

# Valutazione ecotossicologica in acqua salmastra

Versione: N. 1

WP di riferimento: 3.3.1

Partner Responsabile: Università Cà Foscari (PP4)

Autori: Volpi Ghirardini Annamaria, Picone Marco, Distefano Gabriele,  
Russo Martina, Marchetto Davide

Data: 31 maggio 2022

## INDICE

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Introduzione</b> .....                                     | <b>4</b>  |
| 1.1 Ricerca bibliografica preliminare .....                     | 4         |
| <b>2 Materiali e metodi</b> .....                               | <b>6</b>  |
| 2.1 Preparazione lisciviato per test ecotossicologici .....     | 6         |
| 2.2 Integrated Testing Strategy (ITS) .....                     | 8         |
| 2.3 Test di tossicità per le acque salmastre .....              | 9         |
| 2.4 Espressione dei risultati dei test e analisi dei dati ..... | 12        |
| <b>3 Risultati e discussione</b> .....                          | <b>13</b> |
| 3.1 Tier I .....  | 13        |
| 3.2 Tier II .....   | 17        |
| 3.3 Tier III .....  | 18        |
| <b>4 Conclusioni</b> .....                                      | <b>19</b> |
| <b>5 Bibliografia</b> .....                                     | <b>20</b> |

---

## ACRONIMI

---

ACQ - Alkaline Copper Quaternary (Quaternario di rame alcalino)  
ASTM - American Society for Testing and Materials  
CBA - Copper Borate Azole (Composti azolici di rame e boro)  
CCA - Chromated Copper Arsenate (arsenato di rame cromato)  
EC50 - Effect Concentration (Concentrazione Efficace per il 50% degli organismi utilizzati nei test di tossicità)  
ELS - Early Life Stage (stadi precoci di sviluppo)  
ISO - International Organization for Standardization  
ITS - Integrated Testing Strategy (Strategia Integrata di Valutazione)  
LDR - Larval Development Rate (tasso di sviluppo larvale)  
MAV - Magistrato alle Acque di Venezia  
OECD - Organization for Economic Cooperation and Development  
TM - Termically Modified (termicamente modificato)  
TU50 - Toxicity Unit o Unità di Tossicità (TU50 = 100/EC50)  
UC5 - Use Class 5 (classe d'uso del legno 5)  
US-EPA - United States Environmental Protection Agency  
UTW - UnTreated Wood (legno non trattato)

## SOMMARIO

---

In questo studio è stato impiegato un approccio sperimentale basato su una batteria di indicatori in grado di fornire valutazioni del pericolo per il biota marino a diversi livelli trofici e di complessità biologica di alcuni prodotti usati per la protezione del legno. La valutazione della tossicità di lisciviati ottenuti a partire da provini di legno (trattato e non trattato) ha previsto l'adozione di una Integrated Testing Strategy (ITS), la cui struttura di tipo gerarchico permette la valutazione dell'impatto ambientale dei trattamenti che vengono impiegati per aumentare la durabilità del legno. In particolare, l'ITS si caratterizza per un aumento di sensibilità dei test ecotossicologici utilizzati nei tre livelli valutativi (TIER 1 - Test acuti; Tier 2 - Test sugli stadi più sensibili, Tier 3 - Test cronici) e valuta i possibili effetti e quanto questi siano "accettabili" su flora e fauna acquatica, permettendo così di identificare i trattamenti ecocompatibili. L'indagine è stata condotta con lo scopo di comprendere come i tempi di maturazione in acqua possano influenzare il processo di rilascio dal legno al fine di predisporre linee guida a supporto delle aziende per definire i tempi di maturazione necessari prima di impiegare un materiale in ambiente. L'applicazione del percorso ITS ha previsto il confronto tra provini di legno trattato con il corrispondente non trattato (UTW) ed ha focalizzato l'indagine su provini di *Picea abies* modificati termicamente (TM) e trattati con Silvanolin al fine di un suo impiego in ambito marittimo (UC5), utilizzando diverse concentrazioni di Cu: UC5<sub>(I)</sub>, prima formulazione ad alta concentrazione di Cu, UC5<sub>(II)</sub>, seconda formulazione ad alta concentrazione di Cu (con trattamento per limitare il rilascio), UC5<sub>(III)</sub>, formulazione finale con concentrazione di Cu pari all'1%, MAR, formulazione ottenuta utilizzando una concentrazione di Cu dello 0.25% e successivamente trattando il legno con acido ossalico, LOW, formulazione a bassa

concentrazione di Cu, pari allo 0.033% nel trattamento. La prima applicazione dei test di TIER I su UC5<sub>(I)</sub> e UC5<sub>(II)</sub>, ha evidenziato l'altissima tossicità di questi due prodotti e la necessità di rivedere la formulazione dei trattamenti finalizzati all'impiego in categoria UC5 al fine di trovare delle soluzioni meno impattanti sull'ambiente acquatico, in linea con gli obiettivi della strategia ITS. La sperimentazione definitiva sulle nuove formulazioni (UC5<sub>(III)</sub>, MAR e LOW) ha evidenziato che, sulla base dei criteri adottati per la procedura di valutazione ITS predisposta per le acque salate, i trattamenti UC5<sub>(III)</sub> e MAR non risultano compatibili per l'ambiente marino-costiero, a causa dell'elevata tossicità acuta generata (TIER 1), anche dopo maturazione di 30 giorni, nei confronti di tutti gli indicatori (UC5<sub>(III)</sub>) o di almeno due indicatori (MAR). I risultati ottenuti al primo livello valutativo con TM e LOW hanno invece reso questi trattamenti eleggibili per la valutazione di livello II (TIER II), dal momento che gli effetti acuti sono assenti o comunque confrontabili con gli effetti generati dal legno non trattato (UTW). Alla luce dei risultati ottenuti nel secondo step valutativo (TIER II), considerato che il criterio di superamento del TIER II prevedeva che almeno uno dei due test non producesse effetto negativo significativo rispetto a UTW, entrambi i trattamenti TM e LOW sono risultati eleggibili per il passaggio al terzo step valutativo (TIER III). Considerati i risultati di quest'ultimo livello valutativo, i trattamenti TM e LOW sono risultati complessivamente equivalenti, in termini di impatti sugli indicatori acquatici, al legno non trattato (UTW). Ai sensi della valutazione ITS proposta in questo progetto, quindi, i trattamenti TM e LOW sono risultati accettabili per un impiego in ambiente marino/salmastro comportando la possibile insorgenza di effetti a lungo termine solo dopo esposizione a lungo termine in condizioni statiche o di scarso rinnovo. La sperimentazione condotta considerando i tre tempi di maturazione (0, 15 e 30gg) ha fatto emergere tuttavia chiaramente come sia necessario un periodo di maturazione di almeno 30 giorni prima dell'impiego del materiale (trattato e non trattato), per limitare gli impatti sull'ambiente marino-costiero.

## 1 INTRODUZIONE

---

L'obiettivo principale del progetto di ricerca è la valutazione ecotossicologica di lisciviati ottenuti da legni trattati termicamente e chimicamente, seguendo una strategia integrata di valutazione (ITS), la cui struttura di tipo gerarchico permette la valutazione dell'impatto ambientale dei trattamenti che vengono impiegati per aumentare la durabilità del legno. In particolare, la strategia ITS valuta i possibili effetti e quanto questi siano "accettabili" su flora e fauna acquatica, con particolare riguardo all'ambiente marino-costiero.

### 1.1 Ricerca bibliografica preliminare

---

La ricerca bibliografica è stata condotta con lo scopo di definire quale sia lo stato dell'arte relativo alla valutazione della tossicità del lisciviato del legno naturale o trattato ed ha messo in evidenza a) quali sono le procedure standard e quali sono

invece sperimentali, b) il tipo di fluido lisciviante impiegato, c) eventuali pretrattamenti dei legni, d) i parametri chimico-fisici e il tipo di analiti chimici che si è andati a ricercare, e) organismi e tipi di test ecotossicologici impiegati nelle valutazioni, f) e infine i risultati degli studi con le relative criticità.

Abbiamo sintetizzato la ricerca bibliografica in due allegati, il primo focalizzato sui parametri e le tecniche di lisciviazione che sono state impiegate (Allegato 1) e il secondo relativo alla caratterizzazione chimica ed ecotossicologica dei lisciviati (Allegato 2).

### **Tecniche di lisciviazione**

Lo scopo di questa parte della ricerca bibliografica è stato quello di capire quali sono i metodi che sono stati utilizzati per caratterizzare materiali di tipo legnoso che siano trattati o non trattati al fine di definire il disegno sperimentale.

Di fatto, dei 21 lavori presi in esame dieci sono riferiti a legni trattati con vari impregnanti a base di rame (Allegato 1). Il più studiato è l'arsenato di rame cromato (CCA, 5 lavori), ora vietato dall'UE, seguito dal quaternario di rame alcalino (ACQ) e dai composti azolici di rame e boro (CBA) (4 lavori ciascuno). Altri due tipi di trattamenti studiati, non a base di rame, sono la furfurilazione e l'applicazione di pentaclorofenolo. Sette lavori avevano lo scopo di definire la tossicità naturale del legno e anche in questo caso, come per i legni trattati, sono state usate delle tecniche di lisciviazione definite in maniera tale da essere riproducibili. Quattro studi invece prevedevano la raccolta di lisciviato direttamente in campo e generato dalle piogge stagionali.

Per quanto riguarda la procedura di lisciviazione, il fluido maggiormente usato è l'acqua distillata/deionizzata o di rubinetto (13) mentre l'acqua marina artificiale è stata usata in 3 studi. Alcuni studi come quello di Dubey et al. (2007) prevedono l'utilizzo di ben 8 acque naturali dolci, salate e salmastre con caratteristiche differenti tra loro, mentre Adeleye et al. (2016) hanno confrontato acque marine, estuarine e potabili.

Il test di lisciviazione di tipo statico è stato quello più usato dato che è stato impiegato in dodici lavori, mentre test dinamici sono stati usati solo cinque volte. Il rapporto solido:liquido (S/L) è molto variabile a seconda dell'autore e va da un minimo 1:5 ad un massimo di 1:40. Il maggior numero di esperienze è stato tuttavia condotto utilizzando un rapporto di circa 1:10. Svensson et al. (2012, 2014a,b) hanno utilizzato un rapporto S/L 1:40 nel caso specifico dei test su segatura, dal momento che quest'ultima, assorbendo molta acqua, non consentiva una lisciviazione ottimale con rapporti inferiori.

### **Caratterizzazione chimico-fisica ed ecotossicologica dei lisciviati**

Dalla ricerca bibliografica relativa ai lisciviati (Allegato 2) è stato possibile osservare che la maggior parte dei test sono stati condotti su acqua dolce, mentre solo 5 studi sono relativi all'acqua marina. Inoltre, nella maggior parte degli studi, alle analisi chimiche sono state affiancate analisi ecotossicologiche.

Per quanto riguarda i test ecotossicologici effettuati sui lisciviati, la maggior parte

degli studi ha previsto l'utilizzo del batterio *Aliivibrio (Vibrio) fischeri* e del crostaceo *Daphnia magna*. Tra queste due specie, la più sensibile è sempre risultata essere *D. magna*. Per quanto riguarda *A. fischeri*, la bibliografia indica che il truciolo di legno produce lisciviati tossici indipendentemente dal tipo di lisciviazione utilizzato (Rex et al., 2016, Svensson et al., 2014a,b).

Altre specie test utilizzate per valutare la tossicità dei lisciviati sono il bivalve *Crassostrea gigas* e il crostaceo *Artemia salina* (Libralato et al., 2007; Svensson et al. 2012, 2014a), mentre tra gli organismi vegetali si segnala l'impiego di *Scirpus microcarpus* (Wolf et al. 2019). Il test di embriotossicità con *C. gigas* si è dimostrato più sensibile rispetto al test acuto con *Artemia salina* (Libralato et al., 2007) anche perché, come riportato da Svensson et al. (2014a), questo crostaceo non risente significativamente dell'effetto tossico del lisciviato. Il test di crescita con *S. microcarpus*, invece, ha consentito di rilevare che alti livelli di fenoli disciolti possono limitare l'accesso ai nutrienti per le piante (Wolf et al. 2019).

Per quanto riguarda, invece gli organismi terrestri, sono state condotte delle esperienze mirate a valutare il bioaccumulo di metalli e metalloidi e gli effetti su riproduzione e crescita nell'oligochete *E. fetida* esposto a suoli irrorati con lisciviati di legni trattati con CCA e ACQ (Leduc et al., 2008).

In generale è possibile affermare che le sostanze responsabili degli effetti tossici acuti osservati nei legni non trattati probabilmente differiscono secondo l'essenza presa in considerazione; ad esempio, la tossicità della quercia è molto probabilmente legata ai composti fenolici, mentre la tossicità del pino deriva probabilmente dai terpeni (Svensson et al., 2012). Dall'analisi della letteratura è inoltre emerso che l'elevata componente organica del percolato o la combinazione di composti organici e acidi resinici contribuisce in maniera sensibile alla tossicità (Rex et al., 2016). Per quanto riguarda i trattamenti utilizzati per la protezione del legno, invece, è stato riscontrato che la tossicità acquatica è correlata alla frazione di Cu labile presente nel lisciviato. La minore tossicità acquatica osservata nei percolati di legno trattato ottenuti con acque naturali rispetto alle soluzioni di lisciviazione di laboratorio è probabilmente legata alla presenza di maggiori quantità di leganti e chelanti nei medium naturali (Dubey et al., 2007, Kannepalli et al., 2016).

Anche per quanto concerne le caratteristiche chimico-fisiche dei lisciviati la letteratura ha messo in risalto rilevanti differenze legate all'essenza. Ad esempio, sulla base di prove di lisciviazione eseguite con il truciolo di quattro diverse specie (quercia, pino, acero e faggio) sono state osservate differenze statisticamente significative tra la quercia e le altre tre essenze per quanto riguarda quasi tutte le variabili considerate, ovvero carbonio organico disciolto (DOC), fenoli, richiesta biochimica di ossigeno (BOD<sub>5</sub>), pH, tannini, lignina e colore (Svensson et al., 2014b). Quando il legno viene tagliato in piccoli pezzi, il processo di lisciviazione e il trasporto degli inquinanti avvengono in un tempo molto più breve di quanto dovrebbe avvenire naturalmente. Secondo i risultati, la specie, la dimensione delle particelle e le differenze anatomiche del legno del materiale stoccato sembrano determinare il carico inquinante organico rilasciato nella fase acquosa quando il legno viene a contatto con l'acqua.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Preparazione lisciviato per test ecotossicologici

Con riferimento alla letteratura scientifica e a precedenti esperienze per l'ambiente lagunare (UniVe-CVN, 2011; MAV, 2013), per l'esecuzione delle attività di progetto è stato messo a punto un metodo per la valutazione della tossicità dei provini di legno che prevede la lisciviazione al tempo zero (T0), previo lavaggio dei campioni in acqua corrente con lo scopo di eliminare eventuali residui adesi alle superfici, e successivamente altre due lisciviazioni dopo 15 (T15) e 30 (T30) giorni di maturazione in acqua.

Il processo di maturazione è rappresentato schematicamente in Figura 1.

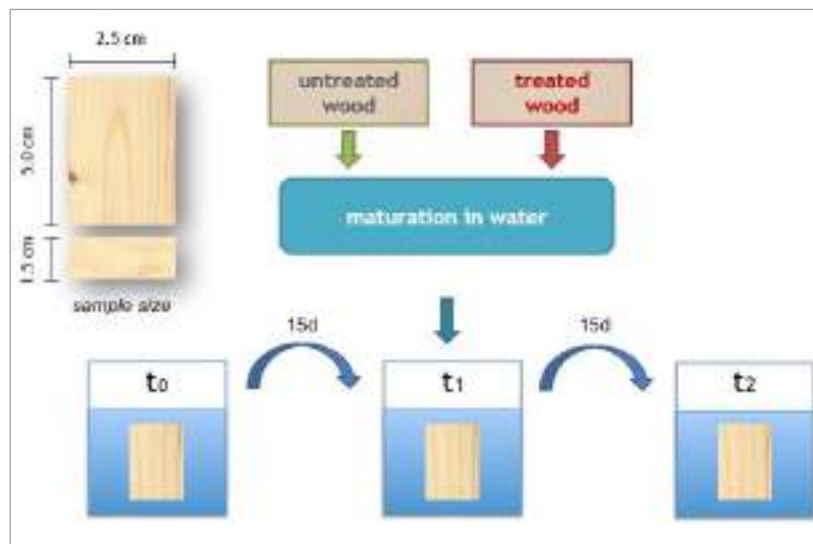


Figura 1. Processo di maturazione dei provini in legno di dimensioni 5.0 x 2.5 x 1.5 cm.

All'interno di ogni acquario che contiene 30 litri di acqua marina ricostruita (Prodac, salinità 30‰) sono stati messi i provini di legno i quali, tendendo a galleggiare, vengono legati a un peso che ne assicura la totale immersione. L'acquario è dotato di due pompe da 25 L/h che hanno lo scopo di mantenere un certo movimento dell'acqua tale da favorire il lavaggio dei provini e simulare in parte le condizioni ambientali a cui saranno sottoposti i pali. L'acqua è totalmente rinnovata al 15° giorno d'inizio del test. Al tempo T0, T15 e T30 i provini di legno sono sottoposti alla procedura di lisciviazione rappresentata in Figura 2.

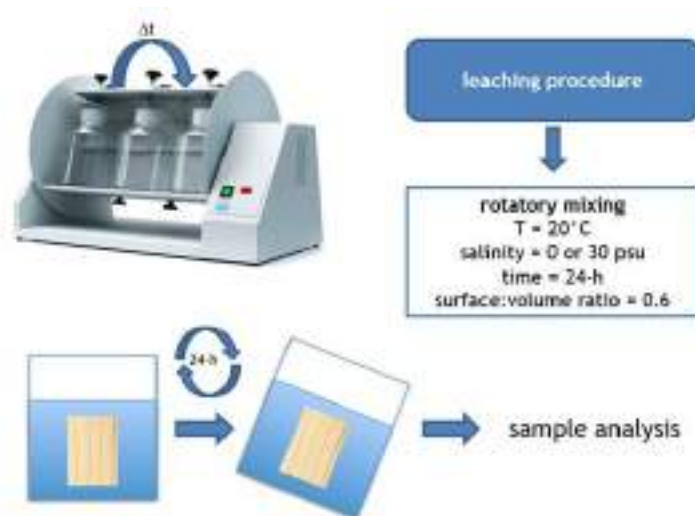


Figura 2. Strumento ROTAX sulla sinistra, parametri di lisciviazione sulla destra. In basso una rappresentazione della lisciviazione.

Per la lisciviazione è stato utilizzato un ROTAX (Velp scientifica) che prevede una rotazione verticale completa dei campioni posti all'interno di bocce chiuse. La lisciviazione è effettuata a 20°C, con salinità pari a 0 o 30 psu per 24h in accordo con le linee guida MAV (2013). È stato scelto un rapporto superficie campione/volume d'acqua pari a 0.6 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> (OECD, 1999; OECD 2007).

Tutti i provini di legno hanno dimensioni di 5.0 x 2.5 x 1.5 cm e sono stati prodotti secondo l'indicazione della norma europea EN 113-1:2020 in materia di durabilità del legno e dei prodotti a base di legno.

## 2.2 Integrated Testing Strategy (ITS)

La valutazione della tossicità dei lisciviati prodotti a partire dai provini di legno trattato e non trattato prevede di adottare una "Integrated Testing Strategy" (ITS), un approccio gerarchico in grado di guidare il processo decisionale relativo alla valutazione di impatto ambientale di nuovi prodotti presenti sul mercato per l'uso nell'industria, nel commercio e nell'edilizia.

La strategia ITS ha previsto una riorganizzazione dei metodi marini già impiegati nel Manuale Operativo prodotto per gli Enti preposti all'autorizzazione all'uso dei materiali in Laguna di Venezia (MAV, 2013), rispetto ai quali sono stati introdotti degli ulteriori livelli di approfondimento.



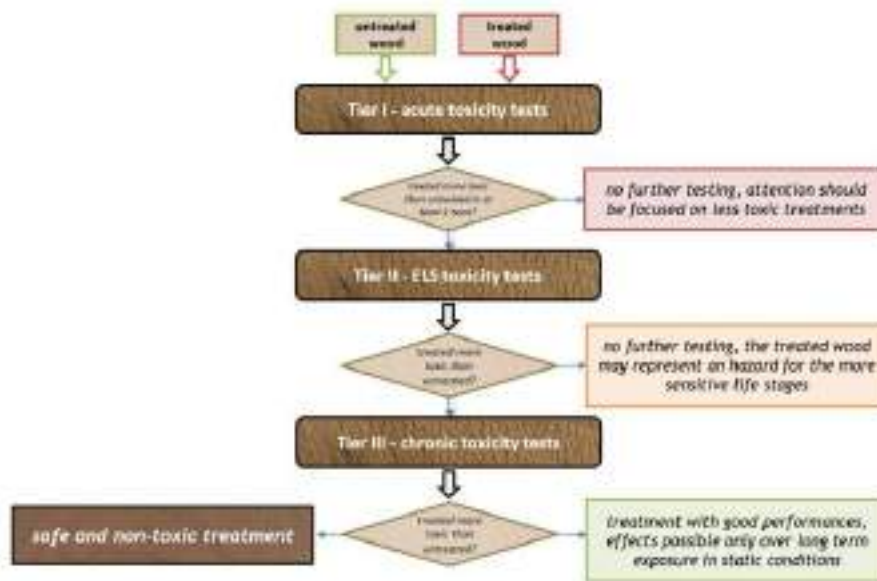


Figura 3. Approccio gerarchico dell'ITS previsto per il progetto Durasoft.

In questo progetto l'ITS prevede tre distinti step in cui si valuta l'accettabilità di possibili effetti tossici tu flora e fauna, con gradi di severità sempre maggiore man mano che si passa allo step di grado superiore in cui via via sono contemplati test sempre più sensibili (Figura 3). In via generale, si confrontano i campioni di legno trattato con il corrispondente naturale e nel caso in cui il trattato risulti meno tossico (o se comunque presenta dei valori di  $TU < 1$ ) si passa allo step di valutazione successivo. L'ultimo livello valutativo, qualora non mostri positività ai test identifica un trattamento totalmente sicuro e compatibile e qualora mostri un certo effetto cronico identifica comunque un trattamento con buona compatibilità, per il quale effetti sono possibili ma solo in particolari condizioni di esposizione (es. condizioni statiche o di scarso rinnovo).

I test previsti per ogni step, chiamati "TIER", hanno delle caratteristiche ben precise e per l'ambiente salmastro sono organizzati come segue (Figura 4):

- Il "TIER 1" valuta gli effetti acuti a breve termine in ambiente salmastro tramite il test di inibizione della bioluminescenza del batterio *Aliivibrio fischeri*, il test di inibizione della crescita della diatomea *Phaeodactylum tricornutum* e il test di immobilizzazione del copepode *Acartia tonsa*.

- Il "TIER 2" valuta la tossicità sugli stadi di sviluppo più sensibili degli organismi acquatici, tramite test di sviluppo larvale. Per l'ambiente salmastro sono previsti test su bivalvi della specie *Mytilus galloprovincialis* con un tempo di esposizione di 48 h e sui copepodi della specie *A. tonsa* con tempo di esposizione di 5 giorni.

- il "TIER 3" valuta l'effetto del lisciviato sull'intero ciclo di vita degli organismi del test; in ambiente salmastro si valuta l'effetto del lisciviato sia sugli adulti sia sulla loro prole di *A. tonsa* per un tempo di esposizione di 40 giorni.

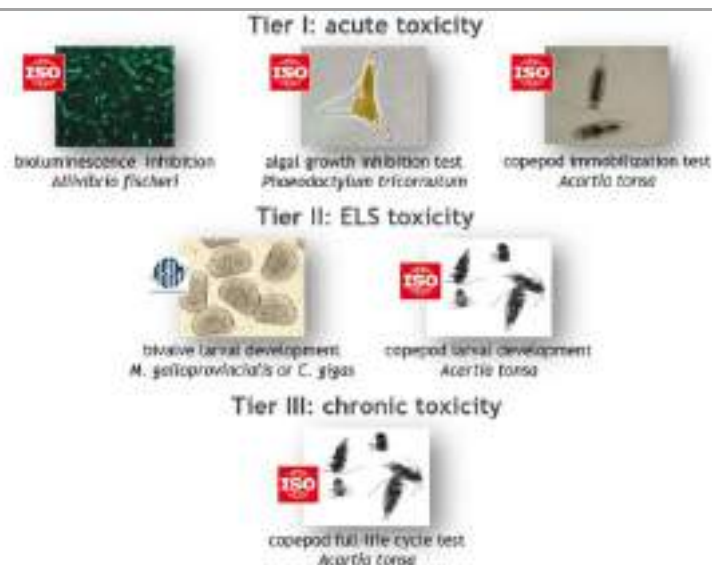


Figura 4. ITS per le acque salmastre.

## 2.3 Test di tossicità per le acque salmastre

### Tier 1

#### **-Test di inibizione della bioluminescenza batterica in *A. fischeri* (Test Microtox®).**

Il test Microtox® è stato eseguito utilizzando un analizzatore M500 (Azur Environmental) e seguendo la procedura per campioni liquidi denominata “test 100%” o “WET, Whole Effluent Test”, riportata nei protocolli del manuale fornito dal produttore (Azur Environmental, 1998). La riattivazione dei batteri liofilizzati (Microtox® Acute Reagent, Modern Water, lotto n°19K4239A) è stata effettuata aggiungendo acqua distillata ultrapura (Reconstitution Solution, Modern Water) alla fiala del reagente acuto costituito da batteri liofilizzati, per ottenere la dispersione batterica; la cuvetta con la dispersione batterica è stata acclimatata nell'apposito pozzetto dell'analizzatore a 4°C per la durata del saggio biologico, che è stato condotto a 15°C. L'inibizione della bioluminescenza a 490 nm di *A. fischeri* è stata misurata dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione a diverse diluizioni di eluati, ottenuti con acqua marina secondo ricetta ASTM ed in acqua distillata, per formulazioni di prodotto da utilizzare in ambiente marino (Silvanolin Low, Silvanolin Marine, UC5, TM e UTW). Secondo il protocollo di test, il campione è stato analizzato come non diluito (1:1) e dopo diluizioni sequenziali distanziate di un fattore 2 (da 7 a 9 con diluizioni 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 etc). Come controllo negativo e mezzo di diluizione sono state utilizzate acqua marina artificiale ASTM per i campioni marini. Il controllo positivo è stato eseguito utilizzando una soluzione di ZnSO<sub>4</sub> come tossico di riferimento e seguendo la procedura riportata nel metodo standard ISO 11348-3 per campioni liquidi utilizzando batteri liofilizzati (ISO 11348, 2007).

#### **-Test di inibizione della crescita algale con *Phaeodactylum tricornutum***

Per l'esecuzione del test con *Phaeodactylum tricornutum* si è seguito il protocollo ASTM E1218-04, "Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae" con cui è stato possibile valutare il lisciviato prodotto. Il principio del metodo prevede che delle popolazioni monospecifiche di *P. tricornutum* siano messe in coltura per diverse generazioni all'interno dei campioni da testare, i quali sono stati precedentemente arricchiti con nutrienti e con un inoculo di alghe tale che esse si trovino in uno stato di crescita esponenziale.

Al termine del test è stata misurata la densità cellulare con cui si calcola il tasso di crescita specifico per quel campione. L'endpoint valutato è l'inibizione della crescita algale rispetto al controllo e si ottiene confrontando il tasso di crescita specifico del campione con quello relativo al controllo negativo.

Un volume di 10 mL di soluzione test, in tre repliche per diluizione, è stato inserito in ciascuno dei sei pozzetti della piastra monouso (Iwaki, Japan). Per ogni trattamento, i campioni sono stati analizzati eseguendo sei diluizioni in progressione geometrica in tre repliche per concentrazione (100, 33, 10, 3, 1, 0.3%). Per il controllo negativo sono state fatte 6 repliche.

