



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale  
Biologia Marina**

---

**POTENZIALI IMPATTI DELLA TECNOLOGIA DI ACCRESCIMENTO  
MINERALE SU ORGANISMI MARINI**

**POTENTIAL IMPACTS OF THE MINERAL ACCRETION  
TECHNOLOGY ON MARINE ORGANISMS**

Tesi di Laurea Magistrale  
di:

**Nicola Simoncini**

Relatore:

Chiar.mo Prof

**Antonio Dell'Anno**

Correlatori:

Chiar.mo Prof

**Francesco Regoli**

Dott.ssa

**Marica Mezzelani**

Sessione estiva

Anno Accademico 2019/2020



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Il problema gestionale delle piattaforme a fine vita.....	1
1.2 Principi del processo di deposizione minerale per via elettrolitica.....	5
1.3 Evoluzione della tecnologia di accrescimento minerale.....	9
1.4 Potenziali effetti avversi dell'elettrodeposizione negli organismi marini e approccio ecotossicologico.....	14
<b>2. OBIETTIVI.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>22</b>
3.1 Allestimento del sistema sperimentale per la valutazione della performance della tecnologia di accrescimento minerale.....	22
3.1.1 Curve potenziodinamiche.....	24
3.1.2 Prove di accrescimento minerale in condizioni potenziostatiche.....	25
3.1.3 Preparazione dei campioni per l'analisi dei minerali depositati.....	26
3.1.4 Analisi dei depositi tramite spettrofotometria FTIR.....	26
3.1.5 Analisi XRD.....	27
3.1.6 Analisi SEM-EDX.....	27
3.2 Effetti dell'esposizione alla tecnologia di accrescimento minerale nel mitilo Mediterraneo <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	28
3.2.1 Parametri elettrici e analisi dell'accrescimento calcareo.....	30
3.2.2 Analisi dei parametri chimico-fisici nell'acqua.....	31
3.2.3 Analisi delle risposte biologiche in <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	37
3.2.4 Analisi statistica.....	46
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>47</b>
4.1 Mappatura della cella elettrochimica – Potenziodinamica.....	47
4.2 Prove di accrescimento minerale in condizioni potenziostatiche.....	49
4.3 Caratterizzazione degli accrescimenti minerali ottenuti.....	53

4.4	Caratterizzazione dell'accrescimento minerale ottenuto durante le sperimentazioni con <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	57
4.5	Parametri chimico-fisici dell'acqua e risposte biologiche in <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	58
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIONI</b> .....	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>72</b>

## 1. INTRODUZIONE

### *1.1 Il problema gestionale delle piattaforme offshore a fine vita*

Attualmente, a livello globale esistono oltre 7500 piattaforme offshore oil & gas di cui una parte considerevole non sarà più produttiva nei prossimi anni e pertanto richiederà azioni gestionali che da un lato minimizzino l'impatto ambientale e dall'altra siano in linea con quanto richiesto dalle varie normative nazionali ed internazionali (Leporini et al. 2019). La maggior parte delle nazioni richiede la completa rimozione delle strutture obsolete (e.g., Geneva Convention 12 August 1949; United Nations Convention on the Law of the Sea -UNCLOS; OSPAR Convention 1998), pratica che presenta notevoli sfide ed è stimata costare all'industria petrolifera decine di miliardi di dollari. Le politiche di rimozione completa sono basate sull'assunto che "lasciare il fondo marino come viene trovato" rappresenti l'opzione ecologicamente più vantaggiosa. Tuttavia, le piattaforme sono in grado di supportare comunità marine abbondanti e diversificate durante la loro vita produttiva, comprese comunità di rilevanza regionale. Ad esempio, piattaforme nel Golfo del Messico, sostengono attività di pesca del dentice americano e piattaforme al largo della California sostengono popolazioni giovanili di scorfani appartenenti a specie in declino. In altri casi, le piattaforme possono fornire rifugi per specie (comprese specie sovra- sfruttate e in pericolo) nonché habitat che garantiscono la connettività delle popolazioni, come per i coralli di acque fredde

nell'Atlantico settentrionale. Pertanto, è improbabile che la rimozione di tali strutture rappresenti la migliore soluzione da un punto di vista ambientale ed ecologico e questa consapevolezza ha portato alcune nazioni a lasciare le strutture obsolete come “scogliere artificiali” o a trovare soluzioni alternative per il loro riutilizzo sostenibile. Anche il Mar Adriatico è stato negli ultimi 50 anni un bacino estremamente sfruttato dal punto di vista energetico, soprattutto per l'estrazione di gas naturale. In poco più di 50 anni sono state installate circa 90 piattaforme per l'estrazione di metano localizzate principalmente nella parte centro-settentrionale del bacino Adriatico. Circa 30 di tali strutture sono già o stanno per essere non più produttive, ponendo quesiti gestionali sul loro destino alquanto complessi da un punto di vista tecnico, economico, sociale ed ambientale. Infatti, le operazioni di rimozione completa di tali strutture installate a mare, secondo il principio di lasciare il fondale marino così come era prima della costruzione, hanno costi elevati e possono determinare significativi impatti ecologici (Day & Gusmita, 2016; Sommer et al., 2018). Ciò sta orientando sempre più la ricerca applicata a trovare soluzioni alternative alla rimozione totale delle piattaforme offshore, attraverso il loro riutilizzo per la produzione di energia rinnovabile (e.g. produzione dell'energia da onda, energia solare e/o energia eolica) o per l'acquacoltura offshore (e.g., MAREenergy, MERMAID, SDWED, THESEUS, MUSES). In particolare, l'acquacoltura si sta sempre più orientando verso l'utilizzo di sistemi integrati multitrofici di allevamento (Quevedo et al., 2013), al fine da un lato di minimizzare

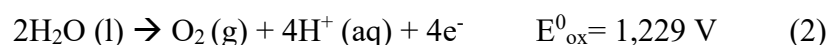
l'impatto ambientale dei sistemi tradizionali monocolturali e dall'altro diversificare e massimizzare il prodotto allevato. L'utilizzo di questi sistemi potrebbe aumentare la sostenibilità dell'acquacoltura offshore (Chopin et al., 2001; Neori et al., 2004; FAO, 2006; Buchholz et al., 2012; Ferreira J.G. et al., 2012) ma ad oggi non sono presenti sistemi IMTA offshore su scala commerciale e sono necessari ulteriori studi sulla fattibilità di tali sistemi in strutture a mare aperto (Buck B.H. et al., 2018). Questa visione di utilizzo multiplo di piattaforme offshore (multiple use platform, MUP) rispecchia a pieno le attuali politiche rivolte alla salvaguardia del mare e al suo sfruttamento sostenibile (Blue Growth Strategy) e inoltre segue il principio dell'economia circolare, un altro punto fondamentale delle più recenti politiche economiche della UE. La conversione delle piattaforme esistenti, tuttavia, richiede una solidità strutturale che queste potrebbero non avere poichè in molti casi si supererebbe la durabilità della struttura stessa (Sedlar et al. 2019). Una delle maggiori sfide tecnologiche per il riutilizzo delle piattaforme offshore, nell'ottica di una nuova economia ecosostenibile, è quella di estendere la loro "vita" proteggendo le strutture dalla corrosione e migliorando la loro resistenza strutturale. In quest'ottica la tecnologia di accrescimento minerale mediante elettrolisi a bassa tensione di acqua marina, originariamente inventata da W. Hilbertz, che prevede la formazione di un deposito calcareo al di sopra delle strutture metalliche della parte sommersa delle piattaforme, potrebbe rappresentare una soluzione per proteggerle dalla corrosione e quindi estenderne la loro durabilità strutturale.

Questa tecnologia ha, inoltre, il potenziale di formare un substrato a sostegno della vita marina attraverso la creazione di "eco-barriere artificiali", favorendo colonizzazione e riproduzione di organismi sessili e attirando numerose specie di pesci, con potenziali benefici per l'industria della pesca tramite il recupero di stock ittici impoveriti. Negli ultimi anni questa tecnologia è stata utilizzata per il recupero di barriere coralline degradate in paesi tropicali (Biorock ®), ma non è ancora stata applicata a nessuna piattaforma offshore e mai testata in acque del Mar Adriatico. Recenti sperimentazioni effettuate sia in laboratorio sia *in-situ* nel Mare del Nord hanno dimostrato la possibilità di utilizzare questa tecnologia con successo anche in ambienti con elevate variazioni del regime termico (Margheretini et al., 2020), lasciando ipotizzare una sua valenza applicativa anche nel contesto del Mare Adriatico. Tuttavia, accanto ad una valutazione della performance del processo di accrescimento minerale in Mare Adriatico, è necessario ottenere informazioni sui potenziali effetti biologici non solo per quanto riguarda specie selvatiche ma anche per quanto riguarda specie potenzialmente da allevare in aree offshore in un sistema di acquacoltura multitrofica tra cui *Mytilus galloprovincialis* (organismo filtratore), dato il grande potenziale economico di questa specie nel Mar Adriatico, la facile reperibilità ed il loro utilizzo come indicatore biologico di qualità ambientale. (Goldberg et al., 1978, Regoli et al., 2011; Benedetti et al., 2012; Regoli et al., 2014).

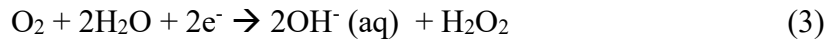


## *1.2 Principi del processo di deposizione minerale per via elettrolitica*

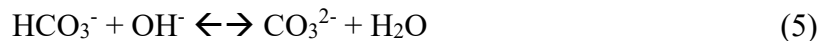
La deposizione di minerali di sopra di un elettrodo mediante elettrolisi di acqua di mare fu per la prima volta provata da Micheal Faraday nel 1833 in uno dei suoi numerosi esperimenti sull'elettrolisi che furono la base della formulazione della prima legge sull'elettrolisi. Fu, tuttavia, G.C. Cox che comprese l'importanza di questo fenomeno e lo applicò come un innovativo metodo di protezione contro la corrosione di superfici metalliche immerse in acqua di mare. In particolare, l'applicazione di una corrente elettrica diretta tra due elettrodi andava a formare un rivestimento protettivo nei confronti del catodo, costituito principalmente da minerali Calcio e Magnesio; questo rivestimento aveva il vantaggio di poter essere riformato ogni volta che veniva a degradarsi, ristabilendo il passaggio della corrente elettrica (U.S. Patent No. 2 200 469 (1940); U.S Patent No. 2 417 064 (1947) G. C. Cox). Costruendo una cella elettrochimica e cioè immergendo in una vasca con acqua di mare due elettrodi (catodo e anodo) a cui viene applicata una differenza di potenziale minima di 1.23 V (elettrolisi dell'acqua) si hanno le seguenti semi-reazioni al catodo (1) e all'anodo (2):



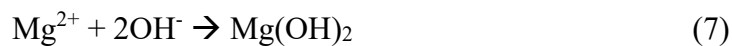
Generalmente la reazione di riduzione dell'ossigeno (1), al catodo, avviene attraverso due processi chimici consecutivi:



Come descritto dalle reazioni (1) (3) (4) si ha una produzione localizzata di ioni ossidrili che aumentano il pH della soluzione (acqua di mare) nella zona più prossima al catodo, creando un ambiente locale alcalino e riducente. Ciò va ad influire nell'equilibrio sull'equilibrio fra le concentrazioni di bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (5); in presenza di ioni Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), naturalmente contenuti in acqua, il carbonato tende a legarsi ad essi ed a precipitare sulla superficie catodica sottoforma di Carbonato di Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (6):



La presenza degli ioni Magnesio disciolti in acqua di mare in maggiore proporzione rispetto al Calcio (Tabella 1), però, non permette una precipitazione selettiva del Carbonato di Calcio che si trova così a competere con la precipitazione del Magnesio sottoforma di Idrossido di Magnesio ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) secondo la reazione (7):

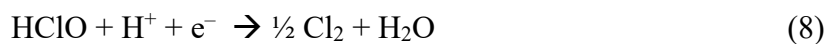


**Table 1. Major ion composition of seawater (mg/L)**

Constituent	Typical seawater	Eastern Mediterranean	Arabian Gulf at Kuwait	Red Sea at Jeddah
Chloride (Cl <sup>-1</sup> )	18,980	21,200	23,000	22,219
Sodium (Na <sup>+1</sup> )	10,556	11,800	15,850	14,255
Sulfate (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	2,649	2,950	3,200	3,078
Magnesium (Mg <sup>+2</sup> )	1,262	1,403	1,765	742
Calcium (Ca <sup>+2</sup> )	400	423	500	225
Potassium (K <sup>+1</sup> )	380	463	460	210
Bicarbonate (HCO <sub>3</sub> <sup>-1</sup> )	140	—	142	146
Strontium (Sr <sup>+2</sup> )	13	—	—	—
Bromide (Br <sup>-1</sup> )	65	155	80	72
Borates (BO <sub>3</sub> <sup>-3</sup> )	26	72	—	—
Fluoride (F <sup>-1</sup> )	1	—	—	—
Silicate (SiO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> )	1	—	1.5	—
Iodide (I <sup>-1</sup> )	<1	2	—	—
Others	1	—	—	—
Total dissolved solids	34,483	38,600	45,000	41,000

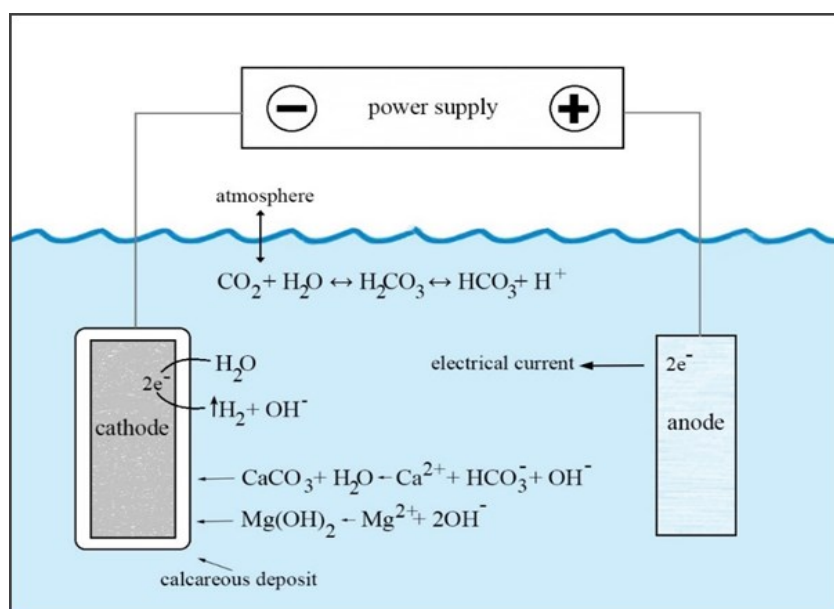
**Tabella 1:** composizione ionica dell'acqua di mare (mg/L)

Sulla superficie dell'anodo, a controbilanciare le semi-reazioni di riduzione si hanno delle reazioni di ossidazione con sviluppo di Ipoclorito (ClO<sup>-</sup>) e, di conseguenza, di Cloro gassoso (Cl<sub>2</sub>) (8) (9):



Il risultato finale dopo l'applicazione del campo elettrico (e lo svolgersi delle reazione precedentemente illustrate) è quella della formazione, al di sopra di una superficie soggetta a corrosione e quindi "arrugginibile", di uno strato minerale formato da carbonato di calcio e da idrossido di magnesio. Questo metodo di protezione delle superfici ossidabili fu pensato da Cox principalmente per le parti metalliche delle navi o per la superficie interna di vasche che spesso andavano

incontro a deterioramento. Gli esperimenti effettuati in questo ambito hanno mostrato inoltre come un aumento della densità di corrente applicata dopo la formazione dello strato protettivo portava all'accrescimento di uno strato friabile e soggetto a "flaking", suggerendo che l'intensità della corrente e le condizioni imposte durante la polarizzazione potessero influenzare il rapporto calcio/magnesio all'interno del rivestimento minerale protettivo.



**Figura 1:** Principali reazioni chimiche nella cella elettrolitica durante la polarizzazione

### *1.3 Evoluzione della tecnologia di accrescimento minerale*

Sebbene la tecnologia di elettrodeposizione di minerali in acqua di mare è stata per molto tempo legata alla protezione catodica e quindi alla possibilità di prevenire (o di rallentare) l'arrugginimento delle superfici metalliche esposte, nel corso degli anni sono state sperimentate numerose applicazioni di questo processo anche in altri ambiti. L'architetto Wolf H. Hilbertz vedeva in questa tecnologia un ottimo metodo per la creazione di componenti per la costruzione di edifici. Le sperimentazioni da lui effettuate hanno permesso di comprendere come, innanzitutto, la variazione della corrente elettrica impressa alla cella elettrolitica inevitabilmente cambiava la composizione del materiale accresciuto. In particolare, la deposizione ottenuta con un tasso di accrescimento maggiore (per cui una deposizione più veloce) aveva una percentuale predominante di idrossido di Magnesio sotto forma di brucite, un minerale poco più duro del talco e del gesso (2.5 Mohs); una deposizione ottenuta invece con un tasso di accrescimento minore (deposizione più lenta nel tempo) presentava una proporzione maggiore di carbonato di Calcio rispetto alla brucite, in forma di aragonite, un minerale più duro (4 Mohs), capace di conferire al materiale accresciuto una resistenza alla pressione tale da poter essere utilizzato come componente di costruzione. Dato che la velocità dell'accrescimento dello strato minerale aumenta all'aumentare della densità di corrente impressa sulla cella, l'applicazione di un voltaggio minore, sebbene rallenti la crescita del deposito è da

preferire poichè permette la formazione di uno strato minerale più resistente. Il processo elettrolitico, quindi, può essere utilizzato per una precipitazione selettiva su superfici idonee. Sono stati proposti tre possibili metodi per l'accrescimento del materiale sul catodo: 1) gradienti di concentrazione, 2) attrazione ionica e 3) la migrazione elettrica, e, sebbene i gradienti di concentrazione sono molto probabilmente causa dell'accrescimento, la combinazione dei tre metodi non può essere esclusa. In aggiunta all'attrazione di ioni, l'elettrolisi dell'acqua di mare produce anche calore sulla superficie degli elettrodi. La resistenza è massima su queste superfici; la temperatura quindi aumenta e di conseguenza anche il pH. All'inizio, la decomposizione termica rimuove l'acido carbonico ( $H_2CO_3$ ) permettendo all'anidride carbonica ( $CO_2$ ) di uscire, causando lo spostamento dell'equilibrio acido carbonico-carbonato verso il carbonato. L'aumento della concentrazione del carbonato, con l'aumento della temperatura e della salinità, aumenta il prodotto ionico dei cristalli di carbonato di calcio inducendo la precipitazione. Tuttavia, man a mano che la soluzione diventa più alcalina nelle vicinanze del catodo ( $pH > 9$ ) il prodotto ionico dell'idrossido di magnesio supera il prodotto di solubilità, per cui anche la brucite precipita con il carbonato di calcio. (Hilbertz, 1979; Hilbertz, 1984).

