

Interreg



ITALIA-SLOVENIJA



DuraSoft

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

Valutazione dell'effetto inibitorio di materiali legnosi modificati o trattati sullo sviluppo del biofilm microbico

Versione: N. 1

WP di riferimento: WP3.3.3 ATT17

Partner Responsabile: PP3 - OGS

Autori: Tamara Cibic, Vanessa Natali

Data: 19/08/2022



1
Data: 19/08/2022

WP3.3 ATT17
Versione n.1

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	3
1.1	DISEGNO SPERIMENTALE.....	3
2	CAMPIONAMENTO E TIPOLOGIA DI ANALISI.....	4
3	RISULTATI.....	6
4	CONCLUSIONI.....	19

ACRONIMI

SILV: impregnante Silvanolin
CCB: impregnante rame-cromo-boro
TerMo: termicamente modificato
CuE: concentrazione di rame
T1: dopo 6 giorni
T2: dopo 20 giorni
T3: dopo 40 giorni
LCSM: Microscopia confocale a scansione laser
SEM: Microscopio elettronico a scansione
AR: abbondanza relativa

SOMMARIO

Questa attività progettuale ha lo scopo di valutare l'effetto inibitorio sullo sviluppo del biofilm microbico di materiali legnosi modificati o trattati con: 1. impregnanti di nuova generazione (Silvanolin); 2. prodotti già presenti sul mercato (CCB, rame-cromo-boro); 3. il legno termicamente modificato per aumentarne la durevolezza. A questo fine, provini di abete bianco e abete rosso opportunamente trattati sono stati immersi in due siti della laguna di Grado soggetti a diverso idrodinamismo e recuperati dopo 6, 20 e 40 giorni per testare gli effetti a breve, medio e lungo periodo sulla densità e composizione della comunità microalgale mediante diverse tecniche microscopiche. Inoltre, laddove presente, sono state stimate anche l'abbondanza e la composizione del primo stadio del macrofouling animale. I risultati hanno evidenziato l'importanza dell'idrodinamismo dell'area: il minor idrodinamismo ha accelerato il processo di colonizzazione sia del biofilm microalgale che del macrofouling animale, a prescindere dalla tipologia di trattamento applicato. In entrambe le aree, in condizioni idrodinamiche differenti, solo i trattamenti con Silvanolin hanno ostacolato l'attecchimento di diversi taxa animali portando ad un'esigua diversità animale; ciononostante, in condizioni di basso idrodinamismo, questo non ha impedito alle poche specie presenti di raggiungere una notevole abbondanza, fino ad un totale ricoprimento dei provini. Inoltre, gli impregnanti testati hanno indotto una serie di modificazioni alla comunità microalgale; rispetto al controllo sono state osservate diatomee di dimensioni inferiori, con frustuli malformati e strategie di vita che li permettono di contrastare l'effetto tossico indotto dalle sostanze contenute negli impregnanti.

1 INTRODUZIONE

Questa attività progettuale ha lo scopo di indagare il possibile effetto inibitorio prodotto da diversi trattamenti sullo sviluppo del biofilm microbico su materiali lignei selezionati: abete bianco e abete rosso. Il biofilm si forma in seguito alla colonizzazione di un substrato solido immerso in acqua marina o lagunare da parte di diversi microrganismi microscopici, soprattutto batteri e diatomee. Uno stadio maturo di biofilm favorisce l'attecchimento di organismi animali, ovvero il macrofouling, che rappresenta uno dei maggiori problemi delle strutture di legno immerse nell'ambiente marino. A tal fine, gli effetti dei diversi trattamenti sulla formazione del biofilm microbico sono stati valutati a breve, medio e lungo termine mediante sperimentazioni svolte in due aree della laguna di Grado soggette a differenti condizioni idrodinamiche.

1.1 DISEGNO SPERIMENTALE

La prima parte dell'esperimento è stata condotta *in situ*, nella laguna di Grado, selezionando due diversi siti per il posizionamento dei provini di legno, mentre le successive analisi sono state condotte nei laboratori dell'Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale - OGS.

Per questa sperimentazione è stato utilizzato il legno di due conifere: *Abies alba* (abete bianco) e *Picea abies* (abete rosso). Da questi legni selezionati sono stati preparati i provini nel formato 7.6 cm x 2.6 cm x 0.5 cm dal partner progettuale Silvaproduct che ha anche provveduto alla preparazione dei trattamenti chimici e fisici, in modo da ottenere due repliche per ciascun tipo di legno e trattamento:

- impregnazione con Silvanolin (rame etanoloammia) a due diverse concentrazioni (CuE = 1% e CuE = 0.25%),
- impregnazione con CCB (Cu/Cr/B), anch'esso alle stesse due concentrazioni,
- con modificazione termica,
- non trattati (come riferimento).

I provini di legno sono stati montati su apposite strutture chiamati collettori (vedi Fig. 1.1) e tenuti in acqua sempre alla stessa altezza (50 cm dal pelo dell'acqua, a prescindere dall'escursione di marea) mediante un sistema di boe di ancoraggio. In totale sono stati allestiti 24 collettori: i primi 12 sono stati posizionati nell'area "Schiusa" caratterizzata da elevato idrodinamismo, mentre i rimanenti 12 sono stati posizionati nell'area "Approdo" caratterizzata da condizioni idrodinamiche relativamente tranquille. In totale, sono stati immersi 144 provini, 72 per ciascuna area, 12 per ciascun tempo sperimentale (Fig.1.1).

Gli effetti dei diversi trattamenti sulla formazione del biofilm microbico sono stati valutati a breve (T1: 6 giorni), medio (T2: 20 giorni) e lungo termine (T3: 40 giorni).

Rispetto al piano sperimentale inizialmente previsto, si è dovuto abbreviare i tempi sperimentali perché nel periodo estivo, quando è stato condotto l'esperimento, il macrofouling ha preso velocemente il sopravvento, non permettendo così di analizzare il biofilm al T2 nell'area "Approdo" e al T3 in entrambe le aree. Per questa ragione, per i campioni di questi tempi sperimentali è stata eseguita un'analisi qualitativa e quantitativa della comunità animale sviluppatasi sui provini.

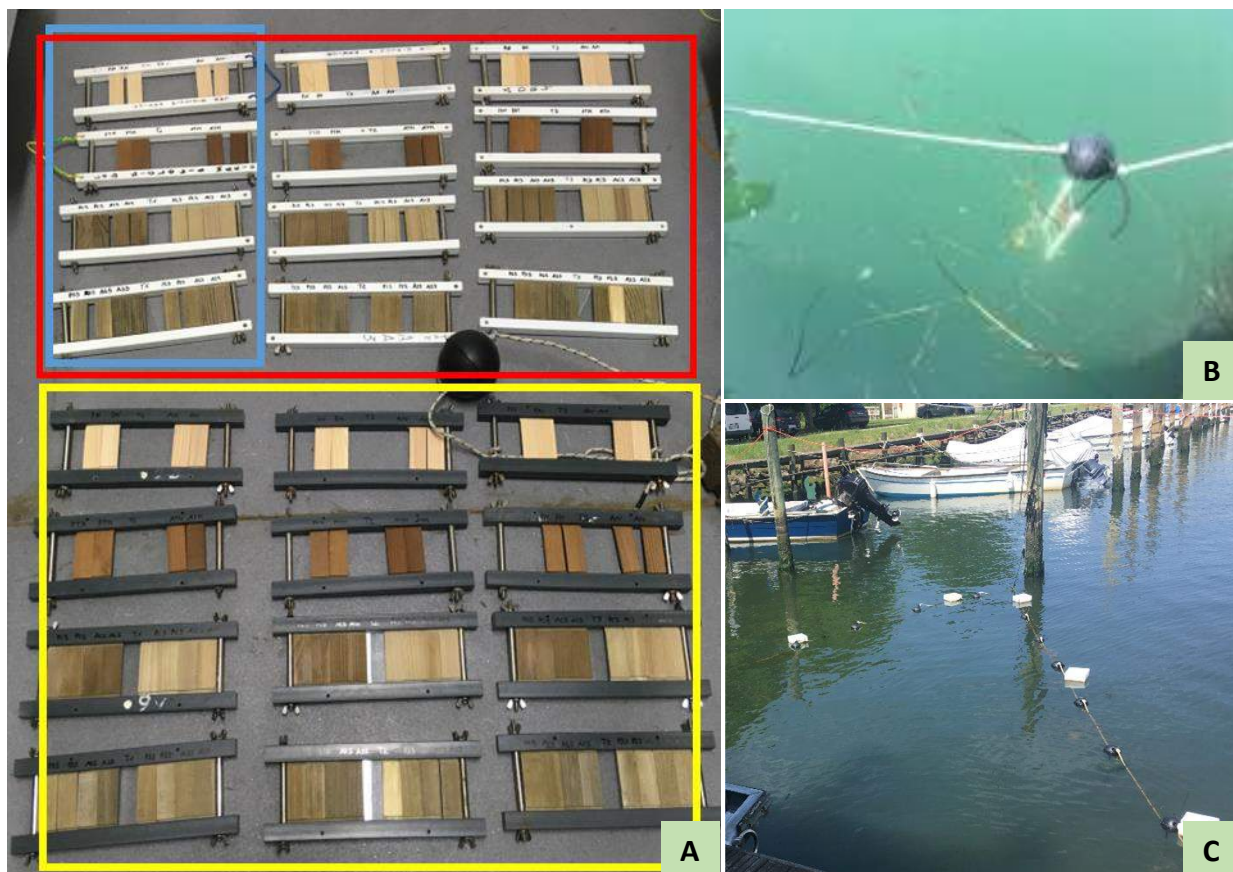


Figura 1.1 Serie di collettori divisi per area: 12 immersi nell'area "Schiusa" (B), evidenziati nel riquadro rosso (A) e 12 immersi nell'area "Approdo" (C) riquadro giallo (A). Per ciascuna area 4 collettori per ogni tempo sperimentale (vedi riquadro blu, A), ogni collettore racchiudeva le repliche di ciascun trattamento (Silvanolin, CCB, modificato termicamente, naturale).

2 CAMPIONAMENTO E TIPOLOGIA DI ANALISI

L'esperimento ha avuto inizio il 9 Giugno 2021, con il posizionamento di tutti i collettori, le relative boe di galleggiamento e le zavorre, nell'area "Schiusa" e area "Approdo" (Fig. 2.1 A-B).