Successivamente, sono stati inseriti i nutrienti e l'inoculo calcolato in base alla densità algale della coltura di crescita che, nei giorni precedenti, è stata mantenuta in uno stato di crescita esponenziale. Le piastre, che all'inizio presentano una densità algale di circa  $10^4$  cell/mL, vengono messe in condizione statica e incubate a  $20 \pm 2$  °C sotto luce continua (6000 lx) per  $72 \pm 2$  h.

Al termine delle 72 h una stima della concentrazione algale all'interno dei pozzetti è ottenuta attraverso la conta diretta con camera di Bürker.

#### **-Test acuto (immobilizzazione) con il copepode *Acartia tonsa***

Per l'esecuzione di questo test si segue la norma standard ISO 14669/1999 che consiste nell'allestire tre vials da 10 mL per concentrazione e in ciascuna di queste inserire 2 organismi adulti prelevati dalle colture di allevamento. Questi vengono alimentati con 100µL di mix tra tre microalghe *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* e *Tisochrysis lutea*, utilizzate come fonte di cibo.

Tutte le vials vengono incubate in condizioni di temperatura  $T=20\pm 1$  °C e illuminazione con ciclo giorno/notte di 16/8 ore. Al termine delle 48 ore, le vials vengono prelevate e si procede alla conta degli organismi che non manifestano alcun tipo di movimento dopo uno stimolo meccanico e che vengono dunque considerati morti.

## **Tier 2**

#### **-Test di sviluppo larvale con *Mytilus galloprovincialis***

Organismi adulti di *Mytilus galloprovincialis* sono stati campionati in laguna di Venezia durante il loro periodo riproduttivo. Gli organismi sono stati messi per 24h in un acquario con 50 litri di acqua marina ricostruita (ASTM) posto all'interno di una cella termostatica a 8°C. Dopo aver verificato il buono stato di salute degli organismi si è proceduto all'esecuzione dei test.

Il test è stato eseguito secondo la procedura riportata in Volpi Ghirardini et al. (2005), con lievi modifiche. Gli adulti sono stati indotti a deporre le uova dopo stimolazione

termica, alternando bagni d'acqua a 18°C e 28°C ogni 30 minuti. Le femmine riproduttrici sono state isolate individualmente in un becher di vetro da 300 ml e lasciate rilasciare le loro uova per 30 minuti; la sospensione di uova è stata quindi filtrata attraverso un setaccio a maglie da 100 µm per rimuovere impurità e detriti. I maschi sono stati posti collettivamente in un cristallizzatore da 500 ml e lasciati emettere per 15 minuti prima di filtrare la sospensione di spermatozoi utilizzando un setaccio a rete da 32 µm. Gli ovuli raccolti da ciascuna femmina sono stati quindi fecondati con l'aggiunta di 2 ml di sospensione di spermatozoi filtrati e sono state monitorate al microscopio invertito le prime fasi di sviluppo (aspetto del corpo polare e prima segmentazione). Per il test sono state selezionate solo le uova raccolte dalle femmine che mostravano il tasso di fecondazione più elevato, che sono state quindi raccolte e versate in un cilindro di vetro da 1 l. La densità degli zigoti è stata determinata contando quattro volte aliquote di 100 ml quindi le uova fecondate sono state aggiunte alle soluzioni di prova per ottenere una densità finale di 60-70 uova ml<sup>-1</sup> in 3 ml di soluzione di prova. L'incubazione è stata eseguita a 18°C, per 48 ore al buio. Il test è stato fissato con l'aggiunta di formalina tamponata al 4% e filtrata. Il conteggio delle anomalie è stato eseguito contando 100 larve e distinguendo tra normo-formate (D-shape) e anormali (malformate, stadi pre-larvali). Il test è considerato accettabile se nel controllo negativo il numero di larve normali è 80%. Per il controllo positivo è stato utilizzato, come tossico di riferimento, il rame (Cu).

#### **-Test di sviluppo larvale (LDR) con *Acartia tonsa***

Per questo test è stato utilizzato il protocollo ISO 2015. Il test di sviluppo larvale con *A. tonsa* è un test semistatico con rinnovo della soluzione test dopo 48 h. Il test inizia il giorno 0 inserendo un numero noto di uova (50 - 80) in becher di vetro da 100 ml contenenti ciascuno 25 ml di soluzione. Questo viene effettuato raccogliendo le uova dalla coltura, filtrando aliquote di sospensione di uova (100-200 µL) attraverso un filtro di cellulosa, contando allo stereomicroscopio tutte le uova recuperate sul filtro e inoculando le uova nei becher usando una siringa sterile monouso.

Il giorno 2, a ciascun becher vengono aggiunti altri 25 ml di soluzione test e cibo.

Le larve sono state alimentate il giorno 0 e il giorno 2 con 100 µL di una miscela concentrata di *T. suecica*, *T. lutea* e *P. lutheri*. I becher, così allestiti vengono posti ad una temperatura di 20 ± 1°C e ad un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Il test termina dopo 5 giorni, in pratica quando circa il 40% delle larve nei controlli negativi raggiunge lo stadio copepodite-I. Dopo un controllo visivo del grado di sviluppo delle larve, il contenuto del becher viene fissato e colorato aggiungendo 0,5 ml di soluzione di Lugol. La fase di sviluppo viene determinata dopo aver filtrato il contenuto del becher. Se nel controllo sono presenti meno del 40% di copepoditi, il test viene lasciato procedere per una ulteriore ora prima di procedere nuovamente alla verifica dello sviluppo larvale. Questa procedura si ripete fino a quando il 40% delle larve nei becher di controllo ha raggiunto lo stadio copepodite-I.

Tutte le uova non schiuse, i naupli e i copepoditi recuperati sul filtro sono stati contati al microscopio per calcolare il rapporto di sviluppo larvale (LDR), ovvero il rapporto tra copepodi e larve totali presenti nei becher e il tasso di mortalità larvale.

I parametri Ossigeno disciolto (DO) e pH vengono misurati il giorno 0, prima dell'inoculazione delle uova, e il giorno 5, prima della fissazione con la soluzione di

Lugol. Vengono allestite 6 repliche per concentrazione e il controllo negativo viene effettuato con il medium di coltura a salinità 20‰.

### Tier 3

#### -Test cronico con *Acartia tonsa*

Per il test cronico con *A. tonsa* è stato utilizzato un protocollo interno UniVe (Picone et al., 2022). Il test cronico ha lo scopo di esporre la generazione parentale (F0) al contaminante dallo stadio di uovo fino a quando l'adulto diventa riproduttivo, mentre la prole (generazione F1) viene esposta al contaminante solo nelle prime fasi di sviluppo larvale, fino allo stadio di copepodite-I. Il test cronico dura 28 giorni; quando gli individui della generazione F0 sono nella fase di piena maturità viene valutato lo sviluppo della generazione F1 (circa da giorno 21 a giorno 26).

Vengono allestiti una replica per soluzione e in ciascuno dei trattamenti sono state inserite circa 400-600 uova prelevate dalla coltura di laboratorio.

Ciascuno dei trattamenti sperimentali è stato mantenuto secondo le medesime modalità previste per le colture di laboratorio, con alcuni accorgimenti finalizzati a non diluire le soluzioni.

Tra il dodicesimo e il quattordicesimo giorno dall'inserimento delle uova nei trattamenti, corrispondente al punto di raggiungimento dello stadio di adulto riproduttivo, almeno 12 femmine vengono prelevate dalle relative colture ed esposte singolarmente in vials di 15 ml di volume contenenti 10 ml di una soluzione di medium al 20‰ di salinità e di mix algale. Questa procedura consente di verificare se il contaminante possa aver inibito la capacità di *A. tonsa* di produrre uova, rispetto alla coltura di controllo. Le femmine sono lasciate nelle vials per 96 ore, mentre il conteggio delle uova prodotte viene effettuato ogni 24 ore. Il conteggio delle uova prodotte da ciascun adulto viene effettuato filtrando il contenuto di ciascuna provetta, contenente l'adulto e le uova, su dei filtri di cellulosa con griglia, per agevolare la lettura previo trasferimento dell'adulto in altra vial contenente medium al 20‰ e mix algale.

Il risultato è espresso come numero di uova prodotte al giorno per ciascuna femmina.

Il test di sviluppo larvale sulle uova prodotte dalla generazione F0 si svolge esattamente secondo le modalità riportate sopra per il tier 2.

#### 2.4 Espressione dei risultati dei test e analisi dei dati

I dati di inibizione della bioluminescenza batterica, della crescita algale e della mortalità di *A. tonsa* sono stati elaborati ai fini del calcolo delle EC<sub>50</sub> (concentrazioni di lisciviato che generano un effetto su 50% degli organismi esposti) e delle TU<sub>50</sub>, calcolate come 100/EC<sub>50</sub>. Nel caso dei trattamenti con effetti bassi o trascurabili, ovvero quando non viene raggiunta una inibizione del 50% nel campione non diluito, le TU<sub>50</sub> sono calcolate secondo l'equazione  $TU_{50} = Ex/50$ , dove Ex rappresenta la percentuale di effetto rilevata nel trattamento X normalizzata rispetto all'effetto rilevato nel controllo negativo. Le EC<sub>50</sub> sono state calcolate utilizzando il software Microtox Omni® per il test Microtox ed un programma sviluppato dalla Danmarks Tekniske Universitet di Lyngby

(Christensen et al. 2009) per l'analisi dei dati continui prodotti dai test algali e dai test con *A. tonsa*.

Nel caso dei test di Tier II, la percentuale di larve normalmente sviluppatasi nel test con molluschi bivalvi ed il rapporto tra copepoditi e totale delle larve presenti nel campione (LDR) sono stati utilizzati per il calcolo delle  $EC_{50}$ , utilizzando il programma sviluppato dalla Danmarks Tekniske Universitet di Lyngby per l'analisi dei dati continui (Christensen et al. 2009). Come nel caso dei test di Tier I, quando non è stata raggiunta una inibizione del 50% nel campione non diluito, le  $TU_{50}$  sono calcolate secondo l'equazione  $TU_{50} = Ex/50$

Nei test di Tier III, il numero di uova prodotte da ogni *Acartia* esposta ai lisciviati è stato analizzato utilizzando l'ANOVA ad una via accoppiata al test t di Tukey per rilevare eventuali differenze tra controllo negativo, legno non trattato (UTW) e trattamenti per la conservazione del legno.

Prima di analizzare i dati dei test del Tier III, la normalità e la distribuzione omogenea delle varianze sono state verificate utilizzando i test di Kolmogorov-Smirnov e di Levene, rispettivamente. Quando una delle due condizioni non è stata verificata, i dati sono stati analizzati utilizzando metodi non parametrici, ovvero Kruskal-Wallis ANOVA e test di Mann-Whitney per i confronti tra due gruppi indipendenti.

## 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

---

### 3.1 Tier I

---

I test del TIER 1 sono stati condotti utilizzando provini di *P. abies* non soggetti ad alcun trattamento (untreated wood, UTW), provini modificati termicamente (termically modified, TM) e provini trattati con Silvanolin al fine di un impiego in ambito marittimo (UC5), utilizzando diverse concentrazioni di Cu per il trattamento, tra cui:

- UC5<sub>(I)</sub>, prima formulazione ad alta concentrazione di Cu;
- UC5<sub>(II)</sub>, seconda formulazione ad alta concentrazione di Cu, con trattamento specifico per limitare il rilascio;
- UC5<sub>(III)</sub>, formulazione finale per impiego UC5, ottenuta trattando il legno con concentrazione di Cu pari all'1%;
- MAR, formulazione specificatamente ideata per applicazione nell'ambito del progetto, ottenuta utilizzando una concentrazione di Cu dello 0.25% e successivamente trattando il legno con acido ossalico;
- LOW, formulazione a bassa concentrazione di Cu, ottenuta impiegando una concentrazione di Cu pari a 0.033% nel trattamento.

Una prima applicazione dei test di TIER I su UC5<sub>(I)</sub> e UC5<sub>(II)</sub> (in questo secondo caso limitata ai soli test Microtox e di crescita algale), ha evidenziato l'altissima tossicità di questi due prodotti e la necessità di rivedere la formulazione dei trattamenti

finalizzati all'impiego in categoria UC5 al fine di trovare delle soluzioni meno impattanti sull'ambiente acquatico, in linea con gli obiettivi della strategia ITS.

I lisciviati ottenuti da legni trattati UC5(I) e UC5(II) sono risultati, infatti, estremamente più tossici rispetto sia ai lisciviati ottenuti da legno non trattato (UTW), sia ai lisciviati ottenuti da provini trattati termicamente (TM) tanto per il test Microtox (Figura 5) quanto per il test di crescita algale (Figura 6). Meno marcate sono le differenze rilevate nel test con *A. tonsa*, soprattutto a T30 (Figura 7).

Il test Microtox ha evidenziato una diminuzione della tossicità di tutti i lisciviati all'aumentare del tempo di maturazione e TM è risultato il trattamento meno impattante sulla bioluminescenza batterica, dal momento che in tutte le condizioni considerate è risultato il trattamento a generare la più bassa TU<sub>50</sub>, di poco inferiore a UTW (Figura 5). UC5(I) e UC5(II) hanno invece sempre prodotto una TU<sub>50</sub> di più di un ordine di grandezza superiore.

#### *Aliivibrio fischeri*

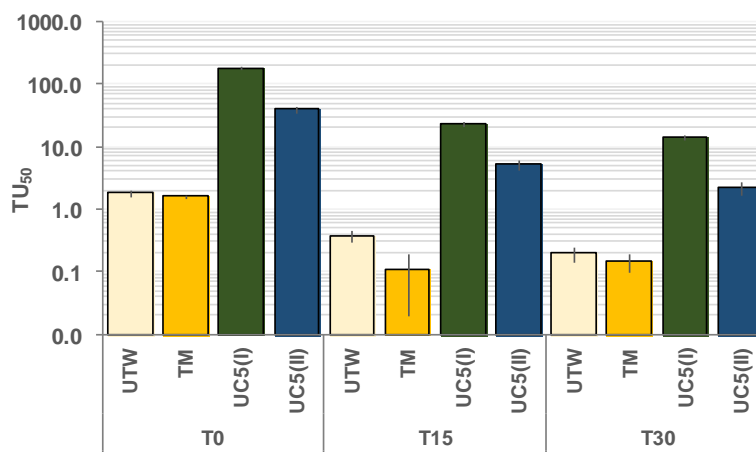


Figura 5. Tossicità dei lisciviati UTW, TM, UC5(I) e UC5(II) nei confronti di *A. fischeri*. Le barre di errore rappresentano i limiti di confidenza al 95% relativi alla TU<sub>50</sub> media calcolata per le 3 repliche sperimentali.

Nel caso del test di crescita algale con *P. tricornutum*, i lisciviati ottenuti dai campioni UTW e TM hanno fornito risultati comparabili a quelli con i batteri ed effetti trascurabili in tutte le condizioni testate (Figura 6). Al contrario, i lisciviati ottenuti dai campioni UC5(I) e UC5(II) determinano una elevata inibizione del tasso di crescita algale, con variazioni minime all'aumentare del tempo di maturazione.

### *Phaeodactylum tricornutum*

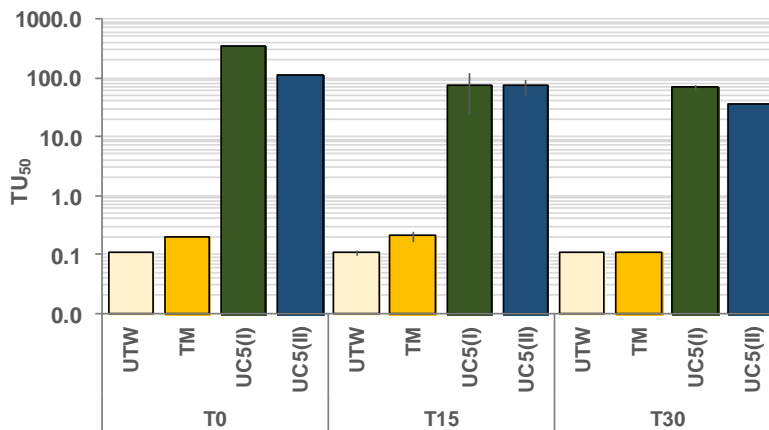


Figura 6. Tossicità dei lisciviati UTW, TM, UC5(I) e UC5(II) nei confronti di *P. tricornutum*. Le barre di errore rappresentano i limiti di confidenza al 95% relativi alla TU<sub>50</sub> media calcolata per le 3 repliche sperimentali.

Infine, il test di immobilità con *A. tonsa* (eseguito solo su UTW, TM e UC5<sub>(I)</sub>) (Figura 7), evidenzia una significativa tossicità di tutti i trattamenti nei confronti della motilità dei copepodi. Tuttavia, mentre il trattamento TM presenta sempre una tossicità di poco inferiore a UTW, il trattamento UC5<sub>(I)</sub> determina effetti tossici sempre superiori. In particolare, gli effetti sono estremamente più marcati a T0 e T15, mentre a T30 la tossicità di UC5<sub>(I)</sub> è di poco superiore a UTW. Sia UTW sia TM presentano un andamento della tossicità a campana, evidenziando come il tempo di maturazione abbia influenzato il rilascio di sostanze dal legno.

### *Acartia tonsa*

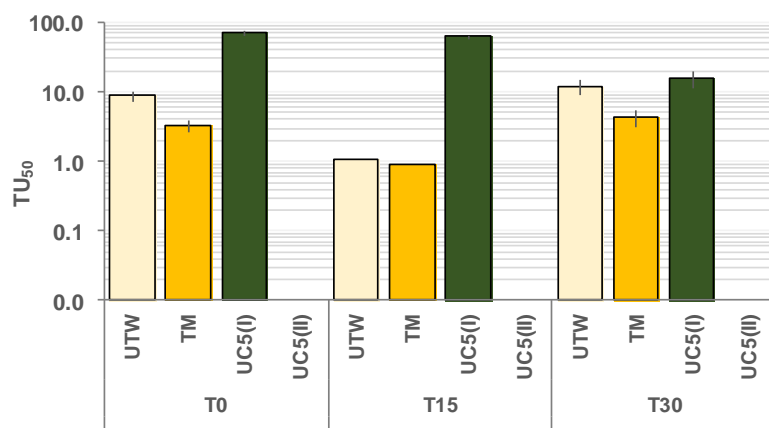


Figura 7. Tossicità dei lisciviati UTW, TM, UC5(I) e UC5(II) nei confronti di *A. tonsa*. Le barre di errore rappresentano i limiti di confidenza al 95% relativi alla TU<sub>50</sub> calcolata sui dati di concentrazione ed effetto.

Sulla base dei risultati dei test acuti, entrambi i trattamenti UC5<sub>(I)</sub> e UC5<sub>(II)</sub> non risultano idonei per l'utilizzo in ambiente marino, dal momento che la tossicità è



estremamente elevata, anche rispetto a UTW. Di conseguenza, si è suggerito di procedere con la preparazione di trattamenti con una minore concentrazione di Cu, al fine di verificarne la tossicità e valutare se questa possa essere ritenuta “accettabile”. Sui provini trattati con le nuove formulazioni (UC5<sub>(III)</sub>, MAR e LOW) sono stati quindi eseguiti ulteriori test di TIER I per valutare le performance dei nuovi trattamenti rispetto a UTW e TM. Nei grafici seguenti, quindi, i dati relativi a UTW e TM sono gli stessi presentati nelle figure precedenti.

Il test con *A. fischeri*, nonostante vi sia una significativa diminuzione degli effetti rispetto a UC5<sub>(I)</sub> e UC5<sub>(II)</sub>, conferma la maggiore tossicità dei trattamenti a base di Cu rispetto a UTW e TM. L’aumento dei tempi di maturazione porta ad un abbassamento della tossicità di tutti i lisciviati. Tuttavia, solo nel caso di LOW la riduzione degli effetti porta ad ottenere un lisciviato di tossicità bassa (TU50<1) confrontabile a UTW e TM a T15 e T30 (Figura 8).

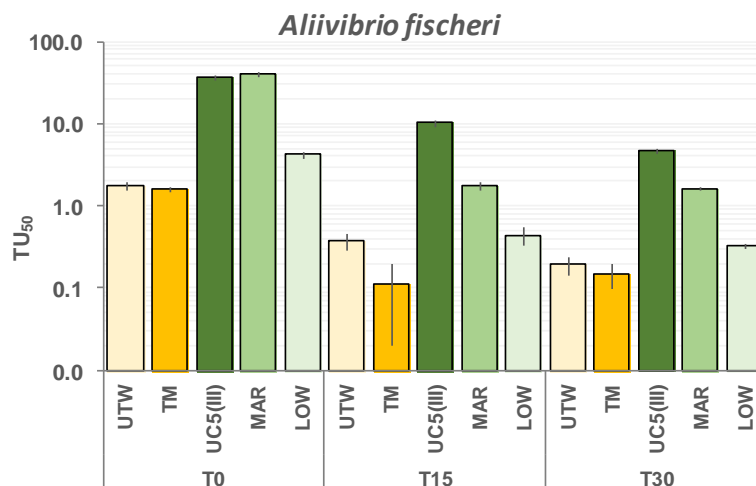


Figura 8. Tossicità dei lisciviati UC5(III), MAR e LOW nei confronti di *A. fischeri*. Le barre di errore rappresentano i limiti di confidenza al 95% relativi alla TU50 media calcolata per le 3 repliche sperimentali.

Il test di crescita algale sostanzialmente conferma l’andamento osservato con i batteri, ovvero i soli lisciviati LOW producono effetti tossici bassi (TU50<1) a T15 e T30. Tuttavia, nel caso delle alghe, gli effetti di LOW risultano comunque superiori rispetto a quanto osservato in UTW e TM, ed una significativa diminuzione degli effetti tossici si osserva solo tra T0 e T15, mentre non sono stati rilevati cambiamenti apprezzabili tra T15 e T30 (Figura 9).

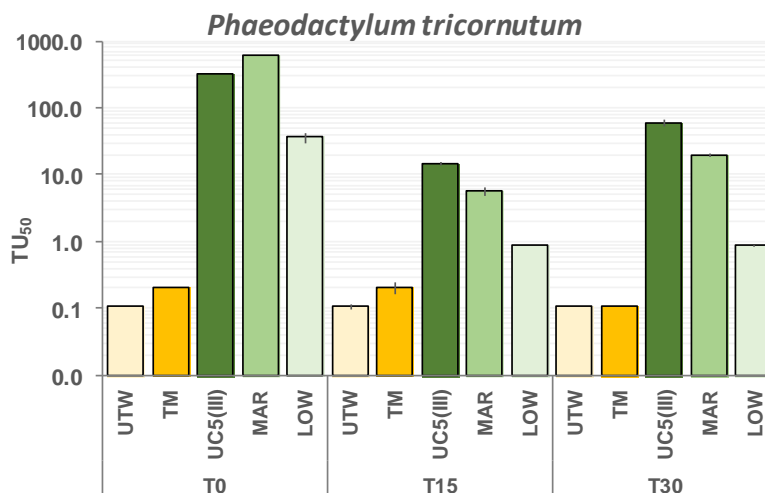


Figura 9. Tossicità dei lisciviati UC5(III), MAR e LOW nei confronti di *P. tricornutum*. Le barre di errore rappresentano i limiti di confidenza al 95% relativi alla TU50 media calcolata per le 3 repliche sperimentali.

Nel caso del test di immobilità con *A. tonsa*, l'elevata tossicità del legno non trattato (UTW) fa sì che dopo un opportuno periodo di maturazione in acquario, tutti i trattamenti a base di Cu raggiungano un livello di tossicità confrontabile (LOW a T15, UC5(III) a T30) se non inferiore (MAR e LOW a T30) rispetto a UTW (Figura 10). Questo andamento è probabilmente dovuto alla relativamente maggiore tolleranza a Cu di *A. tonsa* rispetto ad altri indicatori.

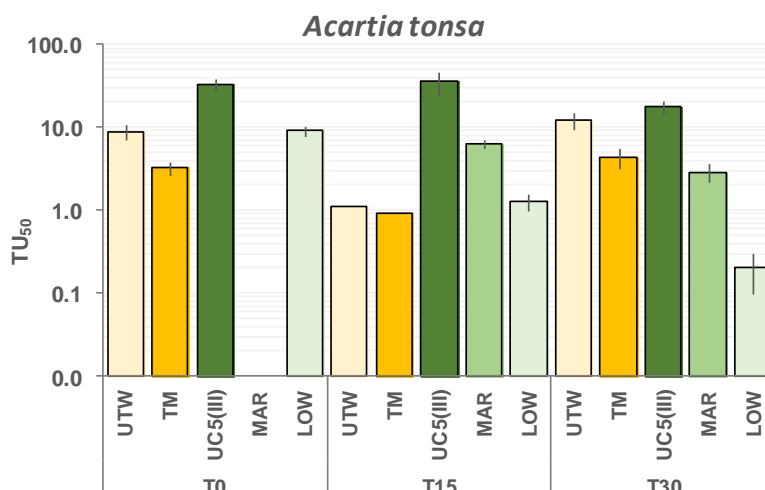


Figura 10. Tossicità dei lisciviati UC5(III), MAR e LOW nei confronti di *A. tonsa*. Le barre di errore rappresentano i limiti di confidenza al 95% relativi alla TU50 calcolata sui dati di concentrazione ed effetto.

Sulla base dei criteri adottati per la procedura ITS predisposta per le acque salate, i trattamenti UC5(III) e MAR non risultano compatibili per l'ambiente marino e costiero, a causa dell'elevata tossicità acuta generata, anche dopo maturazione di 30 giorni, nei confronti di tutti gli indicatori, nel caso di UC5(III), o di almeno due indicatori (batteri

e alghe, nel caso di MAR).

Al contrario, i risultati ottenuti con TM e LOW rendono questi trattamenti eleggibili per la valutazione di livello II, dal momento che gli effetti acuti sono assenti o comunque confrontabili con gli effetti generati dal legno non trattato (UTW).

### 3.2 Tier II

Il test di sviluppo larvale con *M.galloprovincialis* ha messo in evidenza la maggiore tossicità del trattamento LOW rispetto al legno non trattato (UTW) e al trattamento termico (TM), nonostante l'aumentare del tempo di maturazione in acquario abbia significativamente ridotto la tossicità del lisciviato ottenuto dai provini trattati con LOW (Figura 11). I lisciviati ottenuti dal trattamento TM, invece, mostrano sempre una tossicità inferiore o comparabile con UTW. Tuttavia, sia per UTW che per TM, la maturazione in acquario produce una riduzione della tossicità solo tra T0 e T15, mentre tra T15 e T30 le variazioni sono minime e trascurabili.

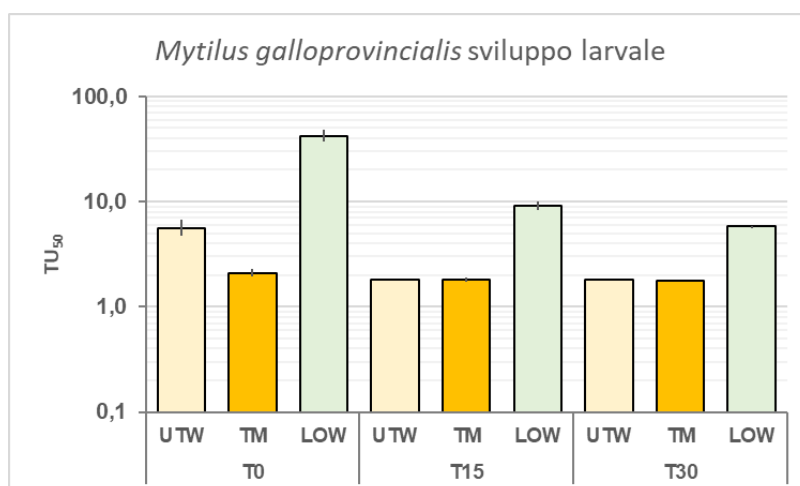


Figura 11. Effetti dei lisciviati sullo sviluppo larvale di *Mytilus galloprovincialis*. I dati sono riportati come TU<sub>50</sub> medio ricavato dalle repliche sperimentale. Le barre di errore rappresentano i limiti fiduciali al 50%.