L'interesse di Hilbertz non si è fermato solamente alla fruibilità di questa tecnologia come strumento per l'accrescimento di minerali utili in campo edile, ma è stato di più ampio interesse ecologico. Le sue sperimentazioni, infatti, hanno coinvolto

anche l'ambiente marino e la possibilità di utilizzo di strutture sommerse elettrificate che potessero promuovere l'accrescimento di organismi marini sessili e fornire protezione alle popolazioni di pesci, così come avviene nelle barriere coralline naturali. L'immersione e la successiva elettrificazione di queste strutture ha mostrato come il numero di individui e di specie di pesci all'interno della struttura aumentasse sia dopo 4 mesi sia dopo 15 mesi dall'immersione, rispetto a delle strutture controllo non elettrificate poste nelle vicinanze. Inoltre è stato notato come il campo elettrico passante tra l'anodo e la struttura (catodo) non influenzasse negativamente le popolazioni di pesci all'interno della struttura né avesse un effetto negativo sulla crescita di alghe, che si sono sviluppate sia sulla struttura elettrificata sia sulla struttura di controllo. Il grande vantaggio di questo metodo rispetto ai metodi più tradizionali di costruzione di barriere artificiali (come l'affondamento di navi o la costruzione di blocchi in cemento) riguarda la possibilità di riparazione in situ della struttura, che necessita solamente del passaggio di corrente per la rigenerazione dello strato depositato, riducendo i costi di trasporto e manutenzione (Hilbertz (1979), Hilbertz (1984)). La sperimentazione su questo fronte si è sviluppata rapidamente, in concomitanza con il progresso delle tecnologie per la raccolta dell'energia e con il crescente bisogno della preservazione delle barriere coralline, in continuo declino a causa del "bleaching", della pesca intensiva e dall'aumento della forza e della ricorrenza di uragani e tempeste tropicali. Hilbertz trovava la mineralizzazione biogenica operata da organismi tipici della barriera

corallina (coralli duri) e dei molluschi molto simile a ciò che accadeva nelle strutture elettrificate durante l'accrescimento dello strato calcareo. Per questo motivo propose l'utilizzo di queste barriere artificiali non solo come struttura di riparo e di protezione ma anche come metodo di "ripristino delle barriere coralline, creando così un substrato idoneo e stimolante per la crescita ed il mantenimento delle varie componenti biogeniche che compongono il reef. In quest'ottica si è utilizzato un ramo di *Acropora palmata* successivamente ricoperto da una rete metallica (catodo) collegata ad una cella fotovoltaica esterna e ad un anodo. L'elettrificazione ha portato alla crescita di materiale calcareo attorno al ramo del corallo fino a racchiuderlo completamente, e dopo 15 giorni, il corallo ha iniziato a colonizzare parte del materiale accresciuto, dimostrando quindi che la bassa densità di corrente applicata non influiva negativamente sulla crescita del corallo. La mancanza di un esperimento di controllo e quindi di un confronto con il tasso di crescita del corallo in un altro ambiente non elettrificato non ha permesso di determinare, però, se la crescita del corallo fosse effettivamente stimolata dall'elettrificazione e dal conseguente accrescimento minerale (Hilbertz 1991; Hilbertz & Goreau 1996).

La tecnologia dell'elettrodeposizione nel corso del tempo ha assunto un significato sempre più marcato per il ripristino di ecosistemi ed habitat degradati, come dimostrato dai numerosi reef artificiali elettrificati che sono attualmente presenti in molte zone tropicali del pianeta. Molti esperimenti hanno dimostrato come questa



tecnologia di accrescimento minerale promuova la crescita di frammenti di corallo con tassi di crescita anche molto più elevati rispetto alla crescita naturale osservata in strutture non elettrificate (Goreau & Hilbertz, 2005). In alcuni esperimenti tuttavia la crescita del corallo è stata osservata solamente durante periodi di non elettrificazione delle strutture catodiche o, in alcuni casi, addirittura si è osservata una mortalità più elevata dei frammenti durante l'elettrificazione (Schumacher et al, 2000 ; Sabater et al., 2002; Sabater. et al., 2004). I risultati negativi di questi esperimenti sono da considerarsi le conseguenze di errori nel disegno sperimentale secondo l'inventore T.J. Goreau, dovuti spesso al posizionamento dell'anodo (fonte di sviluppo di cloro gassoso, deleterio per gli organismi marini) o alla errata regolazione della densità corrente elettrica applicata, spesso troppo alta per assicurare un corretto sviluppo dei coralli (Goreau, 2014). Le indagini sulla performance di questa tecnologia non si sono fermati solamente agli organismi di ambiente tropicale: l'applicazione di una bassa densità di corrente su frammenti di *Lophelia perthus* (corallo tipico di ambienti freddi) in laboratorio ha dimostrato che il numero di calici negli individui trattati è aumentato in modo significativo, aprendo alla possibilità di utilizzo di questa tecnologia anche in ambiente freddo (S. M. Strömberg et al., 2010). Sebbene la maggior parte della letteratura riguardante l'utilizzo dell'accrescimento minerale in ambiente marino sia in relazione ai coralli, alcuni studi hanno indagato l'utilizzo di questa tecnologia anche su altri organismi calcificanti, come i molluschi bivalvi. In un esperimento biennale

l'elettificazione a basso voltaggio di strutture con individui di *Crassostrea virginica* ha determinato una crescita significativamente più veloce delle ostriche e una minore mortalità delle stesse rispetto ad un controllo non elettrificato, dimostrando la possibilità di utilizzo del sistema di accrescimento minerale per il restauro di banchi di ostriche, particolarmente importanti in ambiente estuarino (Berger al., 2012). In un altro studio sulla specie *Pinctada maxima*, ostrica di interesse commerciale per la produzione di perle, l'elettificazione a basso voltaggio ha determinato un tasso di crescita ed una sopravvivenza maggiore degli individui trattati rispetto ad individui controllo, determinando quindi anche un uso più strettamente commerciale della tecnologia descritta.

#### *1.4 Potenziali effetti avversi dell'elettrodeposizione negli organismi marini e l'approccio ecotossicologico.*

Sebbene la tecnologia di accrescimento minerale venga considerata come una possibile soluzione anche per il ripristino ambientale, è necessario da un lato approfondire aspetti sulla sua performance in contesti ambientali differenti e dall'altro valutare i potenziali impatti ecologici e biologici. Infatti, i cambiamenti della chimica dei carbonati e la produzione di ipoclorito e cloro gassoso potrebbero determinare effetti dannosi e dei quali ancora poco si conosce. A tale proposito, diversi studi hanno evidenziato che ipoclorito e cloro gassoso essendo composti

ossidanti possono determinare effetti su diverse componenti biologiche marine sia attraverso il loro potere ossidante sia attraverso la formazione di altri composti ossidanti (e.g., ipobromito) e/o di composti organo-alogenati che si vengono a formare dall'ossidazione della materia organica presente in acqua per sostituzione di atomi di idrogeno con atomi di alogeno (Taylor 2006). Data la novità dell'applicazione di questa tecnologia in Mar Adriatico, in letteratura non ci sono studi che abbiano effettivamente testato il possibile impatto che questa possa avere sulla componente biologica sia selvatica che allevata e si è reso dunque necessario valutare i possibili effetti sugli organismi marini. L'approccio ecotossicologico è risultato il più adeguato nella valutazione di potenziali rischi dell'utilizzo di questa nuova tecnologia poichè si basa sull'integrazione di diversi tipi di informazioni: analisi chimiche del comparto abiotico, indagini sul tasso di bioaccumulo e valutazione delle alterazioni biologiche condotte sugli organismi bioindicatori. Un organismo indicatore per essere ritenuto tale deve rispettare determinate caratteristiche:

1. Deve essere ampiamente distribuito geograficamente;
2. Facile da reperire in ambiente marino;
3. Stazionario e rappresentativo dell'ambiente in cui abita;
4. Resistente agli stress;
5. Non deve presentare meccanismi di regolazione per i contaminanti e quindi deve permettere la valutazione delle concentrazioni di tali molecole nei tessuti;

6. Deve avere un ciclo vitale abbastanza lungo da permettere il confronto di organismi in stadi vitali differenti;

I molluschi bivalvi del genere *Mytilus* sono il gruppo che, più di altri, soddisfano queste caratteristiche e per tale motivo sono ampiamente utilizzati. (Regoli, 2001).

L'analisi di organismi bioindicatori è importante per valutare la presenza di contaminanti ambientali ma anche l'insorgenza di alterazioni biologiche tramite l'utilizzo dei cosiddetti biomarker (Tabella 2). La loro caratterizzazione e il loro

Biomarkers di risposta specifica a classi di inquinanti	Metallotioneine Proliferazione perossisomiale Acetilcolinesterasi
Biomarkers di disturbo ossidativo	Catalasi Glutazione s-trasferasi Glutazione reduttasi Glutazione totale Glutazione perossidasi Capacità antiossidante totale
Biomarkers di alterazioni lisosomiale e di perossidazione lipidica	Destabilizzazione delle membrane lisosomiali Accumulo di lipofuscina Livelli di malonaldeide Accumulo di lipidi neutri
Biomarkers di danno genotossico	Frequenza dei micronuclei

**Tabella 2.** Classificazione delle principali risposte biologiche usate come biomarker

utilizzo si basa essenzialmente sulla conoscenza degli effetti indotti a livello molecolare da molte classi di contaminanti una volta entrate a contatto con gli organismi, effetti che possono andare dall'attivazione di specifici meccanismi di detossificazione all'insorgenza di varie alterazioni indicative di una qualche forma di tossicità. E' dunque necessario esaminare una batteria di biomarker per avere un quadro completo e attendibile. Uno dei vantaggi principali nell'uso dei biomarker consiste nella rapidità e nella sensibilità delle risposte e nella possibilità di evidenziare precocemente l'insorgenza di condizioni di disturbo ambientale prima che queste possano trasmettersi ai livelli successivi (comunità o popolazione) (Regoli, 2001). L'attività dell'acetilcolinesterasi e la proliferazione perossisomiale vengono misurate come tipiche risposte biologiche indotte dalla presenza dei metalli pesanti o di diverse forme di contaminazione organica. L'acetilcolinesterasi rappresenta un enzima fondamentale del sistema nervoso centrale di vertebrati ed invertebrati, e, sebbene la sua inibizione venga comunemente associata alla presenza di composti organofosforici e carbammati è stato dimostrato che altri elementi chimici e parametri ambientali possono modularne l'attività (Najimiet al., 1997; Dellai et al., 2001; Dailians et al., 2003; Frasco et al., 2005). I perossisomi sono organelli cellulari coinvolti nel metabolismo dei lipidi e la loro proliferazione causata da composti organici xenobiotici è di particolare interesse nei mitili, dove invece la risposta di biotrasformazione del citocromo p450 è molto limitata (Cajaraville et al., 2000; Bocchetti e Regoli, 2006). Nei fenomeni di insorgenza di

tossicità un importante ruolo svolto dai contaminanti metallici e organici è quello di aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano le cellule. L'azione tossica delle specie reattive dell'ossigeno viene normalmente contrastata dall'attività degli antiossidanti; le modificazioni dell'attività o dei livelli di queste molecole vengono proposte come biomarkers di contaminazione mediata da condizioni pro ossidanti. Questo tipo di molecole include: la superossido dismutasi, le glutazione perossidasi, la catalasi, la glutazione reduttasi, le glutazione S-transferasi e i livelli di glutazione totale. La caratterizzazione dei singoli antiossidanti può essere integrata con lo studio della capacità antiossidante totale (TOSC) che misura la capacità complessiva dell'intero sistema antiossidante di neutralizzare varie forme di specie reattive dell'ossigeno come radicali perossilici  $ROO\bullet$  o idrossilici  $\bullet OH$  (Winston et., 1998; Regoli e Winston 1999; Gorbi e Regoli, 2003). La compromissione della capacità di neutralizzare i ROS può anticipare l'insorgenza di danni cellulari evidenziabili come incremento di alterazioni cellulari e danni genotossici (Frenzilli et al., 2001; Gorbi e Regoli, 2003; Regoli et al., 2004). Anche le alterazioni a carico dei lisosomi sono ampiamente riconosciute come un biomarker di disturbo ossidativo e chimico (Moore et. al , 2006). Questi organelli sono estremamente sviluppati sia nei tessuti digestivi che negli emociti, dove sono implicati nei processi fondamentali di digestione intracellulare del cibo, degradazione di componenti cellulari durante il turnover autofagico, sequestro e detossificazione di xenobiotici e risposte immunitarie (Moore 1982; Cajaville et

al., 1995). Nei mitili la stabilità delle membrane lisosomiali, il rapporto granulociti/ialinociti e la capacità di fagocitosi analizzati negli emociti dei mitili sono utilizzati come biomarker di risposta immunitaria poichè il comparto emocitario risulta essere direttamente coinvolto nell'attività immunitaria, soprattutto i granulociti, che negli invertebrati sono importanti per il processo di fagocitosi (Carballal et al., 1997; Giulianini et al., 2003) mentre gli ialinociti presentano caratteristiche di cellule indifferenziate che potrebbero essere coinvolte nella coagulazione (García et al., 2008). Inoltre, l'accumulo di lipofuscina e di lipidi neutri nei lisosomi terziari vengono generalmente analizzati per valutare l'intensità dei processi di perossidazione lipidica e lipidosi mediata da xenobiotici (Moore, 1988; Regoli, 1992; Regoli et al., 2004). Infine alcuni inquinanti arrivano ad esercitare azione tossica agli acidi nucleici. Uno dei biomarker di danno genotossico più utilizzati è la quantità di rotture presenti lungo la doppia elica di DNA tramite il "Test della Cometa". Le rotture del DNA che si formano in condizioni fisiologiche vengono generalmente riparate dai sistemi enzimatici preposti. Tuttavia, nel caso in cui questi sistemi risultino essere danneggiati dalla presenza di inquinanti o la loro azione risulti non essere più efficace, si verifica un accumulo delle rotture del DNA. Ciò provoca conseguenze nel ciclo vitale della cellula come una scorretta segregazione del materiale genetico durante la riproduzione cellulare e la formazione di micronuclei (MN) che risultano dalla

formazione di aneuploidie o da frammenti di interi cromosomi che si originano durante la divisione cellulare (Venier et al., 1997; Nigro et al., 2006).



## 2. OBIETTIVI

In questo studio, sono state condotte specifiche sperimentazioni con acqua di mare prelevata in Adriatico al fine di valutare l'efficienza della tecnologia di accrescimento minerale, nell'ottica di una potenziale applicazione per la protezione di strutture metalliche tra cui la parte sommersa di piattaforme estrattive offshore a fine vita. Inoltre, al fine di implementare le conoscenze sui potenziali effetti di tale tecnologia sugli organismi marini sono state condotte specifiche sperimentazioni utilizzando *Mytilus galloprovincialis* come specie modello. In particolare sono state studiate le condizioni di processo necessarie all'ottenimento di un deposito minerale sufficientemente resistente, in relazione ad una serie di fattori che ne potrebbero condizionare la performance (e.g. geometria della cella elettrolitica, potenziale applicato, condizioni statiche vs. dinamiche dell'acqua di mare utilizzata).

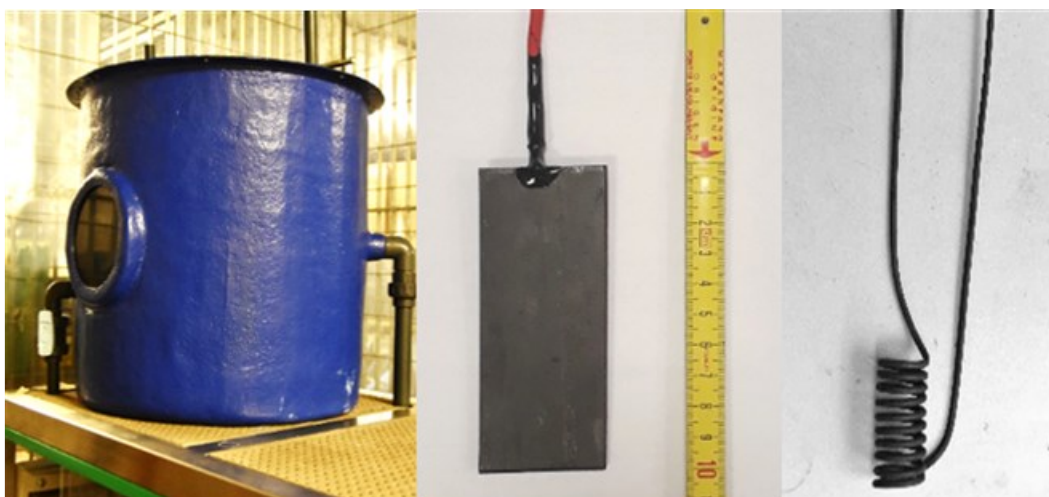
Inoltre sono stati determinati i potenziali effetti indotti dall'applicazione della tecnologia di accrescimento minerale su individui di *Mytilus galloprovincialis* sui quali sono state condotte analisi di diversi parametri di risposta immunitaria e lisosomiale, risposte istologiche sull'accumulo di lipofuscina e di lipidi neutri, marker di proliferazione perossisomiale e di neurotossicità, parametri di stress ossidativo e marker di danno genotossico.