Il successivo recupero dei collettori è avvenuto nei seguenti tempi sperimentali:

- T1 (15 Giugno): prelevati 48 provini di legno da entrambe le aree dopo 6 giorni
- T2 (29 Giugno): prelevati 48 provini di legno da entrambe le aree dopo 20 giorni
- T3 (19 Luglio): prelevati 48 provini di legno da entrambe le aree dopo 40 giorni

I provini di legno recuperati sono stati fissati in formaldeide pre-filtrata e neutralizzata (concentrazione finale al 4%), e successivamente in laboratorio risciacquati dalla formaldeide e conservati a -20°C.

Le analisi del biofilm microbico sui provini di legno sono state effettuate mediante l'impiego di differenti tecniche di microscopia. L'inibizione dello sviluppo della comunità microalgale durante i primi stadi di crescita del biofilm è stata testata utilizzando la microscopia confocale che permette la visualizzazione in 3D dello

spessore del biofilm e la sua composizione. Questo tipo di indagine consente di ottenere solo delle stime qualitative, considerando la limitata estensione dell'area che può essere osservata rispetto all'area del provino. La stima quantitativa della densità della comunità microalgale è stata ottenuta utilizzando la microscopia ottica. Si è proceduto a rimuovere meccanicamente una frazione di biofilm (2 cm², circa 1/10 dell'intera area del provino di legno) mediante grattaggio e l'aliquota ottenuta, opportunamente diluita, è stata osservata al microscopio ottico invertito (ingrandimento finale 320x) per il riconoscimento delle microalghe adoperando le specifiche chiavi tassonomiche. Inoltre, una stima puntuale della copertura dei provini e della dimensione delle cellule microalgali adese è stata ottenuta mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Integrando i risultati ottenuti mediante diverse tecniche microscopiche è stato possibile valutare gli effetti dei diversi trattamenti sull'abbondanza e la composizione della comunità microbica presente nel biofilm.

Sui provini, per i quali non è stato possibile analizzare la composizione del biofilm perché già colonizzati dal fouling, è stata invece effettuata un'analisi quali-quantitativa del macrofouling animale. Quest'ulteriore indagine è stata svolta esclusivamente sui provini del legno *Abies alba* relativi alle seguenti aree e tempi sperimentali: area Approdo al T2 e T3, area Schiusa al T3. Sono stati analizzati entrambi i lati dei provini (2 repliche per provino).



Figura 2.1 Area di studio nella laguna di Grado-Marano (A), dettaglio dei due siti selezionati per l'esperimento (B): 1 - "area Schiusa" e 2 - "area Approdo".

3 RISULTATI

Nelle tavole fotografiche (Fig. 3.1) si può osservare macroscopicamente la colonizzazione graduale degli organismi, dalla fase di biofilm dopo 6 giorni, a quella di fouling più strutturato, avvenuta nell'arco di 40 giorni.

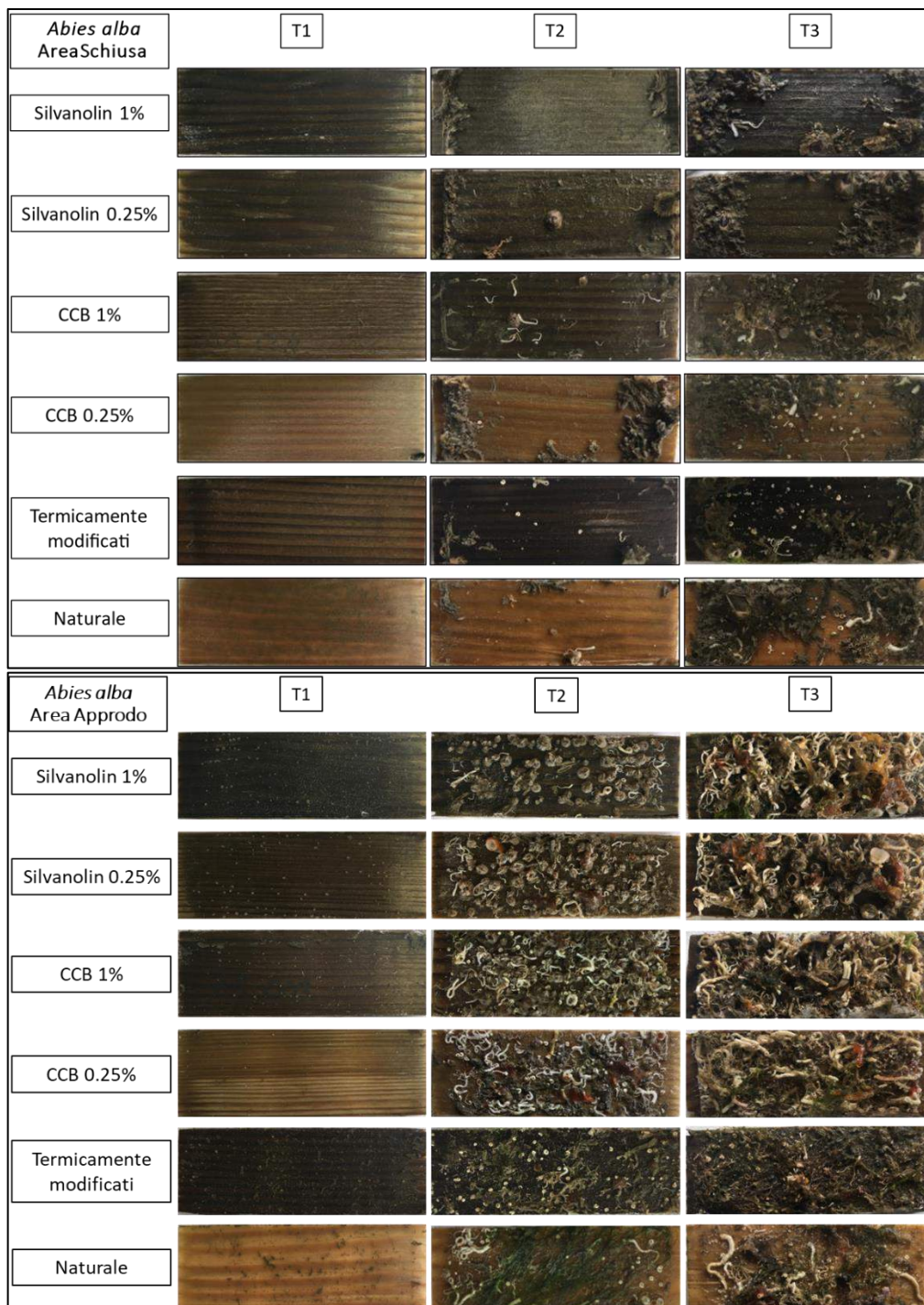


Figura 3.1 Tavole di foto dei diversi provini di legno (*Abies alba*) recuperati nella laguna di Grado ai diversi tempi sperimentali.

Già da questo primo confronto si può evincere una differenza rilevante tra le aree. Infatti, nell'area Approdo, caratterizzata da un minor idrodinamismo, il macrofouling ricopriva quasi tutta la superficie del provino di legno già al T2 (dopo 20 giorni), mentre nell'area Schiusa il maggior idrodinamismo ha rallentato sia il processo di formazione del biofilm che di colonizzazione degli organismi animali (Fig. 3.1).

Questi risultati sono corroborati dalla densità microalgale presente sui diversi provini di legno, stimata mediante conteggio in microscopia ottica, che hanno nuovamente evidenziato la differenza tra le due aree. In generale, le abbondanze cellulari osservate nell'area Approdo sono state fino a un ordine di grandezza maggiori rispetto all'area Schiusa, dove l'attecchimento è stato ostacolato dalle correnti più intense (Fig. 3.2 A-C).

Al T1, nell'area Schiusa l'effetto inibente degli impregnanti è stato maggiore, ciò si è notato soprattutto dalla minor abbondanza cellulare stimata sui provini di legno trattati con CCB 1% e CCB 0.25% (Fig. 3.2 A). Tuttavia, anche i provini di legno trattati con Silvanolin 1% e Silvanolin 0.25% hanno presentato un effetto inibente per lo sviluppo microalgale rispetto a quello naturale. Ciò si può chiaramente evincere dalle analisi effettuate al microscopio confocale (LCSM) e al microscopio a scansione elettronica (SEM) (Fig.3.3). Infatti, pochissime cellule sono state osservate sulla superficie dei campioni trattati con Silvanolin e CCB rispetto al campione naturale, sul quale invece è stata riscontrata una maggior densità cellulare e cellule di dimensioni maggiori (Fig 3.3 a-d). Tuttavia, i valori di abbondanza cellulare sul provino trattato con Silvanolin 1% sono stati 7-8 volte maggiori rispetto a quello trattato con CCB 1%. Inoltre, un'abbondanza paragonabile a quella sul provino trattato con l'impregnante Silvanolin si è riscontrata anche sul legno termicamente modificato.

Invece, al T1 nell'area Approdo è stata osservata un'abbondanza cellulare maggiore in tutti i provini di legno rispetto all'area Schiusa (Fig. 3.2 A,B), verosimilmente ascrivibile al minor idrodinamismo, il quale porta ad una maggiore proliferazione microalgale. L'abbondanza microalgale sul provino con il trattamento termico è stata paragonabile a quella osservata sul provino naturale. Inoltre, rispetto a questi ultimi due, i provini di legno trattati con gli impregnanti hanno presentato abbondanze minori, come si può notare dalle acquisizioni effettuate al LSCM e al SEM (Fig.3.4). I valori di abbondanza cellulare sui provini di legno trattati con Silvanolin 1% sono stati fino a 33 volte inferiori rispetto a quelli stimati sui provini di legno naturale mentre quelli trattati con CCB 0.25% sono stati fino a 25 volte inferiori rispetto ai provini di riferimento. Inoltre, alcune cellule microalgali osservate sia al microscopio ottico che al SEM, hanno presentato frequenti danneggiamenti cellulari: apici piegati o altre malformazioni del frustulo siliceo delle diatomee, come si può osservare nella Fig.3.4 b. In aggiunta, è interessante notare che sul provino di legno *Abies alba* con CCB 1% (Fig.3.2 B) il valore di densità cellulare è stato particolarmente elevato rispetto agli altri trattamenti, in un certo senso anticipando il pattern osservato nell'area Schiusa al T2 (Fig.3.2 C).