Il test di sviluppo larvale (LDR) con i copepodi (Figura 12) evidenzia una maggiore tossicità di LOW rispetto a UTW e TM sia a T0 (ANOVA a una via:  $F = 39,8$ ,  $p < 0.001$ ) che a T15 (ANOVA a una via:  $F = 39,8$ ,  $p < 0.001$ ), mentre a T30 le differenze tra i trattamenti sono trascurabili (ANOVA a una via:  $F = 2,28$ ,  $p = 0,183$ ). La maturazione in acquario ha quindi portato ad un abbattimento significativo della tossicità di LOW nei confronti di *A. tonsa*, mentre per UTW e TM le differenze sono minime.

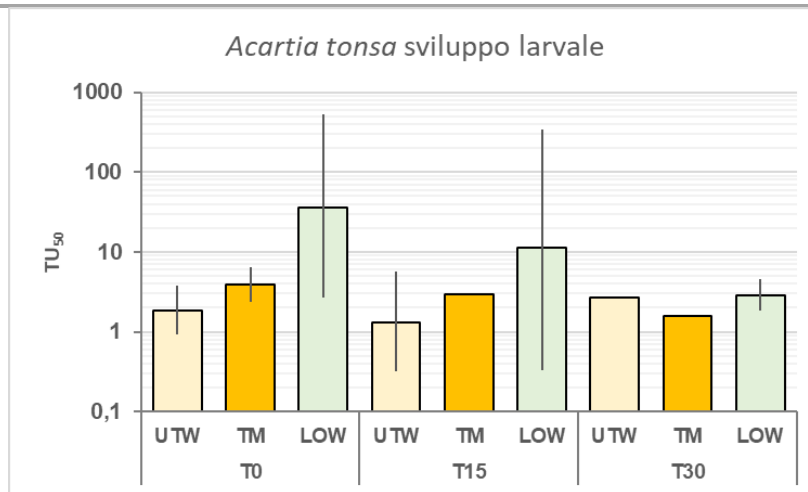


Figura 12. Effetti dei lisciviati sullo sviluppo larvale di *Acartia tonsa*. I dati sono riportati come TU<sub>50</sub> medio ricavato dalle repliche sperimentale. Le barre di errore rappresentano i limiti fiduciali al 50%.

Rispetto al test di sviluppo larvale con i molluschi bivalvi, la minore tossicità del lisciviato LOW è probabilmente legata alla minore sensibilità delle larve di *A. tonsa* a Cu rispetto a quelle di *M. galloprovincialis*. Infatti, per le larve di mitilo l'EC<sub>50</sub> tipica in un test a 48 ore varia da 5 µg L<sup>-1</sup> a 20 µg L<sup>-1</sup> (Beiras and Albertosa, 2004; Boukadida et al., 2016), mentre per le larve di *A. tonsa* l'EC<sub>50</sub> si colloca intorno a 62 µg L<sup>-1</sup>, con assenza di effetti significativi al di sotto di 50 µg L<sup>-1</sup> (UniVe, unpublished data). Alla luce di questi risultati, considerando che il criterio di superamento del TIER II prevedeva che almeno uno dei due test non producesse effetto negativo significativo rispetto a UTW, entrambi i trattamenti TM e LOW risultano eleggibili per il passaggio al TIER III.

### 3.3 Tier III

I risultati del TIER II hanno messo in evidenza come i lisciviati ottenuti da legni trattati e non trattati siano comunque caratterizzati dalla capacità di generare effetti tossici nei confronti degli stadi larvali, come testimoniano le TU<sub>50</sub> > 1 ottenute in tutte le condizioni testate. Inoltre, solo dopo 30 giorni di maturazione gli effetti negativi di LOW si avvicinano ai risultati ottenuti per UTW e TM con *A. tonsa*.

Di conseguenza, considerata anche la sensibilità dei test cronici previsti dal TIER III, e presa coscienza della tossicità del lisciviato nei confronti degli stati larvali, la valutazione di terzo livello è stata condotta secondo le seguenti modalità:

1. sono stati valutati solamente lisciviati ottenuti da provini maturati per 30 giorni in acquario (T30);
2. è stata saggiata una sola concentrazione di lisciviato, corrispondente al 10%, dal momento che questa diluizione è la più alta tra quelle saggiate nel TIER II a non aver generato un effetto tossico negativo in tutti i lisciviati testati a T30.

Il test di produzione di uova condotto con *A. tonsa* (Figura 13) ha evidenziato come tutti i lisciviati inducano una riduzione della produzione di uova rispetto ad una condizione di controllo, confermando quindi come anche il legno non trattato (UTW) sia caratterizzato da una tossicità di base (ANOVA a una via: F = 8,07, p < 0,001). Tra i

tre lisciviati, invece, non sono state rilevate differenze significative.

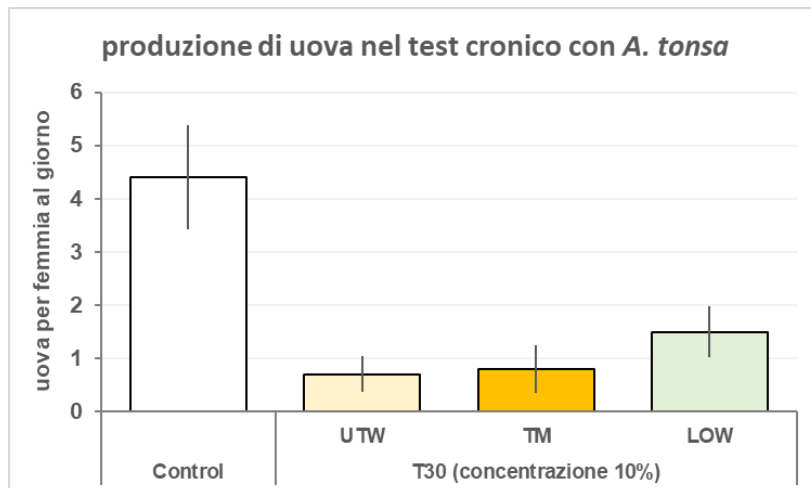


Figura 13. Effetti dei lisciviati sulla produzione di uova di *A. tonsa*. I dati sono riportati come media delle dieci repliche sperimentale. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

I test di sviluppo larvale e mortalità della generazione F1 non sono invece stati condotti, in quanto i copepodi esposti ai 3 lisciviati hanno evidenziato elevata mortalità dopo il dodicesimo giorno di vita e i sopravvissuti non hanno prodotto uova a sufficienza per poter condurre i test. Si conferma quindi la tossicità di base dei lisciviati.

Considerati i risultati del Tier III, i trattamenti TM e LOW risultano complessivamente equivalenti, in termini di impatti sugli indicatori acquatici, al legno non trattato. Emerge tuttavia chiaramente come sia necessario un periodo di maturazione di almeno 30 giorni prima dell'impiego del materiale, per limitare gli impatti sull'ambiente, che comunque sono riscontrabili anche nel legno non trattato.

Ai sensi della valutazione ITS proposta in questo progetto, quindi, i trattamenti TM e LOW risultano accettabili per un impiego in ambiente e comportano la possibile insorgenza di effetti a lungo termine solo dopo esposizione a lungo termine in condizioni statiche o di scarso rinnovo.

#### 4 CONCLUSIONI

La prima applicazione dei test di TIER I su UC5<sup>(I)</sup> e UC5<sup>(II)</sup>, ha evidenziato l'altissima tossicità di questi due prodotti e la necessità di rivedere la formulazione dei trattamenti finalizzati all'impiego in categoria UC5 al fine di trovare delle soluzioni meno impattanti sull'ambiente acquatico, in linea con gli obiettivi della strategia ITS. La sperimentazione definitiva sulle nuove formulazioni (UC5<sup>(III)</sup>, MAR e LOW) ha evidenziato che sulla base dei criteri adottati per la procedura di valutazione ITS predisposta per le acque salate, i trattamenti UC5<sup>(III)</sup> e MAR non risultano compatibili per l'ambiente marino-costiero, a causa dell'elevata tossicità acuta generata (TIER 1), anche dopo maturazione di 30 giorni, nei confronti di tutti gli indicatori (UC5<sup>(III)</sup>) o di almeno due indicatori (MAR). I risultati ottenuti al primo livello valutativo con TM e LOW hanno invece reso questi trattamenti eleggibili per la valutazione di livello II

(TIER II), dal momento che gli effetti acuti sono assenti o comunque confrontabili con gli effetti generati dal legno non trattato (UTW). Alla luce dei risultati ottenuti nel secondo step valutativo (TIER II), considerato che il criterio di superamento del TIER II prevedeva che almeno uno dei due test non producesse effetto negativo significativo rispetto a UTW, entrambi i trattamenti TM e LOW sono risultati eleggibili per il passaggio al terzo step valutativo (TIER III). Considerati i risultati di quest'ultimo livello valutativo, i trattamenti TM e LOW sono risultati complessivamente equivalenti, in termini di impatti sugli indicatori acquatici, al legno non trattato (UTW).

Ai sensi della valutazione ITS proposta in questo progetto, quindi, i trattamenti TM e LOW sono risultati accettabili per un impiego in ambiente marino/salmastro comportando la possibile insorgenza di effetti a lungo termine solo dopo esposizione a lungo termine in condizioni statiche o di scarso rinnovo.

La sperimentazione condotta considerando i tre tempi di maturazione (0, 15 e 30gg) ha fatto emergere tuttavia chiaramente come sia necessario un periodo di maturazione di almeno 30 giorni prima dell'impiego del materiale (trattato e non trattato), per limitare gli impatti sull'ambiente marino-costiero.

## 5 BIBLIOGRAFIA

Adeleye A. S., Oranu E. A., Tao M., Keller A. A., 2016, Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint, *Water Research*, 102, 374-382.

Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria, *Aquaculture* 230, 205-213.

Boukadida, K., Banni, M., Gourves, P.Y., Cachot, J., 2016. High sensitivity of embryolarval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase, *Mar. Environ. Res.* 122, 59-66.

Christensen, E.R.; Kusk, K.O.; Nyholm, N., 2008, Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoints: Calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 826-835.

Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2007, Impact of Surface Water Conditions on Preservative Leaching and Aquatic Toxicity from Treated Wood Products, *Environmental Science Technology*, 41, 3781-3786.

Kannepalli S., Strom P. F., Krogmann U., Subroy V., Gimenez D., Miskewitz R., 2016, Characterization of wood mulch and leachate/runoff from three wood recycling facilities, *Journal of Environmental Management* 182, 421-428

Leduc F., Whalena J. K., Sunaharab G. I., 2008, Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to leachate from wood preservatives, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 219-2

Libralato G., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2007, Toxicity of untreated wood leachates

towards two saltwater organisms (*Crassostrea gigas* and *Artemia franciscana*), Journal of Hazardous Materials 144, 590-593

MAV, 2013. Modalita' di utilizzo di legno o materiali alternativi per pali o strutture marittime in laguna di Venezia - Protocollo di intesa del 13.07.2011 tra Magistrato alle Acque di Venezia, la Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e laguna e il Comune di Venezia - Manuale operativo contenente la procedura di ammissibilità in laguna di Venezia di materiali alternativi - Linee guida per le valutazioni chimiche ed ecotossicologiche. A cura di UniVe-DAIS, Dicembre 2013.

OECD - Organisation de Cooperation et de Development Economiques, 1999. Emission Scenario document for wood preservatives.

OECD - Organisation de Cooperation et de Development Economiques, 2007. Test n. 313: Estimation of Emission from Preservative - Treated Wood to the Environment: Laboratory Method for Wooden Commodities that are not Covered and are in Contact with Fresh Water or Sea Water. OECD 313.

Picone, M., Distefano, G.G., Marchetto, D., Russo, M., Baccichet, M., Brusò, L., Zangrando, R., Gambaro, A., Volpi Ghirardini, A. (2022). Long-term effects of neonicotinoids on reproduction and offspring development in the copepod *Acartia tonsa*, Marine Environmental Research 181, 105761.

Rex J., Dubé S., Krauskopf P., Berch S., 2016, Investigating Potential Toxicity of Leachate from Wood Chip Piles Generated by Roadside Biomass Operations, Forests.

Svensson H., Svensson B., Hogland W., Marques M., 2012, Acute Toxic Effects Caused by Leachate from Five Different Tree Species on *Artemia Salina* and *Vibro Fischeri*, Journal of Biobased Materials and Bioenergy 6, 214-220.

Svensson H., Jani Y., Hogland W., Marques M., 2014a, Particle size characterization of oak wood leachate: chemical oxygen demand and toxicity distribution within different fractions, Water Science & Technology 70.3

Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W., 2014b, Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas, Water and Environment Journal.

UNIVE-CVN, 2011, Valutazione di compatibilità ambientale di materiali da impiegarsi in ambiente marino-costiero e lagunare (Laguna di Venezia) mediante test di tossicità e analisi di bioaccumulo. A cura di UniVe-DAIS, Rapporto finale Febbraio 2011.

Wolf E. C., Rejmánková E., Cooper D. J., 2019, Wood chip soil amendments in restored wetlands affect plant growth by reducing compaction and increasing dissolved phenolics, Restoration Ecology 27, 1128-1136.

*Progetto cofinanziato dal Fondo europeo di sviluppo regionale nell'ambito del "Programma di cooperazione Interreg V-A Italia-Slovenia 2014-2020"*

*I contenuti del presente documento non riflettono in alcun modo l'opinione dell'Autorità di Gestione del "Programma di cooperazione Interreg V-A Italia-Slovenia 2014-2020". La responsabilità di quanto riportato è a carico degli autori.*



## ATTIVITÀ 14 / ACTIVITY 14

### Allegato 1. Analisi bibliografica relativa alle procedure di lisciviazione / Attachment 1. Bibliographic analysis related to leaching procedures

| Matrix  | Type of leaching fluid   | Wood treatment before leaching procedure  | Description of leaching procedure   | Post leaching procedure   | Reference   |
|---|--|---|---|---|---|
| Oak wood treated with commercial copper-based antifouling paint.  | Tap water, estuarine water, and seawater   | Wood was cut into 3 × 1 × 1 cm mini-bars and mini-bars were pre-treated and painted. Painted mini-bars were allowed to dry for 6 h, 24 h or 7 d, and then submerged in water. Each mini-bar was weighed before and after painting to determine mass of paint applied. | Wood mini-bars were submerged in 20mL of water and were kept in conditions simulating natural surface waters: cool white fluorescent lights (14:10 light:dark, 80–100 μmol/m <sup>2</sup> -s) at 20 °C with shaking (125 rpm). Release of Cu from wood and aluminum mini-bars was monitored as a time series for 180 d.   |   | Adeleye A. S., Oranu E. A., Tao M., Keller A. A., 2016, <i>Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint</i> , Water Research, 102, 374-382.  |
| Leachate from natural wood shavings from sawmill  | Rainwater  |   | Leachate was collected from within the heaps of wood shavings (Figure 1C) at five different points in the sawmill into a clean transparent 25 L plastic container to give homogenous mixture from the site.   | Sieved (0.7 mm sieve) to remove wood debris.  | Bakare A. A., Alimba C. G., Hassan T., Ajayi E. O., Sowunmi A. A., 2017, <i>Leachates biological characteristics and potential impacts on the environment</i> , Environmental research advances, 4.   |
| Blocks wood treated with Chromated Copper Arsenate (CCA)  | Synthetic Precipitation Leaching Procedure (SPLP) was used as the synthetic rainwater.   |   | The wood was cut into 2 × 2 in blocks and extracted for 18 hrs with SPLP solution (pH=4.2) using a large mechanical rotator.  | The resulting leachate was transferred to a pressure filtration apparatus and the solution was filtered through an acid-rinsed (20% HNO <sub>3</sub> ) filter (0.7 μm pore size). | Dagan R., Bitton G., Townsend T. G., 2006, <i>Metal Transport and Bioavailability in Soil Contaminated with CCA-Treated Wood Leachates</i> , Soil & Sediment Contamination, 15:1, 61-72.  |
| Blocks of southern yellow pine treated with alkaline copper quaternary (ACQ) and copper boron azole (CBA), along with chromated copper arsenate (CCA)- treated wood | Eight natural waters: two rivers, three lakes, two wetlands, and the Atlantic Ocean. Deionized water and moderately hard water | Blocks of approximately 80 g (average surface area 140-150 cm <sup>2</sup> ) were obtained by cutting pieces of treated dimensional lumber using a power saw. Sawdust samples were collected for each treated wood type for subsequent total Cu measurements.         | Immersion of the sample block (80 g block in this experiment) for 24 h within 1.6 L of leaching solution, resulting in a liquid to solid ratio (L/S) of 20:1.   |   | Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2007, <i>Impact of Surface Water Conditions on Preservative Leaching and Aquatic Toxicity from Treated Wood Products</i> , Environmental Science Technology, 41, 3781-3786.   |
| Leachate/runoff from wood recycling facilities  | Rainwater  |   | Samples of solid wood mulch and leachate/runoff were collected from three Class B wood recycling facilities in New Jersey over a 1.5 year period. A total of 26 leachate/runoff samples were collected either during or within 24 h of the occurrence of different rainfall events.   |   | Kannepalli S., Strom P. F., Krogmann U., Subroy V., Gimenez D., Miskewitz R., 2016, <i>Characterization of wood mulch and leachate/runoff from three wood recycling facilities</i> , Journal of Environmental Management 182, 421-428   |
| Leachate from wood pressure-treated with micronized copper azole  | Rainwater  | Two pieces of lumber (originally 8' × 3.5" × 1.5" in size) were acquired and cut into three sizes: large (5 × 8,9 × 3,8 cm), medium (5 × 5,8 × 3,8 cm), and small (5 × 3 × 3,8 cm). All samples were weighed, and their exact physical dimensions measured.           | Two Teflon straps (purchased from Industrial Netting), were affixed to each sample so that the samples could be secured in place over a rain-water runoff collection jar, thereby preventing sample soaking in accumulated rainwater. Samples were affixed such that the grain of the wood was perpendicular to incoming rainfall (top face exposed surface area 1 cm <sup>2</sup> ). |   | Lankone, R., Goodwin, D., Sung, L., Ruggiero, E., Vilsmeier, K., Mueller, P., Pulbere, S., Challis, K., Bi, Y., Westerhoff, P., Ranville, J., Fairbrother, D. and Wohlleben, W., 2019, <i>Evaluating performance, degradation, and release behavior of a nanoform pigmented coating after natural</i> |

| Matrix  | Type of leaching fluid             | Wood treatment before leaching procedure  | Description of leaching procedure  | Post leaching procedure   | Reference   |
|---|------------------------------------|---|--|---|---|
|   |                                    |   |  |   | and accelerated weathering, NanoImpact  |
| Wood spruce ( <i>Picea</i> sp.) treated with chromated copper arsenate (CCA) and alkaline copper quaternary (ACQ)   | Synthetic Rainwater                | <i>Picea</i> sp. lumber about 5 × 10 cm was treated for two weeks with ACQ or CCA following industry standards. The wood was shredded into small chips (about 0,2 × 0,2 × 0,2 cm) and approximately 0.6 kg of each wood type was placed into separate 20 L acid-washed glass containers.                                    | Synthetic rain water was added about 6 L to each container to achieve a mixture with 10% (w/v) of wood:synthetic rainwater. The mixture was stirred to inundate all wood chips and incubated at 20 °C for 4 days.  | Wood leachates were filtered (<0.2 µm under vacuum) and stored in acid-washed glass containers. | Leduc F., Whalena J. K., Sunaharab G. I., 2008, <i>Growth and reproduction of the earthworm Eisenia fetida after exposure to leachate from wood preservatives</i> , Ecotoxicology and Environmental Safety 69, 219–226      |
| Natural wood: <i>Pouteria guianensis</i> , <i>Minguartia guianensis</i> , <i>Eschweilera</i> spp, <i>Quercus</i> spp, <i>Picea abies</i> .  | Aerated artificial sea water       | A predetermined ratio was maintained between wood block surface area (As) and water leaching solution volume (Vls), corresponding to the immersion of a wood block of 0.1m×0.1m×0.1m in 1 L of water (As/Vls = 0.6 cm <sup>-1</sup> ). The blocks were cut to the required dimensions (3 × 3 × 6,5 cm) with a circular saw. | The leaching procedure consisted of agitating the blocks fixed to a Jar Test at 60 rpm at 20 °C in a leaching medium consisting of aerated artificial sea water. The first cycle lasted 24 h, the leaching fluid was then completely renewed and the leaching procedure continued for a further 48 h (72 h cycle)  | pH values below 7.5 were corrected by adding NaOH 0.1M aliquots                                 | Libralato G., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2007, <i>Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (Crassostrea gigas and Artemia franciscana)</i> , Journal of Hazardous Materials 144, 590–593    |
| Wood chips of <i>Pinus resinosa</i> treated with pentachlorophenol (CBA);   | Sodium hydroxide solution (pH 10). | Wood chips were made from circular slices of Pentachlorophenol-Treated out-of-service poles. The approximate dimensions of the wood chips is longitudinal x radial x tangential = 5 x 0.5 x 0.5 cm.   | A stock leachate solution was produced batchwise by recirculating a sodium hydroxide solution (pH 10) through a cylindrical plexiglass column (8.7 cm i.d. and 100 cm length) that was packed with PCP-treated wood chips. The pH of the leachate was controlled and the temperature was controlled at 90°C. The sodium hydroxide solution was recirculated for 48 h.  |   | Mollah A. H., Allen D. G., 1999, <i>Biodegradation and Detoxification of Wood Leachate from Pentachlorophenol-Treated Poles</i> , The canadian journal of chemical engineering 77.  |
| Blocks wood of <i>P. sylvestris</i> , <i>P. radiata</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , Southern yellow pine treated with furfurylation process. Reference with chromated copper arsenate (CCA).  | Demineralized water                | After treatment the boards were cut into samples with dimensions 0,15x0,25x0,50cm for EN84 and Internal leaching procedure and 0,15x0,70x1,5cm for OECD procedure.  | EN84: 10 water changes during 14 d in demineralized water with a water-over-wood volume equaling 5. Leaching water was collected after 1, 7, and 14 d. Internal leaching procedure: The specimens were submersed in demineralized water for 48 h with water changes and collection of leaching water after 0.5, 1, 6, 12, 24, and 48 h. OECD Guideline 313: recommended ratio (0.4 cm <sup>2</sup> /ml) between the surface of the wood and the amount of water. The submersion test was continued for 32 d with demineralized water, during which the water was replaced eight times at set intervals. The leachates were collected after 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22, and 32d. | pH values below 7.5 were corrected by adding NaOH 0.5M aliquots                                 | Pilgard A., Treu A., Zeeland V., Gosselink J. A., Westin M., 2010, <i>Toxic hazard and chemical analysis of leachates from furfurylated wood</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 29, 1918–1924.                    |
| Blocks wood of <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus sylvestris</i> treated with three different furfurylation process. Untreated <i>P. sylvestris</i> and <i>P. radiata</i> sapwood were used as reference material. | Demineralized water                | Test specimens were larger than the standard recommendations and therefore have been cut at 0,15x0,70x1,5cm . The <i>P. radiata</i> material was planed prior to treatment, because the wood surface was suspected to have been treated with biocides (antisap-stain agents).   | OECD Guideline 313: recommended ratio (0.4 cm <sup>2</sup> /ml) between the surface of the wood and the amount of water. The submersion test was continued for 32 d with demineralized water, during which the water was replaced eight times at set intervals. The leachates were collected after 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22, and 32d. The shower test: method was used to simulate rainfall. Every day, the specimens were sprayed with approximately 2 liters of freshwater over a time span of 1 h. This test was run for 2 weeks,  | pH values below 7.5 were corrected by adding NaOH 0.1M aliquots                                 | Pilgard A., Vetter L., Acker J.,z and Westin M., 2010b, <i>Toxic hazard of leachates from furfurylated wood: comparison between two different aquatic organisms</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 29, 1067–1071. |

| Matrix  | Type of leaching fluid  | Wood treatment before leaching procedure  | Description of leaching procedure   | Post leaching procedure  | Reference   |
|---|---|---|---|--|---|
|   |   |   | and leachates were collected every day over a period of 10 d.   |  |   |
| Natural wood: <i>Populus tremuloides</i> , <i>Pinus contorta</i> , <i>Picea engelmannii</i> x <i>glauca</i> Parry, <i>Picea mariana</i> . As well as from two wood chipping sites using mixes of lodgepole pine and hybrid or black spruce. | 1) Natural weather conditions<br>2) deionized water<br>3) deionized water   |   | 1) Tree species common to the Prince George Forest District mixed in two open 322-L containers at environmental condition for 23 month; 2)The static exposure consisted of placing 2 kg of wood chips in a polypropylene 1-cm opening mesh bag in 18 L of water for 28 days at room temperature and ambient light (9:1 water:wood). 3)A portable rainfall simulator was used to generate a heavy rainfall event of approximately 100 mm x h <sup>-1</sup> .   |  | Rex J., Dubé S., Krauskopf P., Berch S., 2016, <i>Investigating Potential Toxicity of Leachate from Wood Chip Piles Generated by Roadside Biomass Operations</i> , Forests.   |
| Natural wood: birch ( <i>Betula sp.</i> ) and spruce ( <i>Picea abies</i> ) woodchip, and their mixture with washed gravel (WG).  | Tap water   |   | Pure organic and mixed filling materials were used in one-stage batch leaching tests with a liquid to solid ratio of 10 l·kg <sup>-1</sup> without size reduction. Using the calculated dry matter content of each material determined at the beginning, the equivalent mass of raw material (without any pre-treatment) was put into the 2l reagent bottles and filled with 1.6l of tap water. Reagent bottles were placed on the overhead shaker and mixed for 1–5 days at laboratory temperature with 5 RPM.   | One sample of each material was decanted, centrifuged, and filtered using membrane paper (4 µm) on a daily basis.  | Šereš Z., Došenović T., Šoronja-Simović D., Maravić N., Šaranović Z., Šereš L., Šćiban M., Djordjević M., 2019, <i>Modelling of cross-flow microfiltration coupled with bentonite treatment in sugar beet molasses purification</i> , The Canadian Journal of Chemical Engineering 97, 947-954. |
| Block of southern yellow pine treated with alkaline copper quaternary (ACQ), copper boron azole (CBA) and copper citrate (CC).  | 1) Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP) fluid<br>2) Synthetic Precipitation Leaching Procedure (SPLP) fluid,<br>3) deionized water, 4) synthetic seawater. | The samples used for the leaching analysis were cut into small blocks (2.5x5x10 cm) using a mill saw and then ground to particles less than 3 mm in diameter. | Treated wood samples were individually leached with four leaching fluids. Two liters of leaching fluids were combined with 100 g of ground wood (yielding a 1:20 solid/liquid ratio) in a glass container which was capped with a teflon-lined lid and placed on a rotary extractor for 18 ±2 hours.  | The recovered leachates were filtered using a pressurized filtration apparatus with a 0,7 0 µm glass fiber filter. | Stook K., Dubey B., Ward M., Townsend T., Bitton G., Solo-Gabriele H., 2004, <i>Heavy Metal Toxicity of Pressure Treated Wood Leachates with MetPLATE™</i> , Bulletin Environmental Contamination and Toxicology 73, 987–994.   |
| Block of southern yellow pine treated with preservatives included chromated copper arsenate (CCA), alkaline copper quaternary (ACQ), copper boron azole (CBA), copper citrate (CC), and copper dimethyldithiocarbamate .                    | 1) Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP) fluid<br>2) Synthetic Precipitation Leaching Procedure (SPLP) fluid,<br>3) deionized water, 4) synthetic seawater. | The samples used for the leaching analysis were cut into small blocks (2.5x5x10 cm) using a mill saw and then ground to particles less than 3 mm in diameter. | 1) A 100-g, size-reduced, representative wood sample was placed into a 2.2-L Teflon-lined glass container. Two liters of the TCLP extraction fluid was added and the mixture was rotated for 18 (2 h). Other leaching tests were performed in the same manner as the TCLP, with the exception of the leaching fluid. The synthetic precipitation leaching procedure contains nitric and sulfuric acid at a 40/60 weight ratio. The synthetic seawater extraction solution was prepared by dissolving 0.5 cups of Instant Ocean in 3.8-L of deionized water; the resulting salinity of the solution was 3.2 psu. | The leachate was filtered through a 0.7-µm glass fiber filter  | Stook K., Tolaymat T., Ward M., Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2005, <i>Relative Leaching and Aquatic Toxicity of Pressure-Treated Wood Products Using Batch Leaching Tests</i> , Environmental Science and Technology 39, 155-163.  |

