormente adatta. I risultati ottenuti dall'allevamento di diverse specie di bivalvi in stadio larvale quando nutrite con differenti specie di microalghe potrebbero, in questo specifico stadio del ciclo vitale dell'animale, non essere legati alla composizione biochimica delle alghe ma piuttosto all'incapacità delle larve di ingerire o digerire tali microalghe.

Il fatto che particolari specie di microalghe vengano ingerite dalle larve, non significa necessariamente che vengano anche digerite. Da uno studio condotto da Lora-Vilchis e colleghi (1997) su 10 specie di microalghe somministrate su larve di *Argopecten ventricosus-circularis* (Sowerby II, 1842), solo 7 sono state ingerite e di queste solo 5 digerite. Si presume inoltre che la mancata ingestione possa essere correlata alle dimensioni fisiche delle cellule microalgali (forma e taglia): microalghe che presentano dimensioni cellulari $> 15 \mu\text{m}$ di diametro potrebbero essere troppo grandi per l'ingestione da parte delle larve. Il discorso non può però essere generalizzato a tutte le specie di molluschi bivalvi poiché possiedono diverse capacità di alimentazione.

Nonostante una storia relativamente lunga di ricerca nell'ambito dell'alimentazione larvale di molluschi bivalvi, non c'è una standardizzazione di come sono riportati i risultati o di come i tassi di densità alimentare e larvale siano determinati. Generalmente il fitoplancton somministrato alle larve prevede una concentrazione cellulare che varia tra 50.000 e 100.000 cell ml^{-1} (Hendriks et al., 2003) ma c'è ampia variazione nelle densità larvali iniziali che generalmente variano tra 1 e 23 larve ml^{-1} (Torkildsen et al., 2004). Anche il tasso al quale il cibo viene fornito alle larve può variare, tipicamente da giornaliero a ogni terzo giorno. Larve di *R. philippinarum* mostrano alti tassi di crescita ($> 7 \mu\text{m day}^{-1}$) quando nutrite con diete monospecifiche a base di *I. galbana* (T-Iso) (Yan et al., 2006), o diete plurispecifiche a base di T-Iso con l'aggiunta di una diatomea (Marshall et al., 2010).

Queste informazioni sono state la base per lo studio proposto in questo elaborato il quale prevede una densità larvale iniziale che varia tra le 10 e le 20 larve ml^{-1} ed una somministrazione di cellule algali pari a 100.000 cell ml^{-1} , ogni due giorni. T-Iso è stata scelta come microalga per l'alimentazione delle larve adibite a controllo, mentre il ceppo A di *Thalassiosira* è stato scelto, tra le diatomee, principalmente per le ridotte dimensioni che non superano i $7 \mu\text{m}$ di diametro e risultano essere leggermente inferiori al ceppo B. *Tetraselmis chui* è stata esclusa a priori poiché le dimensioni cellulari (comprese tra 10 e $15 \mu\text{m}$) risultano eccessive per l'ingestione da parte delle larve (Martínez-Fernández et al., 2004).

Il volume algale da somministrare alle larve è stato ottenuto grazie alla correlazione precedentemente effettuata tra torbidità (*Abs*) e numero di cellule ml⁻¹. Da tale correlazione sono state ottenute le seguenti equazioni lineari:

- T-Iso: $x = \frac{Abs}{0,0014} \times 10000$
- *Thalassiosira* A: $x = \left[\left(\frac{Abs}{0,0001} \right) - 0,056 \right] \times 1000$

Dove x = numero di cellule ml⁻¹ associate al valore di torbidità misurato. Il valore di x è stato poi diviso per 100.000 (numero di cellule ml⁻¹ da somministrare alle larve) per ottenere il fattore di diluizione; il volume totale contenuto in ciascun contenitore (1L) è stato quindi diviso per il fattore di diluizione: il risultato ha fornito il volume (ml) di coltura da somministrare.

La sopravvivenza delle larve è stata valutata mediante conteggio in triplicato delle stesse, a giorni alterni per 15 giorni. Nel grafico sottostante (**Fig. 26**) è riportato l'andamento della sopravvivenza larvale nel tempo, quest'ultimo misurato come età delle larve (giorni), per ciascun trattamento utilizzato.

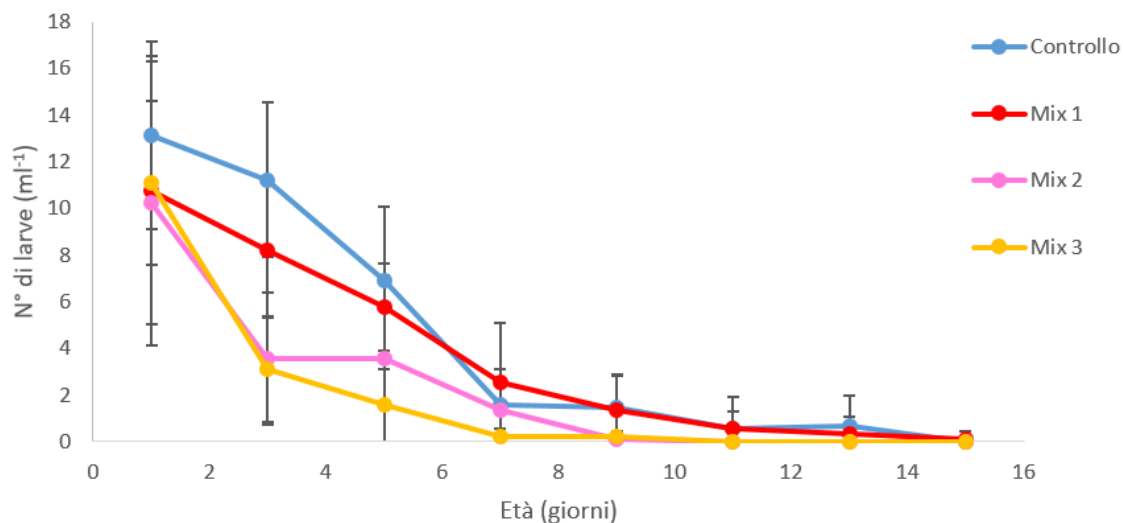


Figura 26 - Distribuzione del numero di larve planctoniche nel tempo, indicato come età delle larve

Dall'osservazione del grafico si evince come la sopravvivenza delle larve alimentate con Mix 2 e Mix 3 subisca un forte decremento già nella prima settimana d'età, passando da valori di 10±3 a valori prossimi allo 0, suggerendo la scarsa efficienza di questi due trattamenti.

I dati sono stati analizzati, previa opportuna trasformazione, mediante test Anova ($p < 0,05$) (**Tab. 8**).

Tabella 8 - Risultati del test Anova condotto sui dati di sopravvivenza larvale. Il codice *** indica che ci sono differenze altamente significative ($p < 0$)

	Df	F value	P value
Dieta	3	10,7797	0,00017 ***
Tempo	7	70,1127	$< 2^{-16}$ ***
Dieta:Tempo	21	1,0357	0,43708

Dai risultati ottenuti, è possibile osservare che ci sono differenze molto significative sia tra le diverse diete utilizzate che nel corso del tempo (Anova, $p < 0,001$), ma non si sono osservate, invece, interazioni statisticamente significative tra i due fattori (Anova, $p > 0,05$). Un'analisi più approfondita sulle diverse diete testate, condotta mediante test a posteriori (*post-hoc*) ha mostrato differenze significative tra il Mix 1 e gli altri due trattamenti ($p < 0,01$) e tra il Controllo e i Mix 2 e 3 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, rispettivamente). Di seguito è riportata una tabella riassuntiva del test condotto (**Tab. 9**).

Tabella 9 - Risultati del test a posteriori condotto successivamente a test Anova. La tabella è leggibile in entrambe le direzioni (alto-basso/sinistra-destra).

"ns": $p > 0,05$; "***": $p < 0,01$; "****": $p < 0,001$.