Nell'area Schiusa al T2 si è notata una situazione completamente diversa rispetto a quella registrata nella stessa area al T1, ovvero le maggiori densità cellulari sono state riscontrate sui provini trattati con gli impregnanti, in particolare su *Abies alba* trattato con CCB 1% e Silvanolin 0.25% (Fig. 3.2 C). Si può ipotizzare che nell'arco di 20 giorni sia stato parzialmente diluito l'impregnante presente sui provini ad opera dalle correnti marine, che hanno favorito l'allontanamento dell'eccesso dei metalli pesanti, diminuendo così il suo potere inibente. Parallelamente, la degradazione di etanolamina, presente nel Silvanolin, in ione ammonio e altri composti azotati, mediata dai batteri (vedi risultati dell'Attività 16), e analogamente di altre sostanze organiche presenti in questi impregnanti, ha favorito la proliferazione microalgale. Solo a concentrazioni maggiori di Silvanolin 1% i livelli di metalli pesanti presenti sul provino hanno presumibilmente contrastato l'effetto stimolante dei nutrienti inorganici rilasciati dai provini. È interessante notare che le densità cellulari nel biofilm sviluppatosi sui provini trattati con Silvanolin 1% sono state paragonabili a quelle sui provini di legno naturale che, tra tutti i trattamenti indagati, ha comunque presentato la minor abbondanza microalgale.

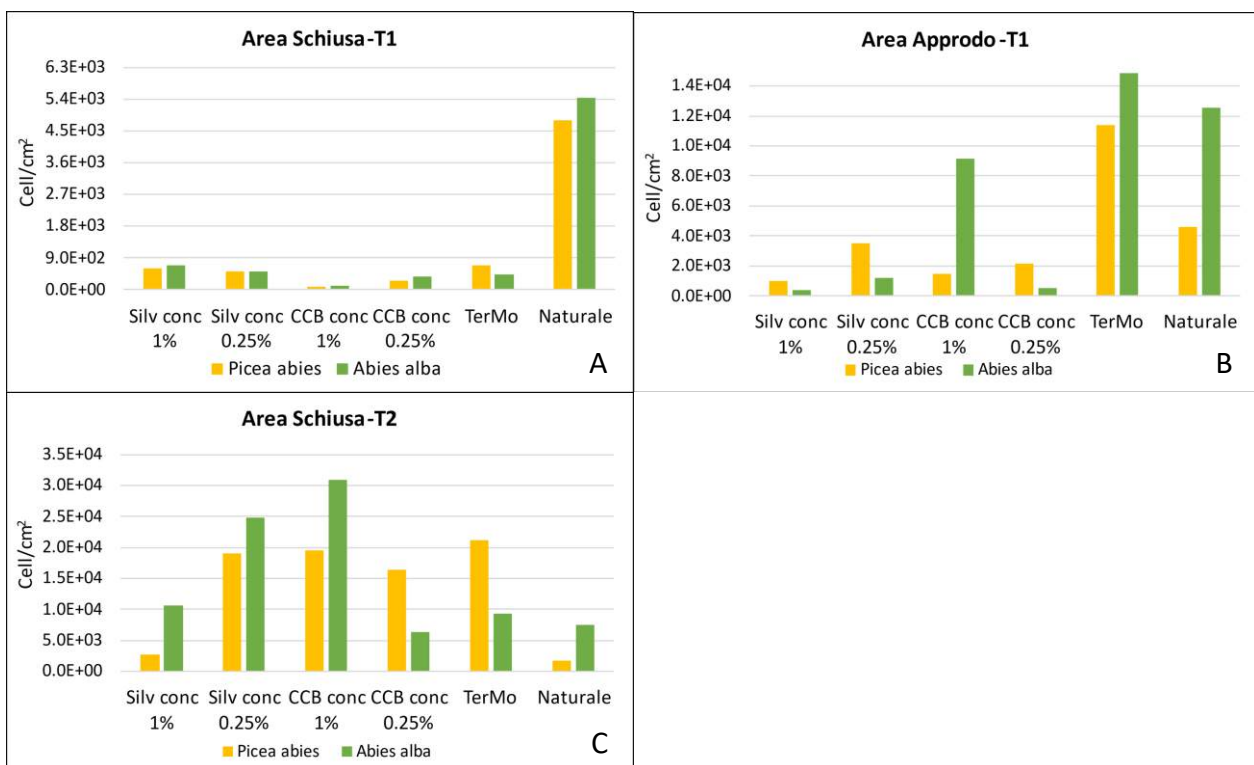
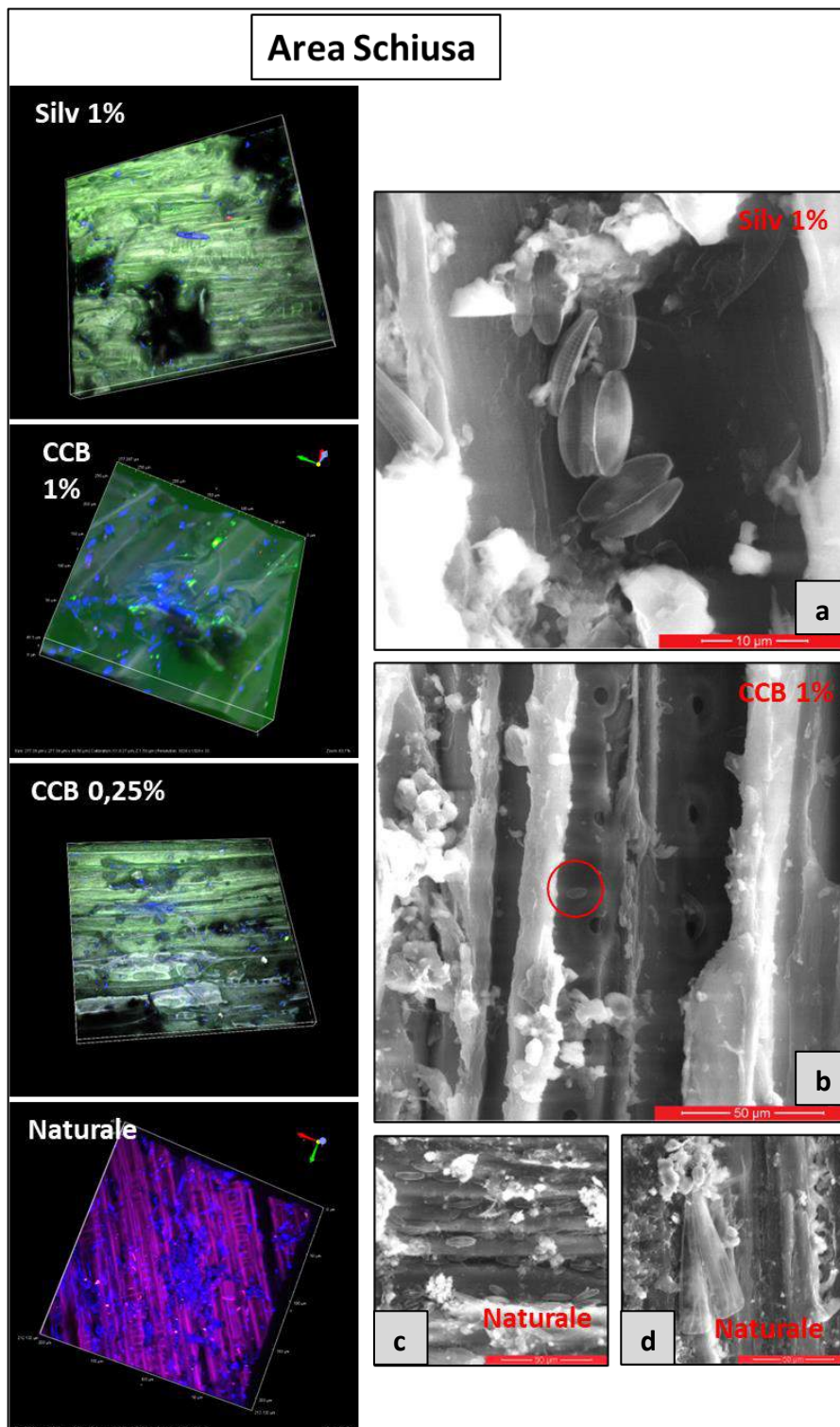


Figura 3.2 Abbondanze totali della comunità microalgale presente sui diversi provini di legno nell'area "Schiusa" (A) e nell'area "Approdo" (B) al T1, e al T2 nell'area "Schiusa" (C).

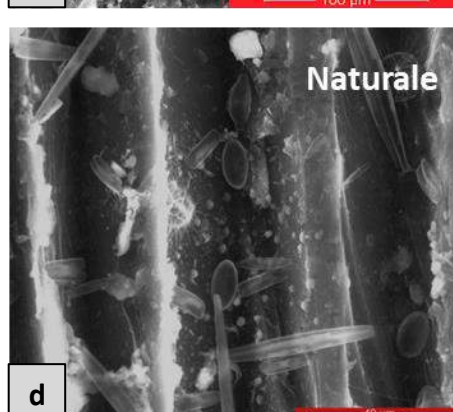
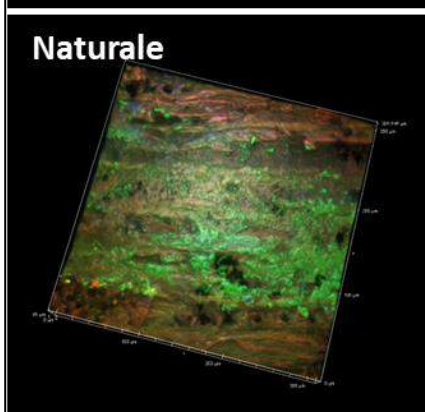
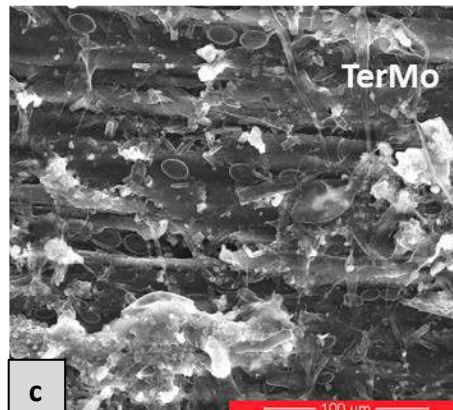
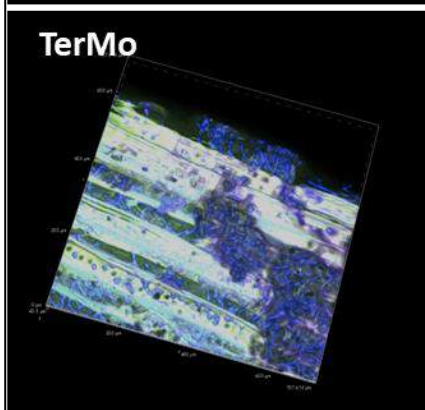
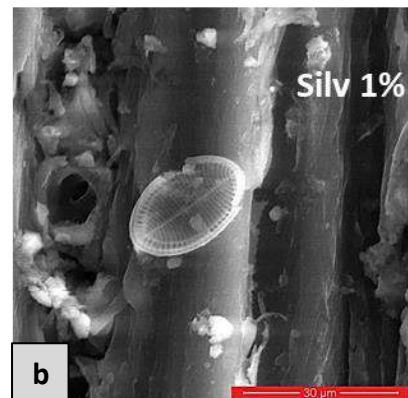
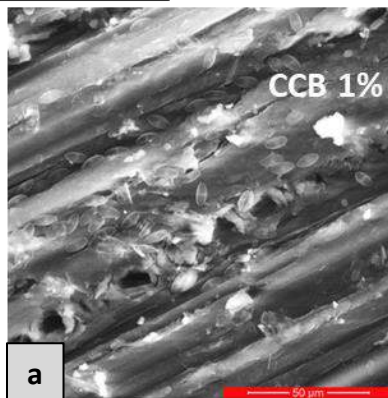
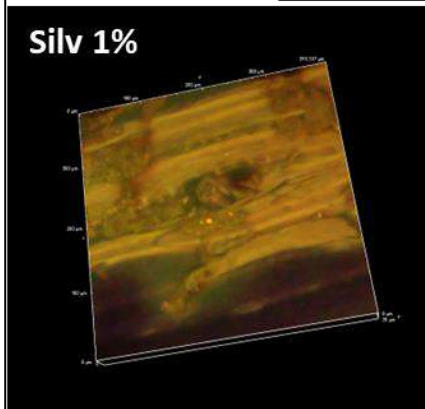
Figura 3.3 Immagini acquisite mediante microscopia confocale a scansione laser (LSCM, le cellule microalgali hanno una colorazione blu) e microscopia elettronica a scansione di alcuni provini di legno recuperati