| Matrix   | Type of leaching fluid                                     | Wood treatment before leaching procedure   | Description of leaching procedure  | Post leaching procedure   | Reference  |
|--|--|--|--|---|--|
| Natural Sawdust and bark from: Pedunculate oak ( <i>Quercus robur</i> ), Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), European larch ( <i>Larix decidua</i> ), Norway spruce ( <i>Picea abies</i> ) and European beech ( <i>Fagus sylvatica</i> )   | Distilled water  | The sawdust and the bark were obtained from sawmills located in Nybro, southern Sweden.  | The leachate was produced according to the batch leaching Standard Method SS-EN 12457-2, Due to the very high water absorbing capacity of sawdust, which makes very difficult to run a leaching test with the ratio 10:1, a liquid to solid (L/S) ratio (40:1) four times the one recommended (10:1) was used. Leachate from bark of oak, pine and spruce where produced according to the same batch test method mentioned above. However, in these cases, the recommended L/S ratio of 10:1 was used.                                     |   | Svensson H., Svensson B., Hogland W., Marques M., 2012, <i>Acute Toxic Effects Caused by Leachate from Five Different Tree Species on Artemia Salina and Vibrio Fischeri</i> , Journal of Biobased Materials and Bioenergy 6, 214–220. |
| 1) water from pond that receives oak wood leachate generated due to log irrigation;<br>2) water from ditch that receives leachate generated due to rainfall contact with oak wood chip piles;<br>3) leachate generated via leaching test with oak sawdust under laboratory conditions. | 1) irrigation water;<br>2) rainfall;<br>3) Distilled water | Vacuum filtration: filter paper grade 005 (20 µm), Munktell 00R (10 µm), and Watchman GF/C (1.2 µm); Next, with Millipore stirred Cell Model 8400 ultra-filtration discs Millipore 100 kDa (approximately 13 nm), 10 kDa (approximately 5 nm) and 1 kDa (approximately 2 nm). After each filtration step, 50 mL of water was removed and used for chemical analyses. | The leachate was produced according to the batch leaching Standard Method SS-EN 12457-2, Due to the very high water absorbing capacity of sawdust, which makes very difficult to run a leaching test with the ratio 10:1, a liquid to solid (L/S) ratio (40:1) four times the one recommended (10:1) was used. Leachate from bark of oak, pine and spruce where produced according to the same batch test method mentioned above. However, in these cases, the recommended L/S ratio of 10:1 was used.                                     |   | Svensson H., Jani Y., Hogland W., Marques M., 2014, <i>Particle size characterization of oak wood leachate: chemical oxygen demand and toxicity distribution within different fractions</i> , Water Science & Technology 70.3          |
| Natural sawdust obtained from oak ( <i>Quercus robur</i> ), maple ( <i>Acer platanoides</i> ), pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), beech ( <i>Fagus sylvatica</i> ) and wood chips from oak and pine.  | Distilled water  | Sawdust is wood debris with particles size 4 mm. Wood chips are larger than 4 mm and produced using a chipper that grinds wood to sizes up to 10 cm in diameter. 9 mg of sieved sawdust (particles 4 mm) were used to estimate the moisture content in the wood residues. The sawdust was dried in an oven for 24 h at 105°C.  | The sawdust used in the leaching test was not dried in the oven, but the moisture content previously measured was taking into account for calculations purposes, as described in the Standard Method SS-EN 12457-2. Because of the very high absorption capacity of sawdust, the solid/liquid (S/L) ratio of 1 : 10 recommended by the Standard Method SS-EN 12457-2 after a preliminary trial was considered inappropriate, and S/L ratios of 1 : 20 (9 mg for 180 mL) and 1 : 40 (9 mg for 360 mL) were used instead in the batch tests. | The water phase was filtrated with a GF/C Whatman 0,45 µm microfiber filter   | Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W., 2014, <i>Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas</i> , Water and Environment Journal.                      |
| Natural chips wood of aspen ( <i>Populus tremuloides</i> )   | Dechlorinated tap water                                    | Five young healthy trees, ranging 28 to 64 years in age and 9.7 to 15.7 cm butt diameter (mean 13.6 cm), were cut at ground level with a chain saw. Trees were topped, limbed, and cut into 2.5-m (8-ft) lengths in the field and then reduced to chips (0.5 to 10 cm in length) with a commercial chipper.  | 50 kg fresh weight (about 28 kg dry weight) of aspen chips in 250 L of water in a 280-L vat lined with polyethylene. The ratio of aspen to water was thus 8.9:1 by dry mass at room temperature. Leaching continued for 35 d at room temperature and until chemical and physical characteristics ceased to show rapid changes.   | 0.45 mm microfiber filter   | Taylor B. R., Goudey J. S., Carmichael N. B., 1996, <i>Toxicity of aspen wood leachate to aquatic life: laboratory studies</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 15, 150–159.   |
| Leachate from natural woodpiles of trembling aspen ( <i>Populus tremuloides</i> )  | Rainwater or snowmelt                                      | The logs were transported to the field site, where they were stacked in two ranks, making a triangular logpile 5.5 m long and 1.5 m high. The logpile comprised 174 aspen logs with a total volume of 17.8 m <sup>3</sup> .  | A polyethylene tarpaulin beneath the logpile, supported around the perimeter by more logs, created a basin (depth, 40 cm) that captured any runoff from the logpile. Part of the bottom row of logs could be half-submerged when the catchbasin was full.  | Temperature of the air and leachate were measured and the specific conductance, pH, and dissolved oxygen tension of the leachate. | Taylor B. R., Carmichael N. B., 2003, <i>Toxicity and chemistry of aspen wood leachate to aquatic life: field study</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2048–2056.  |
| Natural wood with bark chipped from a mixture of conifer tree species including Abies concolor, <i>Pinus</i>   | Deionized water  |  | Separate batches of wood-only chips and bark-only chips of the same Sierra Nevada mixed conifer tree species were soaked in water to create wood and bark leachates. The wood and bark were oven dried and 1.75 kg each were   | The leachate liquids were poured through a 0.152-mm screen to remove solids prior to use as phytometer treatments.                | Wolf E. C., Rejmánková E., Cooper D. J., 2019, <i>Wood chip soil amendments in restored wetlands affect plant growth by reducing compaction and</i>  |

| Matrix  | Type of leaching fluid | Wood treatment before leaching procedure | Description of leaching procedure                         | Post leaching procedure | Reference  |
|---|------------------------|--|---|-------------------------|--|
| <i>lambertiana</i> , <i>Calocedrus decurrens</i> , <i>Pinus jeffreyi</i> , <i>Abies magnifica</i> , and <i>Pinus contorta</i> . |                        |  | separately submerged in 14 L DI water for 6 days at 20°C. |                         | increasing dissolved phenolics, Restoration Ecology 27, 1128–1136. |

**Allegato 2. Analisi bibliografica relativa alla caratterizzazione ecotossicologica e chimico-fisica dei lisciviati. / Attachment 2. Bibliographic analysis relating to the ecotoxicological and chemical-physical characterization of the leachates.**

| Matrix  | Type of test   | Test species  | Result Chemical test  | Result Ecotox test   | Reference   |
|---|--|---|---|--|---|
| Oak wood treated with commercial copper-based antifouling paint.  | Total Cu, dissolved Cu, nanosized Cu, bulk Cu.   |   | Cu <sub>2</sub> O particles in commercial antifouling paints may be released into natural waters during use. These released particles may include those that are nanoparticulate in size.   |  | Adeleye A. S., Oranu E. A., Tao M., Keller A. A., 2016, <i>Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint</i> , Water Research, 102, 374-382.  |
| Leachate from natural wood shavings from sawmill  | COD, BOD, dissolved oxygen (DO), conductivity, chloride, sulphate, nitrate, pH, temperature, lignin and tannin, heavy metals: Pb, Cd, As, Cr Cu.   | <i>C. gariepinus</i> , Sub-Lethal Concentrations and Micronucleus Analysis. | The concentrations of some of the SWL constituents were above permissible NESREA and USEPA limits   | Leachate induced a time dependent acute toxicity and concentration-dependent significant increase in the frequencies of micronucleated peripheral erythrocytes and nuclear abnormalities in <i>C. gariepinus</i> .   | Bakare A. A., Alimba C. G., Hassan T., Ajayi E. O., Sowunmi A. A., 2017, <i>Leachates biological treatment, toxicological characteristics and potential impacts on the environment</i> , Environmental Research Advances, 4.          |
| Blocks wood treated with Chromated Copper Arsenate (CCA)  | Metal Analysis, ecotoxicological test  | <i>Ceriodaphnia dubia</i> , MetPLATE™, <i>Selenastrum capricornutum</i>     | Arsenic has the highest concentration compared to the other two metals in all three types of soil. It appears, however, to have greater mobility in the sandy soil.   | Despite the presence of copper, chromium and arsenic in elutriates collected from all three soil types, no toxicity was observed in any of the fractions collected from these columns.   | Dagan R., Bitton G., Townsend T. G., 2006, <i>Metal Transport and Bioavailability in Soil Contaminated with CCA-Treated Wood Leachates</i> , Soil & Sediment Contamination, 15:1, 61-72.  |
| Blocks of southern yellow pine (SYP) treated with alkaline copper quaternary (ACQ) and copper boron azole (CBA), along with chromated copper arsenate (CCA)- treated wood | pH, total dissolved solids (TDS), alkalinity, hardness, chloride, total organic carbon (TOC), chemical oxygen demand (COD), turbidity (in NTU). Cu, As, Cr, B concentrations, labile Cu. | MetPLATE  | Results show that ACQ- and CBA-treated wood leach approximately 10 and 20 times more total Cu relative to CCA-treated wood and that the presence of organic and inorganic ligands in natural waters lowered the labile fraction of Cu relative to that from laboratory generated leaching solutions.  | Lower toxicity was observed with <b>seawater</b> samples for each wood type compared with the other leachates. In general, among the other nine leachates for each wood treatment, toxicity followed the pattern CBA > ACQ > CCA. For all three treated wood leachates, the highest toxicity was observed from the DI leachate. This coincides with the relatively high labile copper concentrations associated with DI water. | Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2007, <i>Impact of Surface Water Conditions on Preservative Leaching and Aquatic Toxicity from Treated Wood Products</i> , Environmental Science Technology, 41, 3781-3786.       |
| Leachate/runoff from wood recycling facilities  | pH, BOD, COD, TSS, settleable solids, total Kjeldahl nitrogen (TKN), total phosphate-phosphorus (TP), tannin/lignin/phenolic (T/L/P) compounds, fecal coliforms, ecotoxicological test.  | <i>D. rerio</i>   | BOD, COD, and TSS concentrations were comparable to those of untreated domestic wastewater (raw sewage), although both lower and higher individual values were observed. TKN, TP and fecal coliform values were usually slightly lower than is typical for untreated domestic wastewater. BOD, COD, TSS, TKN, and TP median values were all much higher than for typical urban stormwater runoff, while fecal coliform levels were lower. | The developmental effects observed were yolk sac edema, abnormal spine curvature, kink tail, and delay in development. Only delay in development regularly occurred at lower concentrations. little acute toxicity other than the one case attributable to low pH was observed in the mulch leachate/runoff samples, and no correlation was found between delayed development and T/L/P.                                       | Kannepalli S., Strom P. F., Krogmann U., Subroy V., Gimenez D., Miskewitz R., 2016, <i>Characterization of wood mulch and leachate/runoff from three wood recycling facilities</i> , Journal of Environmental Management 182, 421-428 |

| Matrix   | Type of test  | Test species  | Result Chemical test   | Result Ecotox test  | Reference   |
|--|---|---|--|---|---|
| Wood spruce ( <i>Picea</i> sp.) treated with chromated copper arsenate (CCA) and alkaline copper quaternary (ACQ)  | Metal concentration with ICP-OES system, ecotoxicological test  | <i>E. fetida</i>  |  | We found that earthworm tissue concentrations of 80 mg As kg <sup>-1</sup> , 89 mg Cr kg <sup>-1</sup> and 90 mg Cu kg <sup>-1</sup> were not lethal to <i>E. fetida</i> . There was Cu bioaccumulation in <i>E. fetida</i> exposed to soil contaminated with a single metal (Cu from ACQ-treated wood), but Cu was less bioavailable in alkaline than neutral soil conditions. Exposure to Cu alone did not affect <i>E. fetida</i> growth or reproduction, but exposure to multiple metals (As, Cr and Cu from CCA-treated wood) produced soil-specific growth and reproduction outcomes. | Leduc F., Whalena J. K., Sunaharab G. I., 2008, <i>Growth and reproduction of the earthworm Eisenia fetida after exposure to leachate from wood preservatives</i> , Ecotoxicology and Environmental Safety 69, 219–226      |
| Natural wood: <i>Pouteria guianensis</i> , <i>Minuartia guianensis</i> , <i>Eschweilera</i> spp, <i>Quercus</i> spp, <i>Picea abies</i> .  | pH values 3, 24 and 72 h, Dissolved oxygen (DO), chemical oxygen demand (COD), ecotoxicological test.   | <i>Artemia franciscana</i> , <i>Crassostrea gigas</i>     |  | Leachate toxicities showed that AB<MM≈RO<AC<PA at 24 h and AB≈AC≈MM≈RO< PA at 72 h. From 24 to 72 h, toxic effects were reduced by more than 50% for all samples except for PA.   | Libralato G., Losso C., Ghirardini A. V., 2007, <i>Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (Crassostrea gigas and Artemia franciscana)</i> , Journal of Hazardous Materials 144, 590–593       |
| Wood chips of <i>Pinus resinosa</i> treated with pentachlorophenol;  | PCP concentration, chloride ion   | <i>Daphnia magna</i>                                      | Complete degradation of PCP was also achieved in the cases for 120 mg PCP/L and a 12 h cycle time or 50 mg PCP/L and a 6 h cycle time  | <i>Daphnia magna</i> toxicity tests showed that the presence of PCP in leachate caused toxicity, and the biodegradation of PCP resulted in significantly reducing the effluent toxicity to a value similar to that of PCP-free nutrient solution.   | Mollah A. H., Allen D. G., 1999, <i>Biodegradation and Detoxification of Wood Leachate from Pentachlorophenol-Treated Poles</i> , The Canadian Journal of Chemical Engineering 77.  |
| Blocks wood of <i>P. sylvestris</i> , <i>P. radiata</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , Southern yellow pine treated with furfurylation process. Reference with chromated copper arsenate (CCA).                       | Furan compound analysis, Maleic acid analysis, Ecotoxicological test                                    | <i>Daphnia magna</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | The present study shows that the difference in toxicity most likely cannot be attributed to maleic acid, furan, furfural, furfuryl alcohol, or 2-furoic acid. However, the difference could be caused by the two substances 5-hydroxymethylfurfural and 2,5-furandimethanol.             | The leachates from furfurylated wood have low toxicity. Earlier studies have shown that leachates from wood treated with furfuryl alcohol prepolymers have higher toxicity to <i>Vibrio fischeri</i> than leachates from wood treated with furfuryl alcohol monomers.   | Pilgard A., Vetter L., Acker J.,z and Westin M., 2010b, <i>Toxic hazard of leachates from furfurylated wood: comparison between two different aquatic organisms</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 29, 1067–1071. |
| Blocks wood of <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus sylvestris</i> treated with three different furfurylation process. Untreated <i>P. sylvestris</i> and <i>P. radiata</i> sapwood were used as reference material.                      | Ecotoxicological test   | <i>Daphnia magna</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) |  | The results from the toxicity tests show that the bacteria were more sensitive than <i>D. magna</i> to furfurylated wood leachates. These results indicate that, with general furfurylated wood, leachates are not more toxic than untreated wood leachates, the only exception being <i>P. radiata</i> treated with treatment A.   | Pilgard A., Vetter L., Acker J.,z and Westin M., 2010b, <i>Toxic hazard of leachates from furfurylated wood: comparison between two different aquatic organisms</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 29, 1067–1071. |
| Natural wood: <i>Populus tremuloides</i> , <i>Pinus contorta</i> , <i>Picea engelmannii x glauca</i> Parry, <i>Picea mariana</i> . As well as from two wood chipping sites using mixes of lodgepole pine and hybrid or black spruce. | pH, True Color, Total Organic Carbon, Chemical Oxygen Demand, Ammonium, Resin Acids, Phenols, Microtox. | <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)                        | Aspen chips produced the most acidic leachate with higher organic, phenolic, and ammonia concentrations compared to the coniferous and mixed samples. Coniferous samples showed some subtle differences with the spruce samples being more similar to each other than they were to pine. | All samples collected during the 580 days of exposure produced a toxic response within the 15 minute test period; all leachate samples exhibited a consistent toxicity response over the 4-week period, with each toxic sample at concentrations below 10% by volume. There was no significant difference in leachate toxicity between dry and wet exposure within tree species or between tree species. The dry chip Muldowan 18 leachate samples required a higher concentration to induce toxicity than the wet sample and all other samples.  | Rex J., Dubé S., Krauskopf P., Berch S., 2016, <i>Investigating Potential Toxicity of Leachate from Wood Chip Piles Generated by Roadside Biomass Operations</i> , Forests.   |

| Matrix   | Type of test   | Test species   | Result Chemical test   | Result Ecotox test   | Reference   |
|--|--|--|--|--|---|
| Natural wood: birch ( <i>Betula sp</i> ) and spruce ( <i>Picea abies</i> ) woodchip, and their mixture with washed gravel (WG).  | total organic carbon, dissolved organic carbon, phenol index.                                | <i>Daphnia magna</i> , <i>D. subspicatus</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | Statistical analysis of the data showed no significant influence of the leaching period on the quality of effluent represented by concentrations of FNI, TOC, DOC and an inhibitory effect on aquatic organisms. The type of filling medium resulted in significantly different levels of the leachate quality, in terms of TOC, DOC and FNI. The pure organic material (BWCH and SWCH) resulted in a significantly higher concentration of FNI and organic carbon as well as higher inhibition of the tested aquatic organisms. |  | Šereš Z., Došenović T., Šoronja-Simović D., Maravić N., Šaranović Z., Šereš L., Šćiban M., Djordjević M., 2019, <i>Modelling of cross-flow microfiltration coupled with bentonite treatment in sugar beet molasses purification</i> , The Canadian Journal of Chemical Engineering 97, 947-954. |
| Block of southern yellow pine treated with alkaline copper quaternary, copper boron azole and copper citrate.  |  | MetPLATE   |  | Leachate from untrated southern yellow pine were found to be no-toxic to the MetPLATE test bacteria. The toxicity was greatest for CCA-treated wood. Higher EC50 values were calculated in the second part of the experience using larger wooden blocks.   | Stook K., Dubey B., Ward M., Townsend T., Bitton G., Solo-Gabriele H., 2004, <i>Heavy Metal Toxicity of Pressure Treated Wood Leachates with MetPLATE™</i> , Bulletin Environmental Contamination and Toxicology 73, 987–994.   |
| Block of southern yellow pine treated with preservatives included chromated copper arsenate, alkaline copper quaternary, copper boron azole, copper citrate, and copper dimethyldithiocarbamate.   | Arsenic, chromium, and copper  | <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Raphidocelis subcapitata</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)       | CCA-treated wood leached greater concentrations of arsenic and copper relative to chromium, with copper leaching more with the TCLP and synthetic seawater. Copper leached at greater concentrations from the arsenic-free preservatives relative to CCA.  | All of the arsenic free alternatives displayed a greater degree of aquatic toxicity compared to CCA. Invertebrate and algal assays were more sensitive than Microtox.  | Stook K., Tolaymat T., Ward M., Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2005, <i>Relative Leaching and Aquatic Toxicity of Pressure-Treated Wood Products Using Batch Leaching Tests</i> , Environmental Science and Technology 39, 155-163.  |
| Natural Sawdust and bark from: Pedunculate oak ( <i>Quercus robur</i> ), Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), European larch ( <i>Larix decidua</i> ), Norway spruce ( <i>Picea abies</i> ) and European beech ( <i>Fagus sylvatica</i> )   | pH, TOC, phenolic compounds (reported as total poly-phenols)                                 | <i>Artemia salina</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)   | The pH varied from very acid (for oak sawdust leachate pH 4.0) to neutral (for spruce sawdust leachate pH 7.2). Similar to TOC, within the same species, the phenols content was also significantly higher ( $p < 005$ ) in bark than in sawdust regardless the tree species tested (oak, pine and spruce).  | Microtox® test is more sensitive to all tested waters than the crustacean <i>A. salina</i> . Regarding <i>V. fischeri</i> , two of the tested sawdust leachates (pine and oak) and all three tested bark leachates (spruce, pine and bark) were highly toxic while minor toxic effects was observed for the leachate from other species (spruce, beech and larch sawdust). | Svensson H., Svensson B., Hogland W., Marques M., 2012, <i>Acute Toxic Effects Caused by Leachate from Five Different Tree Species on Artemia Salina and Vibrio Fischeri</i> , Journal of Biobased Materials and Bioenergy 6, 214–220.  |
| 1) water from pond that receives oak wood leachate generated due to log irrigation;<br>2) water from ditch that receives leachate generated due to rainfall contact with oak wood chip piles;<br>3) leachate generated via leaching test with oak sawdust under laboratory conditions. | pH, COD, total content of polyphenols (PP), ecotoxicological test                            | <i>Artemia salina</i> , <i>L. sativa</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)                          | 50% of the COD found in the samples collected in the field is in the 100 kDa fraction while only 10% of the COD is removed from the same water fraction after filtration of the laboratory leachate. The 100 kDa filter removes the largest amount of PP found in the field samples, while the amount of PP in the laboratory leachate is more evenly distributed along the fractions.   | Only FSP 2 and LAB-L were toxic to <i>A. salina</i> and <i>V. fischeri</i> . No sample had a toxic effect on <i>L. sativa</i> germination. The toxic effect drops significantly for wood chips after the 100 kDa (over to) filter in both Microtox and Artemia tests, whereas the drop is not that significant for leachate water.   | Svensson H., Jani Y., Hogland W., Marques M., 2014, <i>Particle size characterization of oak wood leachate: chemical oxygen demand and toxicity distribution within different fractions</i> , Water Science & Technology 70.3   |
| Natural sawdust obtained from oak ( <i>Quercus robur</i> ), maple ( <i>Acer platanoides</i> ), pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), beech ( <i>Fagus sylvatica</i> ) and  | DOC, pH, conductivity, colour, phenols, tannins and lignin, biochemical oxygen demand (BOD). |  | The oak chips batch test released DOC up to 312 h of contact time when equilibrium was apparently reached. Based on sawdust leaching tests obtained from maple, oak, pine and beech, the organic compounds measured as DOC were mainly released during the first 24 h and the additional DOC release remains for up to 216 h of contact time. For pine sawdust, the DOC released was   |  | Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W., 2014, <i>Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas</i> , Water and Environment Journal.   |



| Matrix  | Type of test  | Test species   | Result Chemical test  | Result Ecotox test  | Reference   |
|---|---|--|---|---|---|
| wood chips from oak and pine.   |   |  | six times higher than that released from pine wood chips. For oak sawdust, the DOC released was 16 times higher than for oak wood chips. The pH range ranged from 4.1 (oak) to 6.8 (maple). Oak leachate color was found to be 8.7 and 15.2 times the color measured for pine, respectively. BOD7 / DOC ranged from 12 to 28% of the COD. Concentrations of phenol range from 12 to 77 mg / L. Unlike the total leaching of DOC per unit of dry matter, the DOC concentration (mg / L) in the aqueous phase is influenced by the S / L ratio. The DOC concentration in the leachate after a batch test decreased to approximately 40% after the second wash compared to unwashed sawdust. |   |   |
|   | Microtox, conductance, pH, DO, and absorbance (465 nm), 5-day BOD, COD, color, resin and fatty acids, nitrogen, total phenols, total organic carbon | <i>Daphnia magna</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | The analyzes revealed an amber color, low pH (4.0), extremely high BOD (0.2.600 mg / L) and high conductivity (1140 mS / cm). The leachate was rich in phenols (30 mg / l), organic carbon (2,480 mg / l) and organic nitrogen (13 mg / l).   | Median acutely toxic concentrations of leachate were consistently 1 to 2% of full strength for trout and <i>Daphnia</i> . Inhibition of bacterial metabolism began at concentrations below 0.3%. Leachate was less toxic to plant life but inhibited algal growth at concentrations of 12 to 16%.                           | Taylor B. R., Goudey J. S., Carmichael N. B., 1996, <i>Toxicity of aspen wood leachate to aquatic life: laboratory studies</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 15, 150–159.                            |
| Leachate from natural woodpiles of trembling aspen ( <i>Populus tremuloides</i> )   | pH, conductivity Color, BOD, COD, Phenols, TOC, Toxicity index  | <i>Daphnia magna</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | Aspen leachate was characterized by dark color, acid pH (5.0–6.5), high conductivity (200–500 mS / cm), high to very high BOD (500–5,000 mg / L) and concentrations of TOC (500–2,000 mg / L), varying levels of phenolic compounds (2–27 mg / L) and low dissolved oxygen voltages (.2 mg / L).  | The leachate varied from weakly toxic (mean EC50 or LC50 . 10%) to very toxic (mean EC50 or LC50 , 1%). Leachate was produced in every season for two years and was chemically and toxicologically similar to that produced from wood chips in the laboratory (see Taylor, 1996)  | Taylor B. R., Carmichael N. B., 2003, <i>Toxicity and chemistry of aspen wood leachate to aquatic life: field study</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2048–2056.                                 |
| Natural wood with bark chipped from a mixture of conifer tree species including <i>Abies concolor</i> , <i>Pinus lambertiana</i> , <i>Calocedrus decurrens</i> , <i>Pinus jeffreyi</i> , <i>Abies magnifica</i> , and <i>Pinus contorta</i> . | Growth test, phenolics concentration  | <i>Scirpus microcarpus</i>   |   | Leachate of mixed conifer bark contains approximately 20 times higher phenolics concentration than similarly prepared wood-only leachate. High levels of phenolics (211 mg/L) inhibited <i>S. microcarpus</i> growth; this growth inhibition was more pronounced in nutrient-limited conditions and in smaller individuals. | Wolf E. C., Rejmánková E., Cooper D. J., 2019, Wood chip soil amendments in restored wetlands affect plant growth by reducing compaction and increasing dissolved phenolics, Restoration Ecology 27, 1128–1136. |

### Allegato 3: Analisi chimiche dei campioni di lisciviato. / Attachment 3: Chemical analyses of leachate samples.

Di seguito vengono riportate le analisi chimiche effettuate da Agri.Te.Co. Sono riportati solo i valori relativi al rame in quanto per le altre sostanze analizzate (Etanolamina, Polifenoli e Terpeni) non risulta essere presente una quantità rilevante. / Below are reported the chemical analyzes carried out by Agri.Te.Co. Below are the chemical analyzes carried out by Agri.Te.Co. Only the values relating to copper are reported as the other substances analyzed (Ethanalamine, Polyphenols and Terpenes) do not appear to be present in a significant quantity.

| Sample    | Parameter | MU     | Value   |       |
|-----------|-----------|--------|---------|-------|
| UTW       | t0        | Copper | µg/L Cu | 3,88  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 15,5  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 11    |
| TM        | t0        | Copper | µg/L Cu | 44    |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 14,7  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 16,7  |
| S. LOW    | t0        | Copper | µg/L Cu | 1054  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 244   |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 116,8 |
| S. MARINE | t0        | Copper | µg/L Cu | 6190  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 1044  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 660   |
| S. UC5    | t0        | Copper | µg/L Cu | 9600  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 2270  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 2070  |

# Interreg



UNIONE EUROPEA  
EVROPSKA UNIJA

## ITALIA-SLOVENIJA



DuraSoft

Progetto standard co-finanziato dal Fondo europeo di sviluppo regionale  
Standardni projekt sofinancirna Evropski sklad za regionalni razvoj

# Ekotoksikološka ocena v brakični vodi

Različica: ŠT. 1

Povezan DS: 3.3.1

Odgovorni partner: Univerza Cà Foscari (PP4)

Avtorji: Volpi Ghirardini Annamaria, Picone Marco, Distefano Gabriele,  
Russo Martina, Marchetto Davide