### 3 MATERIALI E METODI

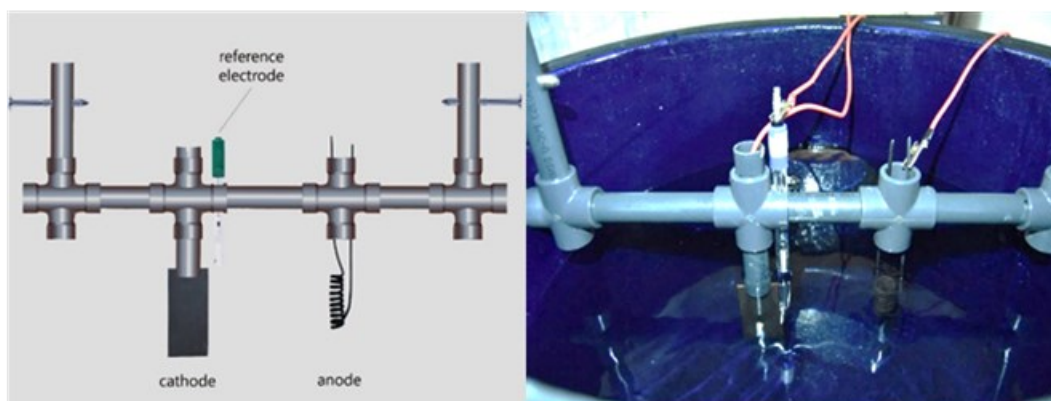
#### *3.1 Allestimento del sistema sperimentale per la valutazione della performance della tecnologia di accrescimento minerale*

Le sperimentazioni di deposizione minerale sono state effettuate utilizzando una vasca di sezione circolare in vetroresina ( $\varnothing$  interno = 51.5 cm, H = 51 cm) con una capacità di circa 80 L (Figura 2 a). Per ogni esperimento la vasca è stata riempita con acqua di mare naturale prelevata in Mare Adriatico, nella zona di Ancona (43°36'39.83"N 13°28'53.47"E). La vasca è stata collegata tramite un sistema di condutture ad una pompa (Bonato & Veronesi) per la movimentazione dell'acqua al suo interno. Il sistema è stato inoltre condizionato (TECO Seachill TK2000) per il mantenimento costante della temperatura dell'acqua. La cella elettrochimica utilizzata era costituita da un catodo sotto forma di una lamina in acciaio al carbonio delle dimensioni di 10×4×0.4 cm e da un anodo costituito da una spirale di titanio attivato (Figura 2 b). La distanza tra anodo e catodo era di 13 cm. Tra anodo e catodo era presente un elettrodo di riferimento a calomelano saturo (SCE). Le lamine in acciaio sono state forate ad una estremità del lato corto ( $\varnothing$  = 4mm) per il passaggio di un cavo elettrico siliconico collegato ad un potenziostato. Il cavo elettrico è stato saldato a stagno sul foro e successivamente ricoperto da una resina epossidica bicomponente (Marinflex 2310 T.F.-R.P) isolando il contatto elettrico dall'acqua (Figura 2 c). Nella vasca è stato montato un supporto in PVC per il

sostegno degli elettrodi necessari ai vari esperimenti. La lunghezza del supporto è di circa 51 cm in modo tale da poter essere inserito all'interno della vasca e limitare eventuali turbolenze o spostamenti derivanti dalla movimentazione dell'acqua (Figura 3 a-b). Al lato della vasca è stato collegato un potenziostato (AMEL modello 2049) che permette di operare sia in modalità potenziostatica (controllo del potenziale applicato al catodo) sia in modalità galvanostatica (controllo della corrente passante tra catodo e anodo) per effettuare gli esperimenti prefissando la differenza di potenziale della cella e/o i valori di corrente impressa. Per registrare i valori in uscita dal potenziostato è stato collegato un sistema di acquisizione (Agilent Data Switching Unit mod. 34970) al potenziostato e ad un PC attraverso una porta USB. Successivamente i dati raccolti sono stati elaborati mediante Excel.



**Figura 2 :** Vasca in vetroresina per l'alloggiamento della cella elettrochimica (a); Catodo in acciaio al carbonio (b); Anodo in titanio (c)



**Figura 3:** schema della cella elettrolitica (a); cella elettrochimica (b)

### 3.1.1 Curve potenziodinamiche

Le curve potenziodinamiche sono state ottenute registrando la corrente passante tra anodo e catodo al variare del potenziale assunto dal catodo rispetto all'elettrodo di riferimento SCE, con una velocità di scansione di 5,0 mV/s. Tali prove, che vengono comunemente definite di “mappatura” o registrazione della caratteristica catodica dell'acciaio utilizzato risultano essenziali per comprendere l'andamento della corrente in funzione del potenziale assunto dal catodo rispetto all'elettrodo di riferimento. Le curve ottenute forniscono inoltre informazioni specifiche sulla cella elettrochimica utilizzata e quindi sul comportamento del materiale catodico utilizzato. Queste possono essere estese anche ad altri sistemi analoghi, a patto che si conoscano le condizioni fluidodinamiche dell'acqua nonché la geometria della cella elettrochimica stessa. Queste prove sono state effettuate in acqua di mare mantenuta alla temperatura costante di 24°C, in condizioni statiche e di movimento

. Data la natura dell'acciaio utilizzato, ricoperto superficialmente da uno strato ossidato protettivo (calamina), 2 delle 4 lamine sono state sottoposte a decapaggio immergendo le lamine in una soluzione di acido cloridrico (HCl) al 15% per circa 60 minuti. In ordine sono state registrate le curve potenziodinamiche nelle seguenti condizioni:

- 1) Lamina in acciaio, acqua in movimento
- 2) Lamina in acciaio, acqua in condizioni di staticità
- 3) Lamina in acciaio dopo decapaggio, acqua in movimento
- 4) Lamina in acciaio dopo decapaggio, acqua in condizioni di staticità

### *3.1.2 Prove di accrescimento minerale in condizioni potenziostatiche*

Per ottenere l'accrescimento dello strato minerale sul catodo è stata utilizzata la polarizzazione potenziostatica che consiste nell'applicazione, tramite potenziostato, di un voltaggio fisso tra l'elettrodo di lavoro (catodo) e l'elettrodo di riferimento, registrando la densità di corrente elettrica che scorre tra catodo e anodo. Sono stati applicati differenti valori di potenziale compresi fra -1.4 V e -1.1 V (intervallo di sviluppo dell'idrogeno molecolare) su 4 lamine, alla temperatura di 24°C e con acqua in movimento. Ogni lamina è stata precedentemente decapata ed è stata sottoposta alla polarizzazione per 72 ore consecutive.

### *3.1.3 Preparazione dei campioni per l'analisi dei minerali depositati*

Una volta svolti gli esperimenti e collezionate le lamine, queste sono state ripetutamente lavate con acqua deionizzata per eliminare eventuali impurità presenti sul deposito e per rimuovere il sale cristallizzato dell'acqua di mare. Le lamine sono state successivamente asciugate tramite debole aria calda per evitare l'arrugginimento delle stesse. Le lamine sono state poi pesate per valutare l'aumento del peso dovuto all'accrescimento minerale. Il deposito, sulle lamine è stato rimosso meccanicamente tramite una spatola su entrambi i lati della lamina e agli spigoli ed è stato successivamente ridotto in polvere per via meccanica.

### *3.1.4 Analisi dei depositi tramite spettrofotometria FTIR*

I campioni raccolti dopo gli esperimenti sono stati analizzati tramite tecnica in riflessione diffusa (DRIFT) utilizzando uno spettrofotometro FT-IR Perkin Elmer Spectrum GX1, equipaggiato con un accessorio per la riflessione diffusa (Macro-Cup in acciaio). Per l'analisi, i campioni sono stati miscelati con bromuro di potassio (KBr) in rapporto 1:100.. L'analisi è stata effettuata nell'intervallo di 4000 - 450  $\text{cm}^{-1}$  eseguendo 16 scansioni consecutive ed una risoluzione spettrale di 4  $\text{cm}^{-1}$ . L'elaborazione dei dati acquisiti dallo strumento, è stata effettuata tramite il software Spectrum, che permette di fare una serie di operazioni sugli spettri ottenuti

come la correzione della linea di base, lo smoothing e la normalizzazione a 1,0 unità di assorbanza.

### *3.1.5 Analisi XRD*

Per la caratterizzazione mediante diffrattometria a raggi X, le polveri sono state analizzate con lo strumento Bruker D8 ADVANCE utilizzando la radiazione  $\text{Cu-K}\alpha$  dotato di goniometro  $\theta$ - $\theta$  utilizzabile anche nelle seguenti configurazioni: Bragg-Brentano (XRD), angolo radente (GID) e riflettometria (XRR). Attraverso il programma d'indicizzazione degli spettri a raggi X, si sono potuti identificare automaticamente i picchi delle specie chimiche presenti nella polvere.

### *3.1.6 Analisi SEM-EDX*

Per ottenere ulteriori informazioni sulla composizione dei depositi minerali, sono state condotte ulteriori analisi mediante un microscopio a scansione elettronica (SEM) PHILIPS XL20, con filamento in tungsteno. La tensione impiegata per questo tipo di indagine è di 30 kV per l'analisi degli elementi superficiali del deposito ottenuto durante le sperimentazioni. Lo strumento è dotato di un rivelatore di elettroni secondari tipo Everhart-Thornley e di un rivelatore di elettroni retrodiffusi allo stato solido a due settori.

### 3.2 Effetti dell'esposizione alla tecnologia di accrescimento minerale nel mitilo

#### *Mediterraneo Mytilus galloprovincialis*

Gli individui di *Mytilus galloprovincialis* ( $6 \pm 1$  cm di lunghezza) sono stati ottenuti a fine Novembre 2019 da un sito di produzione classificato, localizzato lungo la costa marchigiana (Adriatico N-O). Dopo aver pulito le valve per rimuovere eventuali epibionti, gli organismi sono stati acclimatati per 7 giorni alle condizioni di laboratorio e successivamente esposti alle condizioni sperimentali. Il disegno sperimentale ha previsto l'allestimento di due sistemi (vasche da 45 litri), ciascuno contenente acqua di mare naturale del Mare Adriatico prelevata nella zona di Ancona ( $43^{\circ}33'55.63''N$ ,  $13^{\circ}35'27.10''E$ ), pre-filtrata a  $500 \mu m$  ed areata (salinità 37‰, temperatura  $18 \pm 1^{\circ}C$ , pH 8.0) e 40 organismi. Un sistema è stato utilizzato come controllo (CTL), mentre nell'altro (esposto, EXP) è stata inserita la stessa cella elettrochimica utilizzata nell'esperimento di accrescimento minerale ed è stata effettuata una polarizzazione potenziostatica al potenziale imposto di  $-1.1$  V/SCE (Figura 4). L'acqua è stata cambiata in entrambe le vasche ogni due giorni (previa acclimatazione dell'acqua alla temperatura di laboratorio) e gli organismi sono stati alimentati con una miscela commerciale di zooplancton ( $50-300 \mu m$ ) ampiamente utilizzata per organismi filtranti ogni due giorni. Gli eventuali individui morti durante la sperimentazione sono stati rimossi per evitare il deterioramento della qualità dell'acqua. Al termine dell'esperimento sono stati prelevati campioni di



acqua in ciascuna vasca (controllo ed esposto) per le analisi dei parametri chimico-fisici; per i mitili, 5 pool di emolinfa e di ghiandola digestiva sono stati ottenuti da 15 organismi, congelati in azoto liquido e mantenuti a  $-80^{\circ}\text{C}$ , per le analisi delle risposte immunitarie ed enzimatiche. L'emolinfa, prelevata dal muscolo adduttore,



**Figura 4:** setting sperimentale. **In alto a sinistra:** le due vasche sperimentali; **in alto a destra:** vasca sperimentale “esposto” in cui è presente la cella elettrochimica. **In basso a sinistra:** confronto tra le due vasche; **in basso a destra:** catodo con accrescimento minerale adeso nella vasca “esposto”.

è stata in parte direttamente congelata in azoto liquido e mantenuta a  $-80^{\circ}\text{C}$  per le analisi sull'attività dell'acetilcolinesterasi ed in parte immediatamente processata per le analisi dei parametri emocitari (stabilità delle membrane lisosomiali, rapporto granulociti/ialinociti e attività fagocitaria) e del danno genotossico (test della cometa e frequenza dei micronuclei). La sperimentazione ha inizialmente previsto una durata di 14 giorni ma, data l'alta mortalità riscontrata al settimo giorno di esposizione negli individui esposti (circa il 42%), si è deciso di interrompere l'esperimento e procedere al campionamento di ciascun trattamento come precedentemente descritto.

### *3.2.1 Parametri elettrici e analisi dell'accrescimento calcareo*

I dati elettrici della cella elettrochimica e l'accrescimento calcareo ottenuto durante la polarizzazione in vasca sono stati trattati con gli stessi metodi d'indagine dell'esperimento precedente (vedi punto 3.1)

### 3.2.2 *Analisi dei parametri chimico-fisici nell'acqua*

Le analisi dell'acqua sono state effettuate tramite metodi spettrofotometrici utilizzando test in cuvetta Kit Hach Lange. Il calcolo dell'alcalinità totale è stato effettuato applicando il metodo riportato da Dickson e coautori (2007).

Ione cloruro/Cloruri totali (Cl<sup>-</sup>) Poiché la presenza di cloruri totali può rappresentare un fattore interferente per la determinazione di altri parametri, la misura di questi composti è stata sempre effettuata prima di qualsiasi altra analisi quantitativa. Si effettua quindi una diluizione dei campioni in acqua ultrapura (18.2 MΩcm) al fine di ottenere una concentrazione nel range compreso tra circa 300 e 6000 mg/L (Cl<sup>-</sup>); a questo punto è possibile ottenere una seconda stima attraverso il test rapido Hach-Lange Quantab (Hach tritators test tabs categoria 27513-40), immergendo una striscia Quantab per titolazione direttamente in un idoneo volume di campione. Il valore ottenuto è stato utilizzato per calcolare la diluizione finale corretta per effettuare il test di determinazione analitica Hach-Lange LCK 311, basato sulle specifiche del metodo US-EPA 9251 per la determinazione colorimetrica dei cloruri totali, utilizzando il Fotometro Hach-Lange DR3900. Trattando soluzioni contenenti cloruri con tiocianato di mercurio si forma il cloruro di mercurio (II) che si dissocia poco. Allo stesso momento si libera una quantità equivalente di ioni di tiocianato che formano in presenza di sali ferrici (III) il

tiocianato ferrico (III), che viene misurato alla lunghezza d'onda di 468 nm per via fotometrica. I risultati sono stati espressi in mg/L di cloruri (Cl<sup>-</sup>).

Calcio e Magnesio (Ca<sup>2+</sup>; Mg<sup>2+</sup>). I cationi calcio e magnesio sono stati determinati attraverso il metodo Hach-Lange LCK 327 (Water Hardness/Ca/Mg) ed il Fotometro Hach-Lange DR3900, il cui principio è analogo a quanto descritto nel metodo US-EPA 130.1 (NPDES Water Hardness Total Colorimetric Method). Si tratta di un'analisi fotometrica della durezza totale con porpora ftaleina; utilizzando un agente selettivo di mascheramento si può differenziare tra calcio e magnesio. Il saggio, che viene eseguito nell'intervallo di pH compreso tra 4 e 9, produce un composto intensamente colorato in viola, la cui assorbanza può essere monitorata alla lunghezza d'onda di 572 nm. I risultati finali sono stati espressi in mg/L di ioni Ca o Mg.

Ione carbonato/ Carbonati totali (Anidride carbonica CO<sub>2</sub>). Il metodo Hach-Lange LCK 388 prevede la conversione dei carbonati totali (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) disciolti in anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) gassosa che, attraverso una apposita membrana viene intrappolata in una cuvetta pre-caricata di soluzione indicatore secondo le specifiche IRSA-CNR (APAT Manuali e Linee Guida 29/2003) numero 4010 per la misura dell'anidride carbonica. Il viraggio del colore dell'indicatore può essere monitorato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 435 nm, mediante il Fotometro

Hach-Lange DR3900. I risultati finali sono stati espressi in mg/L di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>).

Richiesta chimica di ossigeno (COD). Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione, per mezzo di un ossidante forte in ambiente acido a caldo. In accordo con i protocolli IRSA-CNR (APAT Manuali e Linee Guida 29/2003) numero 5130, è stato seguito un metodo generale applicabile a campioni acquosi contenenti concentrazioni di cloruri  $\leq 1000$  mg/L che prevede l'ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche, presenti in un campione d'acqua, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, come catalizzatore dell'ossidazione. L'eccesso di dicromato viene titolato con una soluzione di solfato di ammonio e ferro (II). La concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili, nelle condizioni del metodo, è proporzionale alla quantità di dicromato di potassio consumato. Sfruttando questo principio, il COD è stato determinato mediante il kit analitico Hach-Lange LCK 514, misurando spettrofotometricamente la colorazione verde del CrIII in eccesso, alla lunghezza d'onda di 605 nm, mediante il Fotometro Hach-Lange DR3900. I risultati finali sono stati espressi in mg/L di ossigeno (O<sub>2</sub>).