	Controllo	Mix 1	Mix 2	Mix 3
Controllo		ns	**	***
Mix 1	ns		**	**
Mix 2	**	**		ns
Mix 3	***	**	ns	

Al termine delle due settimane, ovvero al 15° giorno d'età delle larve, sono stati osservati in vivo alcuni campioni provenienti da ciascun contenitore: da questi si è potuta osservare la presenza di un diverso numero di *pediveliger*. La sopravvivenza è chiaramente identificabile anche in questa fase nonostante le larve non nuotino più poiché quelle morte presentano un guscio completamente

vuoto e trasparente. Caratteristica interessante di questa fase, ovvero quella tipica delle larve che si avvicinano alla metamorfosi, è la presenza di piccoli punti circolari e scuri, gli *eye-spots*, che non sono altro che rudimenti di branchie e si collocano al centro delle due valve (**Fig. 27**).



Figura 27 - Fotografia effettuata con microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con obiettivo 10x raffigurante un esemplare di *R. philippinarum* successivamente a fissazione con alcol etilico. Si può apprezzare la presenza degli *eye-spots*

Il dato più importante per lo studio è quello che mostra il numero totale di esemplari rinvenuti all'interno di ciascun contenitore. Il conteggio delle larve infatti prevedeva il prelievo di tre repliche di 1 ml di acqua da ciascun contenitore al fine di valutare il numero di larve ml^{-1} ancora presenti. Verso il termine del tempo stabilito però, un buon numero di larve era passato alla fase *pediveliger*, fase durante la quale l'animale si deposita sul fondo e si muove, strisciando, grazie alla presenza del piede. Al termine del periodo prescelto, sono stati contati gli esemplari rimasti in ciascun contenitore (tra larve planctoniche e *pediveliger*): 15 esemplari sia per il Controllo che per il trattamento Mix 1 e solo un esemplare per ciascun trattamento Mix 2 e Mix 3. Questo conferma ciò che è emerso dall'analisi dei dati dell'intero esperimento, ovvero che, tra tutti i trattamenti, la composizione plurispecifica del Mix 1 è certamente quella potenzialmente utilizzabile per l'allevamento di *R. philippinarum* in stadio larvale già ai primi giorni d'età. Per ciascun esemplare rinvenuto all'interno dei contenitori sono state misurate altezza (dorso-ventrale) e larghezza (antero-posteriore) delle valve al fine di osservare quanti di questi avessero raggiunto una taglia prossima alla metamorfosi. Dal grafico a dispersione (**Fig. 28**), che riporta i punti di intersezione delle due misure, si osserva una maggiore concentrazione dei punti inerenti il Mix

1, mentre i punti che rappresentano il Controllo risultano maggiormente dispersi. Questo mostra come un maggior numero di larve alimentate con Mix 1 abbiano raggiunto una taglia prossima a quella identificata per la metamorfosi.

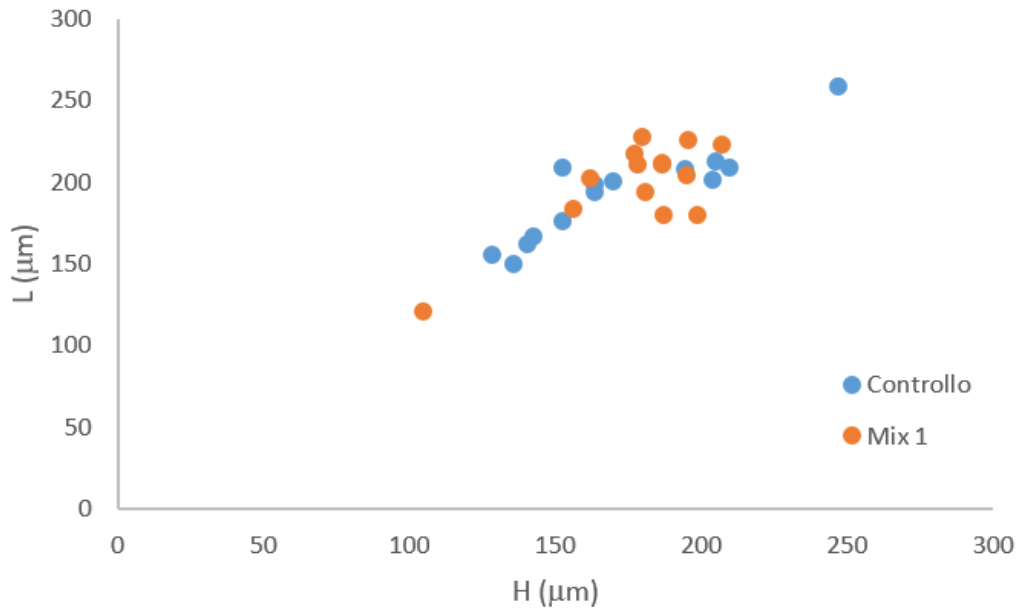


Figura 28 – Grafico a dispersione i cui punti mostrano l'intersezione delle misure di altezza e larghezza delle larve provenienti dai campioni Controllo e Mix 1

Nei grafici boxplot (**Fig. 29**) vengono confrontate le misure di larghezza e altezza, separatamente. La linea blu interna ai box rappresenta la mediana mentre i baffi indicano i valori minimo e massimo per ciascuna categoria, esclusi gli *outliers*. In entrambe le rappresentazioni si evince, ancora una volta, come le misure in larghezza delle larve del Mix 1 si concentrino in un intervallo minore mentre gli esemplari del Controllo mostrino misure maggiormente disperse.

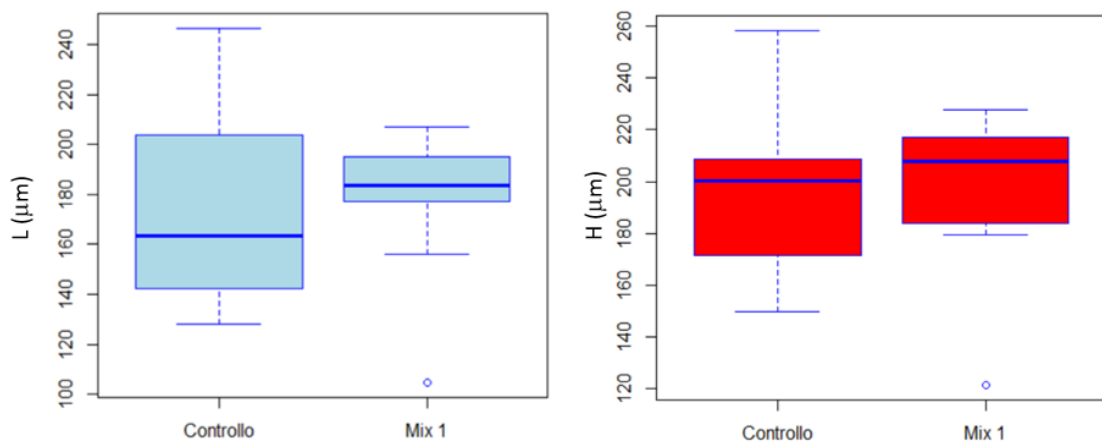


Figura 29 - Boxplot realizzati mediante l'utilizzo del software R (R Core Team, 2020): nei boxplot in azzurro vengono confrontate le misure di larghezza mentre in rosso le misure di altezza

Da questo è possibile concludere che le larve alimentate con dieta plurispecifica nelle giuste proporzioni, raggiungono più velocemente una taglia prossima alla metamorfosi. A causa delle diverse composizioni di nutrienti presenti nelle microalghe, una dieta monospecifica potrebbe non essere sufficiente e le larve potrebbero non riuscire ad ottenere una nutrizione completa; quando si somministrano diete plurispecifiche, i nutrienti delle diverse alghe possono integrarsi a vicenda in modo da fornire alle larve un'alimentazione più completa dal punto di vista nutrizionale e quindi favorire la crescita e la sopravvivenza (Khender et al., 2010), come osservato nel presente studio. È importante ricordare che ciascuna specie presenta caratteristiche e comportamenti di alimentazione diversi: in alcuni studi, condotti su specie diverse di molluschi bivalvi alimentati con diete plurispecifiche, indicano che l'effetto di queste diete miste non ha mostrato alcun vantaggio statistico oppure semplicemente non è stato osservato alcun vantaggio e le diete miste sono risultate addirittura peggiori (Costa et al., 2011; Liu et al., 2009; Ponis et al., 2006; Velasco, 2007). Da qui, l'importanza di studiare e caratterizzare il comportamento alimentare delle diverse specie di molluschi bivalvi ma anche di fornire le giuste indicazioni inerenti la dieta ottimale da somministrare alle singole specie per sostenere i molluschi nelle diverse fasi della loro crescita ed evitare effetti negativi di una dieta mal bilanciata (Cheng et al., 2020).