nell'area "Schiusa" nella laguna di Grado al T1. Le immagini LSCM rappresentano un'area di circa $300 \mu\text{m}^2$ del provino di legno. Le dimensioni della scala nelle immagini SEM sono le seguenti: $10 \mu\text{m}$ (a), $50 \mu\text{m}$ (b-d).

Figura 3.4 Immagini acquisite mediante microscopia confocale a scansione laser (LSCM, le cellule microalgali hanno una colorazione blu o verde) e microscopia elettronica a scansione (SEM) di alcuni provini di legno recuperati nell'area "Approdo" nella laguna di Grado al T1. Le immagini LSCM rappresentano un'area di

Area Approdo



circa 400 μm^2 (Silv 1%), 700 μm^2 (TerMo) e 300 μm^2 (naturale) del provino di legno. Le dimensioni della scala delle immagini SEM sono le seguenti: 50 μm (a), 30 μm (b), 100 μm (c), 40 μm (d).

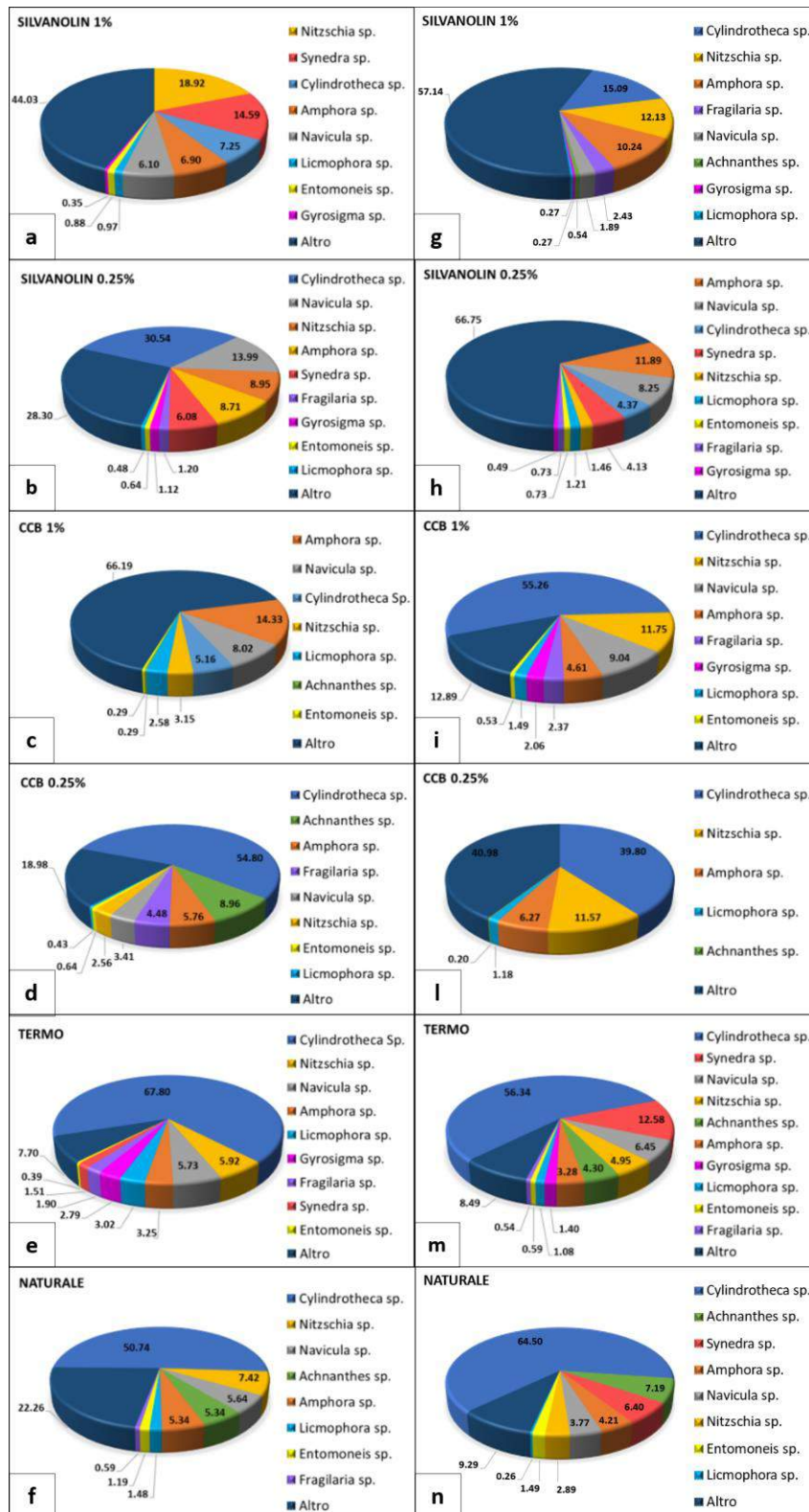


Figura 3.5 Grafici a torta delle abbondanze relative dei generi della comunità microalgale al T1, presenti sui provini di legno *Picea abies* (a-f) e di *Abies alba* (g-n), nell'area "Approdo".

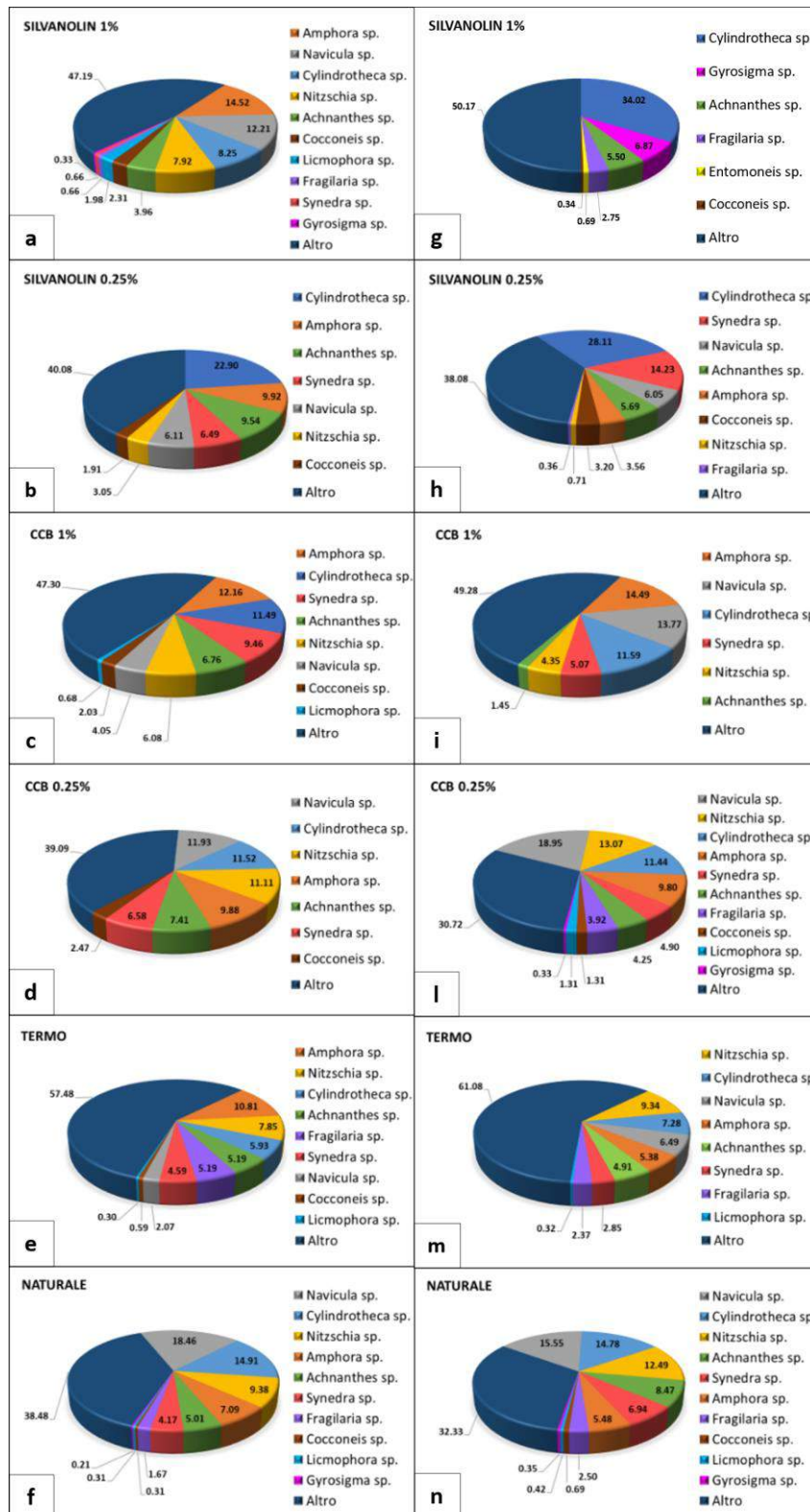


Figura 3.6 Grafici a torta delle abbondanze relative dei generi della comunità microalgale al T1, presenti sui provini di legno *Picea abies* (a-f) e di *Abies alba* (g-n), nell'area "Schiusa".