Ione solfato/Solfati (SO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). La determinazione dei solfati totali (SO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) è stata eseguita mediante il metodo torbidimetrico conforme alle specifiche IRSA-CNR

(APAT Manuali e Linee Guida 29/2003) numero 4140-B; Lo ione solfato viene precipitato in ambiente acido per acido cloridrico con cloruro di bario. La sospensione omogenea di solfato di bario che in tal modo si forma viene stabilizzata con soluzioni di glicerina e cloruro di sodio. La reazione, eseguita mediante il kit analitico Hach-Lange LCK 153 (solfati totali), prevede la successiva misura spettrofotometrica (Hach-Lange DR3900) della sospensione alla lunghezza d'onda di 430 nm. Si risale alla concentrazione incognita mediante una curva di taratura ottenuta trattando quantità note di solfato nelle stesse condizioni dei campioni. Le concentrazioni finali sono state espresse in mg/L di ioni solfato.

Ione solfito /Solfiti ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). I solfiti totali ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) sono stati determinati utilizzando il kit di reazione Hach-Lange LCW 054. Il saggio prevede l'aggiunta di una soluzione tampone di acido fosforico, fosfato di potassio e fosfato di ammonio a 10 mL di campione ed in seguito una reazione con acido tiobenzoico, che forma un composto di colore giallo in presenza di solfiti, misurato alla lunghezza d'onda di 435 nm, mediante il Fotometro Hach-Lange DR3900. I dati sono stati espressi in mg/L di ione solfito.

Ione solfuro/Solfuri ( $\text{S}^{2-}$ ). I solfuri totali sono stati analizzati sfruttando il principio descritto nel metodo US-EPA 376.2 (Sulfide by Colorimetry, Methylene Blue Method). Lo sviluppo della colorazione blu dovuta alla formazione di blu di metilene per reazione di solfuro di idrogeno con dimetil-p-fenilenediamina e ferro

(III) è stato usato per la determinazione spettroscopica dei solfuri ( $S^{2-}$ ) mediante il kit analitico Hach-Lange LCK 653 (solfuri). Il test è molto sensibile e la colorazione che si sviluppa immediatamente dopo il contatto dei reagenti con  $H_2S$  risulta stabile per circa una ora ed è stata determinata monitorando l'assorbanza del prodotto di reazione alla lunghezza d'onda di 665 nm mediante il Fotometro Hach-Lange DR3900; il risultato finale è stato espresso in mg/L di ione solfuro ( $S^{2-}$ ).

Ione ammonio, Azoto ammoniacale ( $NH_4^+$ ). Lo ione ammonio è stato determinato come azoto ammoniacale attraverso il metodo Hach-Lange LCK 303 con il Fotometro Hach-Lange DR3900, conforme al metodo IRSA-CNR (APAT Manuali e Linee Guida 29/2003) numero 4030-A1. Ioni ammonio reagiscono a un  $pH=12.6$  con ioni di ipoclorito e di salicilato, in presenza di nitroprussiato sodico quale catalizzatore, dando un derivato dell'indofenolo che assume una colorazione verde-blu, misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 690 nm. I risultati sono stati espressi in mg/L di ione ammonio ( $NH_4^+$ ).

Ione nitrito/Azoto nitroso ( $NO_2^-$ ). I nitriti reagiscono in soluzione acida con ammine aromatiche primarie formando sali di diazonio, che possono reagire con complessi aromatici contenenti un gruppo amminico o idrossilico, formando prodotti azoici intensamente colorati. Sfruttando tale principio, i nitriti totali sono stati determinati mediante il metodo Hach-Lange LCK 341 con il Fotometro Hach-Lange DR3900, conforme alla procedura IRSA-CNR (APAT Manuali e Linee

Guida 29/2003) numero 4050 (azoto nitroso). A pH=2.0-2.5 la sulfanilammide viene diazotata dall'acido nitroso ed il diazocomposto che ne risulta viene legato con la N-(1-naftil)-etilendiammina; si ottiene così un azocomposto di colore rosso porpora la cui assorbanza è stata misurata alla lunghezza d'onda di 543 nm. I risultati sono stati espressi in mg/L di ione nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Ione nitrato/Azoto nitrico ( $\text{NO}_3^-$ ). L'azoto nitrico è stato determinato spettrofotometricamente mediante il metodo Hach-Lange LCK 339, conforme alle specifiche US-EPA, metodo 10206, approvato in Gennaio 2011 (documento US-EPA 40 CFR 141: "Approved Methods for Inorganic Contaminants & Other Inorganic Constituents - National Primary Drinking Water Regulations"). Gli ioni nitrato reagiscono in soluzione fortemente acida di acido solforico e fosforico, con 2,6-dimetilfenolo dando il 4-nitro-2,6-dimetilfenolo che è stato determinato alla lunghezza d'onda di 370 nm mediante il Fotometro Hach-Lange DR3900. I risultati sono stati espressi in mg/L di ione nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

Ione borato, Borati ( $\text{BO}_3^{3-}$ ). I borati totali sono stati determinati utilizzando il metodo Hach-Lange LCK 307, mediante Fotometro Hach-Lange DR3900. Il metodo consiste nella misura spettrofotometrica a 414 nm di un composto che assume la colorazione gialla, in seguito alla reazione dello ione borato con azometina H, come descritto nelle procedure ufficiali fornite dall'Istituto Superiore di Sanità (Metodi analitici ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi



del D.Lgs. 31/2001, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Reparto di Igiene delle Acque Interne, Versione on-line su sito: [www.iss.it](http://www.iss.it)). Il risultato finale è stato espresso in mg/L di Boro (B).

Alcalinità Totale. Questo parametro è stato misurato seguendo il metodo Dickson et al., 2007. Brevemente, un volume noto di acqua di mare è stato posizionato in un contenitore chiuso e titolato con una soluzione di acido cloridrico, il pH viene monitorato con un'apposita sonda, e la titolazione procede, aggiungendo volumi noti di HCl, fino al raggiungimento di un pH di circa 3. Ad ogni volume di HCl aggiunto è stato appuntato il rispettivo valore di e.m.f. Al termine della titolazione i risultati ottenuti sono stati utilizzati per calcolare il valore di alcalinità totale tramite l'applicazione di funzioni di Gran modificate (in cui le equazioni sono riorganizzate in una forma lineare e quindi adattate iterativamente con il metodo dei minimi quadrati) (Dickson et al., 2007).

### 3.2.3 *Analisi delle risposte biologiche in *Mytilus galloprovincialis**

I principali biomarkers che sono stati misurati nei mitili esposti includono parametri di risposta immunitaria e lisosomiale, risposte istologiche sull'accumulo di lipofuscina e di lipidi neutri, marker di proliferazione perossisomiale e di neurotossicità, parametri di disturbo ossidativo, marker di danno genotossico. Tali parametri sono stati indagati attraverso l'applicazione di tecniche

spettrofotometriche, spettrofluorimetriche e di microscopia ottica e a fluorescenza, seguendo protocolli utilizzati in molti altri studi di ecotossicologia (Gorbi et al., 2012, 2013).

Stabilità delle membrane lisosomiali – Il parametro è stato misurato nell'emolinfa dei mitili (0.5 ml) prelevata dal muscolo adduttore anteriore, mediante siringa ipodermica contenente un eguale volume di soluzione fisiologica (Martínez-Gómez *et al.*, 2015). Una aliquota di tale sospensione è stata poi dispersa su un vetrino da microscopia dove le cellule sono state lasciate aderire per 15 min a 4°C in camera buia e umida. Dopo la rimozione dell'eccesso di emolinfa, le cellule sono quindi state incubate con una soluzione di Rosso Neutro, con rapporto 1:1 rispetto al volume di emolinfa disperso, ed esaminate ad intervalli di 15 min (fino ad un tempo massimo di 120 min) per determinare il tempo al quale il 50% degli emociti presenta il Rosso Neutro non più compartimentalizzato nei lisosomi ma rilasciato nel citosol. La soluzione stock di Rosso Neutro è stata preparata dissolvendo 28.8 mg di colorante in 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO) e conservata a 4°C per non più di 3 settimane; al momento dell'analisi 10 µl di soluzione stock sono stati diluiti in 5 ml di soluzione fisiologica.

Rapporto granulociti/ialinociti - Un volume di 50µL di emolinfa prelevata dal muscolo adduttore degli organismi, viene fatto aderire su vetrino da microscopia per circa 15 minuti a 4°C in camera buia e umida e, dopo averne eliminato l'eccesso,

è stato fissato in Baker's è stato lasciato per 3 minuti in ematossilina, la quale colora di viola gli acidi nucleici, le membrane e le proteine di membrana. Seguono una serie di lavaggi in acqua corrente e acido cloridrico (HCl 0,5%) e la successiva colorazione in eosina (colorando le componenti acidofile, come mitocondri e proteine cellulari) al 1% per 3 minuti. Dopo il risciacquo finale ed il montaggio in Eukitt, il rapporto tra granulociti e ialinociti è stato misurato tramite microscopia ottica contando il numero dei granulociti (cellule rosa con pseudopodi) e degli ialinociti (cellule viola, con un nucleo evidente) per un totale di 200 cellule.

Attività dell'acetilcolinesterasi - l'acetilcolinesterasi è un enzima che catalizza la reazione di idrolisi dell'acetilcolina che viene scissa in colina e gruppo acetato. Dal punto di vista fisiologico è una reazione molto importante perché implicata nella trasmissione dell'impulso nervoso nel sistema volontario. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che a livello delle sinapsi si lega ai recettori trasmettendo così l'impulso nervoso. Quando questo termina, l'eccesso di acetilcolina a livello delle sinapsi deve essere eliminato proprio mediante l'azione dell'acetilcolinesterasi. Nei mitili l'attività di questo enzima è stata misurata in campioni di emolinfa centrifugati per 5 minuti a 3000 x g. Il sovrinatante è stato utilizzato per determinare l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) con il metodo di Ellman che prevede la reazione dell'acetilcolina con il DTNB (acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico) alla temperatura di  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ , alla lunghezza d'onda di 412 nm,

con  $\epsilon=13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Gorbi et al., 2008). L'attività di questo enzima è stata inoltre misurata nelle branchie omogenizzate (rapporto 1:3 peso:volume) in un tampone di Tris-HCl 0,1 M (pH 7,2), saccarosio 0,25 M. L'omogenato è stato centrifugato a 10000 g per 10 minuti e il sovrantante ottenuto utilizzato per determinare l'attività dell' AchE con il metodo di Ellman come descritto per l'emolinfa.

Proliferazione perossisomiale - rappresenta un biomarkers che può essere correlato all'esposizione ad alcune sostanze dette proliferatori perossisomiali compresi alcuni contaminanti organici come idrocarburi policiclici aromatici (IPA) o composti policlorobifenili (PCB) (Cancio et al., 1999). In laboratorio, per misurare i livelli di proliferazione perossisomiale è stato effettuato un saggio enzimatico che misura l'attività dell'acil CoA ossidasi (AOX), enzima coinvolto nella  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. Il metodo ha previsto la preparazione di un omogenato del campione con un tampone sodio bicarbonato 1 mM pH 7.6 e centrifugato a 500 x g per 15 minuti. L'attività enzimatica dell'ACOX è stata determinata seguendo la reazione di ossidazione della diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA) con l'aggiunta di una perossidasi esterna e del substrato specifico Palmitoil CoA. Temperatura del saggio 25°C e  $\lambda=502 \text{ nm}$  (Small et al., 1985).

Enzimi antiossidanti - per le analisi degli enzimi antiossidanti le ghiandole digestive sono state omogenate (1:5 p/v) in tampone K-fosfato 100 mM, pH 7.5, con cloruro di sodio 1.8% e PMSF 0.1 mM. Dopo centrifugazione a 100.000 xg per 1h e 10 min

a 4°C, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80 °C. Le attività enzimatiche sono state misurate con specifici saggi spettrofotometrici utilizzando uno strumento Varian (modello Cary 5) termostato a temperatura costante di  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  (Benedetti *et al.*, 2012).

L'attività dell'enzima *catalasi* è stata misurata seguendo la diminuzione di assorbanza in funzione del tempo, dovuta alla riduzione del perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ad acqua; la lunghezza d'onda utilizzata è stata  $\lambda = 240 \text{ nm}$  ed il coefficiente di estinzione molare applicato è stato  $\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Il saggio è stato condotto per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, con  $\text{H}_2\text{O}_2$  12 mM ed opportune aliquote di campione.

L'attività dell'enzima *glutathione S-transferasi* è stata analizzata seguendo l'aumento di assorbanza dovuto alla formazione del complesso di coniugazione tra GSH e 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), ad una lunghezza d'onda  $\lambda=340 \text{ nm}$  e con un coefficiente di estinzione millimolare  $\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La reazione è stata condotta per un minuto in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM pH 6.5, CDNB 1.5 mM, GSH 1 mM ed opportune aliquote di campione.

L'attività dell'enzima *glutathione reduttasi* è stata valutata alla lunghezza d'onda  $\lambda=340 \text{ nm}$  e con coefficiente di estinzione millimolare  $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , misurando il decremento di assorbanza dovuto al consumo di NADPH nel tempo. La reazione è stata effettuata in un volume di saggio finale di 1 ml contenente

tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.0, GSSG 1 mM, NADPH 0.12 mM ed opportune aliquote di campione.

L'attività enzimatica degli enzimi *glutathione perossidasi*, Se-dipendenti e Se-indipendenti, è stata misurata seguendo l'azione di un sistema di enzimi accoppiati dove il GSSG formato nella reazione delle perossidasi viene convertito nella forma ridotta GSH dalla glutathione reduttasi. Il consumo di NADPH è stato seguito come diminuzione di assorbanza a  $\lambda = 340 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). L'attività delle forme enzimatiche Se-dipendenti e dell'insieme di quelle Se-dipendenti e Se-indipendenti è stata misurata usando come substrato rispettivamente, perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), per verificare l'efficacia di detossificazione degli enzimi su perossidi inorganici, e idroperossido di cumene (CuPx) per valutarne l'azione su perossidi organici. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 1 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM a pH 7.5, EDTA 1 mM, GSH 2 mM, NADPH 0.24 mM, 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  o 0.8 mM CuPx, 1U GR ed opportune aliquote di campione.

Il glutathione totale (GSH) è stato saggiato in laboratorio seguendo la reazione catalizzata dalla glutathione reduttasi (GR) del GSH con il DTNB e comparando questo tasso di conversione con una curva standard di GSH (Gorbi et al., 2008). Gli omogenati di ghiandola digestiva sono stati preparati in acido sulfosalicilico 5% con EDTA 4 mM (1:5 p/v). I campioni sono stati lasciati in ghiaccio per 45 minuti per la deproteinizzazione, poi centrifugati a  $37.000 \times g$  per 15 minuti. Il glutathione

totale è stato determinato nel sovranatante misurando per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda  $\lambda=412$  nm, l'intensità di reazione tra i gruppi -SH e DTNB. Il saggio è stato condotto in tampone K-fosfato 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, DTNB 0,1 mM, NADPH 0,24 mM, glutatione riduttasi 1 U ed opportune aliquote di campione. I valori di assorbanza ottenuti sono stati quantificati mediante una curva di calibrazione standard a concentrazioni note di glutatione ridotto.

Accumulo di lipofuscina e di lipidi neutri- Sono stati valutati su sezioni criostatiche dello spessore di 8  $\mu$ m di ghiandola digestiva di 5 mitili per ciascun gruppo di esposizione. Per l'analisi dell'accumulo di lipofuscina, le sezioni criostatiche sono state fissate in fissativo di Baker's Ca-formolo per 15 minuti a +4°C; successivamente i vetrini sono stati risciacquati in acqua distillata ed immersi per 5 minuti nella soluzione di colorazione costituita da cloruro ferrico 1% e k-ferricianuro 1% (5:1) e portata al volume di 50 ml con acqua distillata. I vetrini sono stati quindi lavati prima in acido acetico al 2% e poi in acqua distillata, e infine montati in mezzo acquoso (gelatina di glicerolo). Per l'analisi dell'accumulo di lipidi neutri, le sezioni criostatiche sono state fissate in fissativo di Baker's Ca-formolo per 15 minuti a +4°C; lavate in acqua e trasferite in alcool isopropilico al 60% per 3 minuti. La procedura di colorazione ha previsto 20 minuti di incubazione in una soluzione satura di Oil red O (1% in alcool isopropilico), un lavaggio in alcool isopropilico al 60% e quindi in acqua distillata, e il montaggio in glicerol

gelatina (Moore, 1998; Regoli,1992). Il software d'analisi d'immagine Image Pro Plus 6.2 è stato utilizzato allo scopo di determinare l'intensità di colorazione dei granuli di lipofuscina, evidenziati come granuli dal colore verde-azzurro o di lipidi neutri, evidenziati come aree di colore rosso, all'interno dei tubuli della ghiandola digestiva di mitili. Per ogni sezione di ghiandola digestiva colorata, sono state effettuate 4 foto, e l'accumulo di lipofuscina e di lipidi neutri è stato espresso in termini di intensità di colorazione di lipofuscina o di lipidi neutri/ $\mu\text{m}^2$  di tessuto totale.