4.3. Tasso di *clearance* ed efficienza di assorbimento del cibo valutati su novellame di *R. philippinarum*

Il tasso di *clearance* (CR) è il risultato della filtrazione da parte del novellame di *R. philippinarum* utilizzato per questo esperimento ed è definito come il volume di acqua dal quale vengono sottratte le particelle sospese, per ora (Widdows et al., 2006).

Essendo stato utilizzato un sistema chiuso, che non prevede quindi il continuo flusso del mezzo in entrata e in uscita, il CR è stato calcolato mediante misura del decremento esponenziale della concentrazione di cellule all'interno di ciascun contenitore, ogni 20 minuti per un periodo di 2 ore. Durante gli esperimenti di *clearance* l'animale sequestra continuamente particelle, diluendo la sospensione

mediante filtrazione. Se il tasso di filtrazione rimane costante, allora il tasso con cui le particelle vengono rimosse diminuirà progressivamente così come la concentrazione di particelle (Coughlan, 1969).

Il novellame è stato alimentato con diete algali monospecifiche composte da *Thalassiosira A*, *Thalassiosira B*, *T. chui* e *P. tricornutum*, ad una concentrazione iniziale di 50.000 cell ml⁻¹.

Come per il precedente esperimento, la correlazione tra i valori di torbidità e quelli di conta cellulare ottenuti in fase di valutazione della crescita, ha permesso l'ottenimento di equazioni lineari utili al calcolo del volume (ml) di coltura algale da somministrare alle vongole. Di seguito, le equazioni lineari riferite a microalghe non riportate in precedenza:

- *Thalassiosira B*: $x = \left(\frac{Abs}{0,0003} - 0,0405 \right) \times 1000$

- *T. chui*: $x = \left(\frac{Abs}{0,0003} - 0,0883 \right) \times 1000$

- *P. tricornutum*: $x = \left(\frac{Abs}{1,454} \right) \times 10^7$

Le microalghe sono state somministrate quando si trovavano in due diverse fasi di crescita, esponenziale e stazionaria.

La densità cellulare iniziale al quale vengono somministrate le diete risulta essere di fondamentale importanza, sia per evitare la produzione di pseudofeci ma anche perché i molluschi bivalvi possiedono un comportamento alimentare complesso. Da precedenti studi effettuati su novellame di *R. philippinarum* sottoposto a differenti concentrazioni di fitoplancton, si è potuto osservare che le vongole esibivano lo stesso comportamento alimentare, che consisteva in un forte declino del CR in risposta all'aumento della disponibilità di cibo. Questo adattamento, messo in atto dai bivalvi al variare delle condizioni alimentari, è stato identificato come un meccanismo che aiuta a regolare i tassi di ingestione a livelli compatibili con l'efficienza di assorbimento del cibo all'interno dell'intestino. Se i molluschi continuassero a filtrare particelle alimentari presenti in grandi quantità per un tempo prolungato, determinerebbero una più rapida trasformazione del cibo con conseguente riduzione dell'efficienza di

assorbimento del cibo associata ad un ridotto passaggio di alimento nell'intestino. Eccessivi aumenti di razione alimentare possono superare la capacità dell'intestino di elaborare il cibo in modo efficiente per cui questi adattamenti mirano a far fronte all'aumento della quantità o della qualità del cibo e sarebbero attuati grazie a cambiamenti che avvengono a livello dei tessuti digestivi e che si traducono in un aumento delle dimensioni, del contenuto proteico e delle attività enzimatiche della ghiandola digestiva (Labarta et al., 1999; Pérez-Camacho et al., 1994) e altri parametri morfometrici (Tamayo et al., 2015; Tamayo et al., 2011).

Dai grafici riportati in **figura 30 (a e b)**, si osserva l'andamento del tasso di clearance nel tempo, ad intervalli regolari di 40 minuti dove le differenze sono maggiormente apprezzabili rispetto a intervalli di 20 minuti (intervallo in cui sono stati raccolti i campioni).

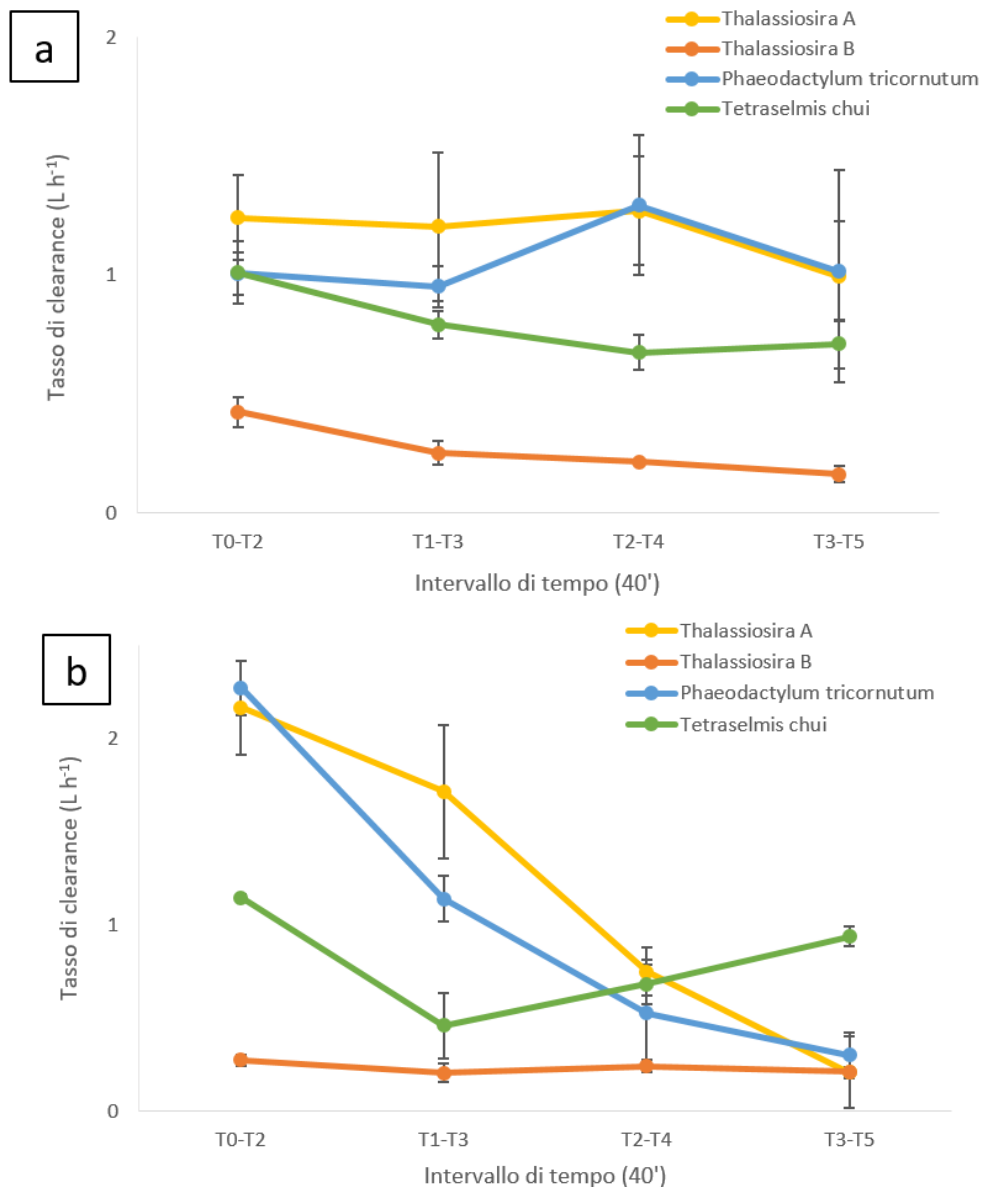


Figura 20 - Grafici che mostrano l'andamento, ad intervalli di tempo, del tasso di *clearance* misurato nei diversi trattamenti in fase esponenziale (a) e fase stazionaria (b).