Datum: 31. maj 2022



PRIMORSKA  
GOSPODARSKA  
ZBORNICA



Silvaproduct  
od 1951



## KAZALO

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Uvod</b> .....  | <b>4</b>  |
| 1.1 Predhodni pregled objav .....  | 4         |
| <b>2 Materiali in metode</b> .....   | <b>6</b>  |
| 2.1 Priprava izpirkov za ekotoksikološko testiranje .....                      | 6         |
| 2.2 Integrated Testing Strategy (ITS) - Integrirana strategija testiranja..... | 8         |
| 2.3 Preizkus toksičnosti za brakične vode .....                                | 9         |
| 2.4 Prikaz testnih rezultatov in analiza podatkov .....                        | 12        |
| <b>3 Rezultati in razprava</b> .....   | <b>13</b> |
| 3.1 Tier I.....  | 13        |
| 3.2 Tier II.....   | 17        |
| 3.3 Tier III.....  | 18        |
| <b>4 Zaključki</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>5 Literatura</b> .....  | <b>20</b> |

---

## OKRAJŠAVE

---

ACQ - alkaline copper quaternary (alkalni bakreni kvaternar)

ASTM - American Society for Testing and Materials (Ameriško združenje za testiranje in materiale)

CBA - copper borate azole (bakrov-borov azol)

CCA - chromated copper arsenate (kromirani bakrov arzenat)

EC50 - effect concentration (efektivna koncentracija za 50 % organizmov, uporabljenih pri toksikološkem preizkušanju)

ELS - early life stage (zgodnje razvojne stopnje)

ISO - International Organization for Standardization (Mednarodna organizacija za standardizacijo)

ITS - Integrated testing strategy (integrirana strategija testiranja)

LDR - Larval Development Rate (razvojna stopnja ličink)

MAV - Magistrato alle Acque di Venezia (Pristojna ustanova za javne infrastrukture v Benetkah)

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj)

TM - termically modified (termična modifikacija)

TU50 - toxicity unit ali toksikološka enota (TU50 = 100/EC50)

UC5 - use class 5 (razred uporabe lesa 5)

US-EPA - United States Environmental Protection Agency (Agencija za varstvo okolja Združenih držav Amerike)

UTW - UnTreated wood (neobdelan les)

## POVZETEK

---

Ta raziskava uporablja eksperimentalni pristop, sloneč na nizu indikatorjev, ki omogočajo oceno tveganja za morsko bioto na različnih trofičnih ravneh ter biološke obremenitve nekaterih izdelkov za zaščito lesa. Pri oceni strupenosti izpirka iz lesnih vzorcev (obdelanih in neobdelanih) smo uporabili integrirano strategijo testiranja (Integrated testing strategy - ITS), katere hierarhično organizirana struktura nudi možnost proučevanja vpliva, ki ga obdelave za povečanje obstojnosti lesa imajo na okolje. ITS sicer zaznamuje povečana občutljivost ekotoksikoloških testov, ki se uporabljajo pri treh stopnjah testiranja (stopnja 1 - Akutni testi; stopnja 2 - Testi najbolj občutljivih stopenj, stopnja 3 - Kronični testi). S to metodo lahko sicer ocenjujemo morebitne učinke in ugotovimo, koliko so le-ti »sprejemljivi« za vodno rastlinstvo in živalstvo, da bi tako določili okolju prijazno obdelavo. Cilj raziskave je bilo ugotoviti, kako bi obdobje izpostavljenosti v vodi vplivalo na sproščanje snovi iz lesa, z namenom priprave smernic, ki bi bile v pomoč družbam pri določanju potrebnega obdobja izpostavljenosti pred uporabo materiala v okolju. Postopek ITS je predvidel primerjavo obdelanih lesnih vzorcev z neobdelanim (UTW), s posebnim poudarkom na proučevanju vzorcev iz lesne vrste *Picea abies*, ki so bili termično modificirani (TM) in obdelani s Silvanolinom, da bi jih tako uporabili v morskem okolju (UC5). Uporabili smo različne koncentracije Cu: UC5<sub>(I)</sub> prva formulacija v visoki koncentraciji Cu, UC5<sub>(II)</sub> druga formulacija v visoki koncentraciji Cu

(obdelana za omejitev sproščanja), UC5<sup>(III)</sup> dokončna formulacija v 1 % Cu koncentraciji, formulacija MAR v 0,25 % Cu koncentraciji, pri kateri smo nato les obdelali z oksalno kislino, LOW formulacija v nizki Cu koncentraciji, to je 0,033 %. Prvi testi stopnje I na UC5<sup>(I)</sup> in UC5<sup>(II)</sup> so pokazali izredno visoko toksičnost teh pripravkov, izkazala se je tako potreba po spremembi formulacije obdelave za uporabo kategorije izdelkov UC5, da bi našli rešitev z manjšim vplivom na vodno okolje skladno s cilji ITS strategije. Končno testiranje na novih formulacijah (UC5<sup>(III)</sup>, MAR in LOW) je pokazalo, da sta obdelavi UC5<sup>(III)</sup> in MAR glede na sprejete kriterije za ITS postopek ocenjevanja v slani vodi neustrezni za morsko-obalno okolje zaradi visoke akutne toksičnosti (TIER 1), nastale tudi po 30-dnevni izpostavljenosti, pri vseh (UC5<sup>(III)</sup>) ali pri vsaj dveh kazalnikih (MAR). Iz rezultatov prvostopenjske ocene je bilo ugotovljeno, da TM in LOW nista pokazali nobenih akutnih učinkov oz. so bili le-ti primerljivi s tistimi za neobdelan les (UTW), zato sta primerni za drugostopenjsko oceno (Tier II). V luči rezultatov drugostopenjske ocene (Tier II) in ob upoštevanju, da merilo za prestajanje druge stopnje določa kot pogoj, da pri enem od dveh testov ni prišlo do pomembnih negativnih učinkov v primerjavi z UKW, sta bili obe zaščitni obdelavi TM in LOW primerni za nadaljevanje testa na tretjo fazo (Tier III). Na podlagi rezultatov zadnje ocenjevalne stopnje sta bili predmetni obdelavi po učinku na vodne indikatorje v celoti enaki neobdelanemu lesu (UTW). Po predlagani oceni ITS je bilo ugotovljeno, da sta obdelavi TM in LOW primerni za uporabo v morskem/brakičnem okolju, saj bi dolgotrajni učinki lahko nastali šele po daljši izpostavljenosti v statičnih pogojih in pri slabi izmenjavi vode. Testiranje v zvezi s tremi časovnimi obdobji izpostavljenosti (0, 15 in 30 dni) je pa jasno pokazalo, da je treba pred uporabo materiala (obdelanega in neobdelanega) zagotoviti minimalni 30-dnevni čas izpostavljenosti, s čimer zajezimo obremenitev na morsko-obalno okolje.

## 1 UVOD

---

Glavni cilj te raziskave je bila ekotoksikološka ocena izpirkov iz toplotno-kemično obdelanega lesa skladno z integrirano strategijo testiranja (ITS), katere hierarhično organizirana struktura nudi možnost proučevanja obremenjenosti okolja, ki jo povzročajo obdelave za povečanje obstojnosti lesa. Strategija ITS sicer ocenjuje morebitne učinke in prouči, koliko so le-ti »sprejemljivi« za vodno živalstvo in rastlinstvo, s posebnim poudarkom na morsko-obalnem okolju.

### 1.1 Predhodni pregled objav

---

Namen pregleda objav je bilo ugotoviti trenutno stanje raziskav na področju toksikološke ocene izpirkov iz neobdelanega in obdelanega lesa; proučili smo namreč: a) standardne in eksperimentalne postopke, b) vrsto uporabljene izpiralne količine, c) morebitno predhodno obdelavo lesa, d) fizično-kemične parametre in vrsto kemičnih analiz, ki jih je treba obravnavati, e) organizme in vrste ekotoksikoloških testov, uporabljenih pri ocenah f) in nazadnje rezultate raziskave ter povezane težave.

V dveh prilogah k temu poročilu je strnjeno prikazan pregled proučenih objav; v prvi prilogi so prikazani uporabljeni parametri in tehnike izpiranja, v drugi pa kemične in ekotoksikološke značilnosti izpirkov.

## Tehnike izpiranja

V tem delu pregledovanja raziskav smo želeli razumeti, katere metode se uporabljajo za opredelitev lastnosti obdelanega in neobdelanega lesenega materiala, na podlagi katerih se določi eksperimentalni načrt.

Deset od 21 proučenih objav obravnava les, impregniran s sredstvom na osnovi bakra (priloga 1). Najbolj analiziran je kromirani bakrov arzenat (CCA, 5 raziskav), ki je danes prepovedan v EU, mu sledijo alkalni bakreni kvaternar (ACQ) in azolne spojine bakra in bora (CBA) (4 raziskave za vsako snov). Drugi dve proučeni obdelavi, ki nista na osnovi bakra, sta furfurizacija in uporaba pentaklorfenola. Cilj sedmih študij je bila opredelitev naravne toksičnosti lesa, kjer so bile tako kot za obdelan les uporabljene tehnike izpiranja, ki se lahko ponovijo. Štiri raziskave pa predvidevajo, da se izpirek, nastal med sezonskimi padavinami, neposredno odvzame na licu mesta.

Glede samega postopka izpiranja najbolj pogosto uporabljena tekočina je destilirana/deionizirana voda oz. voda iz pipe (13), umetna morska voda pa je bila uporabljena pri 3 raziskavah. Nekatere študije, kot Dubey in sod. (2007), celo predvidevajo uporabo 8 naravnih sladkih, slanih in brakičnih voda z različnimi značilnostmi, Adeleye in sod. (2016) pa so primerjali morsko in pitno vodo ter tisto ob rečnih ustjih.

Statični test izpiranja je bil najbolj pogosto uporabljen (v dvanajstih študijah), dinamični test pa je bil opravljen petkrat. Razmerje tekoče:trdno (S/L) se močno razlikuje glede na avtorja, in sicer od minimalne vrednosti 1:5 do maksimalne 1:40. Največ testov je bilo izvedenih z uporabo razmerja približno 1:10. Razmerje S/L 1:40 so Svensson in sod. (2012, 2014a,b) uporabili v posebnem primeru, tj. pri preizkušanju na žagovini, ker zaradi absorpcije velike količine vode ni bilo mogoče zagotoviti optimalnega izpiranja pri nižjih razmerjih.

## Kemično-fizikalne in ekotoksikološke lastnosti izpirkov

Pri pregledu objav o izpirkih (priloga 2) smo lahko ugotovili, da je bila večina testov opravljena na sladki vodi, le 5 zadeva morsko. Pri glavnini študij pa je bila poleg kemijske izvedena tudi ekotoksikološka analiza.

Pri ekotoksikoloških testih na izpirkih je večina analiz uporabila bakterijo *Aliivibrio (Vibrio) fischeri* in rakca *Daphnia magna*, ki se je med obema vrstama izkazal za najbolj občutljivega. Glede vrste *A. fischeri* iz literature izhaja, da iver povzroča strupene izpirke ne glede na vrsto uporabljenega postopka izpiranja (Rex in sod., 2016, Svensson in sod., 2014a,b).

Za oceno strupenosti izpirka se kot testne vrste uporabljata školjka *Crassostrea gigas* in rakec *Artemia salina* (Libralato in sod., 2007; Svensson in sod. 2012, 2014a), med uporabljenimi rastlinskimi organizmi pa velja omeniti vrsto *Scirpus microcarpus* (Wolf in sod. 2019). Test škodljivosti na zarodkih vrste *C. gigas* je pokazal večjo občutljivost kot akutni test z vrsto *Artemia salina* (Libralato in sod., 2007), predvsem zaradi dejstva, ki so ga izpostavili tudi Svensson in sod. (2014a), da ta rakec bistveno ne občuti strupenega učinka izpirka. Test razvoja z vrsto *S. microcarpus* pa je pokazal, da visoke ravni raztopljenih fenolov lahko omejijo možnost rastlin za dostop do hranil (Wolf in sod. 2019).

O kopenskih organizmih so bile sicer opravljene ciljne raziskave za oceno biokopičenja kovin in metaloidov ter vpliva na razmnoževanje in razvoj na maloščetincu *E. fetida*, izpostavljenem tlem, poškrapljenim z izpirkom iz lesa, obdelanega z CCA in ACQ (Leduc in sod., 2008).

Na splošno lahko trdimo, da bi se snovi, ki povzročijo akutne strupene učinke na neobdelanem lesu, razlikovale glede na proučeno lesno vrsto; na primer je toksičnost hrasta po vsej verjetnosti odvisna od fenolnih spojin, strupenost bora pa domnevno od terpenov (Svensson in sod., 2012). Iz pregleda literature tudi izhaja, da visok organski delež izcedne vode ali kombinacija organskih spojin in smolnih kislin lahko občutno pripomorejo k nastanku toksičnosti (Rex in sod., 2016). Glede uporabljene obdelave za zaščito lesa pa je bilo ugotovljeno, da je strupenost za vodno okolje povezana z nestalnim deležem Cu, prisotnim v izpirku. V primerjavi z laboratorijskimi izpirnimi tekočinami je nižja vodna strupenost, izmerjena v izcedni vodi iz obdelanega lesa, pridobljeni z naravnimi vodami, verjetno povezana s prisotnostjo večje količine veziv in kelatov v naravnih medijih (Dubey in sod., 2007, Kannepalli in sod., 2016).

V literaturi so bile izpostavljene pomembne razlike v kemijsko-fizikalnih lastnosti izpirkov glede na vrsto lesa. Na podlagi testov izpiranja na iverju štirih različnih lesnih vrst (hrast, bor, javor in bukev) so bile na primer beležene statistično pomembne razlike med hrastom in drugimi tremi vrstami pri skoraj vseh proučenih spremenljivk, to so raztopljen organski dušik (DOC), fenoli, biokemijska potreba po kisiku (BOD5), pH, tanini, lignin in barva (Svensson in sod., 2014b). Ko se les razreže na manjše kose, postopek izpiranja in prenosa onesnažil potekata veliko hitreje, kot bi naravno. Na podlagi rezultatov je videti, da bi vrsta, velikost delcev in anatomske razlike lesa skladiščene materiala vplivale na obremenjenost z organskim onesnaževalom, ki se sprošča v vodni fazi, ko je les v stiku z vodo.

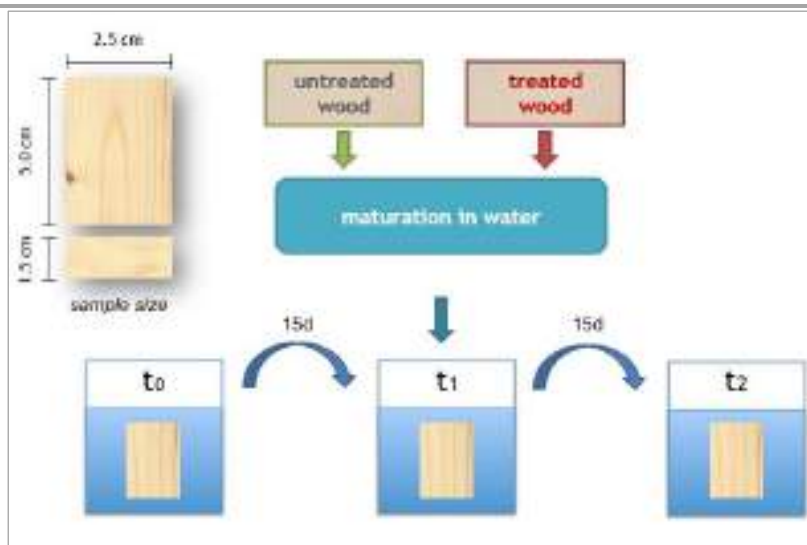
## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Priprava izpirkov za ekotoksikološko testiranje

Glede na znanstveno literaturo in predhodne izkušnje za lagunsko okolje (UniVe-CVN, 2011; MAV, 2013) smo za izvajanje te projektne aktivnosti razvili posebno metodo za oceno toksičnosti lesnih vzorcev, pri kateri se vzorci predhodno operejo pod tekočo vodo, da se s površine odstranijo morebitni ostanki, nato se najprej izvede izpiranje pri času nič (T0), nato še dva dodatna izpiranja po 15 (T15) in 30 (T30) dneh izpostavljenosti v vodi.

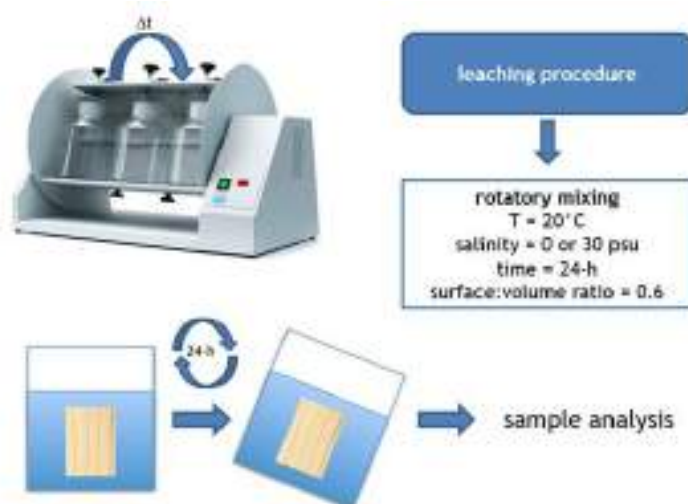
Na sliki 1 je shematsko prikazan postopek izpostavljenosti vzorcev.





Slika 1. Postopek izpostavljenosti lesnih vzorcev velikosti 5,0 x 2,5 x 1,5 cm.

V vsak akvarij s 30 litri rekonstruirane morske vode (Prodac, slanost 30 ‰) smo položili lesene vzorce, ki smo jih privezali na utež, da bi preprečili njihovo lebdenje in tako zagotovili popolno potopljenost v vodi. Akvarij je opremljen z dvema črpalkama moči 25 l/h, ki poskrbita za ustrezno kroženje in posledično čiščenje vode, na tak način se delno simulirajo okoljski pogoji, katerim bodo izpostavljeni koli. Vodo se v celoti zamenja na 15. dan od začetka preizkušanja. Pri  $T_0$ ,  $T_{15}$  in  $T_{30}$  smo na lesnih vzorcih izvedli postopek izpiranja, kot je prikazan na sliki 2.



Slika 2. Levo je naprava ROTAX, desno pa parametri izpiranja. Spodaj je prikazan postopek izpiranja.

Za izpiranje smo uporabili napravo ROTAX (podjetja Velp scientifica), ki zagotavlja popolno navpično vrtenje vzorcev, ki so shranjeni v zaprtih steklenicah. Izpiranje poteka

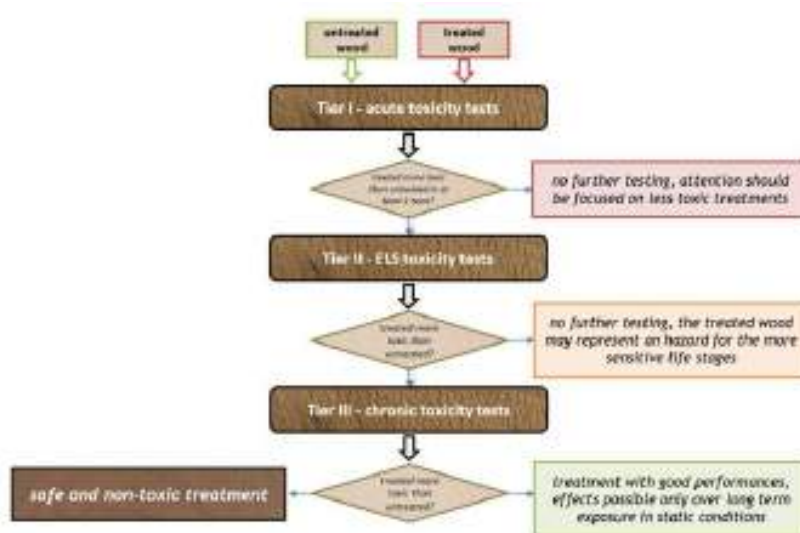
pri 20 °C, slanosti med 0 in 30 psu za 24 h skladno s smernicami MAV (2013). Izbrali smo razmerje površina vzorca/količina vode 0,6 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> (OECD, 1999; OECD 2007).

Vsi leseni vzorci so bili dimenzionirani na 5,0 x 2,5 x 1,5 cm in oblikovani po navodilih evropskega standarda EN 113-1:2020 o trajnosti lesa in lesnih izdelkov.

## 2.2 Integrated testing strategy (ITS) - Integrirana strategija testiranja

Za oceno strupenosti izpirkov iz obdelanih in neobdelanih lesenih vzorcev se uporablja »integrirana strategija testiranja« (ITS); na tem hierarhično organiziranem pristopu sloni odločitveni postopek ocene vpliva novih izdelkov na okolje, ki so namenjeni rabi na področju industrije, trgovanja in gradbeništva.

ITS strategija je uvedla novo organizacijsko ureditev pomorskih metod, vključenih v Operativni priročnik za organe, ki so pristojni za izdajo dovoljenja za uporabo materialov v Beneški laguni (MAV, 2013), z uvedbo dodatnih ravni ocenjevanja.

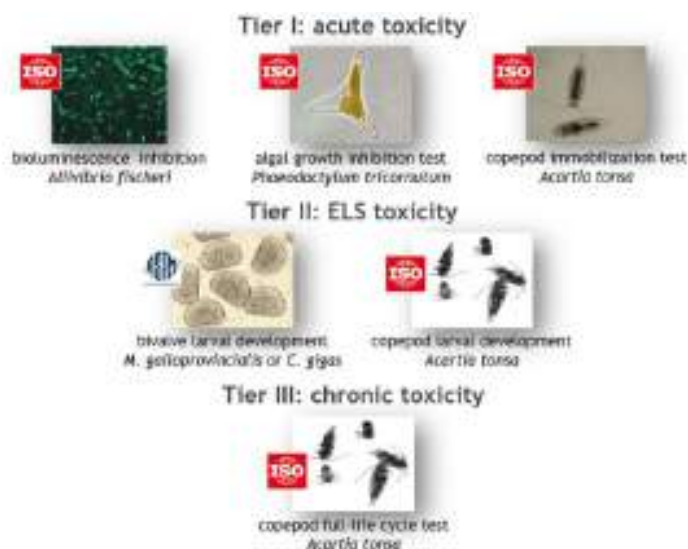


Slika 3. Hierarhično organiziran pristop ITS, ki je bil oblikovan za projekt Durasoft.

V sklopu tega projekta se ITS deli na tri različne faze, preko katerih se ocenjuje sprejemljivost morebitnega strupenega učinka na rastlinstvo in živalstvo, tako da se raven strogosti poveča ob prehodu na naslednjo višjo fazo, kjer so uporabljeni vse bolj občutljivi preizkusi. Obdelani leseni vzorci se v glavnem primerjajo z neobdelanim lesom. Če se obdelani vzorec izkaže za nestrupenega (ali so vrednosti TU <1), se preide na naslednjo fazo testiranja. Če testi niso pokazali pozitivnih rezultatov, zadnja ocenjevalna stopnja pomeni, da je obdelava popolnoma varna in skladna z okoljem, če pa je bil ugotovljen kronični učinek, to vsekakor pomeni, da ima zaščitna obdelava dobro raven kompatibilnosti in da je nastanek učinkov možen, a le pod posebnimi pogoji izpostavljenosti (npr. statični pogoji ali nezadostna izmenjava vode).

Vsaka stopnja, imenovana »TIER«, predvideva teste z jasno določenimi značilnostmi za brakično okolje, ki so organizacijsko urejeni, kot je prikazano spodaj (slika 4):

- »TIER 1« ocenjuje kratkoročne akutne učinke na brakično okolje s preskusom zaviranja bioluminescentnega sevanja bakterije *Aliivibrio fischeri*, preskusom zaviranja rasti diatomeje *Phaeodactylum tricornutum* in preskusom imobilizacije ceponožca *Acartia tonsa*.
- »TIER 2« ocenjuje strupenost na najbolj občutljive razvojne stopnje vodnih organizmov z uporabo testa razvoja ličink. Za brakično okolje je predvideno izvajanje testov na školjkah vrste *Mytilus galloprovincialis* z 48-urnim časom izpostavljenosti in na ceponožcih vrste *A. tonsa* s 5-dnevnim časom izpostavljenosti.
- »TIER 3« ocenjuje učinek izpirka na celotni življenjski cikel testnih organizmov; v brakičnem okolju se ovrednoti učinek izpirka na odrasle in mladiče vrste *A. tonsa* pri 40-dnevnem času izpostavljenosti.



Slika 4. ITS za brakične vode.

## 2.3 Preizkušanje toksičnosti za brakične vode

### Tier 1

#### -Test zaviranja luminescence bakterije *A. fischeri* (Test Microtox®).

Test Microtox® smo izvedli z uporabo analizatorja M500 (Azur Environmental) po postopku za tekoče vzorce, imenovanem »test 100 %« ali »WET, Whole Effluent Test«, kot je opisan v protokolih proizvajalčevega priročnika (Azur Environmental, 1998). Liofilizirane bakterije (Microtox® Acute Reagent, Modern Water, št. serije 19K4239A) smo ponovno aktivirali z dodajanjem izredno čiste destilirane vode (Reconstitution Solution, Modern Water) v ampulo z akutnim reagentom, ki vsebuje liofilizirane bakterije, da smo tako pridobili bakterijsko suspenzijo. Ampulo z bakterijsko suspenzijo smo za čas biološkega testa, ki se je izvajal pri 15 °C, namestili v odprtino analizatorja pri temperaturi 4 °C, da se aklimatizira. Zaviranje oddajanja svetlobe pri 490 nm vrste *A. fischeri* smo izmerili po 5, 15 in 30 minutah izpostavljenosti različnim razredčenim

eluatom, ki so bili pridobljeni iz morske vode po receptu ASTM, in v destilirani vodi za formulacije izdelkov, ki so namenjeni rabi v morskem okolju (Silvanolin Low, Silvanolin Marine, UC5, TM in UTW). Skladno s testnim protokolom smo najprej analizirali nerazredčen vzorec (1:1), nato s pomočjo serije razredčitev v razmerjih, ki se stopnjevalno razlikujejo v razmiku faktorja 2 (od 7 na 9 z razmerji redčenja 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 itd.). Za negativno kontrolo in sredstvo redčenja morskih vzorcev je bila uporabljena umetna morska voda ASTM. Pozitivna kontrola je bila opravljena z uporabo raztopine ZnSO<sub>4</sub>, kot referenčne strupene raztopine, skladno s postopkom, navedenim v standardu ISO 11348-3 za tekoče vzorce z uporabo liofiliziranih bakterij (ISO 11348, 2007).

#### **-Test zaviranja rasti alg vrste *Phaeodactylum tricornutum***

Preizkušanje z vrsto *Phaeodactylum tricornutum* smo izvedli skladno s protokolom ASTM E1218-04, »Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae«, na podlagi katerega smo lahko ocenili nastale izpirke. Metoda sloni na načelu, po katerem se različne generacije enovrstne populacije *P. tricornutum* gojijo znotraj testnih vzorcev, ki so bili predhodno obogateni s hranili in z inokulacijo alg, ki so v stanju eksponencialne rasti.

Na koncu preizkusa smo izmerili celično gostoto, ki se uporablja za izračun specifične stopnje rasti vzorca. Ocenjena končna točka predstavlja zaviranje rasti alge glede na kontrolnik, ki se pridobi s primerjavo specifične stopnje rasti vzorca s tisto pri negativni kontroli.

Volumen 10 mL testne raztopine v treh replikacijah za vsako razmerje redčenja smo vstavili v vsako od šestih rež na plošči za enkratno rabo (Iwaki, Japan). Za vsako obdelavo smo ocenili vzorce s serijo šest razmerij redčenja v geometričnem zaporedju za tri replikacije posamezne koncentracije (100, 33, 10, 3, 1, 0.3%). Za negativno kontrolo smo uporabili 6 replikacij.

Vnesli smo nato hranila in inokulum, izračunan na podlagi algalne gostote v rastni kulturi, ki smo jo v prejšnjih dneh pustili v stanju eksponencialne rasti. Plošče, na katerih je sprva prisotna algalna gostota približno 10<sup>4</sup> cell/mL, smo postavili v statične pogoje in inkubirali 72 ± 2 ur pri 20 ± 2 °C pod stalno svetlobo (6000 lx).