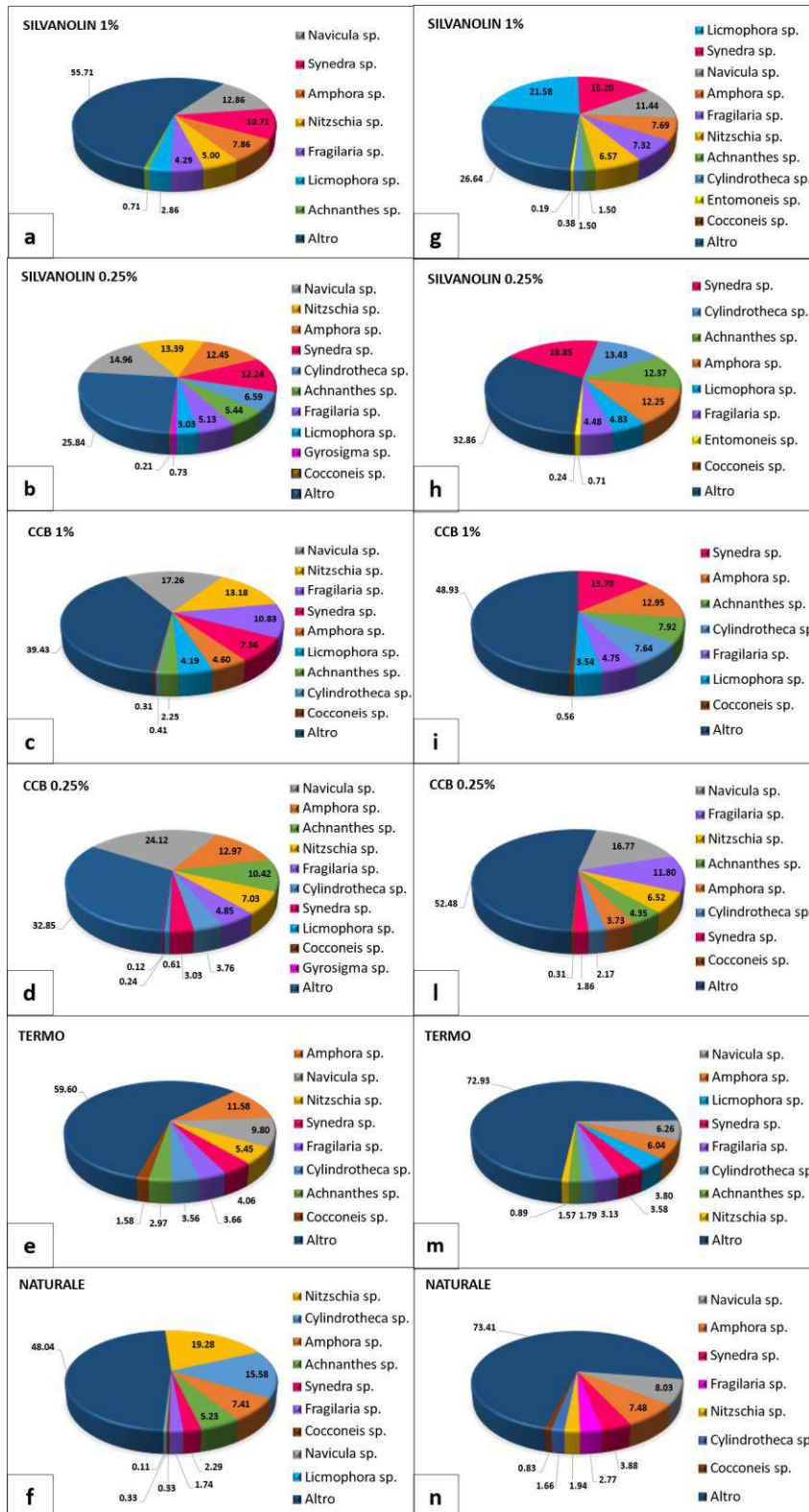


Figura 3.7 Grafici a torta delle abbondanze relative dei generi della comunità microalgale al T2, presenti sui provini di legno *Picea abies* (a-f) e di *Abies alba* (g-n), nell'area "Schiusa".

Analizzando in dettaglio la composizione della comunità microalgale in microscopia ottica, si possono osservare delle variazioni in termini di abbondanza relativa (AR) dei principali generi di diatomee presenti sui diversi campioni. Purtroppo, in numerosi campioni una frazione della comunità è stata costituita da diatomee pennate di piccole dimensioni (<10 µm), di difficile identificazione al microscopio ottico, che pertanto necessitano di indagini più approfondite con altre tecniche microscopiche per permetterne il riconoscimento.

Per quanto concerne l'area Approdo, al T1 si sono osservati dei risultati leggermente diversi a seconda del legno considerato, *Abies* o *Picea* (Fig. 3.5). *Cylindrotheca* è risultato il genere dominante sui provini naturali, mentre ha presentato AR inferiori nei trattamenti con gli impregnanti, soprattutto rispetto al Silvanolin 0.25% (su *Abies*, Fig. 3.5h) e CCB 1% (su *Picea*, Fig. 3.5c). Altri generi sono invece risultati tolleranti, ad esempio *Nitzschia* che ha aumentato la densità cellulare su entrambi i provini trattati con Silvanolin 1% (Fig. 3.5 a,g) ma anche quelli con CCB 1% e CCB 0.25% (su *Abies*, Fig. 3.5 i,l). Analogamente, *Amphora* ha presentato abbondanze maggiori nei trattamenti rispetto al legno naturale. Infine, alcune diatomee sono scomparse del tutto nei trattamenti con gli impregnanti, come il genere *Achnanthes*, su entrambe le tipologie di legno.

Nell'area Schiusa la composizione della comunità microalgale ha mostrato un andamento molto più confrontabile tra i due tipi di legno (Fig. 3.6). Il genere *Navicula*, prevalente sul legno naturale, ha mantenuto un'alta RA anche nei trattamenti con CCB e Silvanolin alle concentrazioni maggiori (Fig. 3.6 a,c,i). In generale, *Cylindrotheca* ha presentato densità inferiori sui provini naturali rispetto all'area Approdo, a causa del maggior idrodinamismo che tende a sospendere in acqua questa diatomea che è debolmente associata al substrato. La AR di questo taxon è incrementata nel trattamento con Silvanolin 0.25% (Fig. 3.6 b,h), mentre è leggermente diminuita nei trattamenti con CCB, con dati altamente paragonabili tra i due trattamenti e tipi di legno. Come già osservato nell'area Approdo, anche qui il genere *Amphora* è aumentato in abbondanza nel trattamento con CCB 0.25%, ma soprattutto con CCB 1% (Fig 3.6 c,i) confermando la sua tolleranza ai metalli pesanti.

Al T2, analizzato esclusivamente nell'area Schiusa, dove i provini non sono stati ancora colonizzati dal macrofouling animale, si è notata una modificazione nella struttura della comunità microalgale (Fig. 3.7). In sintesi, è fortemente diminuita o del tutto scomparsa la presenza di diatomee che rappresentano i primi colonizzatori di substrati solidi (es. *Cocconeis*, *Cylindrotheca*) mentre hanno preso il sopravvento le specie che attecchiscono al substrato mediante un disco adesivo o peduncolo mucillaginoso, formando delle complesse strutture tridimensionali a forma di ventaglio o altre forme complesse, tipiche del biofilm molto maturo (es. *Licmophora*, *Synedra*, ma anche *Fragilaria* e *Achnanthes*). Questa modalità di attecchimento ha un doppio vantaggio: 1. avvicinarsi alla fonte di luce, sovrastando le specie che invece sono adese al substrato per tutta la lunghezza della cellula; e contemporaneamente 2. allontanarsi dalla sorgente di contaminazione. Infatti, aderendo solo tramite questi dischi o peduncoli diminuisce l'effetto tossico sulle cellule presenti all'interno nella struttura mucillaginoso. A conferma di ciò, queste diatomee, soprattutto *Synedra*, non sono state

molto rappresentate sui provini naturali o termicamente modificati, mentre sono divenute dominanti sui provini trattati con gli impregnanti (vedi Fig 3.7 g,h,i).