Osserviamo che il CR risulta essere molto variabile nel tempo, tranne per le vongole a cui è stata somministrata dieta a base di *Thalassiosira B*: qui, il tasso di filtrazione infatti rimane piuttosto costante nel tempo, in entrambe le fasi di crescita della microalga somministrata. L'unica piccola variazione si evidenzia in fase esponenziale, con un leggero decremento del CR nel tempo. Una diminuzione nel tasso di *clearance* indica che i molluschi filtrano sempre meno volume nel tempo e questo dovrebbe essere una diretta conseguenza del fatto che gli animali stanno consumando via via il cibo disponibile come accade ad esempio nel grafico in **figura 30b** per le serie *Thalassiosira A* e *P. tricornutum*. Questa è un'ipotesi plausibile ma sono necessari ulteriori studi per poterla

confermare. Per *T. chui* invece la situazione cambia repentinamente dopo più di un'ora: il tasso di filtrazione aumenta esponenzialmente e un maggiore volume di acqua viene filtrato.

Dall'analisi dei dati emergono differenze significative (Anova, $p < 0,05$) nel tasso di *clearance* tra le diverse diete somministrate nel tempo (Anova, $p < 0,05$) ma non tra le alghe nelle diverse fasi di crescita (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Le interazioni specifiche sono state individuate mediante test *post-hoc* (Tukey test e Dunn test, rispettivamente) (**Fig. 31**).

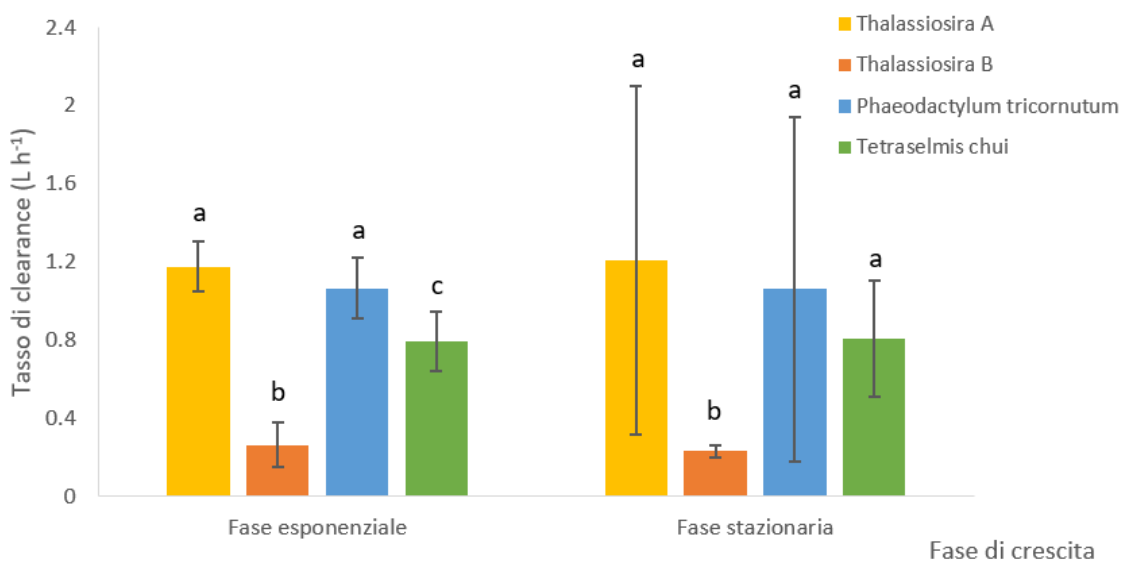


Figura 31 - Tassi di *clearance* misurati su vongole sottoposte alle diverse diete monospecifiche utilizzate in due fasi di crescita, esponenziale e stazionaria. Le lettere indicano differenze significative tra le alghe all'interno della stessa fase

Dai risultati possiamo affermare che non vi è alcuna differenza nel CR misurato su due intervalli di tempo (40 minuti), nelle stesse alghe, tra le diverse fasi: le barre dell'istogramma che riportano lo stesso colore raggiungono infatti altezze molto simili, per cui, da questa specifica analisi, sembrerebbe non esserci distinzione nella somministrazione di alghe in diverse fasi di crescita. La scelta dell'una o dell'altra fase di crescita algale durante l'alimentazione dei bivalvi potrebbe non essere discriminante.

Il calcolo dei massimi valori dei tassi di filtrazione (CR MAX) però, indica risultati differenti. Il CR MAX ($L h^{-1}$) è stato calcolato sulla base di un periodo di due incrementi di tempo consecutivi (cioè 40 minuti) durante i quali il declino della

concentrazione cellulare è stato maggiore (**Fig. 32**), secondo le indicazioni di Widdows e Staff (2006). Questo evita l'inclusione di periodi di tempo in cui gli individui possono essere completamente o parzialmente "chiusi", come ad esempio all'inizio se lenti ad estroflettere i sifoni o alla fine se, come risultato di un alto CR, hanno consumato la maggior parte delle cellule. In tabella 10 vengono riportati i valori in questione.

Tabella 10 – Massimo valore del tasso di *clearance* (L h⁻¹) valutato su due intervalli di tempo consecutivi (40 minuti)

	Fase esponenziale	Fase stazionaria
<i>Thalassiosira A</i>	1,48 ± 0,08	2,17 ± 0,25
<i>Thalassiosira B</i>	0,42 ± 0,06	0,28 ± 0,03
<i>P. tricornutum</i>	1,49 ± 0,13	2,27 ± 0,15
<i>T. chui</i>	1,01 ± 0,13	1,15 ± 0,02

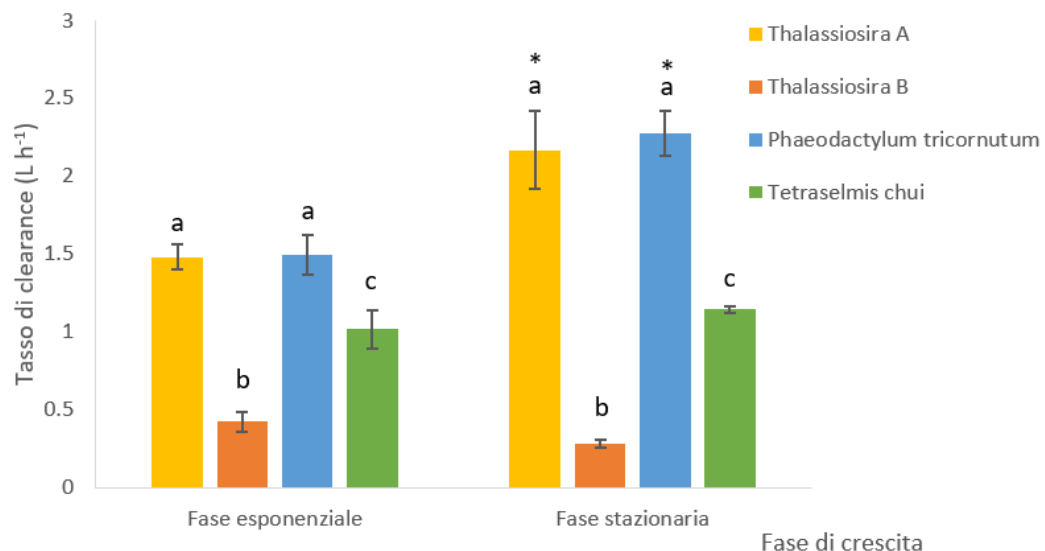


Figura 32 - Massimo tasso di *clearance* dei molluschi bivalvi sottoposti a dieta monospecifica in due fasi di crescita. Le lettere indicano differenze specifiche tra le diverse diete all'interno della stessa fase mentre gli asterischi (*) indicano differenze significative all'interno della stessa dieta in due diverse fasi di crescita