Po preteku 72 ur smo oceno koncentracije alg v režah opravili z neposrednim štetjem s pomočjo kamere Bürker.

#### **- Akutni test (negibnosti) ceponožca *Acartia tonsa***

Test se izvaja skladno s standardom ISO 14669/1999, po katerem za vsako koncentracijo pripravimo tri stekleničke za vzorce po 10 mL, v vsako od katerih vnesemo 2 odrasla organizma, ki smo ju odvzeli iz kulture. Organizma hranimo z 100µL mešanice treh mikroalg *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* in *Tisochrysis lutea*, ki služijo kot vir hrane.

Vse stekleničke inkubiramo pri temperaturi T=20±1°C z dnevno-nočnim ciklom 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Po 48 urah odvezamo stekleničke in preštujemo organizme, ki se ob mehanskem dražljaju ne gibljejo in zato veljajo za mrtve.

## Tier 2

### **-Test razvoja ličink vrste *Mytilus galloprovincialis***

Odrasle osebkje *Mytilus galloprovincialis* smo nabrali v Beneški laguni v času razmnoževanja. Tako odvzete organizme smo pustili 24 ur v akvariju s 50 litrov rekonstruirane morske vode v termostatirani komori pri 8 °C. Potem ko smo preverili dobro zdravstveno stanje, smo se lotili testiranja, ki smo ga opravili skladno z rahlo spremenjenim postopkom, opisanem v objavi Volpi Ghirardini in sod. (2005). Izleganje jajčec smo toplotno spodbudili tako, da smo odrasle osebkje v presledkih 30 minut izmenično potopili v vodo temperature 18 °C in 28 °C. Vsako plemensko samico smo izolirali v 300 ml becher kozarcu in jo pustili 30 minut, da izleže jajčeca; suspenzijo z jajčeci smo nato filtrirali s sitom 100 µm, da bi odstranili morebitne nečistoče in ostanke. Samce smo skupaj prenesli v kristalizator 500 ml in jih pustili 15 minut, da izločijo semenčice, nato smo to suspenzijo filtrirali z mrežastim sitom 32 µm. Jajčeca vsake samice smo nato oplodili z dodatkom 2 ml filtrirane suspenzije semenčic, z invertnim mikroskopom pa smo spremljali prve razvojne faze (videz polarnega telesa in prva segmentacija). Za test smo izbrali le jajčeca samic, ki so kazale najvišjo raven plodnosti, in jih predstavili v stekleno 1-litrsko posodo. Gostoto zigotov smo določili s štirikratnim štetjem količin 100 ml, nato smo oplojena jajčeca dodali testni raztopini in tako dobili končno gostoto 60–70 jajčec ml<sup>-1</sup> v 3 ml testne raztopine. Inkubacija je potekala 48 ur v temi na 18 °C. Test smo fiksirali z dodatkom filtriranega, 4 % puferiranega formalina.

Štetje anomalij smo opravili na 100 ličinkah, pri katerih smo razlikovali med normalno (D-shape) in nepravilno razvitimi ličinkami (z malformacijami, pred-larvalne stopnje). Test se šteje kot sprejemljiv, če je pri negativni kontroli število pravilno razvitih ličink enako 80 %.

Za referenčno strupeno snov smo pri pozitivnem testu uporabili baker (Cu).

### **-Test razvoja ličink (LDR) vrste *Acartia tonsa***

Pri tem testu je bil uporabljen protokol ISO 2015. Test razvoja ličink vrste *A. tonsa* je polstatični preizkus z zamenjavo preizkusne raztopine na vsakih 48 ur. Testiranje se začne na dan 0, ko jasno določeno število jajčec (50–80) vnesemo v steklene becher stekleničke 100 ml, ki vsebujejo 25 ml raztopine. To storimo z odvzemom jajčec iz kulture, nato deleže jajčec v suspenziji (100-200 µL) filtriramo s celuloznim filtrom; vsa jajčeca, nabrana na filtru, preštujemo s pomočjo stereomikroskopa in jih s sterilno brizgalko za enkratno rabo vbrizgamo v becher stekleničke.

Na 2. dan dodamo v vsako becher stekleničko še 25 ml testne raztopine in hrano.

Na dan 0 in 2 smo ličinke hranili s 100 µL koncentrirane mešanice vrst *T. suecica*, *T. lutea* in *P. lutheri*. Becher stekleničke smo pustili pri temperaturi 20 ± 1 °C z obdobjem osvetljenosti 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Test konča po 5 dneh, ko v negativnih kontrolah približno 40 % ličink doseže I. kopepoditni stadij. Po vizualni kontroli razvojne stopnje ličink vsebino v becher steklenički fiksiramo in obarvamo z dodatkom 0,5 ml Lugolove raztopine. Razvojno fazo določimo potem, ko smo vsebino becher stekleničk filtrirali. Če pri kontroli ugotovimo

manj kot 40 % kopepoditov, preizkus nadaljujemo še eno dodatno uro, nato lahko ponovno preverimo razvoj ličink. Ta postopek ponovimo, dokler 40 % ličink v kontrolni becher steklenički ni doseglo I. kopepoditnega stadija.

Vsa neizvaljena jajčeca, navplje in kopepodite, nabrane s filtra, smo prešteli z mikroskopom in izračunali razvojno razmerje ličink (LDR), to je razmerje med skupnim številom ceponožcev in ličink, prisotnih v becher steklenici, ter stopnjo smrtnosti ličink. Parametra za raztopljen kisik (DO) in pH izmerimo na dan 0, pred inokulacijo jajčec, in na dan 5, pred fiksacijo z Lugolovo raztopino. Pripravimo 6 replikacij za vsako koncentracijo, negativno kontrolo pa izvedemo z gojilnim medijem slanosti 20‰.

### Tier 3

#### - Kronični test z vrsto *Acartia tonsa*

Pi kroničnem preizkusu z vrsto *A. tonsa* smo uporabili notranji protokol Beneške univerze (Picone in sod., 2022). Cilj kroničnega preizkušanja je izpostaviti generacijo staršev (F0) onesnaževalu od stadija jajčeca vse do trenutka, ko je odrasel osebek sposoben razmnoževanja, potomci (generacija F1) pa so izpostavljeni onesnaževalu le v začetnih razvojnih fazah ličink do I. kopepoditnega stadija. Kronični test traja 28 dni; razvoj generacije F1 ocenimo, ko so osebki generacije F0 v fazi polne zrelosti (približno od dneva 21 do dneva 26).

Za vsako obdelavo se pripravi eno replikacijo; v vsako obdelavo se nato vnese približno 400–600 jajčec, ki so bili odvzeti iz laboratorijske kulture.

Vsako testno obdelavo ohranimo pod enakimi pogoji kot laboratorijske kulture, a z manjšimi razlikami, da se prepreči redčenje raztopin.

Med dvanajstim in štirinajstim dnevom od vnosa jajčec v obdelave – to je čas, ko odrasel doseže stadij razmnoževanja – odvezamo iz pripadajočih kultur vsaj 12 samic, vsako od katerih posamično izpostavimo v steklenički za vzorce 15 ml, ki vsebuje 10 ml medija 20‰ slanosti in mešanico alg. Ta metoda omogoča, da preverimo, ali bi onesnažilo lahko zaviralo sposobnost *A. tonsa* za lego jajlec v primerjavi s kontrolno kulturo. Samice pustimo 96 ur v stekleničkah za vzorce, štetje iznesenih jajčec pa opravimo vsakih 24 ur. Štetje količine jajčec, ki jih je vsak odrasli osebek izlegel, naredimo tako, da vsebino vsake epruvete (odrasel osebek in jajčeca) filtriramo skozi celulozni filter z rešetko, kar omogoča lažje prebiranje, potem ko smo odraslega osebka prenesli v drugo stekleničko z medijem pri 20‰ in mešanico alg.

Rezultat se izraža kot število jajčec, ki jih je vsaka samica izlegla na dan.

Test razvoja ličink na jajčecih, ki so jih izlegli osebki generacije F0, poteka na enak način kot je opisan v poglavju o Tier 2.

## 2.4 Prikaz testnih rezultatov in analiza podatkov

Obdelava podatkov o zaviranju luminescence bakterij, rasti alg in smrtnosti vrste *A. tonsa* je služila izračunu vrednosti  $EC_{50}$  (koncentracije izpirka, ki imajo učinek na 50 % izpostavljenih organizmov) in  $TU_{50}$ , ocenjeno kot  $100/EC_{50}$ . Za zaščitne obdelave z nizkim ali zanemarljivim učinkom ali pri katerih ne pride do 50 % zaviranja v nerazredčenem vzorcu, se vrednost  $TU_{50}$  izračuna po enačbi  $TU_{50} = Ex/50$ , kjer  $Ex$  predstavlja beležen odstotek učinka v obdelavi  $X$ , ki je normaliziran glede na učinek, ugotovljen pri negativni

kontroli. Za preizkus Microtox smo vrednosti  $EC_{50}$  določili z uporabo programske opreme Microtox Omni®, za oceno dinamičnih podatkov iz testov alg in vrste *A. tonsa* pa s pomočjo programske opreme, ki jo je razvila univerza Danmarks Tekniske Universitet v kraju Lyngby (Christensen in sod. 2009).

Pri preizkušanju Tier II sta bila odstotek normalno razvitih ličink v testu s školjkami in razmerje med kopepoditov in skupnega števila ličink, prisotnih v vzorcu (LDR), uporabljena za izračun vrednosti  $EC_{50}$  z uporabo programske opreme univerze Danmarks Tekniske Universitet di Lyngby za analizo dinamičnih podatkov (Christensen in sod. 2009). Tako kot za teste Tier I se vrednost  $TU_{50}$ , če v nerazredčenem vzorcu ni doseženo 50 % zaviranje, izračuna po enačbi  $TU_{50} = Ex/50$ .

Pri preizkusih Tier III je bilo število jajčec, ki jih je izlegel vsak osebek vrste *Acartia*, izpostavljen izpirkom, ocenjeno po metodi ANOVA skupaj s Tukeyjevim t-testom, da bi tako ugotovili morebitne razlike med negativno kontrolo, neobdelanim lesom (UTW) in obdelavami za zaščito lesa.

Pred analizo podatkov iz testa Tier III smo normalno porazdelitev in enakost varianc preverili s Kolmogorov-Smirnovim in Levenovim testom. Ko enega od omenjenih pogojev ni bilo mogoče ugotoviti, smo podatke analizirali z neparametričnimi metodami, to je z metodo Kruskal-Wallis ANOVA in testom Mann-Whitney za primerjavo dveh neodvisnih vzorcev.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

---

#### 3.1 Tier I

---

Preizkuse TIER 1 smo opravili na neobdelanih vzorcih lesne vrste *P. abies* (untreated wood, UTW), termično obdelanih vzorcih (termically modified, TM) in vzorcih, obdelanih s Silvanolinom za morsko rabo (UC5), v različnih koncentracijah Cu in sicer:

- UC5<sub>(I)</sub> prva formulacija v visoki koncentraciji Cu;
- UC5<sub>(II)</sub> druga formulacija v visoki koncentraciji Cu s posebno obdelavo za omejitev sproščanja;
- UC5<sub>(III)</sub> dokončna formulacija za rabo UC5, kjer se les zaščiti z 1 % Cu raztopino;
- MAR formulacija, posebej razvita za namene tega projekta, na osnovi Cu v koncentraciji 0,25 %, ki predvide kasnejšo obdelavo lesa z oksalno kislino;
- LOW formulacija v nizki koncentraciji Cu, ki je enaka 0,033 % Cu v raztopini.

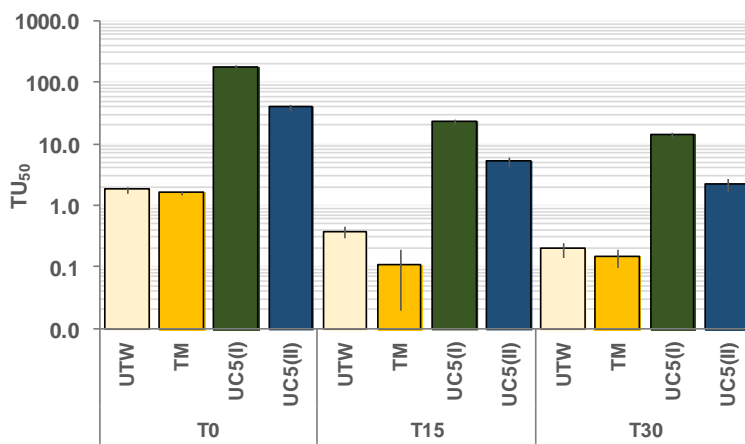
Prvi testi TIER I na UC5<sub>(I)</sub> in UC5<sub>(II)</sub> (v tem drugem primeru le za preizkus Microtox in rasti alg) so pokazali izredno visoko toksičnost teh pripravkov, izkazala se je tako potreba po spremembi formulacije za uporabo kategorije izdelkov UC5, da bi našli rešitev z manjšim vplivom na vodno okolje skladno s cilji ITS strategije.

Pri testih Microtox (slika 5) in rasti alg (slika 6) so se izpirki obdelanega lesa UC5<sub>(I)</sub> in UC5<sub>(II)</sub> v primerjavi z izpirki iz neobdelanega (UTW) in termično modificiranega lesa (TM)

izkazali za veliko bolj strupene. V testu z vrsto *A. tonsa*, predvsem pri T30 (slika 7), so bile ugotovljene manj izrazite razlike.

Test Microtox je pokazal zmanjšanje toksičnosti vseh izpirkov ob povečanju časa izpostavljenosti; TM je imela najmanjši vpliv na luminescenco bakterij, saj je pri vseh proučenih pogojih povzročila najnižje vrednosti  $TU_{50}$ , ki so bile rahlo nižje od UTW (slika 5).  $UC5_{(I)}$  in  $UC5_{(II)}$  pa sta vedno beležila za več kot en red večjo vrednost  $TU_{50}$ .

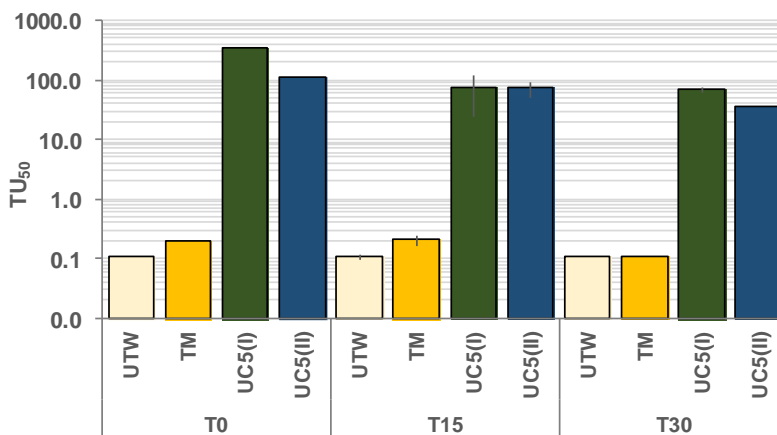
#### *Aliivibrio fischeri*



Slika 5. Strupenost izpirkov UTW, TM,  $UC5_{(I)}$  in  $UC5_{(II)}$  na *A. fischeri*. Stopnje napak predstavljajo 95 % meje zanesljivosti za POVPREČNO VREDNOST  $TU_{50}$  treh testnih replikacij.

Pri testu rasti alg vrste *P. tricornutum* so bili rezultati izpirkov iz vzorcev UTW in TM enaki tistim preizkusov z bakterijami, beleženi učinki pa so bili v vseh preizkušanih pogojih zanemarljivi (slika 6). Izpirki iz vzorcev  $UC5_{(I)}$  in  $UC5_{(II)}$  pa povzročajo visoko zaviranje stopnje rasti alg z manjšimi odstopanji ob podaljšanju časa izpostavljenosti.

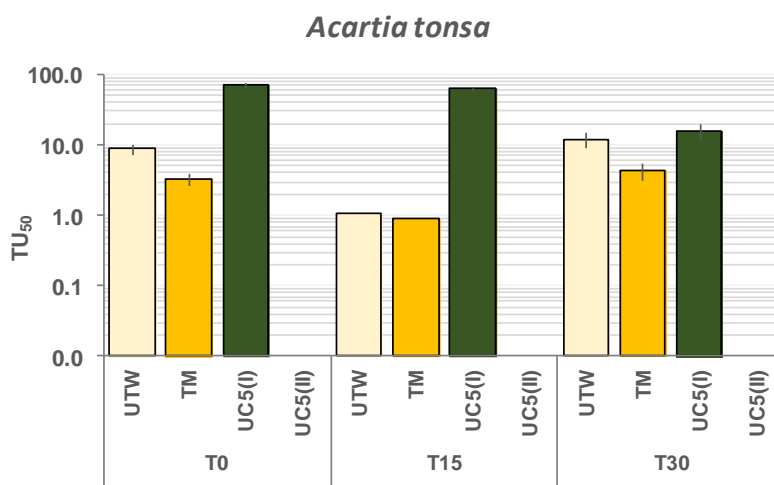
#### *Phaeodactylum tricornutum*



Slika 6. Strupenost izpirkov UTW, TM,  $UC5_{(I)}$  in  $UC5_{(II)}$  za *P. tricornutum*. Stopnje napak predstavljajo 95 % meje zanesljivosti za povprečno vrednost  $TU_{50}$  treh testnih replikacij.



Preizkus negibnosti *A. tonsa* (opravljen le na UTW, TM in UC5<sub>(I)</sub>) (slika 7) je pokazal visoko strupenost vseh obdelav na gibalno sposobnost ceponožcev. Pri tem je obdelava TM vedno pokazala rahlo manjšo strupenost od vrednosti UTW, obdelava UC5<sub>(I)</sub> pa je vedno imela večje strupene učinke. Učinki so veliko bolj izraziti pri T0 in T15, medtem ko je bila strupenost obdelave UC5<sub>(I)</sub> pri T30 rahlo nižja od UTW. UTW in TM sta pokazali trend strupenosti v obliki zvona, kar kaže na to, da je čas izpostavljenosti vplival na sproščanje snovi iz lesa.

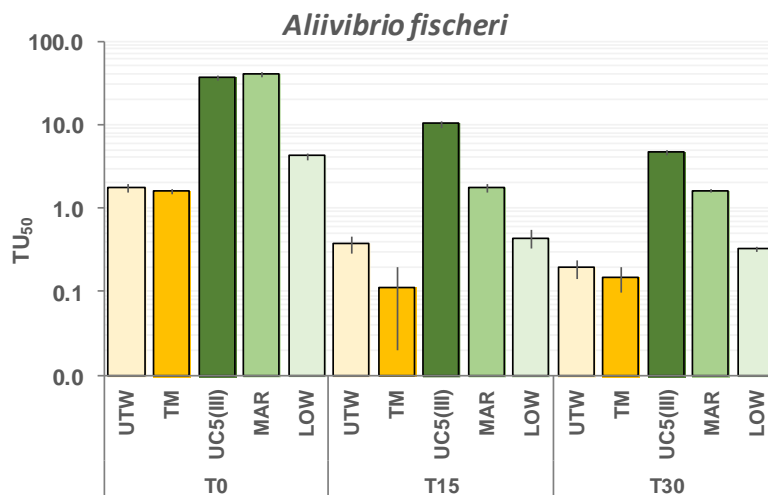


Slika 7. Strupenost izpirkov UTW, TM, UC5(I) in UC5(II) za *A. Tonsa*. Stopnje napak predstavljajo 95 % meje zanesljivosti za vrednost TU<sub>50</sub>, izračunano na podlagi podatkov o koncentraciji in učinku.

Iz rezultatov akutnih testov je bilo ugotovljeno, da obdelavi UC5<sub>(I)</sub> in UC5<sub>(II)</sub> nista primerni za rabo v morskem okolju zaradi znatno visoke strupenosti, tudi v primerjavi z UTW. Na podlagi navedenega smo predlagali pripravo obdelav z manjšo koncentracijo Cu, da se tako preveri dejansko strupenost in ugotovi, ali je le-ta »sprejemljiva«.

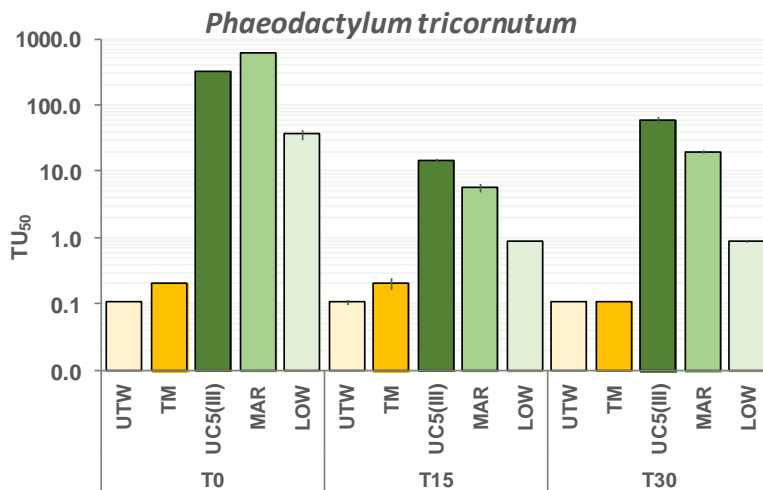
Na vzorcih, obdelanih z novimi formulacijami (UC5<sub>(III)</sub>, MAR in LOW), smo tako opravili dodatne preizkuse TIER I, da bi ocenili učinkovitost novih zaščitnih obdelav v primerjavi z UTW in TM. Podatki o UTW in TM, prikazani v spodnjih grafikonih, so enaki podatkom iz prejšnjih slik.

Kljub bistvenemu zmanjšanju učinkov v primerjavi z UC5<sub>(I)</sub> in UC5<sub>(II)</sub> je test na vrsti *A. fischeri* potrdil višjo toksičnost obdelav na osnovi Cu v primerjavi z UTW in TM. Daljši je čas izpostavljenosti, nižja je namreč strupenost vseh izpirkov. Samo pri obdelavi LOW namreč zmanjšanje učinkov privede do nastanka izpirka z nizko stopnjo toksičnosti (TU<sub>50</sub><1), ki je primerljiva z UTW in TM pri T15 in T30 (slika 8).



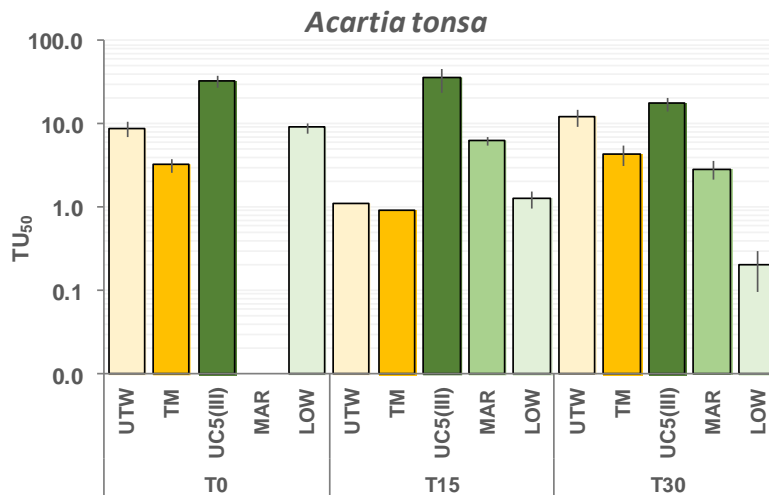
Slika 8. Strupenost izpirkov UC5(III), MAR in LOW za *A. fischeri*. Maje napak predstavljajo 95 % meje zanesljivosti za povprečno vrednost TU<sub>50</sub> treh testnih replikacij.

Test rasti alg v glavnem potrjuje ugotovljen trend za bakterije, in sicer da samo izpirki iz obdelave LOW imajo nizke toksične učinke (TU<sub>50</sub><1) pri T15 in T30. V primeru alg so sicer učinki LOW pripravka višji od tistih, beleženih pri UTW in TM; ugotavlja se pa znatno zmanjšanje toksičnih učinkov samo pri T0 in T15, medtem ko pri T15 in T30 ni bilo večjih sprememb (slika 9).



Slika 9. Strupenost izpirkov UC5(III), MAR in LOW na *P. tricornutum*. Le barre di errore predstavljajo 95 % meje zanesljivosti za povprečne vrednosti TU<sub>50</sub> treh testnih replikacij.

Pri testu negibnosti za *A. tonsa* je zaradi visoke strupenosti neobdelanega lesa (UTW) bilo ugotovljeno, da vse obdelave na osnovi Cu dosežejo po ustreznem času izpostavljenosti takšno stopnjo toksičnosti, ki je primerljiva (LOW pri T15, UC5(III) pri T30) ali celo nižja (MAR in LOW pri T30) od UTW (slika 10). Ta trend bi verjetno pripisali večji toleranci *A. tonsa* na Cu v primerjavi z drugimi kazalniki.

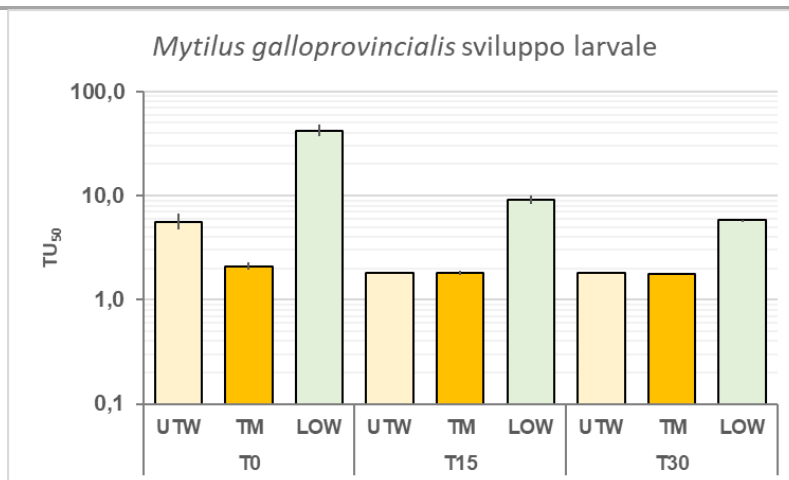


Slika 10. Strupenost izpirkov UC5(III), MAR in LOW za *A. tonsa*. Stropnje napak predstavljajo 95 % meje zanesljivosti za vrednost TU<sub>50</sub>, izračunano na podlagi podatkov o koncentraciji in učinku.

Na podlagi uvedenih kriterijev za postopek ITS za slano vodo sta se zaščitni obdelavi UC5(III) in MAR zaradi visoke akutne toksičnosti, nastale tudi po 30-dnevni izpostavljenosti, izkazali za neustrezni za morsko-obalno okolje pri vseh kazalnikih (v primeru UC5(III)) ali pri vsaj dveh kazalnikih (bakterije in alge v primeru raztopine MAR). Nasprotno, na podlagi rezultatov obdelavi TM in LOW nista pokazali nobenih akutnih učinkov oz. so bili le-ti primerljivi s tistimi za neobdelan les (UTW), zato sta primerni za oceno druge ravni.

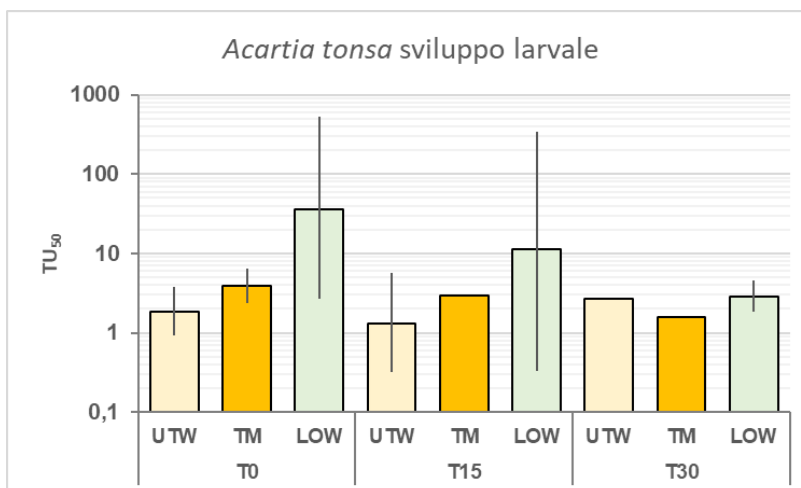
### 3.2 Tier II

Test razvoja ličink vrste *M.galloprovincialis* je pokazal, da je obdelava LOW bolj strupena od neobdelanega (UTW) in toplotno modificiranega lesa (TM), čeprav se je pri daljšem času izpostavljenosti v akvariju občutno zmanjšala stopnja toksičnosti izpirkov iz vzorcev, obdelanih z raztopino LOW (slika 11). Izpirki obdelave TM pa so se vedno izkazali za manj strupene ali enako strupene kot tisti iz UTW. Kljub navedenemu se tako pri UTW kot pri TM stopnja strupenosti zmanjša le med T0 in T15, med T15 in T30 pa so ugotovljene razlike majhne oz. zanemarljive.