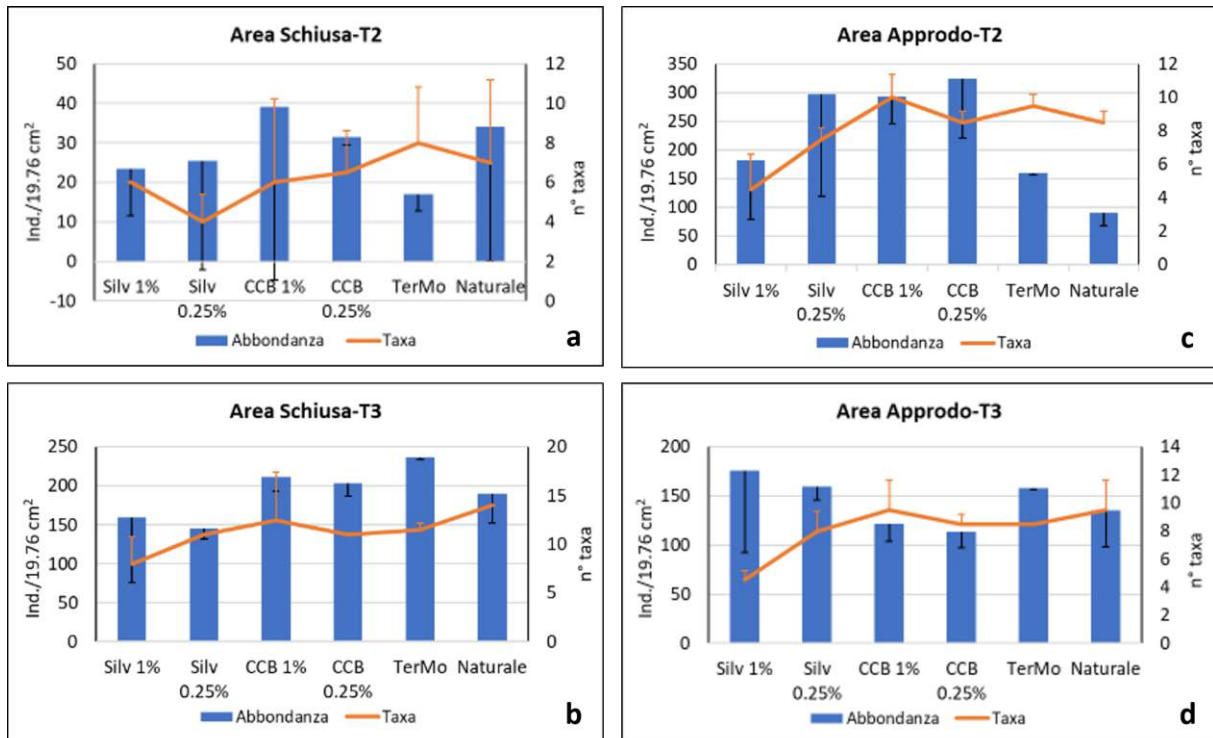


Figura 3.8 Abbondanze totali e numero di taxa del macrofouling animale presente sui diversi provini di legno nell'area "Schiusa" (a-b) e nell'area "Approdo" (c-d) al T2 e al T3. Le scale di misura dell'abbondanza e del numero dei taxa sono diverse nell'area Schiusa-T2 e area Approdo-T2, rispetto ai grafici al T3.

È stata svolta anche un'analisi quali-quantitativa del macrofouling animale (Fig 3.8). Al T2 il numero totale di individui osservati nell'area Approdo è stato di un ordine di grandezza superiore rispetto a quanto osservato nell'area Schiusa (Fig. 3.8 a,c). Questa elevata abbondanza è ascrivibile alla spessa copertura del biofilm che ha favorito l'attecchimento degli organismi superiori. In termini di biodiversità, sono state osservate poche specie e taxa dominanti, in particolare il balano *Balanus trigonus* (Fig. 3.9 a), e i serpulidi *Hydroides dianthus* (Fig. 3.9 c) e *Pileolaria militaris*. Com'è stato già possibile evincere dalle tavole fotografiche (Fig. 3.1), nell'area Approdo al T2 l'abbondanza dei foulers sui provini trattati con gli impregnanti è stata oltre 3 volte superiore rispetto a quella stimata sul controllo, probabilmente grazie al rilascio di sostanze nutritive che hanno stimolato il biofilm microalgale, substrato necessario al successivo attecchimento degli animali. Solo nel trattamento con Sivanolin 1% la presenza dei foulers è stata paragonabile a quella del trattamento termico (Fig. 3.8 c). Al contrario, nell'area Schiusa al T2 solamente il trattamento termico si è dimostrato efficace nel rallentare la colonizzazione animale (Fig. 3.8 a). Una situazione molto diversa è stata osservata dopo 40 giorni. Al T3 nell'area Schiusa (Fig.3.8 b) entrambi i trattamenti con Silvanolin hanno leggermente inibito la colonizzazione del

macrofouling, ma soprattutto il trattamento all'1% ha diminuito la biodiversità animale (Fig. 3.11), mentre gli altri trattamenti hanno presentato un'abbondanza di foulers leggermente maggiore rispetto a quella del controllo. Il trattamento termico sembra aver maggiormente favorito lo sviluppo e la densità del fouling animale.

È interessante notare che nell'area Approdo le abbondanze totali al T3 sono state inferiori rispetto a quelle osservate al T2 (Fig. 3.8 c,). Il Silvanolin 1%, che sembra aver mantenuto meglio l'efficacia inibente dopo 20 giorni, dopo 40 giorni invece è risultato il provino con la maggior densità animale, ma il minor numero di specie (Fig. 3.10 g), mentre i trattamenti con CCB hanno presentato abbondanze leggermente inferiori rispetto al provino naturale (Fig.3.8 d). Bisogna ribadire comunque che in entrambi i casi (Silvanolin e CCB) le differenze in termini di densità rispetto al provino naturale erano poco significative.

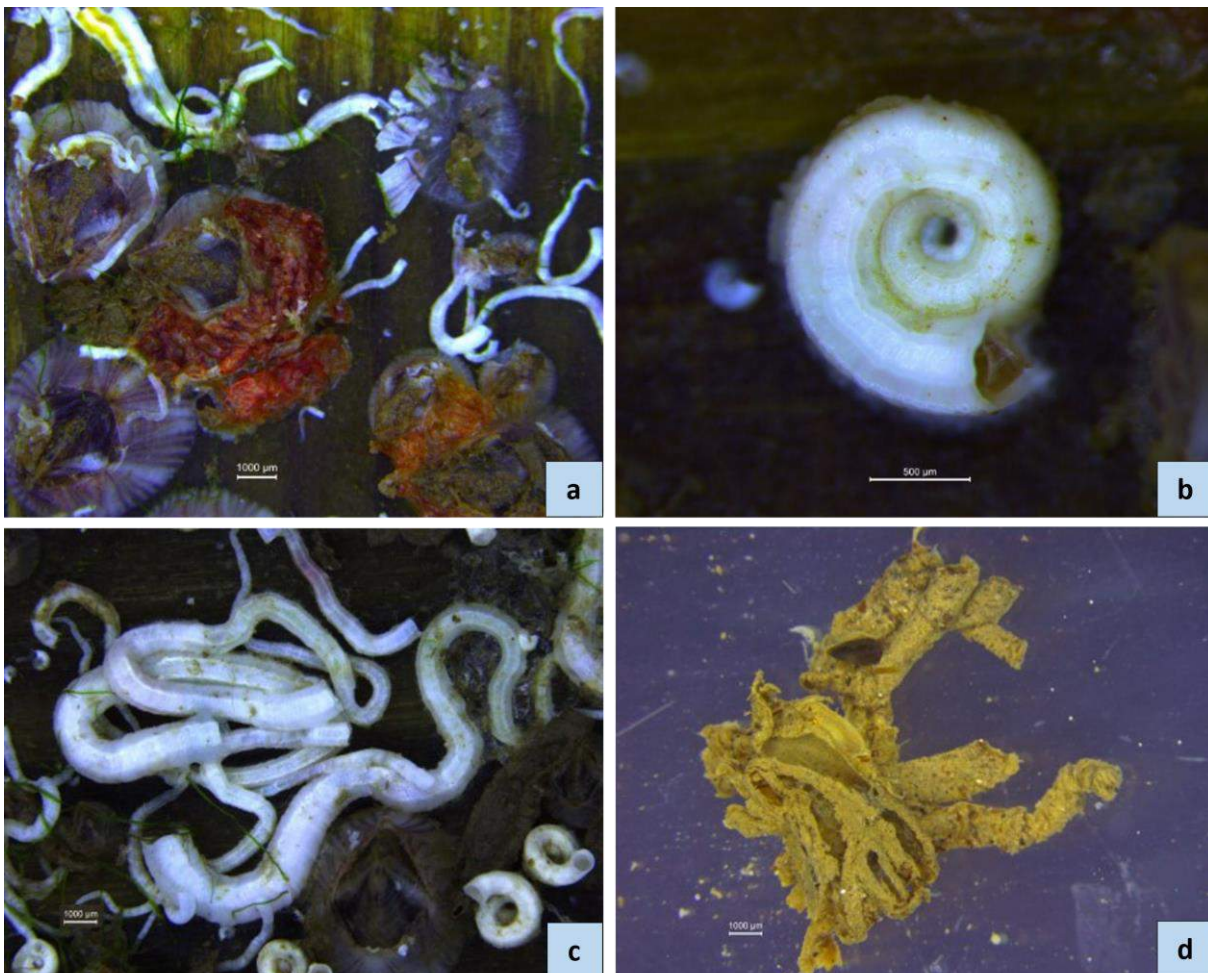


Figura 3.9 Immagini del fouling animale maggiormente presente sui provini di legno *Abies alba*: a) *Balanus trigonus* e ascidie coloniali appartenenti al genere *Botryllus* (scala:1000 μ m); b) Polichete spirorbide *Janua heterostropha* (scala:500 μ m); c) Policheti serpulidi appartenenti al genere *Hydrooides* (scala:1000 μ m); d) Agglomerato di tubi costruiti da crostacei anfipodi (scala:1000 μ m).