I valori più alti di CR MAX sono stati evidentemente raggiunti dalle vongole sottoposte a dieta a base di *Thalassiosira A* e *P. tricornutum* in fase di crescita

stazionaria: in tale situazione, le vongole hanno filtrato fino a $2,17 \pm 0,25$ e $2,27 \pm 0,15$ L h⁻¹, rispettivamente. L'analisi dei dati di CR MAX conferma quanto appena osservato: il test Anova effettuato sui dati ha rivelato differenze significative ($p < 0,05$) all'interno dei fattori Dieta, Fase e dall'interazione dei due (DietaxFase). Le differenze specifiche sono state individuate mediante test a posteriori (SNK test). Interessante come all'interno delle singole fasi, le differenze tra le diete siano le medesime, rispecchiando i risultati ottenuti sui dati di CR: nessuna differenza tra *Thalassiosira A* e *P. tricornutum* che però differiscono significativamente da *T. chui* e *Thalassiosira B*, quest'ultima in particolare mostra differenze con tutti gli altri trattamenti, mostrando un livello massimo di CR MAX particolarmente inferiore ($0,42 \pm 0,06$ e $0,28 \pm 0,03$ in fase esponenziale e stazionaria, rispettivamente), come per i valori di CR.

Se confrontiamo però le diverse fasi di crescita delle alghe somministrate, per i valori di CR non si evincono differenze significative mentre per i valori di CR MAX si apprezzano differenze significative tra le diverse fasi di crescita di *Thalassiosira A* ($2,17 \pm 0,25$ L h⁻¹ in fase stazionaria contro $1,48 \pm 0,08$ L h⁻¹ in fase esponenziale) e di *P. tricornutum* ($2,27 \pm 0,15$ L h⁻¹ in fase stazionaria contro $1,49 \pm 0,13$ L h⁻¹ in fase esponenziale). Questo fa presupporre che le vongole siano spinte a filtrare maggiori volumi di acqua quando ricchi di *Thalassiosira A* e *P. tricornutum* in fase di crescita stazionaria. Il motivo per il quale esse siano spinte a farlo richiede certamente ulteriori approfondimenti. Dall'osservazione al microscopio non si sono notate differenze evidenti nelle dimensioni cellulari tra fase stazionaria ed esponenziale, quindi non è certo che il comportamento possa essere attribuito a questa specifica motivazione, ma da confronti tra peso secco e peso del materiale organico particolato, risulta che tutte le componenti inorganiche hanno un forte impatto sul peso secco totale in *Thalassiosira A*, e questo può essere dato non solo dall'aumento del numero di cellule, ma anche da un leggero aumento delle dimensioni. Certo è che, basandoci sui dati ottenuti in questo studio, le microalghe preferite da novellame di *R. philippinarum* risultano essere *Thalassiosira A* e *P. tricornutum* che mostrano alti valori sia di CR che di CR MAX, e questo può dipendere dai vari fattori che entrano in gioco nel meccanismo di alimentazione dei molluschi bivalvi ovvero dimensione delle

cellule algali fornite agli animali, composizione biochimica e la digeribilità delle stesse (Martínez-Fernández et al., 2004).

L'efficienza di assorbimento del cibo (AE) è stata misurata basandosi sul metodo di Conover (1966). Questo indice rappresenta l'efficienza con la quale il materiale organico viene assorbito dal cibo ingerito e viene calcolato mediante la seguente equazione:

$$AE = \frac{(F - E)}{[(1 - E)F]} \times 100$$

Dove:

- $F = \frac{\text{peso secco del cibo} - \text{peso delle ceneri}}{\text{peso secco del cibo}}$
- $E = \frac{\text{peso secco delle feci} - \text{peso delle ceneri}}{\text{peso secco delle feci}}$

L'efficienza di assorbimento è una componente di acquisizione dell'energia deputata alla crescita, quindi i molluschi che mostrano alta efficienza di assorbimento, in teoria, avrebbero maggiore accesso a questa energia. È stato riscontrato che individui che crescevano più rapidamente, mostravano alti tassi di *clearance*, di ingestione e di assorbimento, con un costo metabolico inferiore, che in ultima analisi si traduce in una migliore capacità di crescita (Fernández-Reiriz et al., 2016). Da queste informazioni si può dedurre che CR e AE sono correlati tra loro. Nella tabella seguente (**Tab. 11**) vengono riportati i valori di AE (%) calcolati sulla base dell'equazione proposta da Conover (1966).

Tabella 11 - Valori di AE (%) misurati su novellame di *R. philippinarum* sottoposto a diverse diete algali monospecifiche somministrate in due fasi di crescita esponenziale e stazionaria (indicate in tabella come "exp" e "stat", rispettivamente)

Dieta	Fase	AE (%)
<i>Thalassiosira A</i>	Exp	-172
	Stat	67
<i>Thalassiosira B</i>	Exp	45
	Stat	42
<i>P. tricornutum</i>	Exp	32
	Stat	46
<i>T. chui</i>	Exp	23
	Stat	-0,67

Dall'analisi dei dati di AE (%) riportati in **figura 33**, si osservano differenze significative all'interno delle stesse fasi. Nello specifico per *Thalassiosira A* in fase esponenziale che differisce significativamente dalle altre diete, visto il valore negativo ottenuto in fase di elaborazione. L'ottenimento di questo dato fa certamente pensare che qualcosa non abbia funzionato durante l'esperimento: le vongole potrebbero non essersi acclimatate a sufficienza nell'arco delle 24 ore precedenti oppure il cibo è stato fornito in quantità eccessive, precedentemente al tempo di raccolta degli esemplari. Purtroppo non è stato possibile risalire alla motivazione, ma ci si riserva di ipotizzare che questo sia un risultato poco veritiero.

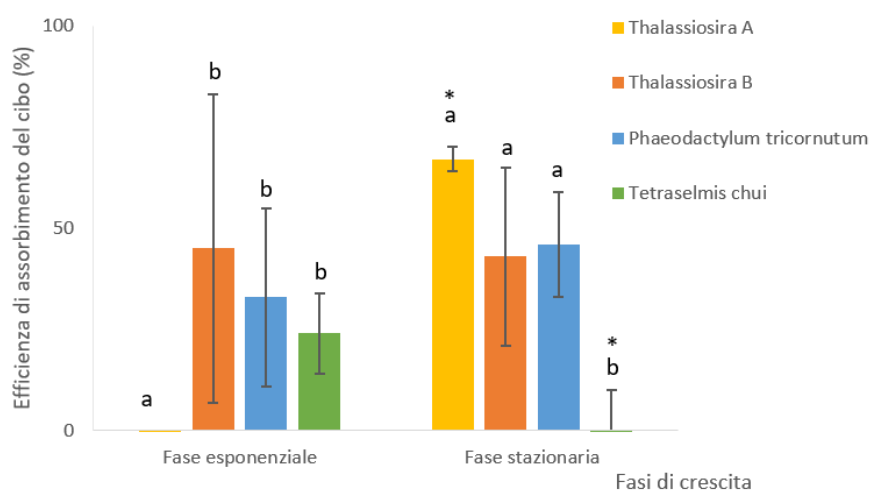


Figura 33 - Percentuali di efficienza di assorbimento del cibo da parte di novellame di *R. philippinarum*, sottoposto a diverse diete microalgali in diverse fasi di crescita. Le lettere indicano differenze significative tra diete a base di diverse microalghe nella stessa fase di crescita mentre gli asterischi (*) indicano differenze tra la stessa dieta ma in due fasi di crescita