Slika 11. Učinki izpirkov na razvoj ličink *Mytilus galloprovincialis*. Navedeni podatki predstavljajo povprečno vrednost TU<sub>50</sub>, izmerjeno na podlagi testnih replikacij. Stopnje napak predstavljajo 50 % meje zanesljivosti.

Test razvoja ličink (LDR) ceponožcev (slika 12) nakazuje večjo strupenost obdelave LOW v primerjavi z UTW in TM tako pri T0 (enosmerna ANOVA:  $F = 39,8$ ,  $p < 0.001$ ) kot pri T15 (enosmerna ANOVA:  $F = 39,8$ ,  $p < 0.001$ ), pri T30 pa so razlike med zaščitnimi obdelavami zanemarljive (enosmerna ANOVA:  $F = 2,28$ ,  $p = 0,183$ ). Izpostavljenost v akvariju je tako občutno zmanjšala toksičnost raztopine LOW na *A. tonsa*, pri UTW in TM pa so bile ugotovljene izredno majhne razlike.



Slika 12. Učinki izpirkov na razvoj ličink *Acartia tonsa*. Navedeni podatki predstavljajo povprečno vrednost TU<sub>50</sub>, izmerjeno na podlagi testnih replikacij. Stopnje napak predstavljajo 50 % meje zanesljivosti.

V zvezi s preizkusom razvoja ličink školjk bi manjšo stopnjo strupenosti izpirkov iz raztopine LOW lahko pripisali manjši občutljivosti vrste *A. tonsa* na Cu v primerjavi z *M. galloprovincialis*. 48-urna EC<sub>50</sub> za ličinke školjk običajno varira od  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  do  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (Beiras in Albentosa, 2004; Boukadida in sod., 2016), za ličinke vrste *A. tonsa* pa EC<sub>50</sub> znaša približno  $62 \mu\text{g L}^{-1}$ , medtem ko pod  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  ni opaziti bistvenih učinkov (UniVe, neobjavljeni podatki).

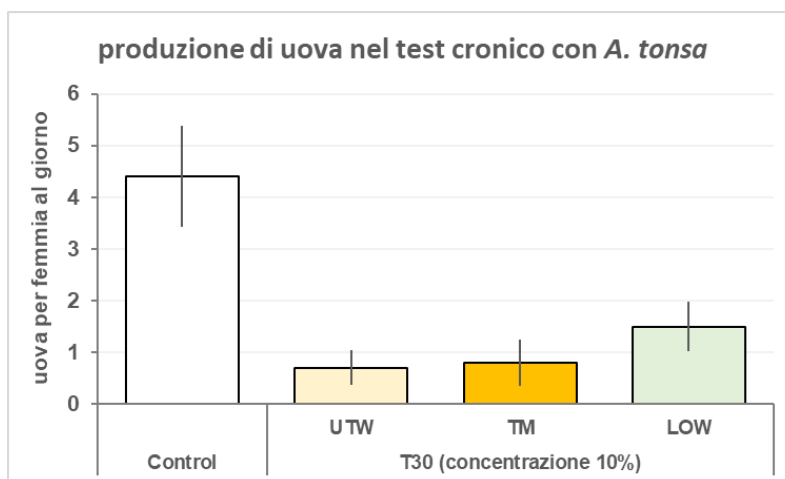
V luči rezultatov drugostopenjske ocene (TIER II) in ob upoštevanju, da merilo za prestajanje druge stopnje določa kot pogoj, da pri enem od dveh testov ni prišlo do pomembnih negativnih učinkov v primerjavi z UKW, sta bili obe zaščitni obdelavi TM in LOW primerni za nadaljevanje testa na tretjo fazo (Tier III).

### 3.3 Tier III

Iz rezultatov TIER II izhaja, da izpirki obdelanega in neobdelana lesa sicer lahko imajo strupene učinke na larvalno stopnjo, kot dokazujejo vrednosti  $TU_{50} > 1$ , izmerjene pri vseh testnih pogojih. Šele po 30-dnevni izpostavljenosti so negativni učinki obdelave LOW skoraj podobni izsledkom, ugotovljenim pri testih učinka UTW in TM na *A. tonsa*. Glede na občutljivost kroničnih testov TIER III in ugotovljeno strupenost izpirkov za larvalne stopnje je bila ocena tretje stopnje opravljena po naslednjem postopku:

1. ocenili smo le izpirke vzorcev, ki so bili v akvariju izpostavljeni 30 dni (T30);
2. proučili smo le 10 % koncentracijo izpirkov, to je najvišje razmerje redčenja od tistih, preizkušenih na stopnji TIER II, ki ni imelo negativnega toksičnega učinka pri vseh izpirkih, ocenjenih pri T30.

Ocena izleganja jajčec vrste *A. tonsa* (slika 13) je pokazala, da vsi izpirki povzročijo zmanjšanje sposobnosti izleganja jajčec v primerjavi s kontrolnikom, kar potrjuje dejstvo, da je tudi neobdelan les (UTW) v osnovi toksičen (enosmerna ANOVA:  $F = 8,07$ ,  $p < 0,001$ ). Med tremi izpirki pa ni bilo ugotovljenih večjih razlik.



Slika 13. Učinki izpirkov na izleganje jajčec *A. tonsa*. Navedeni podatki predstavljajo povprečje deset testnih replikacij. Stopnje napak predstavljajo standardno napako.

Preizkusov razvoja ličink in smrtnosti generacije F1 nismo opravili, ker so ceponožci, izpostavljeni 3 izpirkom, pokazali visoko stopnjo smrtnosti že dvanajsti dan po rojstvu, preživeli osebk pa niso izlegli dovolj jajčec za testiranje. Na podlagi navedenega potrjujemo osnovno toksičnost izpirkov.

Na podlagi rezultatov ocene tretje stopnje sta obdelavi TM in LOW po učinku na vodne indikatorje v celoti enaki neobdelanemu lesu. Sicer se izkaže potreba po vsaj 30-dnevem času izpostavitve pred uporabo izdelka, da se tako omeji obremenitev okolja, ki ga sicer povzroča tudi neobdelan les.

Po oceni ITS, predlagani v okviru tega projekta, sta obdelavi TM in LOW primerni za uporabo v morskem/brakičnem okolju, dolgotrajni učinki pa bi lahko nastali šele po daljši izpostavljenosti v statičnih pogojih in pri nezadostni izmenjavi vode.

#### 4 ZAKLJUČKI

Prvi testi TIER I na UC5<sup>(I)</sup> in UC5<sup>(II)</sup> so pokazali izredno visoko toksičnost teh pripravkov, izkazala se je tako potreba po spremembi formulacije obdelave z uporabo kategorije izdelkov UC5, da bi našli rešitev z manjšim vplivom na vodno okolje skladno s cilji ITS strategije.

Končno testiranje na novih formulacijah (UC5<sup>(III)</sup>, MAR in LOW) je pokazalo, da sta obdelavi UC5<sup>(III)</sup> in MAR glede na sprejete kriterije za ITS postopek ocenjevanja v slani vodi neustrezni za morsko-obalno okolje zaradi visoke akutne toksičnosti (TIER 1), nastale tudi po 30-dnevni izpostavljenosti, pri vseh (UC5<sup>(III)</sup>) ali pri vsaj dveh kazalnikih (MAR). Na podlagi rezultatov ocene prve stopnje TM in LOW nista pokazali nobenih akutnih učinkov oz. so bili le-ti primerljivi s tistimi za neobdelan les (UTW), zato sta obdelavi primerni za oceno druge stopnje (TIER II). V luči rezultatov drugostopenjske ocene (TIER II) in ob upoštevanju, da merilo za prestajanje druge stopnje določa kot pogoj, da pri enem od dveh testov ni prišlo do pomembnih negativnih učinkov v primerjavi z UKW, sta bili obe zaščitni obdelavi TM in LOW primerni za nadaljevanje testa na tretjo fazo (Tier III). Na podlagi rezultatov zadnje ocenjevalne stopnje sta bili predmetni obdelavi po učinku na vodne kazalnike v celoti enaki neobdelanemu lesu (UTW).

Po predlagani oceni ITS je bilo ugotovljeno, da sta obdelavi TM in LOW primerni za uporabo v morskem/brakičnem okolju, saj bi dolgotrajni učinki lahko nastali šele po daljši izpostavljenosti v statičnih pogojih in pri slabi izmenjavi vode.

Testiranje v zvezi s tremi časovnimi obdobji izpostavljenosti (0, 15 in 30 dni) je pa jasno pokazalo, da je treba pred uporabo materiala (obdelanega in neobdelanega) zagotoviti minimalni 30-dnevni čas izpostavljenosti, s čimer zajezimo vpliv na morsko-obalno okolje.

#### 5 LITERATURA

Adeleye A. S., Oranu E. A., Tao M., Keller A. A., 2016, Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint, *Water Research*, 102, 374-382.

Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria, *Aquaculture* 230, 205-213.

Boukadida, K., Banni, M., Gourves, P.Y., Cachot, J., 2016. High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase, *Mar. Environ. Res.* 122, 59-66.

Christensen, E.R.; Kusk, K.O.; Nyholm, N., 2008, Dose-response regressions for algal growth and similar continuous endpoints: Calculation of effective concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 826-835.

Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2007, Impact of Surface Water Conditions on Preservative Leaching and Aquatic Toxicity from Treated Wood Products, *Environmental Science Technology*, 41, 3781-3786.

Kannepalli S., Strom P. F., Krogmann U., Subroy V., Gimenez D., Miskewitz R., 2016, Characterization of wood mulch and leachate/runoff from three wood recycling facilities, *Journal of Environmental Management* 182, 421-428

Leduc F., Whalena J. K., Sunaharab G. I., 2008, Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to leachate from wood preservatives, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 219-2

Libralato G., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2007, Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (*Crassostrea gigas* and *Artemia franciscana*), *Journal of Hazardous Materials* 144, 590-593

MAV, 2013. Modalita' di utilizzo di legno o materiali alternativi per pali o strutture marittime in laguna di Venezia - Protocollo di intesa del 13.07.2011 tra Magistrato alle Acque di Venezia, la Soprintendenza per i Beni Architettonici e per il Paesaggio di Venezia e laguna e il Comune di Venezia - Manuale operativo contenente la procedura di ammissibilità in laguna di Venezia di materiali alternativi - Linee guida per le valutazioni chimiche ed ecotossicologiche. A cura di UniVe-DAIS, Dicembre 2013.

OECD - Organisation de Cooperation et de Development Economiques, 1999. Emission Scenariodocument for wood preservatives.

OECD - Organisation de Cooperation et de Development Economiques, 2007. Test n. 313: Estimation of Emission from Preservative - Treated Wood to the Environment: Laboratory Method for Wooden Commodities that are not Covered and are in Contact with Fresh Water or Sea Water. OECD 313.

Picone, M., Distefano, G.G., Marchetto, D., Russo, M., Baccichet, M., Brusò, L., Zangrando, R., Gambaro, A., Volpi Ghirardini, A. (2022). Long-term effects of neonicotinoids on reproduction and offspring development in the copepod *Acartia tonsa*, *Marine Environmental Research* 181, 105761.

Rex J., Dubé S., Krauskopf P., Berch S., 2016, Investigating Potential Toxicity of Leachate from Wood Chip Piles Generated by Roadside Biomass Operations, *Forests*.

Svensson H., Svensson B., Hogland W., Marques M., 2012, Acute Toxic Effects Caused by Leachate from Five Different Tree Species on *Artemia Salina* and *Vibrio Fischeri*, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 6, 214-220.

Svensson H., Jani Y., Hogland W., Marques M., 2014a, Particle size characterization of oak wood leachate: chemical oxygen demand and toxicity distribution within different fractions, *Water Science & Technology* 70.3

---

Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W., 2014b, Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas, *Water and Environment Journal*.

UNIVE-CVN, 2011, Valutazione di compatibilità ambientale di materiali da impiegarsi in ambiente marino-costiero e lagunare (Laguna di Venezia) mediante test di tossicità e analisi di bioaccumulo. A cura di UniVe-DAIS, Rapporto finale Febbraio 2011.

Wolf E. C., Rejmánková E., Cooper D. J., 2019, Wood chip soil amendments in restored wetlands affect plant growth by reducing compaction and increasing dissolved phenolics, *Restoration Ecology* 27, 1128-1136.

*Projekt, sofinanciran iz Evropskega sklada za regionalni razvoj v sklopu »Programa za sodelovanje Interreg V-A Italija-Slovenija 2014 - 2020«*

*Vsebina publikacije v nobenem pogledu ne izraža stališča Organa upravljanja »Programa sodelovanja Interreg V-A Italija-Slovenija 2014 - 2020«. Za vsebine so odgovorni avtorji.*



## ATTIVITÀ 14 / ACTIVITY 14

### Allegato 1. Analisi bibliografica relativa alle procedure di lisciviazione / Attachment 1. Bibliographic analysis related to leaching procedures

| Matrix  | Type of leaching fluid   | Wood treatment before leaching procedure  | Description of leaching procedure   | Post leaching procedure   | Reference   |
|---|--|---|---|---|---|
| Oak wood treated with commercial copper-based antifouling paint.  | Tap water, estuarine water, and seawater   | Wood was cut into 3 × 1 × 1 cm mini-bars and mini-bars were pre-treated and painted. Painted mini-bars were allowed to dry for 6 h, 24 h or 7 d, and then submerged in water. Each mini-bar was weighed before and after painting to determine mass of paint applied. | Wood mini-bars were submerged in 20mL of water and were kept in conditions simulating natural surface waters: cool white fluorescent lights (14:10 light:dark, 80–100 μmol/m <sup>2</sup> -s) at 20 °C with shaking (125 rpm). Release of Cu from wood and aluminum mini-bars was monitored as a time series for 180 d.   |   | Adeleye A. S., Oranu E. A., Tao M., Keller A. A., 2016, <i>Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint</i> , Water Research, 102, 374-382.  |
| Leachate from natural wood shavings from sawmill  | Rainwater  |   | Leachate was collected from within the heaps of wood shavings (Figure 1C) at five different points in the sawmill into a clean transparent 25 L plastic container to give homogenous mixture from the site.   | Sieved (0.7 mm sieve) to remove wood debris.  | Bakare A. A., Alimba C. G., Hassan T., Ajayi E. O., Sowunmi A. A., 2017, <i>Leachates biological characteristics and potential impacts on the environment</i> , Environmental research advances, 4.   |
| Blocks wood treated with Chromated Copper Arsenate (CCA)  | Synthetic Precipitation Leaching Procedure (SPLP) was used as the synthetic rainwater.   |   | The wood was cut into 2 × 2 in blocks and extracted for 18 hrs with SPLP solution (pH=4.2) using a large mechanical rotator.  | The resulting leachate was transferred to a pressure filtration apparatus and the solution was filtered through an acid-rinsed (20% HNO <sub>3</sub> ) filter (0.7 μm pore size). | Dagan R., Bitton G., Townsend T. G., 2006, <i>Metal Transport and Bioavailability in Soil Contaminated with CCA-Treated Wood Leachates</i> , Soil & Sediment Contamination, 15:1, 61-72.  |
| Blocks of southern yellow pine treated with alkaline copper quaternary (ACQ) and copper boron azole (CBA), along with chromated copper arsenate (CCA)- treated wood | Eight natural waters: two rivers, three lakes, two wetlands, and the Atlantic Ocean. Deionized water and moderately hard water | Blocks of approximately 80 g (average surface area 140-150 cm <sup>2</sup> ) were obtained by cutting pieces of treated dimensional lumber using a power saw. Sawdust samples were collected for each treated wood type for subsequent total Cu measurements.         | Immersion of the sample block (80 g block in this experiment) for 24 h within 1.6 L of leaching solution, resulting in a liquid to solid ratio (L/S) of 20:1.   |   | Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2007, <i>Impact of Surface Water Conditions on Preservative Leaching and Aquatic Toxicity from Treated Wood Products</i> , Environmental Science Technology, 41, 3781-3786.   |
| Leachate/runoff from wood recycling facilities  | Rainwater  |   | Samples of solid wood mulch and leachate/runoff were collected from three Class B wood recycling facilities in New Jersey over a 1.5 year period. A total of 26 leachate/runoff samples were collected either during or within 24 h of the occurrence of different rainfall events.   |   | Kannepalli S., Strom P. F., Krogmann U., Subroy V., Gimenez D., Miskewitz R., 2016, <i>Characterization of wood mulch and leachate/runoff from three wood recycling facilities</i> , Journal of Environmental Management 182, 421-428   |
| Leachate from wood pressure-treated with micronized copper azole  | Rainwater  | Two pieces of lumber (originally 8' × 3.5" × 1.5" in size) were acquired and cut into three sizes: large (5 × 8,9 × 3,8 cm), medium (5 × 5,8 × 3,8 cm), and small (5 × 3 × 3,8 cm). All samples were weighed, and their exact physical dimensions measured.           | Two Teflon straps (purchased from Industrial Netting), were affixed to each sample so that the samples could be secured in place over a rain-water runoff collection jar, thereby preventing sample soaking in accumulated rainwater. Samples were affixed such that the grain of the wood was perpendicular to incoming rainfall (top face exposed surface area 1 cm <sup>2</sup> ). |   | Lankone, R., Goodwin, D., Sung, L., Ruggiero, E., Vilsmeier, K., Mueller, P., Pulbere, S., Challis, K., Bi, Y., Westerhoff, P., Ranville, J., Fairbrother, D. and Wohlleben, W., 2019, <i>Evaluating performance, degradation, and release behavior of a nanoform pigmented coating after natural</i> |

| Matrix  | Type of leaching fluid             | Wood treatment before leaching procedure  | Description of leaching procedure  | Post leaching procedure   | Reference  |
|---|------------------------------------|---|--|---|--|
|   |                                    |   |  |   | and accelerated weathering, NanoImpact   |
| Wood spruce ( <i>Picea</i> sp.) treated with chromated copper arsenate (CCA) and alkaline copper quaternary (ACQ)   | Synthetic Rainwater                | <i>Picea</i> sp. lumber about 5 × 10 cm was treated for two weeks with ACQ or CCA following industry standards. The wood was shredded into small chips (about 0,2 × 0,2 × 0,2 cm) and approximately 0.6 kg of each wood type was placed into separate 20 L acid-washed glass containers.                                    | Synthetic rain water was added about 6 L to each container to achieve a mixture with 10% (w/v) of wood:synthetic rainwater. The mixture was stirred to inundate all wood chips and incubated at 20 °C for 4 days.  | Wood leachates were filtered (<0.2 µm under vacuum) and stored in acid-washed glass containers. | Leduc F., Whalena J. K., Sunaharab G. I., 2008, <i>Growth and reproduction of the earthworm Eisenia fetida after exposure to leachate from wood preservatives</i> , <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> 69, 219–226      |
| Natural wood: <i>Pouteria guianensis</i> , <i>Minguartia guianensis</i> , <i>Eschweilera</i> spp, <i>Quercus</i> spp, <i>Picea abies</i> .  | Aerated artificial sea water       | A predetermined ratio was maintained between wood block surface area (As) and water leaching solution volume (Vls), corresponding to the immersion of a wood block of 0.1m×0.1m×0.1m in 1 L of water (As/Vls = 0.6 cm <sup>-1</sup> ). The blocks were cut to the required dimensions (3 × 3 × 6,5 cm) with a circular saw. | The leaching procedure consisted of agitating the blocks fixed to a Jar Test at 60 rpm at 20 °C in a leaching medium consisting of aerated artificial sea water. The first cycle lasted 24 h, the leaching fluid was then completely renewed and the leaching procedure continued for a further 48 h (72 h cycle)  | pH values below 7.5 were corrected by adding NaOH 0.1M aliquots                                 | Libralato G., Losso C., Volpi Ghirardini A., 2007, <i>Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (Crassostrea gigas and Artemia franciscana)</i> , <i>Journal of Hazardous Materials</i> 144, 590–593    |
| Wood chips of <i>Pinus resinosa</i> treated with pentachlorophenol (CBA);   | Sodium hydroxide solution (pH 10). | Wood chips were made from circular slices of Pentachlorophenol-Treated out-of-service poles. The approximate dimensions of the wood chips is longitudinal x radial x tangential = 5 x 0.5 x 0.5 cm.   | A stock leachate solution was produced batchwise by recirculating a sodium hydroxide solution (pH 10) through a cylindrical plexiglass column (8.7 cm i.d. and 100 cm length) that was packed with PCP-treated wood chips. The pH of the leachate was controlled and the temperature was controlled at 90°C. The sodium hydroxide solution was recirculated for 48 h.  |   | Mollah A. H., Allen D. G., 1999, <i>Biodegradation and Detoxification of Wood Leachate from Pentachlorophenol-Treated Poles</i> , <i>The canadian journal of chemical engineering</i> 77.  |
| Blocks wood of <i>P. sylvestris</i> , <i>P. radiata</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , Southern yellow pine treated with furfurylation process. Reference with chromated copper arsenate (CCA).  | Demineralized water                | After treatment the boards were cut into samples with dimensions 0,15x0,25x0,50cm for EN84 and Internal leaching procedure and 0,15x0,70x1,5cm for OECD procedure.  | EN84: 10 water changes during 14 d in demineralized water with a water-over-wood volume equaling 5. Leaching water was collected after 1, 7, and 14 d. Internal leaching procedure: The specimens were submersed in demineralized water for 48 h with water changes and collection of leaching water after 0.5, 1, 6, 12, 24, and 48 h. OECD Guideline 313: recommended ratio (0.4 cm <sup>2</sup> /ml) between the surface of the wood and the amount of water. The submersion test was continued for 32 d with demineralized water, during which the water was replaced eight times at set intervals. The leachates were collected after 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22, and 32d. | pH values below 7.5 were corrected by adding NaOH 0.5M aliquots                                 | Pilgard A., Treu A., Zeeland V., Gosselink J. A., Westin M., 2010, <i>Toxic hazard and chemical analysis of leachates from furfurylated wood</i> , <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> 29, 1918–1924.                    |
| Blocks wood of <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus sylvestris</i> treated with three different furfurylation process. Untreated <i>P. sylvestris</i> and <i>P. radiata</i> sapwood were used as reference material. | Demineralized water                | Test specimens were larger than the standard recommendations and therefore have been cut at 0,15x0,70x1,5cm . The <i>P. radiata</i> material was planed prior to treatment, because the wood surface was suspected to have been treated with biocides (antisap-stain agents).   | OECD Guideline 313: recommended ratio (0.4 cm <sup>2</sup> /ml) between the surface of the wood and the amount of water. The submersion test was continued for 32 d with demineralized water, during which the water was replaced eight times at set intervals. The leachates were collected after 0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 15, 22, and 32d. The shower test: method was used to simulate rainfall. Every day, the specimens were sprayed with approximately 2 liters of freshwater over a time span of 1 h. This test was run for 2 weeks,  | pH values below 7.5 were corrected by adding NaOH 0.1M aliquots                                 | Pilgard A., Vetter L., Acker J.,z and Westin M., 2010b, <i>Toxic hazard of leachates from furfurylated wood: comparison between two different aquatic organisms</i> , <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> 29, 1067–1071. |

| Matrix  | Type of leaching fluid  | Wood treatment before leaching procedure  | Description of leaching procedure   | Post leaching procedure  | Reference   |
|---|---|---|---|--|---|
|   |   |   | and leachates were collected every day over a period of 10 d.   |  |   |
| Natural wood: <i>Populus tremuloides</i> , <i>Pinus contorta</i> , <i>Picea engelmannii</i> x <i>glauca</i> Parry, <i>Picea mariana</i> . As well as from two wood chipping sites using mixes of lodgepole pine and hybrid or black spruce. | 1) Natural weather conditions<br>2) deionized water<br>3) deionized water   |   | 1) Tree species common to the Prince George Forest District mixed in two open 322-L containers at environmental condition for 23 month; 2)The static exposure consisted of placing 2 kg of wood chips in a polypropylene 1-cm opening mesh bag in 18 L of water for 28 days at room temperature and ambient light (9:1 water:wood). 3)A portable rainfall simulator was used to generate a heavy rainfall event of approximately 100 mm x h <sup>-1</sup> .   |  | Rex J., Dubé S., Krauskopf P., Berch S., 2016, <i>Investigating Potential Toxicity of Leachate from Wood Chip Piles Generated by Roadside Biomass Operations</i> , Forests.   |
| Natural wood: birch ( <i>Betula sp.</i> ) and spruce ( <i>Picea abies</i> ) woodchip, and their mixture with washed gravel (WG).  | Tap water   |   | Pure organic and mixed filling materials were used in one-stage batch leaching tests with a liquid to solid ratio of 10 l·kg <sup>-1</sup> without size reduction. Using the calculated dry matter content of each material determined at the beginning, the equivalent mass of raw material (without any pre-treatment) was put into the 2l reagent bottles and filled with 1.6l of tap water. Reagent bottles were placed on the overhead shaker and mixed for 1–5 days at laboratory temperature with 5 RPM.   | One sample of each material was decanted, centrifuged, and filtered using membrane paper (4 µm) on a daily basis.  | Šereš Z., Došenović T., Šoronja-Simović D., Maravić N., Šaranović Z., Šereš L., Šćiban M., Djordjević M., 2019, <i>Modelling of cross-flow microfiltration coupled with bentonite treatment in sugar beet molasses purification</i> , The Canadian Journal of Chemical Engineering 97, 947-954. |
| Block of southern yellow pine treated with alkaline copper quaternary (ACQ), copper boron azole (CBA) and copper citrate (CC).  | 1) Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP) fluid<br>2) Synthetic Precipitation Leaching Procedure (SPLP) fluid,<br>3) deionized water, 4) synthetic seawater. | The samples used for the leaching analysis were cut into small blocks (2.5x5x10 cm) using a mill saw and then ground to particles less than 3 mm in diameter. | Treated wood samples were individually leached with four leaching fluids. Two liters of leaching fluids were combined with 100 g of ground wood (yielding a 1:20 solid/liquid ratio) in a glass container which was capped with a teflon-lined lid and placed on a rotary extractor for 18 ±2 hours.  | The recovered leachates were filtered using a pressurized filtration apparatus with a 0,7 0 µm glass fiber filter. | Stook K., Dubey B., Ward M., Townsend T., Bitton G., Solo-Gabriele H., 2004, <i>Heavy Metal Toxicity of Pressure Treated Wood Leachates with MetPLATE™</i> , Bulletin Environmental Contamination and Toxicology 73, 987–994.   |
| Block of southern yellow pine treated with preservatives included chromated copper arsenate (CCA), alkaline copper quaternary (ACQ), copper boron azole (CBA), copper citrate (CC), and copper dimethyldithiocarbamate .                    | 1) Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP) fluid<br>2) Synthetic Precipitation Leaching Procedure (SPLP) fluid,<br>3) deionized water, 4) synthetic seawater. | The samples used for the leaching analysis were cut into small blocks (2.5x5x10 cm) using a mill saw and then ground to particles less than 3 mm in diameter. | 1) A 100-g, size-reduced, representative wood sample was placed into a 2.2-L Teflon-lined glass container. Two liters of the TCLP extraction fluid was added and the mixture was rotated for 18 (2 h). Other leaching tests were performed in the same manner as the TCLP, with the exception of the leaching fluid. The synthetic precipitation leaching procedure contains nitric and sulfuric acid at a 40/60 weight ratio. The synthetic seawater extraction solution was prepared by dissolving 0.5 cups of Instant Ocean in 3.8-L of deionized water; the resulting salinity of the solution was 3.2 psu. | The leachate was filtered through a 0.7-µm glass fiber filter  | Stook K., Tolaymat T., Ward M., Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2005, <i>Relative Leaching and Aquatic Toxicity of Pressure-Treated Wood Products Using Batch Leaching Tests</i> , Environmental Science and Technology 39, 155-163.  |