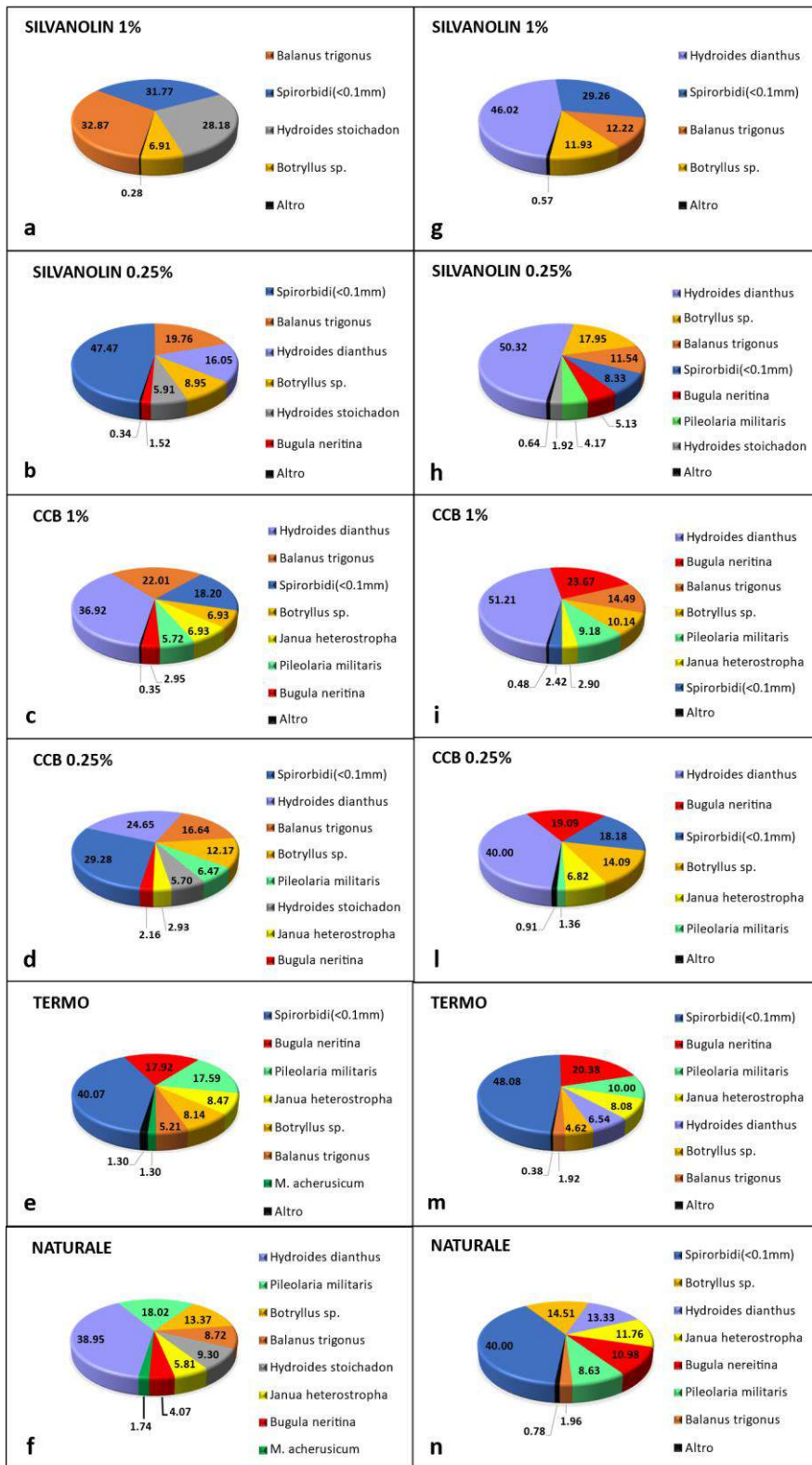


Figura 3.10 Grafici a torta delle abbondanze relative dei taxa del fouling animale al T2 (a-f) e al T3 (g-n), presente sui provini di legno nell'area "Approdo".

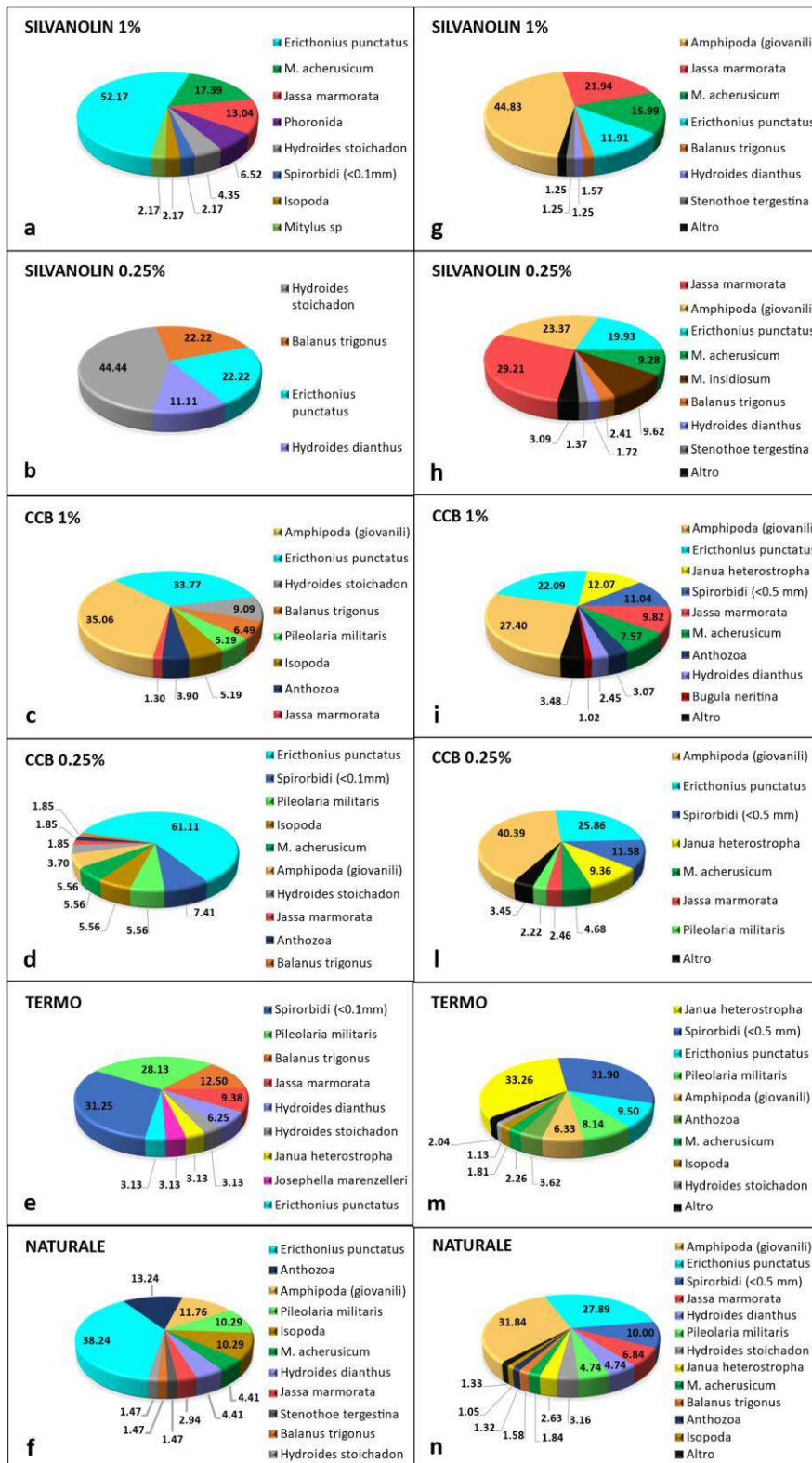


Figura 3.11 Grafici a torta delle abbondanze relative dei taxa del fouling animale al T2 (a-f) e al T3 (g-n), presente sui provini di legno nell'area "Schiusa".

4 CONCLUSIONI

Già da una prima analisi macroscopica si può notare la differenza nella tipologia di copertura del biofilm e macrofouling sviluppatosi nelle due aree indagate che differiscono per l'intensità delle correnti presenti. Il minor idrodinamismo ha accelerato il processo di colonizzazione, prima del biofilm microalgale e poi di quello animale, a prescindere dalla tipologia di trattamento applicato.

Gli impregnanti testati hanno indotto una serie di modificazioni alla comunità microalgale, sono state osservate cellule di dimensioni inferiori e con frustuli malformati. Inoltre, sono state selezionate specie di diatomee che formano delle strutture mucillaginose tridimensionali che li permettono di allontanarsi dalla sorgente di contaminazione e diminuire l'effetto tossico.

L'effetto inibente a breve termine (6 giorni) degli impregnanti è stato più efficace nell'area a maggior idrodinamismo, soprattutto per i trattamenti con CCB 1% e CCB 0.25%, ma anche per entrambi i trattamenti con Silvanolin.

Nell'area a maggior idrodinamismo, ad eccezione del trattamento con Silvanolin 1%, l'efficacia degli altri trattamenti nell'inibire lo sviluppo del biofilm è scemata nel medio termine, dopo 20 giorni, o per effetto del dilavamento dei metalli pesanti oppure per il rilascio di composti nutritivi presenti negli impregnanti che hanno favorito la proliferazione microalgale. Analogamente, nella stessa area e allo stesso tempo sperimentale, nessuno dei trattamenti testati tranne il Silvanolin 0.25% sembra essere stato efficace nel diminuire la biodiversità degli organismi animali incrostanti.

Nell'area a minor idrodinamismo, nessuno tra i trattamenti testati nel medio termine (20 giorni) ha rallentato l'attecchimento dei foulers, mentre a lungo termine (40 giorni) solo il trattamento con Silvanolin 1% ha diminuito la diversità degli organismi animali, con un numero esiguo di specie presenti, sebbene abbondanti.

Analogamente, dopo 40 giorni nell'area a maggior idrodinamismo, solo i trattamenti con Silvanolin hanno leggermente rallentato la colonizzazione del macrofouling, e soprattutto il trattamento all'1% ha diminuito il numero di taxa animali presenti rispetto a quello del controllo. Il trattamento termico, per contro, sul lungo periodo sembra aver favorito lo sviluppo del fouling animale.

Da questi risultati si può dedurre che l'idrodinamismo dell'area gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo del macrofouling. In entrambe le aree, in condizioni idrodinamiche differenti, i trattamenti con Silvanolin 1% hanno ostacolato l'attecchimento di diversi taxa animali portando ad un'esigua diversità animale; ciononostante, in condizioni di basso idrodinamismo, questo non ha impedito alle poche specie presenti di raggiungere una notevole abbondanza, fino ad un totale ricoprimento dei provini.

Ha contribuito all'ATT17 il seguente personale OGS: Elena Di Poi, Edvino Cociancich, Gianluca Zazo, Federica Nasi, Federica Camisa.

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.