Le vongole nutrite con dieta a base di *Thalassiosira* B (in entrambe le fasi) raggiungono buone percentuali di AE (45 e 42% nelle due fasi esponenziale e stazionaria, rispettivamente). Tuttavia, l'alta variabilità delle repliche si traduce in una deviazione standard piuttosto alta, suggerendo ulteriori approfondimenti e studi. Nonostante il tasso di *clearance* mostri valori piuttosto bassi, l'efficienza di assorbimento del cibo evidenzia buoni valori, non statisticamente differenti dalle altre microalghe (valori negativi esclusi). Da questo se ne deduce che l'alga potrebbe essere poco appetibile ma altamente digeribile. Le vongole a cui è stata somministrata dieta a base di *Thalassiosira* A in fase stazionaria invece mostrano buone percentuali di AE (67%) che ben si correla ai precedenti dati di CR e CR MAX. I molluschi alimentati con dieta a base di *T. chui* mostrano valori di CR moderati, con anche andamento opposto (ascendente, in fase stazionaria) rispetto ai quelli alimentati con diete a base di altre alghe, e valori di AE in media più bassi. In fase di sperimentazione è stata notata la produzione di pseudofeci, dovuta probabilmente ad una scarsa appetibilità dell'alga, che si è tradotta poi in un più basso valore, in media, di AE, persino negativo per le vongole alimentate con *T. chui* in fase stazionaria. I risultati in media più bassi potrebbero essere dovuti alla motilità dell'alga che presenta movimenti avvitatori con cambi rapidi di direzione che potrebbero rendere difficoltosa la filtrazione da parte dei molluschi bivalvi; inoltre, le cellule di quest'alga sono circondate da una teca di scaglie organiche fuse tra loro e questo potrebbe rendere difficoltosa l'azione degli enzimi digestivi che potrebbero non riuscire a degradarla per accedere ai composti biochimici utili all'animale (Borowitzka, 2018). A parità di numero di cellule, le dimensioni maggiori conducono ad un numero maggiore di composti carboniosi, infatti dal confronto tra il peso del materiale organico particolato misurato in tutte le alghe, *T. chui* mostra valori più alti poiché presenta dimensioni cellulari maggiori rispetto alle altre alghe (12 μm c.a.). Per quel che concerne questo studio si desume quindi che *T. chui* sia un'alga meno appetibile e meno digeribile rispetto alle altre microalghe utilizzate, ma i valori ottenuti non fanno escludere un suo potenziale utilizzo per l'allevamento di molluschi bivalvi. Non sono presenti, per quanto noto, esperimenti di *feeding* su *R. philippinarum* mediante l'utilizzo di diete a base di *T. chui*, un'alga oggetto di recente interesse nella coltivazione industriale in quanto ritenuta utile anche per l'alimentazione

umana. Diversi studi concentrano gli esperimenti di alimentazione su altre specie di molluschi bivalvi, somministrando diete a base di un'altra Chlorophyta dello stesso genere, *Tetraselmis suecica*, sia come cibo fresco sia in forma di concentrato o liofilizzato algale (Robert et al., 2001; Aji, 2011), pertanto si auspicano nuovi studi al fine di confermare o smentire i risultati preliminari ottenuti riguardanti la specie *T. chui*.

Ulteriori studi legati al tasso di *clearance*, efficienza di assorbimento del cibo e altri parametri fisiologici misurabili su questi bivalvi sono necessari al fine di implementare le conoscenze riguardo il *feeding* in ambito larvale e post-larvale in sede di allevamento. Nel frattempo, questo studio e i risultati che ne sono conseguiti risulteranno utili per l'azienda Naturedulis Srl, come guida per la scelta delle alghe da coltivare all'interno del loro schiuditoio, al fine di ottimizzare i processi di produzione e di allevamento dei molluschi.

5. Conclusioni

La coltivazione di microalghe ha acquisito grande rilevanza negli ultimi decenni grazie ai molteplici impieghi di questi organismi nei diversi settori commerciali ed economici tra i quali l'acquacoltura. L'implemento sostenibile di questa attività risulta essere fondamentale per la sicurezza alimentare globale, rappresentando un metodo sostenibile per fornire cibo nutriente alla popolazione umana, oltre che a prezzi accessibili (Willer & Aldridge, 2019). La coltivazione di microalghe a livelli industriali richiede alti costi di investimento e mantenimento, per questo è importante ottimizzare le informazioni disponibili per una scelta consapevole da parte degli acquacoltori che decidono di coltivare autonomamente il fitoplancton da fornire agli animali, poiché non tutte le specie microalgali sono ottimali per l'allevamento, la crescita e lo sviluppo larvale e post-larvale dei molluschi bivalvi.

La prima fase di questo studio ha permesso la caratterizzazione di cinque specie di microalghe, utilizzate nei successivi esperimenti di *feeding*, al fine di valutare quali fossero quelle più idonee per l'alimentazione di larve e novellame di *Ruditapes philippinarum*. Tutte le alghe hanno mostrato buoni contenuti di lipidi e acidi grassi essenziali, fondamentali per fornire ai bivalvi il giusto apporto nutrizionale per una crescita e uno sviluppo ottimali. Tuttavia, la composizione biochimica non è l'unico fattore che dev'essere preso in considerazione, poiché nell'alimentazione dei molluschi bivalvi è molto importante la dimensione cellulare del cibo che viene fornito agli animali; anche quest'ultimo fattore ha giocato un ruolo determinante nella scelta delle microalghe da somministrare. Il ceppo A di *Thalassiosira*, in particolare, possiede dimensioni cellulari che non superano i 10 μm ; inoltre ha mostrato buoni risultati in termini di sopravvivenza larvale quando somministrata con T-Iso, nel giusto rapporto. La microalga in questione mostra inoltre un buon contenuto di acidi grassi essenziali, fondamentali per la crescita e lo sviluppo ottimale dei molluschi bivalvi. I risultati ottenuti fanno supporre che questa microalga possa essere utile nell'alimentazione di questo delicato stadio del ciclo di vita di *R. philippinarum*.

La valutazione dell'efficienza alimentare di novellame di *R. philippinarum* effettuata mediante analisi dei tassi di *clearance* e di efficienza di assorbimento

del cibo, ha decretato *Thalassiosira A* in fase di crescita stazionaria come potenzialmente utile nell'alimentazione dei molluschi bivalvi della specie *R. philippinarum*: diete a base di *Thalassiosira A* mostrano alti tassi di filtrazione da parte dei bivalvi quando somministrata in fase esponenziale e stazionaria, con altrettanto alti valori di CR MAX (soprattutto in fase stazionaria). Gli alti valori di AE osservati in molluschi alimentati con diete a base di *Thalassiosira ceppo A*, confermano le ipotesi sull'utilità di quest'alga per l'attività di acquacoltura di *R. philippinarum*. Anche il ceppo B di *Thalassiosira* ha mostrato buoni valori di AE seppur valori in media più bassi, di CR: questo fa presupporre che la microalga sia ben digeribile ma non molto appetibile per questi animali. Anche *P. tricornutum* non è da escludere nell'alimentazione di novellame poiché, in fase di sperimentazione, ha mostrato buoni valori di CR e AE da parte del novellame. Inoltre *P. tricornutum* è una microalga resistente, che cresce bene anche in sistemi industriali e produce grande biomassa in tempo relativamente breve.

Le alghe somministrate ai molluschi bivalvi nel presente studio sono state analizzate in due diverse fasi di crescita perché a livello di applicabilità delle stesse, le tecniche di coltivazione possono cambiare: se si utilizza la tecnica di coltivazione semi-continua, questo consentirà di mantenere più a lungo la coltura ma si disporrà esclusivamente di microalghe in fase di crescita esponenziale poiché, all'apice della crescita, le alghe verranno raccolte e verrà aggiunto nuovo terreno. È quindi fondamentale individuare la fase di crescita ottimale a cui fornire le alghe per decidere come coltivare le alghe.