| Matrix   | Type of leaching fluid                                     | Wood treatment before leaching procedure   | Description of leaching procedure  | Post leaching procedure   | Reference   |
|--|--|--|--|---|---|
| Natural Sawdust and bark from: Pedunculate oak ( <i>Quercus robur</i> ), Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), European larch ( <i>Larix decidua</i> ), Norway spruce ( <i>Picea abies</i> ) and European beech ( <i>Fagus sylvatica</i> )   | Distilled water  | The sawdust and the bark were obtained from sawmills located in Nybro, southern Sweden.  | The leachate was produced according to the batch leaching Standard Method SS-EN 12457-2, Due to the very high water absorbing capacity of sawdust, which makes very difficult to run a leaching test with the ratio 10:1, a liquid to solid (L/S) ratio (40:1) four times the one recommended (10:1) was used. Leachate from bark of oak, pine and spruce where produced according to the same batch test method mentioned above. However, in these cases, the recommended L/S ratio of 10:1 was used.                                     |   | Svensson H., Svensson B., Hogland W., Marques M., 2012, <i>Acute Toxic Effects Caused by Leachate from Five Different Tree Species on Artemia Salina and Vibro Fischeri</i> , Journal of Biobased Materials and Bioenergy 6, 214–220. |
| 1) water from pond that receives oak wood leachate generated due to log irrigation;<br>2) water from ditch that receives leachate generated due to rainfall contact with oak wood chip piles;<br>3) leachate generated via leaching test with oak sawdust under laboratory conditions. | 1) irrigation water;<br>2) rainfall;<br>3) Distilled water | Vacuum filtration: filter paper grade 005 (20 µm), Munktell 00R (10 µm), and Watchman GF/C (1.2 µm); Next, with Millipore stirred Cell Model 8400 ultra-filtration discs Millipore 100 kDa (approximately 13 nm), 10 kDa (approximately 5 nm) and 1 kDa (approximately 2 nm). After each filtration step, 50 mL of water was removed and used for chemical analyses. | The leachate was produced according to the batch leaching Standard Method SS-EN 12457-2, Due to the very high water absorbing capacity of sawdust, which makes very difficult to run a leaching test with the ratio 10:1, a liquid to solid (L/S) ratio (40:1) four times the one recommended (10:1) was used. Leachate from bark of oak, pine and spruce where produced according to the same batch test method mentioned above. However, in these cases, the recommended L/S ratio of 10:1 was used.                                     |   | Svensson H., Jani Y., Hogland W., Marques M., 2014, <i>Particle size characterization of oak wood leachate: chemical oxygen demand and toxicity distribution within different fractions</i> , Water Science & Technology 70.3         |
| Natural sawdust obtained from oak ( <i>Quercus robur</i> ), maple ( <i>Acer platanoides</i> ), pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), beech ( <i>Fagus sylvatica</i> ) and wood chips from oak and pine.  | Distilled water  | Sawdust is wood debris with particles size 4 mm. Wood chips are larger than 4 mm and produced using a chipper that grinds wood to sizes up to 10 cm in diameter. 9 mg of sieved sawdust (particles 4 mm) were used to estimate the moisture content in the wood residues. The sawdust was dried in an oven for 24 h at 105°C.  | The sawdust used in the leaching test was not dried in the oven, but the moisture content previously measured was taking into account for calculations purposes, as described in the Standard Method SS-EN 12457-2. Because of the very high absorption capacity of sawdust, the solid/liquid (S/L) ratio of 1 : 10 recommended by the Standard Method SS-EN 12457-2 after a preliminary trial was considered inappropriate, and S/L ratios of 1 : 20 (9 mg for 180 mL) and 1 : 40 (9 mg for 360 mL) were used instead in the batch tests. | The water phase was filtrated with a GF/C Whatman 0,45 µm microfiber filter   | Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W., 2014, <i>Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas</i> , Water and Environment Journal.                     |
| Natural chips wood of aspen ( <i>Populus tremuloides</i> )   | Dechlorinated tap water                                    | Five young healthy trees, ranging 28 to 64 years in age and 9.7 to 15.7 cm butt diameter (mean 13.6 cm), were cut at ground level with a chain saw. Trees were topped, limbed, and cut into 2.5-m (8-ft) lengths in the field and then reduced to chips (0.5 to 10 cm in length) with a commercial chipper.  | 50 kg fresh weight (about 28 kg dry weight) of aspen chips in 250 L of water in a 280-L vat lined with polyethylene. The ratio of aspen to water was thus 8.9:1 by dry mass at room temperature. Leaching continued for 35 d at room temperature and until chemical and physical characteristics ceased to show rapid changes.   | 0.45 mm microfiber filter   | Taylor B. R., Goudey J. S., Carmichael N. B., 1996, <i>Toxicity of aspen wood leachate to aquatic life: laboratory studies</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 15, 150–159.  |
| Leachate from natural woodpiles of trembling aspen ( <i>Populus tremuloides</i> )  | Rainwater or snowmelt                                      | The logs were transported to the field site, where they were stacked in two ranks, making a triangular logpile 5.5 m long and 1.5 m high. The logpile comprised 174 aspen logs with a total volume of 17.8 m <sup>3</sup> .  | A polyethylene tarpaulin beneath the logpile, supported around the perimeter by more logs, created a basin (depth, 40 cm) that captured any runoff from the logpile. Part of the bottom row of logs could be half-submerged when the catchbasin was full.  | Temperature of the air and leachate were measured and the specific conductance, pH, and dissolved oxygen tension of the leachate. | Taylor B. R., Carmichael N. B., 2003, <i>Toxicity and chemistry of aspen wood leachate to aquatic life: field study</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2048–2056.   |
| Natural wood with bark chipped from a mixture of conifer tree species including Abies concolor, <i>Pinus</i>   | Deionized water  |  | Separate batches of wood-only chips and bark-only chips of the same Sierra Nevada mixed conifer tree species were soaked in water to create wood and bark leachates. The wood and bark were oven dried and 1.75 kg each were   | The leachate liquids were poured through a 0.152-mm screen to remove solids prior to use as phytometer treatments.                | Wolf E. C., Rejmánková E., Cooper D. J., 2019, <i>Wood chip soil amendments in restored wetlands affect plant growth by reducing compaction and</i>   |

| Matrix  | Type of leaching fluid | Wood treatment before leaching procedure | Description of leaching procedure                         | Post leaching procedure | Reference  |
|---|------------------------|--|---|-------------------------|--|
| <i>lambertiana</i> , <i>Calocedrus decurrens</i> , <i>Pinus jeffreyi</i> , <i>Abies magnifica</i> , and <i>Pinus contorta</i> . |                        |  | separately submerged in 14 L DI water for 6 days at 20°C. |                         | increasing dissolved phenolics, Restoration Ecology 27, 1128–1136. |

**Allegato 2. Analisi bibliografica relativa alla caratterizzazione ecotossicologica e chimico-fisica dei lisciviati. / Attachment 2. Bibliographic analysis relating to the ecotoxicological and chemical-physical characterization of the leachates.**

| Matrix  | Type of test   | Test species  | Result Chemical test  | Result Ecotox test   | Reference   |
|---|--|---|---|--|---|
| Oak wood treated with commercial copper-based antifouling paint.  | Total Cu, dissolved Cu, nanosized Cu, bulk Cu.   |   | Cu <sub>2</sub> O particles in commercial antifouling paints may be released into natural waters during use. These released particles may include those that are nanoparticulate in size.   |  | Adeleye A. S., Oranu E. A., Tao M., Keller A. A., 2016, <i>Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint</i> , Water Research, 102, 374-382.  |
| Leachate from natural wood shavings from sawmill  | COD, BOD, dissolved oxygen (DO), conductivity, chloride, sulphate, nitrate, pH, temperature, lignin and tannin, heavy metals: Pb, Cd, As, Cr Cu.   | <i>C. gariepinus</i> , Sub-Lethal Concentrations and Micronucleus Analysis. | The concentrations of some of the SWL constituents were above permissible NESREA and USEPA limits   | Leachate induced a time dependent acute toxicity and concentration-dependent significant increase in the frequencies of micronucleated peripheral erythrocytes and nuclear abnormalities in <i>C. gariepinus</i> .   | Bakare A. A., Alimba C. G., Hassan T., Ajayi E. O., Sowunmi A. A., 2017, <i>Leachates biological treatment, toxicological characteristics and potential impacts on the environment</i> , Environmental Research Advances, 4.          |
| Blocks wood treated with Chromated Copper Arsenate (CCA)  | Metal Analysis, ecotoxicological test  | <i>Ceriodaphnia dubia</i> , MetPLATE™, <i>Selenastrum capricornutum</i>     | Arsenic has the highest concentration compared to the other two metals in all three types of soil. It appears, however, to have greater mobility in the sandy soil.   | Despite the presence of copper, chromium and arsenic in elutriates collected from all three soil types, no toxicity was observed in any of the fractions collected from these columns.   | Dagan R., Bitton G., Townsend T. G., 2006, <i>Metal Transport and Bioavailability in Soil Contaminated with CCA-Treated Wood Leachates</i> , Soil & Sediment Contamination, 15:1, 61-72.  |
| Blocks of southern yellow pine (SYP) treated with alkaline copper quaternary (ACQ) and copper boron azole (CBA), along with chromated copper arsenate (CCA)- treated wood | pH, total dissolved solids (TDS), alkalinity, hardness, chloride, total organic carbon (TOC), chemical oxygen demand (COD), turbidity (in NTU). Cu, As, Cr, B concentrations, labile Cu. | MetPLATE  | Results show that ACQ- and CBA-treated wood leach approximately 10 and 20 times more total Cu relative to CCA-treated wood and that the presence of organic and inorganic ligands in natural waters lowered the labile fraction of Cu relative to that from laboratory generated leaching solutions.  | Lower toxicity was observed with <b>seawater</b> samples for each wood type compared with the other leachates. In general, among the other nine leachates for each wood treatment, toxicity followed the pattern CBA > ACQ > CCA. For all three treated wood leachates, the highest toxicity was observed from the DI leachate. This coincides with the relatively high labile copper concentrations associated with DI water. | Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2007, <i>Impact of Surface Water Conditions on Preservative Leaching and Aquatic Toxicity from Treated Wood Products</i> , Environmental Science Technology, 41, 3781-3786.       |
| Leachate/runoff from wood recycling facilities  | pH, BOD, COD, TSS, settleable solids, total Kjeldahl nitrogen (TKN), total phosphate-phosphorus (TP), tannin/lignin/phenolic (T/L/P) compounds, fecal coliforms, ecotoxicological test.  | <i>D. rerio</i>   | BOD, COD, and TSS concentrations were comparable to those of untreated domestic wastewater (raw sewage), although both lower and higher individual values were observed. TKN, TP and fecal coliform values were usually slightly lower than is typical for untreated domestic wastewater. BOD, COD, TSS, TKN, and TP median values were all much higher than for typical urban stormwater runoff, while fecal coliform levels were lower. | The developmental effects observed were yolk sac edema, abnormal spine curvature, kink tail, and delay in development. Only delay in development regularly occurred at lower concentrations. little acute toxicity other than the one case attributable to low pH was observed in the mulch leachate/runoff samples, and no correlation was found between delayed development and T/L/P.                                       | Kannepalli S., Strom P. F., Krogmann U., Subroy V., Gimenez D., Miskewitz R., 2016, <i>Characterization of wood mulch and leachate/runoff from three wood recycling facilities</i> , Journal of Environmental Management 182, 421-428 |

| Matrix   | Type of test  | Test species  | Result Chemical test   | Result Ecotox test  | Reference  |
|--|---|---|--|---|--|
| Wood spruce ( <i>Picea</i> sp.) treated with chromated copper arsenate (CCA) and alkaline copper quaternary (ACQ)  | Metal concentration with ICP-OES system, ecotoxicological test  | <i>E. fetida</i>  |  | We found that earthworm tissue concentrations of 80 mg As kg <sup>-1</sup> , 89 mg Cr kg <sup>-1</sup> and 90 mg Cu kg <sup>-1</sup> were not lethal to <i>E. fetida</i> . There was Cu bioaccumulation in <i>E. fetida</i> exposed to soil contaminated with a single metal (Cu from ACQ-treated wood), but Cu was less bioavailable in alkaline than neutral soil conditions. Exposure to Cu alone did not affect <i>E. fetida</i> growth or reproduction, but exposure to multiple metals (As, Cr and Cu from CCA-treated wood) produced soil-specific growth and reproduction outcomes. | Leduc F., Whalena J. K., Sunaharab G. I., 2008, <i>Growth and reproduction of the earthworm Eisenia fetida after exposure to leachate from wood preservatives</i> , <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> 69, 219–226      |
| Natural wood: <i>Pouteria guianensis</i> , <i>Minuartia guianensis</i> , <i>Eschweilera</i> spp, <i>Quercus</i> spp, <i>Picea abies</i> .  | pH values 3, 24 and 72 h, Dissolved oxygen (DO), chemical oxygen demand (COD), ecotoxicological test.   | <i>Artemia franciscana</i> , <i>Crassostrea gigas</i>     |  | Leachate toxicities showed that AB<MM≈RO<AC<PA at 24 h and AB≈AC≈MM≈RO< PA at 72 h. From 24 to 72 h, toxic effects were reduced by more than 50% for all samples except for PA.   | Libralato G., Losso C., Ghirardini A. V., 2007, <i>Toxicity of untreated wood leachates towards two saltwater organisms (Crassostrea gigas and Artemia franciscana)</i> , <i>Journal of Hazardous Materials</i> 144, 590–593       |
| Wood chips of <i>Pinus resinosa</i> treated with pentachlorophenol;  | PCP concentration, chloride ion   | <i>Daphnia magna</i>                                      | Complete degradation of PCP was also achieved in the cases for 120 mg PCP/L and a 12 h cycle time or 50 mg PCP/L and a 6 h cycle time  | <i>Daphnia magna</i> toxicity tests showed that the presence of PCP in leachate caused toxicity, and the biodegradation of PCP resulted in significantly reducing the effluent toxicity to a value similar to that of PCP-free nutrient solution.   | Mollah A. H., Allen D. G., 1999, <i>Biodegradation and Detoxification of Wood Leachate from Pentachlorophenol-Treated Poles</i> , <i>The Canadian Journal of Chemical Engineering</i> 77.  |
| Blocks wood of <i>P. sylvestris</i> , <i>P. radiata</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>F. excelsior</i> , Southern yellow pine treated with furfurylation process. Reference with chromated copper arsenate (CCA).                       | Furan compound analysis, Maleic acid analysis, Ecotoxicological test                                    | <i>Daphnia magna</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | The present study shows that the difference in toxicity most likely cannot be attributed to maleic acid, furan, furfural, furfuryl alcohol, or 2-furoic acid. However, the difference could be caused by the two substances 5-hydroxymethylfurfural and 2,5-furandimethanol.             | The leachates from furfurylated wood have low toxicity. Earlier studies have shown that leachates from wood treated with furfuryl alcohol prepolymers have higher toxicity to <i>Vibrio fischeri</i> than leachates from wood treated with furfuryl alcohol monomers.   | Pilgard A., Vetter L., Acker J.,z and Westin M., 2010b, <i>Toxic hazard of leachates from furfurylated wood: comparison between two different aquatic organisms</i> , <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> 29, 1067–1071. |
| Blocks wood of <i>Pinus radiata</i> , <i>Pinus sylvestris</i> treated with three different furfurylation process. Untreated <i>P. sylvestris</i> and <i>P. radiata</i> sapwood were used as reference material.                      | Ecotoxicological test   | <i>Daphnia magna</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) |  | The results from the toxicity tests show that the bacteria were more sensitive than <i>D. magna</i> to furfurylated wood leachates. These results indicate that, with general furfurylated wood, leachates are not more toxic than untreated wood leachates, the only exception being <i>P. radiata</i> treated with treatment A.   | Pilgard A., Vetter L., Acker J.,z and Westin M., 2010b, <i>Toxic hazard of leachates from furfurylated wood: comparison between two different aquatic organisms</i> , <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> 29, 1067–1071. |
| Natural wood: <i>Populus tremuloides</i> , <i>Pinus contorta</i> , <i>Picea engelmannii x glauca</i> Parry, <i>Picea mariana</i> . As well as from two wood chipping sites using mixes of lodgepole pine and hybrid or black spruce. | pH, True Color, Total Organic Carbon, Chemical Oxygen Demand, Ammonium, Resin Acids, Phenols, Microtox. | <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)                        | Aspen chips produced the most acidic leachate with higher organic, phenolic, and ammonia concentrations compared to the coniferous and mixed samples. Coniferous samples showed some subtle differences with the spruce samples being more similar to each other than they were to pine. | All samples collected during the 580 days of exposure produced a toxic response within the 15 minute test period; all leachate samples exhibited a consistent toxicity response over the 4-week period, with each toxic sample at concentrations below 10% by volume. There was no significant difference in leachate toxicity between dry and wet exposure within tree species or between tree species. The dry chip Muldowan 18 leachate samples required a higher concentration to induce toxicity than the wet sample and all other samples.  | Rex J., Dubé S., Krauskopf P., Berch S., 2016, <i>Investigating Potential Toxicity of Leachate from Wood Chip Piles Generated by Roadside Biomass Operations</i> , <i>Forests</i> .  |

| Matrix   | Type of test   | Test species   | Result Chemical test   | Result Ecotox test   | Reference   |
|--|--|--|--|--|---|
| Natural wood: birch ( <i>Betula sp</i> ) and spruce ( <i>Picea abies</i> ) woodchip, and their mixture with washed gravel (WG).  | total organic carbon, dissolved organic carbon, phenol index.                                | <i>Daphnia magna</i> , <i>D. subspicatus</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | Statistical analysis of the data showed no significant influence of the leaching period on the quality of effluent represented by concentrations of FNI, TOC, DOC and an inhibitory effect on aquatic organisms. The type of filling medium resulted in significantly different levels of the leachate quality, in terms of TOC, DOC and FNI. The pure organic material (BWCH and SWCH) resulted in a significantly higher concentration of FNI and organic carbon as well as higher inhibition of the tested aquatic organisms. |  | Šereš Z., Došenović T., Šoronja-Simović D., Maravić N., Šaranović Z., Šereš L., Šćiban M., Djordjević M., 2019, <i>Modelling of cross-flow microfiltration coupled with bentonite treatment in sugar beet molasses purification</i> , The Canadian Journal of Chemical Engineering 97, 947-954. |
| Block of southern yellow pine treated with alkaline copper quaternary, copper boron azole and copper citrate.  |  | MetPLATE   |  | Leachate from untrated southern yellow pine were found to be no-toxic to the MetPLATE test bacteria. The toxicity was greatest for CCA-treated wood. Higher EC50 values were calculated in the second part of the experience using larger wooden blocks.   | Stook K., Dubey B., Ward M., Townsend T., Bitton G., Solo-Gabriele H., 2004, <i>Heavy Metal Toxicity of Pressure Treated Wood Leachates with MetPLATE™</i> , Bulletin Environmental Contamination and Toxicology 73, 987–994.   |
| Block of southern yellow pine treated with preservatives included chromated copper arsenate, alkaline copper quaternary, copper boron azole, copper citrate, and copper dimethyldithiocarbamate.   | Arsenic, chromium, and copper  | <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Raphidocelis subcapitata</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)       | CCA-treated wood leached greater concentrations of arsenic and copper relative to chromium, with copper leaching more with the TCLP and synthetic seawater. Copper leached at greater concentrations from the arsenic-free preservatives relative to CCA.  | All of the arsenic free alternatives displayed a greater degree of aquatic toxicity compared to CCA. Invertebrate and algal assays were more sensitive than Microtox.  | Stook K., Tolaymat T., Ward M., Dubey B., Townsend T., Solo-Gabriele H., Bitton G., 2005, <i>Relative Leaching and Aquatic Toxicity of Pressure-Treated Wood Products Using Batch Leaching Tests</i> , Environmental Science and Technology 39, 155-163.  |
| Natural Sawdust and bark from: Pedunculate oak ( <i>Quercus robur</i> ), Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), European larch ( <i>Larix decidua</i> ), Norway spruce ( <i>Picea abies</i> ) and European beech ( <i>Fagus sylvatica</i> )   | pH, TOC, phenolic compounds (reported as total poly-phenols)                                 | <i>Artemia salina</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)   | The pH varied from very acid (for oak sawdust leachate pH 4.0) to neutral (for spruce sawdust leachate pH 7.2). Similar to TOC, within the same species, the phenols content was also significantly higher ( $p < 005$ ) in bark than in sawdust regardless the tree species tested (oak, pine and spruce).  | Microtox® test is more sensitive to all tested waters than the crustacean <i>A. salina</i> . Regarding <i>V. fischeri</i> , two of the tested sawdust leachates (pine and oak) and all three tested bark leachates (spruce, pine and bark) were highly toxic while minor toxic effects was observed for the leachate from other species (spruce, beech and larch sawdust). | Svensson H., Svensson B., Hogland W., Marques M., 2012, <i>Acute Toxic Effects Caused by Leachate from Five Different Tree Species on Artemia Salina and Vibrio Fischeri</i> , Journal of Biobased Materials and Bioenergy 6, 214–220.  |
| 1) water from pond that receives oak wood leachate generated due to log irrigation;<br>2) water from ditch that receives leachate generated due to rainfall contact with oak wood chip piles;<br>3) leachate generated via leaching test with oak sawdust under laboratory conditions. | pH, COD, total content of polyphenols (PP), ecotoxicological test                            | <i>Artemia salina</i> , <i>L. sativa</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)                          | 50% of the COD found in the samples collected in the field is in the 100 kDa fraction while only 10% of the COD is removed from the same water fraction after filtration of the laboratory leachate. The 100 kDa filter removes the largest amount of PP found in the field samples, while the amount of PP in the laboratory leachate is more evenly distributed along the fractions.   | Only FSP 2 and LAB-L were toxic to <i>A. salina</i> and <i>V. fischeri</i> . No sample had a toxic effect on <i>L. sativa</i> germination. The toxic effect drops significantly for wood chips after the 100 kDa (over to) filter in both Microtox and Artemia tests, whereas the drop is not that significant for leachate water.   | Svensson H., Jani Y., Hogland W., Marques M., 2014, <i>Particle size characterization of oak wood leachate: chemical oxygen demand and toxicity distribution within different fractions</i> , Water Science & Technology 70.3   |
| Natural sawdust obtained from oak ( <i>Quercus robur</i> ), maple ( <i>Acer platanoides</i> ), pine ( <i>Pinus sylvestris</i> ), beech ( <i>Fagus sylvatica</i> ) and  | DOC, pH, conductivity, colour, phenols, tannins and lignin, biochemical oxygen demand (BOD). |  | The oak chips batch test released DOC up to 312 h of contact time when equilibrium was apparently reached. Based on sawdust leaching tests obtained from maple, oak, pine and beech, the organic compounds measured as DOC were mainly released during the first 24 h and the additional DOC release remains for up to 216 h of contact time. For pine sawdust, the DOC released was   |  | Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W., 2014, <i>Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas</i> , Water and Environment Journal.   |



| Matrix  | Type of test  | Test species   | Result Chemical test  | Result Ecotox test  | Reference   |
|---|---|--|---|---|---|
| wood chips from oak and pine.   |   |  | six times higher than that released from pine wood chips. For oak sawdust, the DOC released was 16 times higher than for oak wood chips. The pH range ranged from 4.1 (oak) to 6.8 (maple). Oak leachate color was found to be 8.7 and 15.2 times the color measured for pine, respectively. BOD7 / DOC ranged from 12 to 28% of the COD. Concentrations of phenol range from 12 to 77 mg / L. Unlike the total leaching of DOC per unit of dry matter, the DOC concentration (mg / L) in the aqueous phase is influenced by the S / L ratio. The DOC concentration in the leachate after a batch test decreased to approximately 40% after the second wash compared to unwashed sawdust. |   |   |
|   | Microtox, conductance, pH, DO, and absorbance (465 nm), 5-day BOD, COD, color, resin and fatty acids, nitrogen, total phenols, total organic carbon | <i>Daphnia magna</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | The analyzes revealed an amber color, low pH (4.0), extremely high BOD (0.2.600 mg / L) and high conductivity (1140 mS / cm). The leachate was rich in phenols (30 mg / l), organic carbon (2,480 mg / l) and organic nitrogen (13 mg / l).   | Median acutely toxic concentrations of leachate were consistently 1 to 2% of full strength for trout and <i>Daphnia</i> . Inhibition of bacterial metabolism began at concentrations below 0.3%. Leachate was less toxic to plant life but inhibited algal growth at concentrations of 12 to 16%.                           | Taylor B. R., Goudey J. S., Carmichael N. B., 1996, <i>Toxicity of aspen wood leachate to aquatic life: laboratory studies</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 15, 150–159.                            |
| Leachate from natural woodpiles of trembling aspen ( <i>Populus tremuloides</i> )   | pH, conductivity Color, BOD, COD, Phenols, TOC, Toxicity index  | <i>Daphnia magna</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) | Aspen leachate was characterized by dark color, acid pH (5.0–6.5), high conductivity (200–500 mS / cm), high to very high BOD (500–5,000 mg / L) and concentrations of TOC (500–2,000 mg / L), varying levels of phenolic compounds (2–27 mg / L) and low dissolved oxygen voltages (.2 mg / L).  | The leachate varied from weakly toxic (mean EC50 or LC50 . 10%) to very toxic (mean EC50 or LC50 , 1%). Leachate was produced in every season for two years and was chemically and toxicologically similar to that produced from wood chips in the laboratory (see Taylor, 1996)  | Taylor B. R., Carmichael N. B., 2003, <i>Toxicity and chemistry of aspen wood leachate to aquatic life: field study</i> , Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2048–2056.                                 |
| Natural wood with bark chipped from a mixture of conifer tree species including <i>Abies concolor</i> , <i>Pinus lambertiana</i> , <i>Calocedrus decurrens</i> , <i>Pinus jeffreyi</i> , <i>Abies magnifica</i> , and <i>Pinus contorta</i> . | Growth test, phenolics concentration  | <i>Scirpus microcarpus</i>   |   | Leachate of mixed conifer bark contains approximately 20 times higher phenolics concentration than similarly prepared wood-only leachate. High levels of phenolics (211 mg/L) inhibited <i>S. microcarpus</i> growth; this growth inhibition was more pronounced in nutrient-limited conditions and in smaller individuals. | Wolf E. C., Rejmánková E., Cooper D. J., 2019, Wood chip soil amendments in restored wetlands affect plant growth by reducing compaction and increasing dissolved phenolics, Restoration Ecology 27, 1128–1136. |

### Allegato 3: Analisi chimiche dei campioni di lisciviato. / Attachment 3: Chemical analyses of leachate samples.

Di seguito vengono riportate le analisi chimiche effettuate da Agri.Te.Co. Sono riportati solo i valori relativi al rame in quanto per le altre sostanze analizzate (Etanolamina, Polifenoli e Terpeni) non risulta essere presente una quantità rilevante. / Below are reported the chemical analyzes carried out by Agri.Te.Co. Below are the chemical analyzes carried out by Agri.Te.Co. Only the values relating to copper are reported as the other substances analyzed (Ethanolamine, Polyphenols and Terpenes) do not appear to be present in a significant quantity.

| Sample    | Parameter | MU     | Value   |       |
|-----------|-----------|--------|---------|-------|
| UTW       | t0        | Copper | µg/L Cu | 3,88  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 15,5  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 11    |
| TM        | t0        | Copper | µg/L Cu | 44    |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 14,7  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 16,7  |
| S. LOW    | t0        | Copper | µg/L Cu | 1054  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 244   |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 116,8 |
| S. MARINE | t0        | Copper | µg/L Cu | 6190  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 1044  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 660   |
| S. UC5    | t0        | Copper | µg/L Cu | 9600  |
|           | t1        | Copper | µg/L Cu | 2270  |
|           | t2        | Copper | µg/L Cu | 2070  |