Test della Cometa (Comet Assay) - Per il test della cometa gli emociti sono stati prelevati dal muscolo adduttore posteriore e per ogni sito sono stati analizzati 5 individui in replica. Le cellule, lavate in buffer salino (12.5 mM KCl; 0.5 M NaCl; 20 mM HEPES; 10 mM EDTA) e portate alla concentrazione di  $40 \times 10^4$  cellule/mL, sono state incluse in un triplice strato di agarosio a basso punto di fusione, allestito su vetrini da microscopia pretrattati con agarosio a punto di fusione normale. I vetrini così allestiti sono stati immersi per 90 minuti in una soluzione di lisi cellulare (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Trizma base; 1% Triton X-100 e 10% DMSO), a 4°C, al buio, pH 10 e sottoposti a denaturazione alcalina (75 mM NaOH; 1mM EDTA a pH > 12 per 10 minuti) e a corsa elettroforetica (1V/cm per 10 minuti, a 4°C, al buio). Dopo lavaggio di 10 minuti in soluzione di neutralizzazione (400 mM TRIS HCl, pH 7.5) e fissaggio in metanolo (3 minuti, a -20°C), i vetrini sono



stati colorati con il 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), colorante fluorescente specifico per il DNA. L'entità della frammentazione del DNA è stata misurata per via microscopica: attraverso l'utilizzo del software Image Pro-Plus 6.2, sono stati creati dei mosaici di foto, costituiti dalle fotografie di circa 70 nuclei, che sono stati successivamente analizzati con il programma di analisi di immagine Comet Score 1.5. La quantificazione della perdita di integrità strutturale del DNA valutata attraverso questo programma è stata espressa come percentuale di DNA nella coda su una media di 70 nuclei analizzati per singolo vetrino.

Frequenza dei micronuclei – è stata determinata nelle sospensioni di emolinfa conservate in fissativo di Carnoy (acido acetico:metanolo 1:3), successivamente strisciate su vetrino da microscopia e colorate con un colorante specifico per il DNA, il 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), alla concentrazione di 1 µg/ml. Per il loro riconoscimento e conteggio i micronuclei sono stati identificati come piccole strutture rotonde e ben definite, con una grandezza inferiore a un terzo del diametro del nucleo principale, completamente separati dal esso e posizionati sullo stesso piano ottico. La valutazione della frequenza di comparsa dei MN è stata effettuata attraverso l'osservazione con microscopio a fluorescenza e conta cellulare; il numero di nuclei da contare per singolo vetrino è  $\geq$  a 2000 e i risultati sono stati espressi come numero di nuclei con micronuclei ogni mille nuclei.

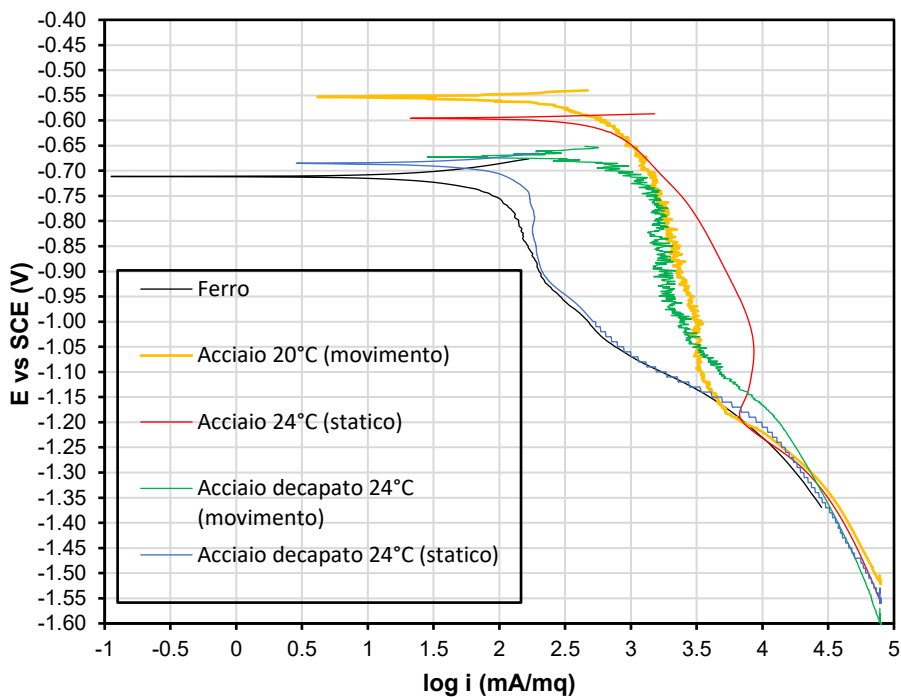
#### 3.2.4 *Analisi statistica*

E' stato applicato il test di t-Student ai risultati dei biomarker per valutare la presenza di differenze statisticamente significative tra gli individui controllo e quelli esposti al trattamento ( $p < 0.05$ ).

## 4 RISULTATI

### 4.1 Mappatura della cella elettrochimica – Potenziodinamica

Le curve registrate durante la mappatura della cella elettrochimica (Figura 5) mostrano delle marcate differenze a seconda delle condizioni imposte al sistema (movimento/staticità dell'acqua e presenza/assenza di calamina). E' stata aggiunta una curva denominata "Ferro", derivata da sperimentazioni precedenti in acqua di mare sintetica, per avere un riferimento rispetto alle curve registrate.



**Figura 5** Curve potenziodinamiche ottenute durante le prove sperimentali. L'asse x rappresenta i valori di densità di corrente (scala logaritmica) passante tra anodo e catodo. L'asse y rappresenta il voltaggio (differenza di potenziale tra catodo ed elettrodo di riferimento SCE).

Le due sperimentazioni iniziali (rispettivamente curva gialla e curva rossa in Figura 5) sono state necessarie per comprendere la differenza del comportamento dell'acciaio utilizzato in condizioni di movimento dell'acqua ed in condizioni statiche. Le due lamine utilizzate non hanno ricevuto il trattamento di decapaggio e sono state immerse in acqua di mare direttamente dopo il taglio. Il comportamento della curva rossa, in condizioni di staticità dell'acqua, appare discontinuo, mostrando una forte resistenza alla polarizzazione e, di conseguenza, un aumento della densità di corrente, già a basse differenze di potenziale. E' stato ipotizzato che l'alta resistenza fosse dovuta allo strato ossidato superficiale presente sull'acciaio al carbonio (calamina), e pertanto, per le successive sperimentazioni le lamine utilizzate sono state sottoposte a decapaggio. Le curve registrate con le lamine decapate (curva verde e curva blu) presentano in generale una diminuzione della resistenza alla polarizzazione, confermando l'ipotesi dell'aumento di resistenza dovuto alla presenza della calamina. In particolare, la curva blu, registrata in condizioni di staticità dell'acqua mostra un profilo sovrapponibile alla curva di riferimento "Ferro"; la curva verde mostra uno spostamento verso valori di densità di corrente maggiori rispetto alla curva blu, attribuibili alla movimentazione dell'acqua durante la mappatura. Tutte le curve, indipendentemente dalla presenza/assenza di calamina o del movimento/staticità dell'acqua, mostrano un flesso tra i valori di potenziale compresi tra -1.1 e -1.2 V indicando l'inizio del fenomeno di produzione di idrogeno gassoso (H<sub>2</sub>) ottenuto dalla riduzione

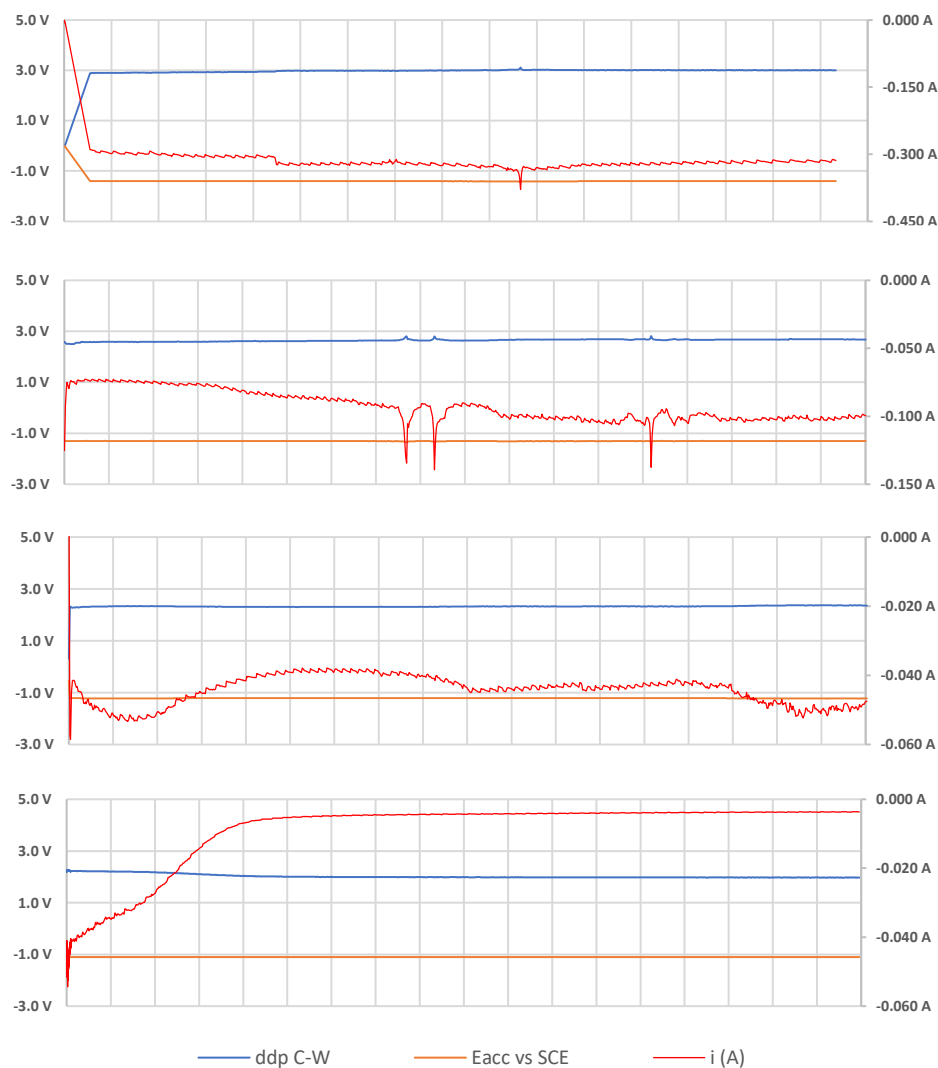
dell'acqua. La produzione dell'idrogeno aumenta sulla superficie del catodo via via che la differenza di potenziale tra l'acciaio e l'elettrodo di riferimento (SCE) si sposta verso potenziali più negativi. Dalla mappatura è quindi risultato che: 1) il movimento dell'acqua aumenta la resistenza alla polarizzazione del catodo, con un conseguente aumento della densità di corrente passante tra gli elettrodi e 2) il potenziale necessario per la produzione di idrogeno molecolare (e quindi dell'accrescimento minerale) si assesta intorno ai valori 1.4 – 1.1 V.

#### *4.2 Prove di accrescimento minerale in condizioni potenziostatiche*

I profili di densità di corrente delle 4 sperimentazioni effettuate in modalità potenziostatica sono risultate piuttosto differenti fra loro (Figura 6). La prima prova (Figura 6 a) è stata effettuata ad un potenziale imposto di -1.4 V ( $E_{acc}$  vs SCE, linea arancione) determinando una differenza di potenziale reale tra anodo e catodo che raggiunge i 3 V (ddp C-W, linea blu), assestandosi dopo circa 12 ore dall'inizio dell'esperimento. La lamina, durante la polarizzazione, ha mostrato una forte effervescenza dovuta alla formazione di idrogeno molecolare sulla sua superficie (giustificata dal forte potenziale applicato). La curva di corrente ( $i(A)$ , in rosso) mostra dei picchi dopo circa 42 ore dall'inizio dell'esperimento che sono stati interpretati come aumenti temporanei di superficie libera sulla lamina: l'accrescimento del deposito minerale, infatti, non è risultato omogeneo durante

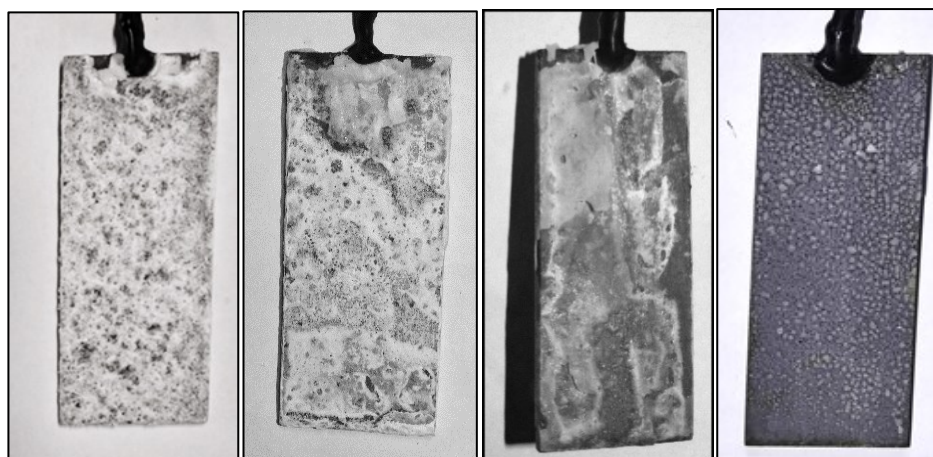
l'intero esperimento a causa del disturbo meccanico esercitato dalla produzione di bolle di idrogeno sulla superficie del catodo (Figura 7). A sostegno di ciò è stato osservato del deposito minerale a fondo vasca, distaccatosi dalla lamina durante l'esperimento. Inoltre, la curva di densità di corrente è caratterizzata da un pattern preciso che vede degli aumenti di corrente e delle diminuzioni di corrente cicliche del periodo di 2 ore circa: questo può essere attribuito ad una ciclica formazione (diminuzione della corrente elettrica) e dissoluzione (aumento di corrente elettrica) del deposito minerale. La seconda prova è stata effettuata ad un potenziale imposto di -1.3 V (Figura 6 b) ed ha registrato una differenza di potenziale reale di -2.67 V tra catodo ed anodo della cella. Sebbene la piccola diminuzione di voltaggio rispetto alla prima prova abbia contribuito alla diminuzione della densità di corrente media, nuovamente la curva elettrica mostra dei picchi di aumento, rispettivamente a 31, 33 e 40 ore dall'inizio della polarizzazione. Anche in questo caso data la presenza di materiale minerale depositatosi a fondo vasca, la formazione delle bolle di idrogeno sulla superficie catodica, sebbene in misura minore rispetto alla prima prova, non ha permesso un accrescimento del materiale duraturo e unitario (Figura 7). La terza prova, effettuata ad un potenziale di 1.2 V (Figura 6 c) ha prodotto un risultato simile alle prove precedenti, sebbene con minore materiale depositato a fondo vasca e una maggior compattezza dell'accrescimento al di sopra del catodo (Figura 7). La quarta prova è stata l'unica nella quale non è stato osservato distacco del minerale dalla lamina. Il voltaggio imposto, in questo caso, è stato di 1.1 V

(Figura 6.d), un valore piuttosto basso che ha determinato una differenza di potenziale reale (tra catodo e anodo) di 2 V. E' interessante notare come la curva della densità di corrente sia più stabile, non presentando picchi e mostrando una



**Figura 6 :** Regrazioni elettriche durante la polarizzazione potenziostatica delle 4 prove; dall'alto: Prova 1 (-1.4 V), Prova 2 (-1.3 V), Prova 3 (-1.2 V) e Prova 4 (1.1 V). La linea blu indica la differenza di potenziale (V) tra il catodo e l'anodo, la linea arancione indica il potenziale imposto (V) tra il catodo e l'elettrodo di riferimento e la linea rossa rappresenta la corrente passante tra catodo e anodo durante la polarizzazione (A).

diminuzione progressiva del valore (che raggiunge asintoticamente i 3.6 mA), . Sebbene l'andamento della densità di corrente sia indicativo della progressiva deposizione di materiale minerale (la diminuzione della densità di corrente è diretta conseguenza del ricoprimento superficiale da parte dello strato minerale al di sopra del catodo), l'accrescimento è stato anche in questo caso non omogeneo, distribuendosi a "patch" sulla lamina, probabilmente zone in cui si sono concentrate le correnti elettriche (Figura 7). Pesando le 4 lamine alla fine delle sperimentazioni si è notato che l'accrescimento maggiore in termini di peso è avvenuto nella prima prova (2,305 g), mentre quello minore è stato ottenuto nella quarta prova (0,379 g); dunque a parità di tempo di sperimentazione, la quantità di materiale accresciuto è maggiore all'aumentare del valore di voltaggio imposto. La disomogeneità del materiale minerale depositato sulla lamina di acciaio nella quarta prova risulta essere quindi anche la conseguenza della necessità di maggior tempo per



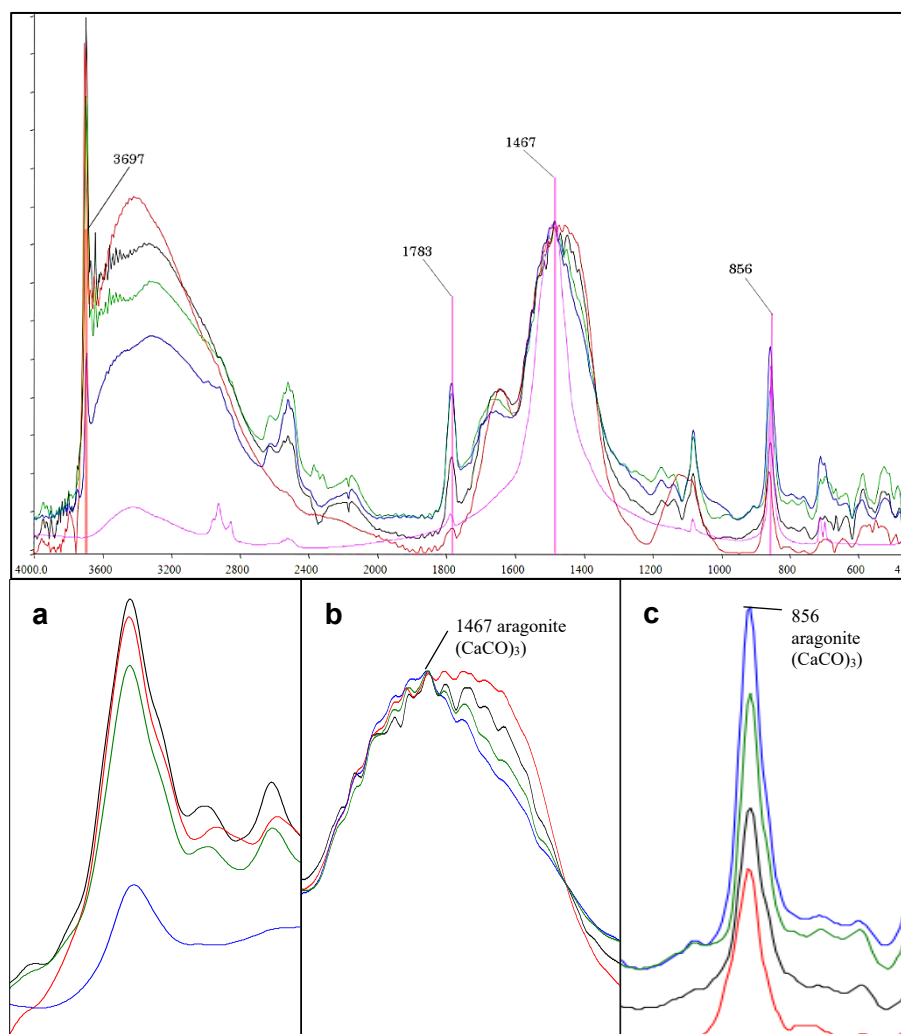
**Figura 7:** Lamine con accrescimento calcareo dopo 72 ore di sperimentazione. Da sinistra: Prova 1 (1.4V); Prova 2 (1.3V); Prova 3 (1.2V); Prova 4 (1.1V).



l'accrescimento a densità di corrente così basse. Non si può quindi escludere un risultato più proficuo aumentando il tempo di sperimentazione.