Lo sviluppo e l'implemento della pratica dell'acquacoltura sono una priorità per la società e l'economia globale, per questo ulteriori prove e studi sono necessari per implementare la mole di informazioni già presente in questo ambito. La continua ricerca di nuove specie algali e test più approfonditi sulle attuali specie disponibili e soprattutto sui molluschi bivalvi sono fondamentali per la crescita sostenibile del settore dell'acquacoltura. Il presente studio ha permesso di studiare e caratterizzare due specie autoctone della Sacca di Goro e identificarle come potenzialmente utili in mangimistica; la caratterizzazione biochimica risulta essere un fattore fondamentale nell'alimentazione dei molluschi bivalvi e diversi studi mostrano correlazioni positive tra il contenuto di lipidi e il comportamento di alimentazione degli animali (Tang et. al, 2006). Inoltre ha consentito di esplorare

gli equilibri tra appetibilità, digeribilità e alto valore nutrizionale di diverse microalghe, caratteristiche importanti per la giusta applicabilità.

Identificare le specie dei due ceppi, A e B, di *Thalassiosira* risulterà quindi una priorità. Successivamente sarà importante valutarne e monitorarne la crescita in sistemi industriali per capire se le microalghe in questione, quando coltivate in grandi sistemi come ad esempio i fotobioreattori, potranno rendere un buon quantitativo in termini di biomassa. Altre prove di *feeding* sui molluschi bivalvi alimentati con i ceppi autoctoni di *Thalassiosira* potranno essere condotte per analizzare un maggior numero di parametri fisiologici, con l'obiettivo finale del calcolo dello *Scope for Growth* (SFG) che fornisce una misura istantanea dello stato energetico di un animale e può variare da valori massimi positivi in condizioni ottimali, a valori negativi quando l'animale è fortemente stressato e utilizza le proprie riserve corporee (Widdows et al., 2006). Il presente studio si propone quindi come base indicativa per eventuali studi futuri.

6. Bibliografia

- Abbiati, M., Ceccherelli, V. U., Gamba, E., Ragazzoni, A., Castellini, A., & Ponti, M. (2017). Decline of the Manila clams stock in the northern Adriatic lagoons: A survey on ecological and socio-economic aspects. *Acta Adriatica*, 58(1), 89–104;
- Aji, L. P. (2011). The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves. *MAKARA*, Sains, 15(1), 1-9;
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., & O'Leary, S. J. B. (2019). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 309–318;
- Borowitzka, M.A., & Volcani, B.E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. Phycol.* 14, 10–21;
- Bartoli, M., Castaldelli, G., Nizzoli, D., Fano, E. A., & Viaroli, P. (2016). Manila clam introduction in the Sacca di Goro Lagoon (Northern Italy): Ecological implications. *Bull. Jap. Fish. Res. Edu. Agen.* No. 42, 43–52;
- Bhattacharjya, R., Kiran Marella, T., Tiwari, A., Saxena, A., Kumar Singh, P., & Mishra, B. (2020). Bioprospecting of marine diatoms *Thalassiosira*, *Skeletonema* and *Chaetoceros* for lipids and other value-added products. *Bioresource Technology*, 318, 124073;
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917;
- Bohlin, K. (1898). Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen. Öfversigt af Kongliga [Svenska] Vetenskademiens Förhanligar, Stockholm 54: 507-529;
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—Their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756;
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. In Levene, A., & Fleurence, J. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Academic Press, Elsevier, London, United Kingdom. 3, 23-59;
- Butcher, R.W. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I: Introduction and Chlorophyceae. *Fisheries Investigations*, London, series IV 1: 1-74, 15 pls;
- Cheng, P., Zhou, C., Chu, R., Chang, T., Xu, J., Ruan, R., Chen, P., & Yan, X. (2020). Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. *Algal Research*, 51, 102076;

- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306;
- Cleve, P.T. (1873). Examination of diatoms found on the surface of the Sea of Java. Bihang till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar 1(11): 1-13, 3 pls;
- Conover, R. J. (1966). Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 11: 338–354;
- Costa, F., Novoa, S., Ojea, J., & Martínez-Patiño, D. (2011). Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Mar. Biol.*, 158, 1829–1840;
- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*, 2: 356–358;
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350– 356;
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J.-M., & Jeffrey, S. W. (1993). Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 35(1), 155–161;
- FAO. (2020a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. doi: 10.4060/ca9229en
- FAO. (2020b). FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018. Roma. *Aquaculture production C-1*, 176;
- Fernández-Reiriz, M.J., Irisarri, J., & Labarta, U. (2016) Flexibility of Physiological Traits Underlying Inter-Individual Growth Differences in Intertidal and Subtidal Mussels *Mytilus galloprovincialis*. PLOS ONE 11(2): e0148245;
- Goldman, J. C., Porcella, D. B., Joe Middlebrooks, E., & Toerien, D. F. (1972). The effect of carbon on algal growth—Its relationship to eutrophication. *Water Research*, 6(6), 637–679;
- Guillard, R.R.L., & Ryther, J.H., (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) *Gran. Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 1–9
- Heimann, K., & Huerlimann, R. (2015). Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. *Handbook of Marine Microalgae*, 18.

- Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A., & FAO (Eds.). (2004). *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Hendriks, I. E., van Duren, L. A., & Herman, P. M. J. (2003). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 199–213. doi: 10.1016/S0022-0981(03)00323-X
- Hori, T., Norris, R. E., & Chihara, M. (1986). Studies on the Ultrastructure and Taxonomy of the Genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae) III. Subgenus *Parviselmis*. *Bot. Mag. Tokyo*, (99), 123–135
- Horner, R. A. (2002). *A Taxonomic Guide To Some Common Marine Phytoplankton*. Biopress Limited, Bristol, England. 195 pp
- Irigoien, X., Huisman, J., & Harris, R. P. (2004). Global biodiversity patterns of marine phytoplankton and zooplankton. *Nature*, 429(6994), 863–867. doi: 10.1038/nature02593
- 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), 36. doi: 10.1186/s12934-018-0879-x
- Khoo, C. G., Lam, M. K., & Lee, K. T. (2016). Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): Hydrodynamics and gas–liquid mass transfer study. *Algal Research*, 15, 65–76. doi: 10.1016/j.algal.2016.02.001
- Kim, S.-K., & Venkatesan, J. (2015). Introduction to Marine Biotechnology. In *Handbook of Marine Biotechnology*. Springer, Heidelberg Berlin. 1, 1-8;
- Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 87–134). Elsevier. doi: 10.1533/9780857098689.1.87
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M. J., & Pérez-Camacho, A. (1999). Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 238(2), 225–242. doi: 10.1016/S0022-0981(98)00171-3
- Liu, W., Pearce, C. M., Alabi A. O., & Gurney-Smith, H. (2009). Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, 293, 248–254;
- Liu, W., Gurney-Smith, H., Beerens, A., & Pearce, C. M. (2010). Effects of stocking density, algal density, and temperature on growth and survival of larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, Volume 299, Issues 1–4, pp. 99-105. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.023

- López-Elías, J. A., Voltolina, D., Enríquez-Ocaña, F., & Gallegos-Simental, G. (2005). Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery. *Aquacultural Engineering*, 33(3), 181–191. doi: 10.1016/j.aquaeng.2005.01.001
- Lora-Vilchis, M.C., & Maeda-Martínez, A.N. (1997). Ingestion and digestion index of catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research* 28: 905–910
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275
- Marquez, A., Lodeiros, C., Loo, A., Revilla, J., Da Costa, F., & Sonnenholzner, S. (2019). Microalgae diet for juveniles of *Spondylus limbatus*. *Aquaculture International*, 27(1), 323–335. doi: 10.1007/s10499-018-0327-2
- Marshall, R., McKinley, S., & Pearce, C. M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2(1), 33–55. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01022.x>
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., & Rangel-Dávalos, C. (2004). Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture*, 230(1–4), 417–423. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00416-2
- Masojídek, J., Papáček, Š., Sergejevová, M., Jirka, V., Červený, J., Kunc, J., ... Torzillo, G. (2003). A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: Basic design and performance. *Journal of Applied Phycology*, 15(2/3), 239–248. doi: 10.1023/A:1023849117102
- Milke, L. M., Bricelj, V. M., & Parrish, C. C. (2008). Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. In unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 276(1–4), 130–142. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.040
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), 113–131. doi: 10.1016/S0168-1656(01)00353-4
- Myklestad, S.M., Haug, A., & Larsen, B. (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var *Willeri* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9, 137–144
- Naira, V. R., Das, D., & Maiti, S. K. (2020). A novel bubble-driven internal mixer for improving productivities of algal biomass and biodiesel in a bubble-

column photobioreactor under natural sunlight. *Renewable Energy*, 157, 605–615. doi: 10.1016/j.renene.2020.05.079