#### *4.3 Caratterizzazione degli accrescimenti minerali ottenuti*

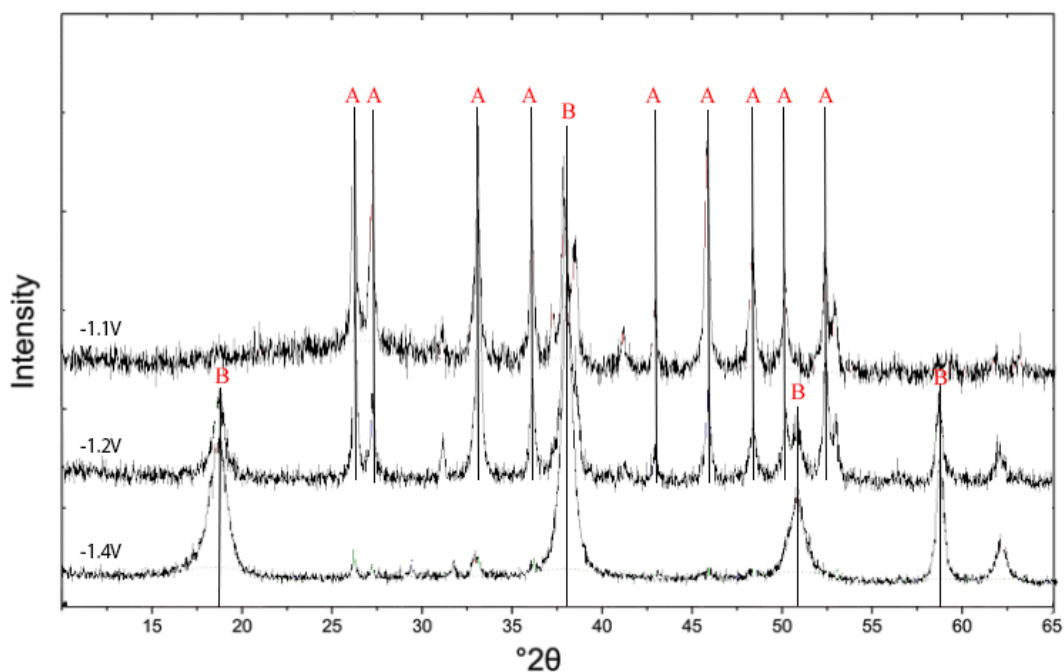
Le caratterizzazioni chimiche sono state effettuate sia sugli accrescimenti adesi al catodo. Gli spettri ottenuti dalle analisi DRIFT FT-IR sugli accrescimenti adesi (Figura 8) hanno permesso la caratterizzazione dei due principali componenti del materiale calcareo (carbonato di calcio e idrossido di magnesio) in tutte le prove analizzate. In corrispondenza del picco della brucite ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) a  $3697\text{ cm}^{-1}$  (Figura 8 a) si osserva come l'assorbanza maggiore sia attribuibile agli spettri delle prove a potenziali di 1.3 V (nero) e 1.4 V (rosso) mentre il picco ha un'intensità molto inferiore nella prova al potenziale minore (1.1 V, blu). Per la caratterizzazione del carbonato di calcio sono stati evidenziati i picchi tipici dell'aragonite a  $1783\text{ cm}^{-1}$ ,  $1467\text{ cm}^{-1}$  e  $856\text{ cm}^{-1}$ . In corrispondenza di questi picchi il materiale accresciuto a 1.1 V risulta avere un'assorbanza maggiore rispetto a tutte le altre prove.



**Figura 8** :Spettri di assorbanza degli accrescimenti minerali ottenuti nelle prove potenziostatiche (FT-IR DRIFT). Il picco a  $3697\text{ cm}^{-1}$  è caratteristico della brucite ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) mentre i picchi a  $1783$ ,  $1467$  e  $856\text{ cm}^{-1}$  sono tipici del carbonato di calcio in forma aragonitica. Dettaglio del picco della brucite, più sviluppato nelle prove sottoposte a voltaggio maggiore di  $1.1\text{V}$  (a). Dettaglio del picco a  $1467\text{ cm}^{-1}$  (aragonite) (b). Picco a  $856\text{ cm}^{-1}$  (aragonite) che tende ad essere meno rappresentato all'aumentare del voltaggio utilizzato per l'accrescimento (c).

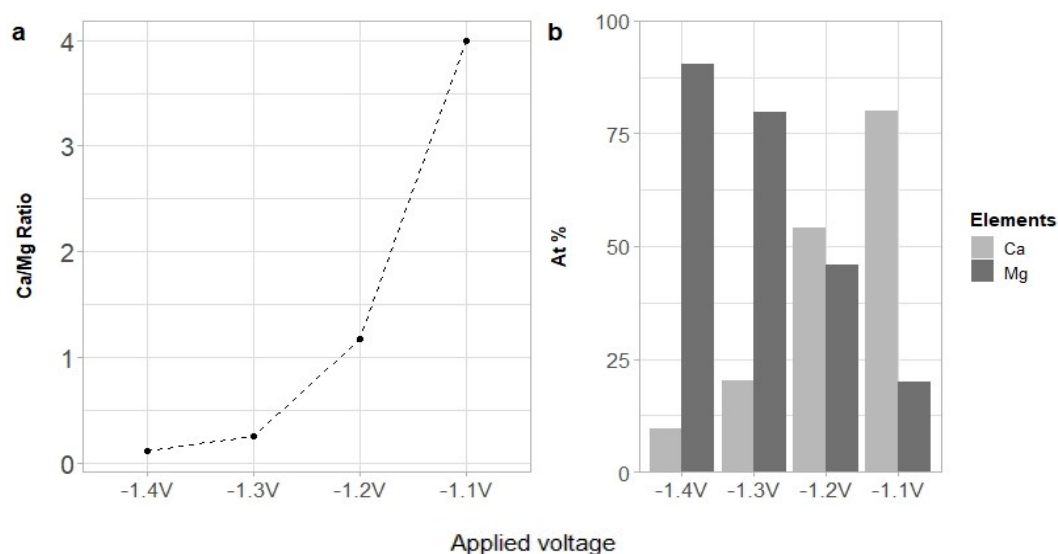
In particolare ciò risulta evidente nel picco a  $856\text{ cm}^{-1}$  (Figura 8 c) dove l'assorbanza diminuisce progressivamente negli spettri degli accrescimenti ottenuti

a voltaggi più negativi di 1.1V. Le analisi XRD, effettuate sugli stessi campioni, sono state utilizzate per individuare la presenza sia della brucite sia della forma aragonitica del carbonato di calcio. I diffrattogrammi ottenuti (Figura 9) sembrano confermare i risultati ottenuti tramite le analisi IR: lo strato minerale ottenuto al potenziale più negativo (1.4 V) presenta dei picchi di intensità maggiori per la brucite, che si attenuano negli strati ottenuti a voltaggi meno negativi. L'aragonite inizia ad essere apprezzabile nell'accrescimento a potenziali  $E \leq 1.2$  V/SCE e diventa preponderante nel materiale ottenuto al potenziale di 1.1 V. L'analisi qualitativa degli spettri ottenuti dai differenti accrescimenti ha avuto conferma anche dall'analisi elementare effettuata in SEM/EDX. I risultati (Figura



**Figura 9:** Diffrattogrammi XRD degli accrescimenti minerali formati a differenti potenziali. (B e A si riferiscono rispettivamente a brucite e aragonite).

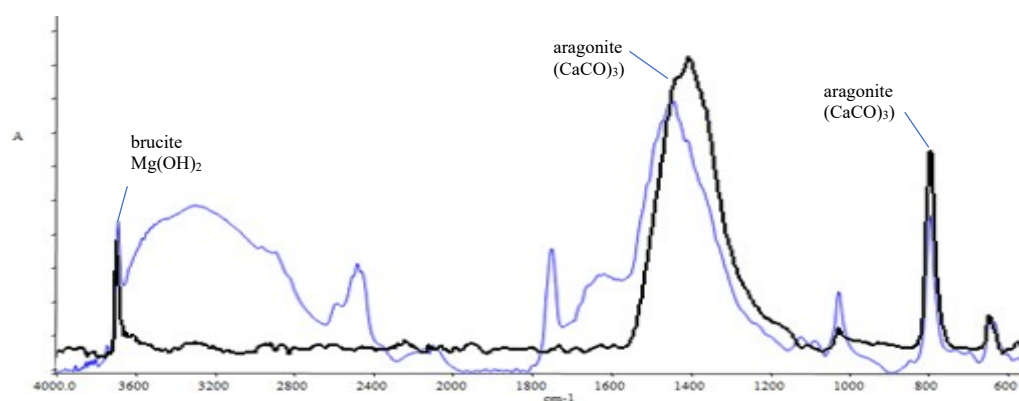
10 a-b) mostrano come il voltaggio imposto durante la polarizzazione determini un diverso rapporto Ca/Mg nell'accrescimento: valori di potenziale  $E < 1.2$  V/SCE determinano un rapporto Ca/Mg  $< 1$ , in cui il Mg è l'elemento principale, che costituisce, sottoforma di brucite, dal 79.7 % al 90.5 % dell'accrescimento. Al potenziale di  $-1.2$  V il rapporto Ca/Mg è di poco superiore ad 1, con un accrescimento formato per il 54% da Ca, sotto forma di aragonite e per il 46% da Mg come brucite. L'accrescimento ottenuto al valore di potenziale meno negativo ( $-1.1$  V) è quello che presenta la composizione maggiore di aragonite, 80 %, e la percentuale minore di Mg (20%), con un rapporto Ca/Mg che raggiunge un valore di 4.



**Figura 10** : Analisi EDX sugli accrescimenti a differenti potenziali. Rapporto Ca/Mg degli accrescimenti (a); percentuale atomica di Ca e Mg negli accrescimenti. (b)

#### 4.4 Caratterizzazione dell'accrescimento minerale ottenuto durante le sperimentazioni con *Mytilus galloprovincialis*

La polarizzazione della lamina durante le sperimentazioni condotte in presenza dei mitili effettuata ad un voltaggio di -1.1 V e di durata di sette giorni ha determinato l'accrescimento di un notevole strato di deposito minerale che, tuttavia, non è rimasto adeso alla lamina ed è precipitato in vasca, con successiva ricrescita di materiale sulla lamina nelle zone di distaccamento. L'analisi qualitativa effettuata tramite DRIFT FT-IR ha mostrato uno spettro simile a quello della sperimentazione precedente condotta allo stesso voltaggio, con picchi di assorbimento per l'aragonite ( $1445\text{ cm}^{-1}$ ,  $855\text{ cm}^{-1}$ ) maggiori rispetto a quelli della brucite ( $3693\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 11). Allo stesso modo, la composizione elementare analizzata in SEM EDX ha indicato un maggior quantitativo di carbonato di calcio rispetto all'idrossido di magnesio (in percentuale atomica).



**Figura 11:** Spettri di assorbimento degli accrescimenti minerali ottenuti nelle prove potenziostatiche (FT-IR DRIFT) al potenziale di -1.1 V. **In blu:** spettro della prova preliminare di accrescimento (-1.1V); **in nero:** spettro della prova di accrescimento in vasca sperimentale con *Mytilus galloprovincialis* (-1.1 V)

#### 4.5 Parametri chimico-fisici dell'acqua e risposte biologiche in *Mytilus galloprovincialis*

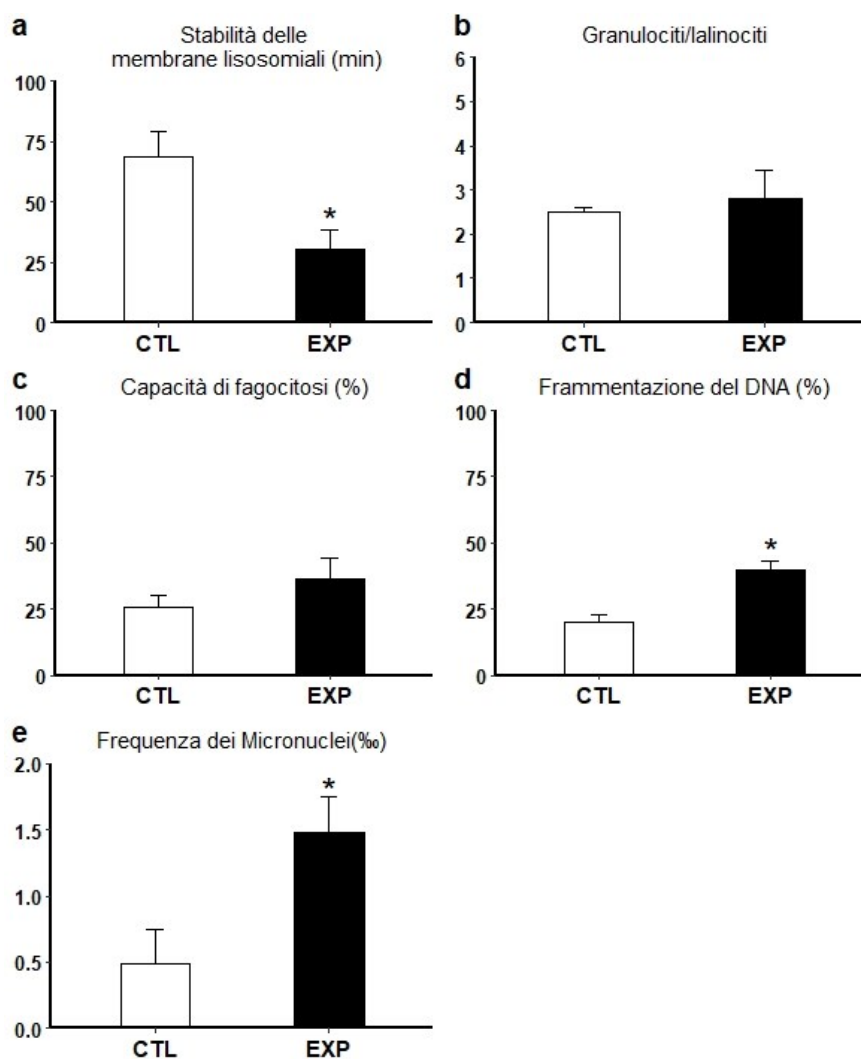
Dopo 7 giorni di sperimentazione, gli organismi trattati (EXP) con la polarizzazione potenziostatica hanno mostrato una mortalità del 42% (19 individui morti) mentre nella vasca in condizioni di controllo non è stata riscontrata mortalità. I risultati ottenuti dalle analisi dei parametri chimico-fisici dei campioni di acqua sono riportati in Tabella 3. Le analisi delle acque hanno evidenziato un aumento nella concentrazione dei cloruri ( $\text{Cl}^-$ ) e dello ione magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ed una diminuzione di ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) di circa il 50% nella vasca esposto rispetto alla vasca controllo. Non sono state riscontrate differenze nei valori di durezza, richiesta chimica di ossigeno (COD), nei composti dello zolfo ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ) dell'azoto ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) del boro ( $\text{BO}_3^{3-}$ ), alcalinità e pH tra i campioni di acqua della vasca esposto e quella di controllo.

Parametri		CTL	EXP
$\text{Cl}^-$	mg/L	52600	81600
$\text{Ca}^{2+}$	mg/L	114	57
$\text{Mg}^{2+}$	mg/L	80.3	112
$\text{CO}_3^{2-}$	mg( $\text{CO}_2$ )/L	131	147
Durezza	°dH	34.6	33.9
COD	mg( $\text{O}_2$ )/L	309	276
$\text{SO}_4^{2-}$	mg/L	393	407
$\text{SO}_3^{2-}$	mg/L	1	1.06
$\text{S}^{2-}$	mg/L	< 0.1	< 0.1
$\text{NH}_4^+$	mg/L	< 2	< 2
$\text{NO}_2^-$	mg/L	0.038	0.04
$\text{NO}_3^-$	mg/L	0.593	0.53
$\text{BO}_3^{3-}$	mg(B)/L	2.98	4.24
pH		7.95	8.1
Alcalinità Totale	$\mu\text{mol/kg}$	3091.8	2916.6

**Tabella 3:** Risultati dei parametri chimico-fisici misurati nei campioni di acqua ( $\text{Cl}^-$  ione cloruro,  $\text{Ca}^{2+}$  ione calcio,  $\text{Mg}^{2+}$  ione magnesio,  $\text{CO}_3^{2-}$  ione carbonato, Durezza, COD (Chemical Oxygen Demand),  $\text{SO}_4^{2-}$  ione solfato,  $\text{SO}_3^{2-}$  ione solfito,  $\text{S}^{2-}$  ione solfuro,  $\text{NH}_4^+$  ione ammonio,  $\text{NO}_2^-$  ione nitrito,  $\text{NO}_3^-$  ione nitrato,  $\text{BO}_3^{3-}$  ione borato, Alcalinità Totale. I dati sono riportati come valori di letture singole.

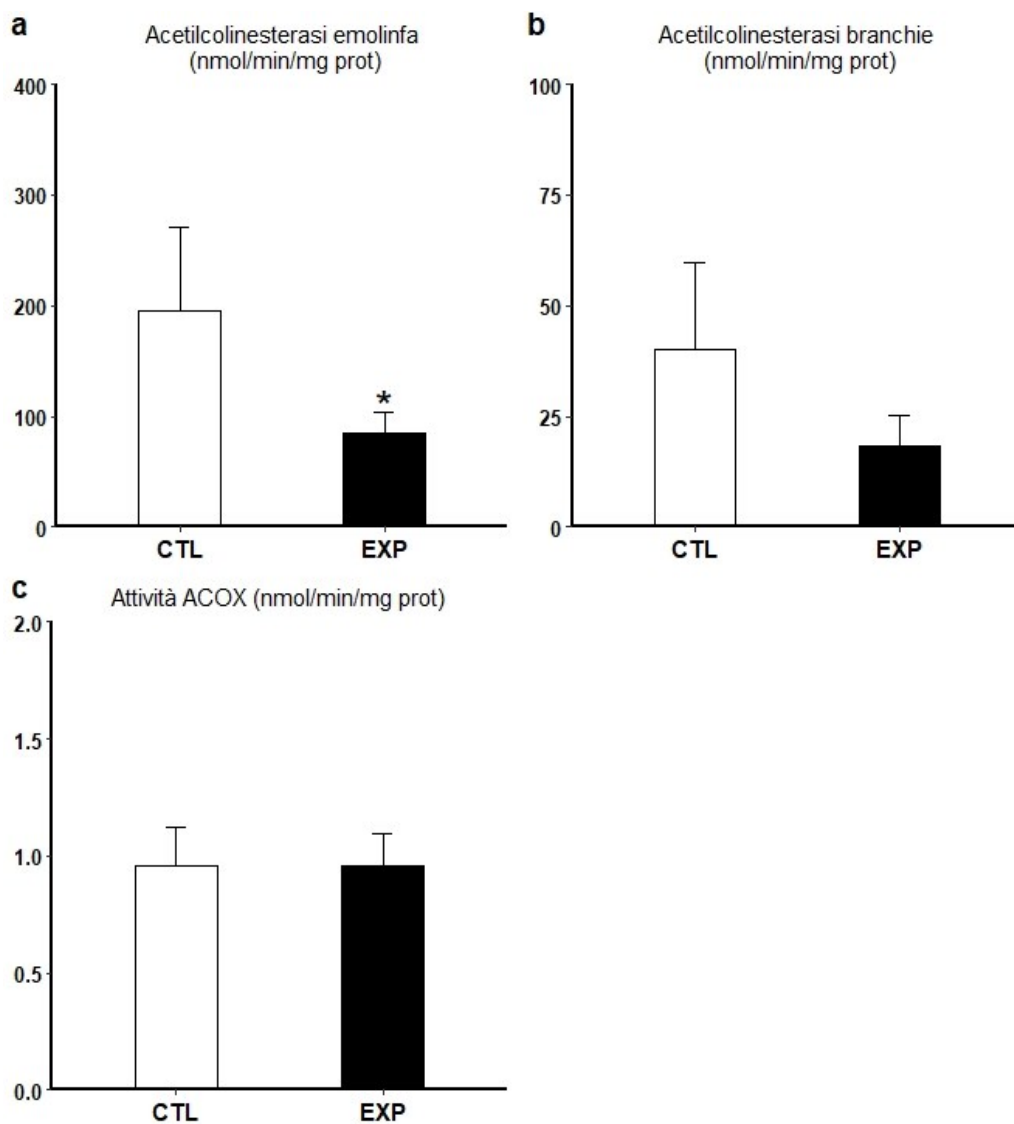
I risultati delle risposte biologiche valutate negli organismi di controllo (CTL) e in quelli trattati (EXP) sono riportati nelle Figure 12-13-14. I biomarkers di risposta immunitaria, analizzati nell'emolinfa dei mitili mostrano una riduzione significativa della stabilità delle membrane lisosomiali negli individui esposti rispetto ai controlli (Figura 12 a), mentre le variazioni nel rapporto granulociti ialinociti (Figura 12 b) e nella capacità di fagocitosi risultano limitate (Figura 12 c). Sono state riscontrate variazioni statisticamente significative anche nei biomarker di danno genotossico valutati nell'emolinfa, in particolare un aumento dei livelli di frammentazione del DNA (Figura 12 d) e della frequenza di micronuclei (Figura 12 e) negli individui esposti all'accrescimento minerale rispetto agli individui di controllo. Per quanto riguarda i biomarker di risposta specifica è stata osservata negli individui esposti una inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa e, in modo minore nelle branchie (Figura 13 a-b) ma non sono state evidenziate delle differenze significative nell'attività dell'Acil-CoA ossidasi (Figura 13 c). Riguardo i parametri utilizzati per la valutazione dello stress ossidativo l'analisi dei singoli enzimi antiossidanti hanno evidenziato un'induzione significativa degli enzimi glutatione S-transferasi (Figura 14 b), delle glutatione perossidasi totali (Figura 14 e) e, seppur non in maniera significativa, un aumento dei livelli medi di glutatione totale negli organismi della vasca esposto rispetto a quelli di controllo. Anche il contenuto di lipofuscina nelle ghiandole digestive ha mostrato un aumento significativo negli organismi trattati (Figura 14 g e 15). Delle

variazioni più limitate sono state invece misurate per gli enzimi catalasi (Figura 14 a), glutatione reduttasi (Figura 14 c), glutatione perossidasi Se-dipendenti (Figura 14 d) e contenuto di lipidi neutri (Figura 14 h).

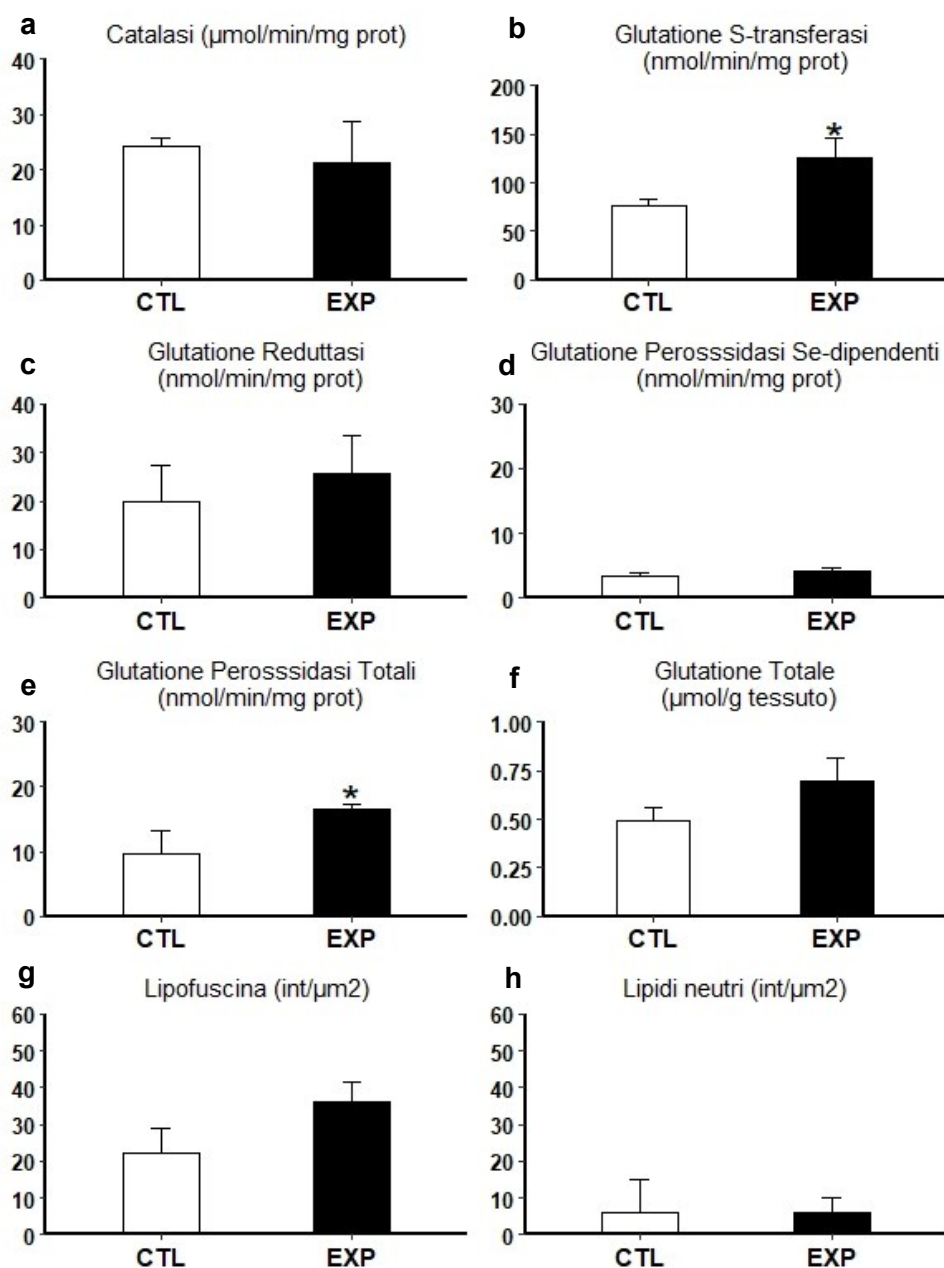


**Figura 12** : Biomarkers di risposta immunitaria e di danno genotossico analizzati nell'emolinfa dei mitili. Stabilità delle membrane lisosomiali (a), rapporto granulociti/ialinociti (b), capacità di fagocitosi (c), percentuale di frammentazione di DNA (d) e frequenza di micronuclei (e). Dati espressi come media  $\pm$  deviazione standard, n=4. Gli asterischi (\*) indicano le differenze statisticamente significative per il gruppo degli esposti (EXP) rispetto al gruppo di controllo (CTL) (t-test, t di Student, p<0.05).

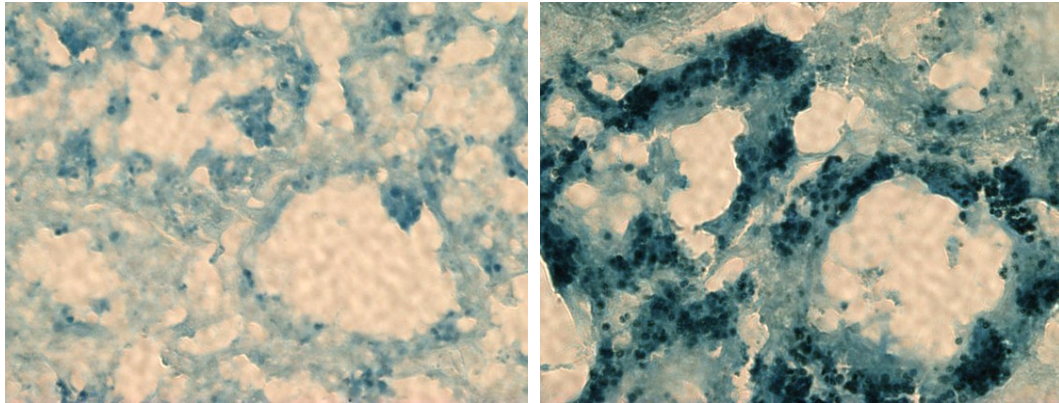




**Figura 13:** Biomarkers di risposta specifica. Attività dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa (a) e nelle branchie (b), e attività dell' Acyl-Coenzima A ossidasi misurata nella ghiandola digestiva (c). Dati espressi come media  $\pm$  deviazione standard, n=4. Gli asterischi (\*) indicano le differenze statisticamente significative per il gruppo degli esposti (EXP) rispetto al gruppo di controllo (CTL) (t-test, t di Student,  $p < 0.05$ ).



**Figura 14:** Attività degli enzimi antiossidanti, dei livelli di glutazione totali e accumulo di prodotti di perossidazione lipidica, analizzati nella ghiandola digestiva dei mitili campionati. Catalasi (a), glutazione S-transferasi (b), glutazione reduttasi (c), glutazione perossidasi Se-dipendenti (d) e totali (e), livelli di glutazione totali (f), livelli di lipofuscina (g) e lipidi neutri (h). Dati espressi come media  $\pm$  deviazione standard,  $n=3$ . Gli asterischi (\*) indicano le differenze statisticamente significative per il gruppo degli esposti (EXP) rispetto al gruppo di controllo (CTL) (t-test, t di Student,  $p<0.05$ ).



**Figura 15:** Sezioni criostatiche di ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* colorate con reazione di Schmorl. **A sinistra:** sezione in un individuo controllo; **a destra:** sezione in un individuo esposto.

## 5 DISCUSSIONI

Dai risultati ottenuti in laboratorio sulle lamine in acciaio al carbonio è stato possibile confermare che anche in acqua di mare naturale del Mar Adriatico si può avere un accrescimento di materiale minerale per elettrodeposizione. L'accrescimento risulta formato principalmente da due composti, idrossido di magnesio (brucite,  $Mg(OH)_2$ ) e carbonato di calcio ( $CaCO_3$ ) così come descritto sia da G.C. Cox che da Hilbertz (U.S. Patent No. 2 200 469 (1940); U.S Patent No. 2 417 064 (1947) G. C. Cox, Hilbertz 1976). E' stato inoltre evidenziato come il voltaggio impresso nella cella, a parità di condizioni di sperimentazione, tenda a modificare la composizione del materiale accresciuto e la velocità di accrescimento. In particolare, la velocità di accrescimento è maggiore man a mano che il voltaggio applicato è maggiore; il rapporto Ca/Mg del deposito minerale invece tende a diminuire all'aumentare del voltaggio imposto (e quindi della corrente applicata durante la polarizzazione), come riportato da Humble (H. A. Humble, Corrosion, Vol. 4, No. 7, p. 358 (1948)). Sebbene incoraggianti, i risultati ottenuti sono frutto di sperimentazioni in ambiente controllato (temperatura e movimentazione dell'acqua) e in condizioni limitanti, è quindi necessario provare questa tecnologia in situ per confermare un possibile utilizzo in strutture dismesse in Mar Adriatico. Proprio nell'ottica di un futuro utilizzo della tecnologia dell'accrescimento minerale in piattaforme offshore è stato anche valutato il possibile effetto che questa

tecnologia possa avere sulla chimica dell'acqua e sugli organismi marini, analizzando le risposte biologiche (biomarker) degli organismi esposti. L'integrazione di tali risultati aiuta a meglio interpretare le cause di alterazioni biochimiche e cellulari legate a varie forme di tossicità (Cajaraville et al., 2000; Gorbi et al., 2008), potenzialmente indotta dalla tecnologia di accrescimento minerale. Gli effetti della tecnologia di accrescimento minerale sono stati valutati su individui di *Mytilus galloprovincialis* dato l'ampio utilizzo del genere *Mytilus* come organismo bioindicatore in studi eco-tossicologici (Livingstone, 1993), nonché per la loro naturale abbondanza sia su substrati naturali sia artificiali come le piattaforme offshore presenti in Adriatico. Le analisi chimiche delle acque hanno evidenziato delle differenze di alcuni parametri tra la vasca di esposizione e quella di controllo. In particolare è stato osservato un aumento del  $\text{Cl}^-$  nella vasca di esposizione, un effetto diretto provocato dall'elettrolisi dell'acqua di mare, ed una diminuzione dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ , anche in questo caso una conseguenza diretta della tecnologia di accrescimento minerale. La produzione di cloro durante l'elettrolisi è inevitabile ed essendo un agente altamente ossidante si può accumulare in acquari o in vasche, tuttavia non sembra essere problematico in sistemi aperti, come in oceano, dove non risulta avere effetti negativi sulle specie marine (Goreau, 2012). Tuttavia questo studio ha evidenziato un incremento significativo della mortalità degli organismi esposti rispetto ai controlli. Le reazioni di ossidazione durante il processo elettrolitico determinano la produzione di ipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), cloro

molecolare gassoso ( $\text{Cl}_2$ ) e acido ipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) in percentuale differente a seconda del pH dell'acqua (Henao et al., 2018; Mourad and Hobro, 2020). Queste sostanze hanno un forte potere ossidante e sono spesso impiegate nel trattamento delle acque reflue e potabili con l'obiettivo di eliminare microorganismi indesiderati e ossidare la sostanza organica presente nei reflui degli impianti di depurazione (Plewa et al., 2002, Plewa et al., 2008a, Plewa et al., 2008b, Echigo et al., 2004; Richardson et al., 2007, Richardson et al., 2008, Dad et al., 2013, Pals et al., 2013; Mourad and Hobro, 2020). Inoltre a pH compreso tra 7-9 l'acido ipocloroso può ossidare gli ioni bromuro ( $\text{Br}^-$ ) per formare acido ipobromoso. agente a sua volta ossidante anche più forte delle specie del cloro stesse. Tali composti ossidanti possono avere importanti effetti biologici. Questi effetti sono stati studiati principalmente a livello sperimentale utilizzando organismi marini appartenenti a diversi taxa (Tabella 5) per valutare il potenziale impatto del cloro rilasciato da parte di impianti industriali con prese d'acqua mare dove l'elettrolisi è impiegata per il contenimento del biofouling all'interno delle tubature. Oltre alla formazione del cloro l'elettrolisi dell'acqua di mare porta alla formazione di composti organo-alogenati (e.g. tria-alometani, cloroformio) che sebbene prodotti in basse concentrazioni tali da non determinare tossicità acuta (i.e. mortalità, Jenner et al. 1997) potrebbero determinare effetti genotossici e diossina simile con manifestazioni biologiche più di medio e lungo termine (Taylor 2006).