- Nalder, T. D., Miller, M. R., & Packer, M. A. (2015). Changes in lipid class content and composition of *Isochrysis* sp. (T-Iso) grown in batch culture. *Aquaculture International*, 23(5), 1293–1312. doi: 10.1007/s10499-015-9884-9
- Ohse, S., Bianchini Derner, R., Ávila Ozório, R., Gordo Corrêa, R., Badiale Furlong, E., & Roberto Cunha, P. C. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia (Arica)*, 33(1), 93–101. doi: 10.4067/S0718-34292015000100010
- Olaizola, M., & Grewe, C. (2019). In Hallmann, A., & Rampelotto, P. H., *Grand Challenges in Algae Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing. 1, 3-34;
- Paesanti, F., & Pellizzato, M. (2000). *Tapes philippinarum*. Manuale sulla vongola verace d'allevamento. II ed., Veneto Agricoltura, Legnaro, Padova, 73 pp;
- Parke, M. (1949). Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 28: 255-288, 73 figs, 2 pls;
- Pérez-Camacho, A., Belras, R., & Albentosa, M. (1994). Effects of algal food concentration and body size on the ingestion rates of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) veliger larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 115, 87–92;
- Pernet, F., Bricelj, V. M., & Parrish, C. C. (2005). Effect of varying dietary levels of ω 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327(2), 115–133;
- Pires, J. C. M. (2015). Mass Production of Microalgae. In Kim, S.- K. *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier Science & Technology. 5, 55-68;
- Ponis, E., Probert, I., Veron, B., Mathieu, M., & Robert, R. (2006). New microalgae for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 253, 618–627;
- Prioli, G. (2008). La molluschicoltura in Italia. In A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, 12. Roma, FAO. 159–176;
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

- Raso, S., van Genugten, B., Vermuë, M., & Wijffels, R. H. (2012). Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. At low light intensity. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 863–871;
- Robert, R., Parisi, G., Rodolfi, L., Poli, B. M., & Tredici, M. R. (2001). Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 192, 333-346;
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112;
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64;
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., & Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, 160, 393–400;
- Sandrini-Neto, L. & Camargo, M.G. (2020). GAD: an R package for ANOVA designs from general principles. Available on CRAN;
- Santos-Sánchez, N. F., Valadez-Blanco, R., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., Guadarrama-Mendoza, P. C., & Salas-Coronado, R. (2016). Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(20), 8667–8684;
- Saucedo, P. E., González-Jiménez, A., Acosta-Salmón, H., Mazón-Suástegui, J. M., & Ronsón-Paulín, J. A. (2013). Nutritional value of microalgae-based diets for lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) juveniles reared at different temperatures. *Aquaculture*, 392–395, 113–119;
- Simonazzi, M. (2017). Crescita della diatomea *Phaeodactylum tricornutum* in acque reflue da impianto di digestione anaerobica. *Tesi di Laurea in Botanica Marina Applicata*;
- Simonazzi, M., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Samorì, C., & Pistocchi, R. (2019). Use of waste carbon dioxide and pre-treated liquid digestate from biogas process for *Phaeodactylum tricornutum* cultivation in photobioreactors and open ponds. *Bioresource Technology*, 292, 121921;
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. In Kim, S.- K. *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier Science & Technology. 2, 11-24;
- Steele, J. H. (1985). A comparison of terrestrial and marine ecological systems. *Nature*, 313(6001), 355–358;

- Tamayo, D., Ibarrola, I., Urrutia, M. B., & Navarro, E. (2011). The physiological basis for inter-individual growth variability in the spat of clams (*Ruditapes philippinarum*). *Aquaculture*, 321(1–2), 113–120;
- Tamayo, D., Ibarrola, I., Cigarría, J., & Navarro, E. (2015). The effect of food conditioning on feeding and growth responses to variable rations in fast and slow growing spat of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 471, 92–103;
- Tanaka, T., Muto, M., Liang, Y., Yoshino, T., & Matsunaga, T. (2015). Marine Microalgae. In *Handbook of Marine Biotechnology*. Springer, Heidelberg Berlin. 5, 51-58;
- Tang, B., Liu, B., Wang, G., Zhang, T., & Xiang, J. (2006). Effect of various algal diets and starvation on larvae growth and survival of *Meretrix meretrix*. *Aquaculture*, 254, 526-533;
- Torkildsen, L., & Magnesen, T. (2004). Hatchery Production of Scallop Larvae (*Pecten maximus*) – Survival in Different Rearing Systems. *Aquaculture International*, 12(4/5), 489–507;
- Turolla, E. (2008). La venericoltura in Italia. In A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 177–188;
- Turolla, S., Ferrari, C. R., & Lovo, S. (2019a). Monitoraggio morfologico della Sacca di Goro. In ECOSCIENZA, 6, 74;
- Turolla, E., Boffo, L., & Rossetti, E. (2019b). Venericoltura, un'eccellenza nazionale ed europea a rischio per la carenza di seme. In IL PESCE, 4, 58;
- Utermöhl, H. (1958) Zur Ver vollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Angewandte Limnologie, 9, 39;
- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., & Wangikar, P. P. (2015). Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology*, 184, 363–372;
- Velasco, L. A. (2007). Energetic physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus* fed with different microalgal diets. *Aquaculture*, 270, 299–311;
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S.-K. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. *Handbook of Marine Microalgae*, 1, 1-9;

- Whyte, J. N. C., Bourne, N., & Ginther, N. G. (1991). Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 149(1), 67–79;
- Whyte, J. N. C., Bourne, N., Ginther, N. G., & Hodgson, C. A. (1992). Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 163(1), 13–29;
- Widdows, J., & Staff, F. (2006). Biological effects of contaminants: measurement of scope for growth in mussels. *Ices techniques in marine environmental sciences*, n. 40. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark;
- Willer, D. F., & Aldridge, D. C. (2019). Microencapsulated diets to improve growth and survivorship in juvenile European flat oysters (*Ostrea edulis*). *Aquaculture*, 505, 256–262;
- Willis, A., Chiovitti, A., Dugdale, T. M., & Wetherbee, R. (2013). Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): Structure, composition, and adhesive characteristics. *Journal of Phycology*, 49(5), 937–949;
- Y. Shen, W. Yuan, Z. J. Pei, Q. Wu, & E. Mao. (2009). Microalgae Mass Production Methods. *Transactions of the ASABE*, 52(4), 1275–1287;
- Yan, X., Zhang, G., & Yang, F. (2006). Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253(1–4), 350–358.

Sitografia

Blue Growth, Unione Europea:

https://ec.europa.eu/maritimeaffairs/policy/blue_growth_it; visitato in data 17 gennaio 2021;

Definizione di “Biotecnologie”, *FAO Statement on Biotechnology*:

<http://www.fao.org/biotech/fao-statement-on-biotechnology/en/>; visitato in data 2 gennaio 2021;

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2021. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; visitato in data 9 gennaio 2021;

Naturedulis Srl: <https://sites.google.com/naturedulis.com/naturedulisbio/home>; visitato in data 5 gennaio 2021;

United Nations Decade of Ocean Science for Sustainable Development, 2021-2030: https://oceandecade.org/about?tab=our-planning#top_of_page;
visitato in data 17 gennaio 2021;

World Register of Marine Species at:
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=231750>;
visitato in data 13 gennaio 2021.