	<b>Effetti osservati</b>	<b>Ossidante</b>	<b>Concentrazione (mg/L)</b>	<b>Riferimento bibliografico</b>
Fitoplancton	Modificazioni permeabilità di membrana	TRC	0.1	Vidieau et al. (1979)
	Riduzione dei tassi di respirazione	“	“	“
	Riduzione dei tassi di crescita e della fotosintesi	TRC	0.1	Maggi et al. (1979)
Idroidi	Riduzione dei tassi di crescita	TRC	>1.0	McLean (1973)
Anellidi	Riduzione della mobilità spermatica	TRC	0.2	Muchmore & Epel (1973)
Molluschi	Riduzione dei tassi di crescita	TRC	0.5	Bucaille & Kim (1981)
	Diminuzione del potenziale riproduttivo	“	“	
	Riduzione dei tassi di filtrazione	TRC	0.1	Roberts (1980)
Crostacei	Modificazioni dell'escrezione dell'ammoniaca	TRC	0.68	Roesijadi (1979)
Pesci	Ritardo dello sviluppo larvale	TRC	0.1-05	Hall et al. (1979)
	Danno alle branchie e riduzione dei tassi respiratori	“	“	Bass & Heath (1977)
	Cambiamenti del pH nel plasma	“	“	Booth et al. (1981)

**Tabella 4:** Effetti sub-letali del cloro residuo totale (espresso come TRC) su differenti gruppi di organismi marini (tratti da Abarnou & Miossec 1992)

E' importante sottolineare come di fatto questo studio rappresenti il primo tentativo di indagine ecotossicologica applicata a questa tecnologia e che non sia confrontabile con sperimentazioni simili. Ad oggi, infatti, non esistono studi che hanno valutato il potenziale impatto della tecnologia di accrescimento minerale che viene considerata, per la sua ampia applicazione nel restauro ambientale, in

particolare di barriere coralline degradate, come tecnologia ad elevata compatibilità ambientale (Goreau, 2012).

I risultati dei biomarker, sull'insorgenza di alterazioni a livello sub-letale suggeriscono una elevata compromissione della stabilità delle membrane lisosomiali degli organismi esposti rispetto a quelli di controllo. I lisosomi sono la sede principale di detossificazione degli xenobiotici e la stabilità delle loro membrane viene comunemente utilizzata come risposta molto sensibile all'insorgenza di stress (Lowe et al., 1995; Petrovic'et al., 2004). Ulteriori parametri di risposta immunitaria analizzati nel presente studio includono: il rapporto granulociti/ialinociti e la capacità di fagocitosi. Un vario spettro di fattori può influenzare la modulazione di questi biomarker, come metalli pesanti, IPA e tossine algali ma anche variazioni di temperatura dell'acqua, disponibilità di nutrienti ed il ciclo riproduttivo. Ciò influisce sul numero di emociti circolanti e sul rapporto tra le varie sub popolazioni cellulari (Feng, 1965; Sureshand Mohandas, 1990; Santare al.,1994, Gorbi 2013). Nei mitili le due principali popolazioni emocitarie sono i granulociti e gli ialinociti: sebbene non siano state chiarite tutte le funzioni di queste due subpopolazioni alcuni autori sostengono che i granulociti siano coinvolti nel processo di fagocitosi (Garcia et al., 2008).

In questo studio il rapporto granulociti/ialinociti e la capacità fagocitaria misurata nei mitili esposti e in quelli controllo non hanno mostrato differenze significative.



La presenza di un danno genotossico è stata indagata tramite i biomarker di frequenza dei micronuclei e il test della cometa. Per entrambi i biomarker sono state trovate delle differenze significative negli individui esposti, con un aumento della frammentazione della doppia elica di DNA e un aumento della frequenza di micronuclei, piccole masse di cromatina risultanti dalla rottura cromosomale o dalla formazione aneuploidie durante la divisione cellulare (Venier et al., 1997). La risposta dei due biomarker certifica l'insorgenza di un danno genotossico negli organismi che sono stati esposti alla tecnologia di accrescimento minerale ed è in linea con l'aumento della mortalità.

Per quanto riguarda i biomarker di risposta specifica, l'Acetilcolinesterasi (AChE) è un enzima che svolge un ruolo fondamentale nel sistema nervoso degli invertebrati e la sua inibizione può essere considerato un tipico effetto della presenza di carbammati e di composti organofosforici (Rickwood & Galloway, 2004), sebbene anche altri fattori possono causare la sua inibizione. Negli individui esposti si è verificata un'inibizione significativa dell'acetilcolinesterasi nell'emolinfa che potrebbe rivelare un certo effetto neurotossico dell'esposizione alla tecnologia di accrescimento. La proliferazione perossisomiale è stata valutata tramite l'attività dell'acil-CoA ossidasi (ACOX) che risulta un biomarker rilevante negli invertebrati marini (Cancio et al., 1999). In questo studio non sono state rilevate induzioni significative dell'enzima.

Limitate variazioni sono state misurate per le risposte antiossidanti: i livelli di glutazione totale hanno mostrato un aumento negli individui esposti rispetto a quelli di controllo, così come l'induzione dell'attività dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST). La GST è un enzima coinvolto nella fase II del metabolismo degli xenobiotici catalizzando la coniugazione delle molecole tossiche con il glutatione. L'aumento significativo dell'attività di questo enzima suggerisce la potenziale attivazione dei sistemi di detossificazione, negli organismi esposti. L'accumulo della lipofuscina e dei lipidi neutri nei lisosomi delle ghiandole digestive sono biomarker analizzati per la valutazione dei processi di perossidazione lipidica e lipidosi mediata da xenobiotici (Moore, 1988; Regoli, 1992; Regoli et al., 2004). Nel presente studio è stato osservato un lieve aumento, non significativo, dell'accumulo di lipofuscina negli organismi esposti rispetto ai controlli. Le lipofuscine sono prodotti di attacco ossidativo su proteine e lipidi che possono generare ulteriori specie reattive all'ossigeno, inibendo ulteriormente la funzione lisosomiale. Non sono state notate invece delle differenze nell'accumulo di lipidi neutri tra organismi esposti ed organismi controllo.

In conclusione, le variazioni di alcuni parametri chimici dell'acqua, unitamente all'elevata mortalità e la presenza di alterazioni biochimiche e cellulari misurate negli organismi sopravvissuti alla sperimentazione suggeriscono che la tecnologia di accrescimento minerale potrebbe determinare una situazione non solo di stress ma anche di disturbo sugli organismi marini. Tuttavia, sono necessarie delle

ulteriori sperimentazioni in laboratorio (tramite sistemi che prevedano il ricircolo continuo di acqua) o in ambiente naturale (tramite l'utilizzo di mesocosmi) per meglio comprendere l'entità di tali effetti sugli organismi marini, dal momento che questi potrebbero essere circoscritti spazialmente e variabili in funzione della capacità dei sistemi naturali di diluire e disperdere i composti ossidanti prodotti dall'elettrodeposizione.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Cancio, I., A. Ibabe, and M. P. Cajaraville. "Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 123.2 (1999): 135-144.

Abarnou, A., and L. Miossec. "Chlorinated waters discharged to the marine environment chemistry and environmental impact. An overview." *Science of the Total environment* 126.1-2 (1992): 173-197.

Benedetti, Maura, et al. "A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays." *Environment International* 38.1 (2012): 17-28.

Berger, Nikola, et al. "Increased Oyster Growth and Survival Using Biorock Technology." *Innovative Methods of Marine Ecosystem Restoration*, CRC Press, Boca Raton (2012): 141-150.

Bocchetti, Raffaella, and Francesco Regoli. "Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea." *Chemosphere* 65.6 (2006): 913-921.

Buchholz, Cornelia M., Gesche Krause, and Bela H. Buck. "Seaweed and man." *Seaweed biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, (2012). 471-493.

Buck, Bela H., et al. "State of the art and challenges for offshore integrated multi-trophic aquaculture (IMTA)." *Frontiers in Marine Science* 5 (2018): 165.

Cajaraville, M. P., et al. "Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes." *Cell biology in environmental toxicology*. University of the Basque Country Press Service Bilbo, (1995). 29-55.

Cajaraville, Miren P., et al. "The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach." *Science of the Total Environment* 247.2-3 (2000): 295-311.

Carballal, Maria Jesus, et al. "In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes." *Fish & Shellfish Immunology* 7.6 (1997): 403-416.

Chopin, Thierry, et al. "Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability." *Journal of Phycology* 37.6 (2001): 975-986.

Dad, Azra, et al. "Pyruvate remediation of cell stress and genotoxicity induced by haloacetic acid drinking water disinfection by-products." *Environmental and molecular mutagenesis* 54.8 (2013): 629-637.

Dailianis, S., et al. "Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring." *Marine Environmental Research* 56.4 (2003): 443-470.

Day, M. D., and A. Gusmitta. "Decommissioning of offshore oil and gas installations." *Environmental Technology in the Oil Industry*. Springer, Cham, (2016). 257-283.

Dellali, Mohamed, et al. "The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130.2 (2001): 227-235.

Dickson, Andrew G., J. D. Afghan, and G. C. Anderson. "Reference materials for oceanic CO<sub>2</sub> analysis: a method for the certification of total alkalinity." *Marine Chemistry* 80.2-3 (2003): 185-197.

Echigo, S., et al. "Contribution of brominated organic disinfection by-products to the mutagenicity of drinking water." *Water Science and Technology* 50.5 (2004): 321-328.

Ferreira, Joao G., Camille Saurel, and J. M. Ferreira. "Cultivation of gilthead bream in monoculture and integrated multi-trophic aquaculture. Analysis of production

- and environmental effects by means of the FARM model." *Aquaculture* 358 (2012): 23-34.
- Frasco, M. F., et al. "Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity." *Biomarkers* 10.5 (2005): 360-375.
- Frenzilli, Giada, et al. "DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon." *Aquatic Toxicology* 53.1 (2001): 19-32.
- García-García, Erick, et al. "Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families." *Developmental & Comparative Immunology* 32.6 (2008): 637-653.
- Giulianini, Piero Giulio, et al. "Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in in vivo phagocytosis." *Tissue and Cell* 35.4 (2003): 243-251.
- Goldberg, Edward D., et al. "The mussel watch." *Environmental conservation* 5.2 (1978): 101-125.
- Gorbi, S., et al. "Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*." *Fish & shellfish immunology* 35.3 (2013): 941-950.
- Gorbi, Stefania, and Francesco Regoli. "Total oxyradical scavenging capacity as an index of susceptibility to oxidative stress in marine organisms." (2003): 303-322.
- Goreau, Thomas J. "Electrical stimulation greatly increases settlement, growth, survival, and stress resistance of marine organisms." *Natural Resources* 2014 (2014).
- Goreau, Thomas J., and W. Hilbertz. "Marine ecosystem restoration: costs and benefits for coral reefs." *World resource review* 17.3 (2005): 375-409.
- Henao, Laura Domínguez, Andrea Turolla, and Manuela Antonelli. "Disinfection by-products formation and ecotoxicological effects of effluents treated with peracetic acid: A review." *Chemosphere* 213 (2018): 25-40.

Hilbertz, Wolf H. "Accretion coating and mineralization of materials for protection against biodegradation." U.S. Patent No. 4,461,684. (1984).

Hilbertz, Wolf H. "Solar-generated construction material from sea water to mitigate global warming: Availability of nearly unlimited and easily accessible resources such as minerals dissolved in sea water and carbon in the atmosphere enable the underlying concept of the formulation and development of solar-generated building materials (SBM)." *Building research and information* 19.4 (1991): 242-255.

Hilbertz, Wolf H., and Thomas J. Goreau. "Method of enhancing the growth of aquatic organisms, and structures created thereby." U.S. Patent No. 5,543,034.(1996).

Hilbertz, Wolf. "Electrodeposition of minerals in sea water: Experiments and applications." *IEEE Journal of Oceanic Engineering* 4.3 (1979): 94-113.

Jenner, Henk A., et al. "Chlorination by-products in chlorinated cooling water of some European coastal power stations." *Marine Environmental Research* 43.4 (1997): 279-293.

Leporini, Mariella, et al. "Reconversion of offshore oil and gas platforms into renewable energy sites production: Assessment of different scenarios." *Renewable Energy* 135 (2019): 1121-1132.

Livingston, D. R., L. Förlin, and S. G. George. "Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms." (1994): 154-171.

Margheritini, Lucia, et al. "Development of an Eco-Sustainable Solution for the Second Life of Decommissioned Oil and Gas Platforms: The Mineral Accretion Technology." *Sustainability* 12.9 (2020): 3742.

Martínez-Gómez, Concepción, J. Bignell, and D. Lowe. "Lysosomal membrane stability in mussels." (2015).

Moore, Michael N., and K. Robert Clarke. "Use of microstereology and quantitative cytochemistry to determine the effects of crude oil-derived aromatic hydrocarbons on lysosomal structure and function in a marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*." *The Histochemical Journal* 14.5 (1982): 713-718.

Moore, Michael N., J. Icarus Allen, and Allan McVeigh. "Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status." *Marine Environmental Research* 61.3 (2006): 278-304.

Mourad, Khaldoon A., and Sture Hobro. "Developing chlorine-based antiseptic by electrolysis." *Science of The Total Environment* 709 (2020): 136108.

Najimi, S., et al. "Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco)." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58.6 (1997): 901-908.

Neori, Amir, et al. "Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture." *Aquaculture* 231.1-4 (2004): 361-391.

Nigro, M., et al. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, (2006), 77.4: 339-347.

Pals, Justin, et al. "Human cell toxicogenomic analysis linking reactive oxygen species to the toxicity of monohaloacetic acid drinking water disinfection byproducts." *Environmental science & technology* 47.21 (2013): 12514-12523.

Plewa, Michael J., et al. "Comparative mammalian cell toxicity of N-DBPs and C-DBPs." 2008. 36-50.

Plewa, Michael J., et al. "Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products." *Environmental and molecular mutagenesis* 40.2 (2002): 134-142.

Plewa, Michael J., et al. "Occurrence, synthesis, and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of haloacetamides: an emerging class of nitrogenous drinking water disinfection byproducts." *Environmental science & technology* 42.3 (2008): 955-961.

Quevedo, E., et al. "Multi-use offshore platform configurations in the scope of the FP7 TROPOS Project." 2013 *MTS/IEEE OCEANS-Bergen. IEEE*, (2013).



Regoli Francesco, Abbiati M., Maccaferri S. Principi e metodi per la caratterizzazione di sedimenti contaminati ai fini dell'Analisi di Rischio Ecologico. 2011. Documento Interno.

Regoli, F. "Monitoraggio della contaminazione chimica: ecotossicologia e biomarkers." *Recupero ambientale*. UTET, Torino, Italy (2001): 189-222.

Regoli, Francesco, and Gary W. Winston. "Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxyxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals." *Toxicology and applied pharmacology* 156.2 (1999): 96-105.

Regoli, Francesco, et al. "Application of a weight of evidence approach for monitoring complex environmental scenarios: the case-study of off-shore platforms." *Frontiers in Marine Science* 6 (2019): 377.

Regoli, Francesco, et al. "Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment." *Aquatic toxicology* 68.2 (2004): 167-178.

Regoli, Francesco. "Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution." *Marine Ecology Progress Series* (1992): 63-69.

Richardson, Susan D., et al. "Integrated disinfection by-products mixtures research: comprehensive characterization of water concentrates prepared from chlorinated and ozonated/postchlorinated drinking water." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71.17 (2008): 1165-1186.

Richardson, Susan D., et al. "Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 636.1-3 (2007): 178-242.

Sabater, Marlowe G., and Helen T. Yap. "Growth and survival of coral transplants with and without electrochemical deposition of CaCO<sub>3</sub>." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 272.2 (2002): 131-146.

Sabater, Marlowe G., and Helen T. Yap. "Long-term effects of induced mineral accretion on growth, survival and corallite properties of *Porites cylindrica*

Dana." *Journal of experimental marine biology and ecology* 311.2 (2004): 355-374.

Sedlar, D. Karasalihović, et al. "Offshore gas production infrastructure reutilisation for blue energy production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 108 (2019): 159-174.

Small, G. M., K. Burdett, and M. J. Connock. "A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase." *Biochemical Journal* 227.1 (1985): 205-210.

Sommer, Brigitte, et al. "Decommissioning of offshore oil and gas structures—Environmental opportunities and challenges." *Science of the total environment* 658 (2019): 973-981.

Strömberg, Susanna M., Tomas Lundälv, and Thomas J. Goreau. "Suitability of mineral accretion as a rehabilitation method for cold-water coral reefs." *Journal of experimental marine biology and ecology* 395.1-2 (2010): 153-161.

Taylor, Colin JL. "The effects of biological fouling control at coastal and estuarine power stations." *Marine Pollution Bulletin* 53.1-4 (2006): 30-48.

Venier, Paola, Sabrina Maron, and Sabrina Canova. "Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 390.1-2 (1997): 33-44.

Winston, Gary W., et al. "A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids." *Free Radical Biology and Medicine* 24.3 (1998): 480-493.