Interreg



UNIONE EUROPEA
EVROPSKA UNIJA

ITALIA-SLOVENIJA



DuraSoft

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

Ocena inhibitornega učinka modificiranih ali obdelanih lesenih materialov na tvorbo mikrobnega biofilma

Različica: ŠT. 1

Povezan DS: DS 3.3.3 AKT17

Odgovorni partner: PP3 - OGS

Avtorici: Tamara Cibic, Vanessa Natali

Datum: 19. 08. 2022



CNR
ISMAR
ISTITUTO
DI SCIENZE
MARINE



University of Ljubljana



Università
Ca' Foscari
Venezia



PRIMORSKA
GOSPODARSKA
ZBORNICA



Silvaproduct
od 1951



KAZALO

1	UVOD.....	3
1.1	PREIZKUSNI NAČRT.....	3
2	VZORČENJE IN VRSTA ANALIZ.....	4
3	REZULTATI.....	6
4	ZAKLJUČKI.....	19

OKRAJŠAVE

SILV: impregnacijsko sredstvo Silvanolin
CCB: impregnacijsko sredstvo na osnovi bakra, kroma in bora
TerMo: termično modificiran
CuE: koncentracija bakra
T1: po 6 dneh
T2: po 20 dneh
T3: po 40 dneh
LCSM: laserska konfokalna skenirna mikroskopija
SEM: vrstični elektronski mikroskop
AR: relativna številčnost

POVZETEK

Cilj te projektne aktivnosti je proučevanje inhibitornega učinka na tvorbo mikrobnega filma, ki ga imajo leseni materiali, modificirani ali obdelani z 1. impregnacijskimi sredstvi novejšje generacije (Silvanolin), 2. s sredstvi, že prisotnimi na trgu (CCB, na osnovi bakra, kroma in bora) in 3. s termično modificiranim lesom, t.j. s tehnikami, ki povečujejo njegovo obstojnost. V ta namen smo na dveh območjih Gradeške lagune z različno hidrodinamiko potopili ustrezno obdelane vzorce bele jekle in navadne smreke ter jih odvzeli po 6, 20 in 40 dneh z namenom, da bi z različnimi mikroskopskimi tehnikami ocenili kratko-, srednje- in dolgoročne učinke na številčnost in sestavo skupnosti mikroalg. Ocenili smo tudi številčnost in sestavo prve stopnje obrasti večjih organizmov, kjer je bila prisotna. Rezultati so izpostavili pomen hidrodinamike posameznega območja: ne glede na vrsto uporabljene obdelave se je ob manjši hidrodinamiki pospešil proces nastanka biofilma mikroalg kakor tudi pritrditve večjih organizmov. Ugotovljeno je bilo, da so na obeh območjih in ob različnih hidrodinamičnih pogojih le obdelave s Silvanolinom zavirale pritrditve raznih živalskih taksonov s posledičnim zmanjšanjem živalske raznolikosti; kljub navedenemu to sicer ni preprečilo, da se nekaj vrst v pogojih nizke hidrodinamike ne bi občutno razmnožilo in v celoti prekrilo vzorce. Preizkušana impregnacijska sredstva so tudi povzročila razne spremembe v skupnosti mikroalg; v primerjavi s kontrolnim pogojem je bila namreč opažena prisotnost kremenastih alg manjših velikosti z deformirano frustulo, ki so razvile posebne življenjske strategije premagovanja strupenega učinka, ki ga imajo snovi, vsebovane v impregnacijskih sredstvih.

1 UVOD

Cilj te projektne aktivnosti je proučevanje morebitnega inhibitornega učinka raznih obdelovalnih tehnik na tvorbo mikrobnega biofilma na izbranega lesenega materiala iz bele jelke in navadne smreke. Biofilm nastane, ko različni mikroskopski organizmi, predvsem bakterije in diatomeje, kolonizirajo trdi substrat (nosilec), ki je potopljen v morski ali lagunski vodi. Biofilm v naprednem stanju razvoja pospešuje pritrnitev organizmov, to je macrofouling, ki predstavlja eden od glavnih problemov pri lesenih strukturah, potopljenih v morskem okolju. Proučili smo zato kratko-, srednje- in dolgoročne učinke različnih obdelav na tvorbo mikrobnega biofilma z izvedbo preizkušanj na dveh območjih Gradeške lagune, ki poznata različne hidrodinamične pogoje.

1.1. PREIZKUSNI NAČRT

Prvi del preizkušanja smo opravili *in situ*, in sicer na dveh območjih Gradeške lagune, kjer smo postavili lesene vzorce, nato smo analize nadaljevali v laboratorijih Državnega inštituta za eksperimentalno oceanografijo in geofiziko - OGS.

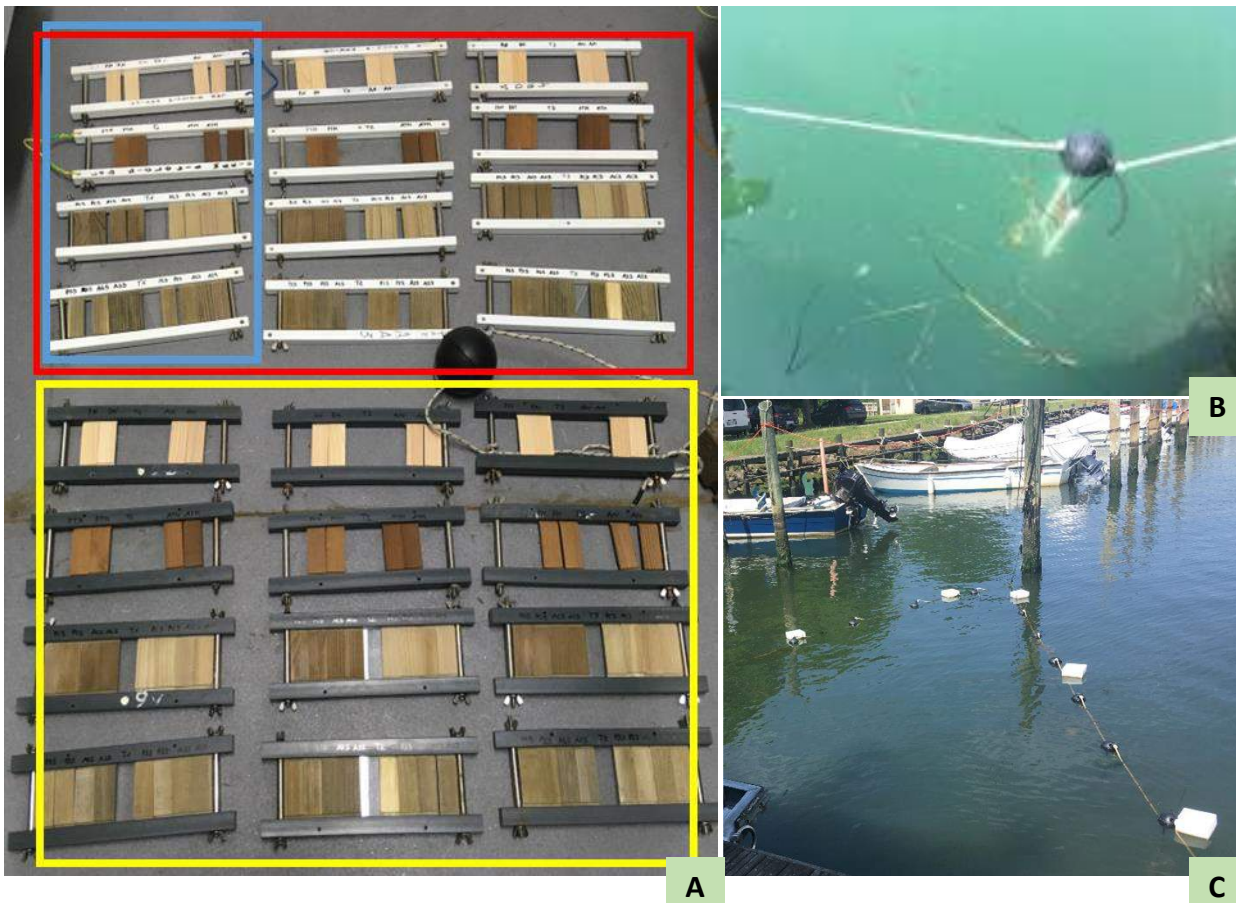
Uporabljeni sta bili dve vrsti iglavcev: *Abies alba* (bela jelka) in *Picea abies* (navadna smreka). Iz izbranih vrst je projektni partner Silvaproduct izdelal vzorce velikosti 7,6 cm x 2,6 cm x 0,5 cm in pripravil raztopino za postopke kemijske in fizične obdelave tako, da sta bila za vsako vrsto lesa in obdelave pripravljena dva vzorca (ponovitev), in sicer:

- zaščita z impregnacijskim sredstvom Silvanolin (baker etanolamin) v dveh koncentracijah (CuE = 1 % in CuE = 0,25 %),
- zaščita z impregnacijskim sredstvom CCB (Cu/Cr/B), tudi v dveh koncentracijah,
- kemična modifikacija,
- neobdelani vzorec (referenčni).

Lesene vzorce, ki so bili pritrjeni na nosilce, imenovane kolektorje (glej sliko 1.1), smo potopili v vodo in jih s sistemom priveznih boj obdržali na stalni globini (50 cm pod vodno površino ne glede na plimovanje). Skupno je bilo izdelanih 24 kolektorjev: 12 je bilo nameščenih na območje »Schiusa«, ki ga zaznamuje izrazita hidrodinamika, preostalih 12 pa na območje »Approdo« z relativno nizko hidrodinamiko. Skupno je bilo potopljenih 144 vzorcev, to je 72 na vsakem območju oz. 12 za vsako testno časovno obdobje (slika 1.1).

Učinke različnih obdelav na tvorbo mikrobnega biofilma smo ocenili kratkoročno (T1: 6 dni), srednjeročno (T2: 20 dni) in dolgoročno (T3: 40 dni).

V primerjavi s prvotnim preizkusnim načrtom smo testna časovna obdobja morali skrajšati, ker se je v poletnem času, ko smo opravili test, obrast (macrofouling) hitro širila, zato ni bilo mogoče analizirati biofilma za T2 na območju »Approdo« in T3 na obeh območjih. Na podlagi navedenega smo na vzorce teh testnih časovnih obdobjev opravili količinsko in kakovostno oceno živalske skupnosti, ki se je razmnožila na teh vzorcih.



Slika 1.1 Kolektorji, nameščeni na posamezno območje: 12 na območje »Schiusa« (B), prikazanih znotraj rdečega okvirja (A), in 12 na območje »Approdo« (C), prikazanih znotraj rumenega okvirja (A). Za vsako območje so bili določeni 4 kolektorji za vsako testno časovno obdobje (glej modri okvir A), vsak kolektor je nato zajemal vzorce, obdelane s posameznim postopkom (Silvanolin, CCB, termično modificiran, neobdelan).

2 VZORČENJE IN VRSTA ANALIZ

Preizkušanje se je začelo 9. junija 2021, ko smo vse kolektorje, boje in obtežitve postavili na območji »Schiusa« in »Approdo« (Slika 2.1 A-B).

Kolektorje smo nato odvzeli po preteku naslednjih testnih časovnih obdobj:

- T1 (15. junij): po 6 dneh smo iz obeh območij odvzeli 48 lesenih vzorcev
- T2 (29. junij): po 20 dneh smo iz obeh območij odvzeli 48 lesenih vzorcev
- T3 (19. julij): po 40 dneh smo iz obeh območij odvzeli 48 lesenih vzorcev.

Odvzete lesene vzorce smo fiksirali s predhodno filtriranim in nevtraliziranim formaldehidom (v končni 4 % koncentraciji), ki smo ga nato v laboratoriju izprali s plošč; plošče smo hranili pri -20 °C.

Mikrobni biofilm na lesenih vzorcih smo analizirali z različnimi mikroskopskimi tehnikami. Zaviranje tvorbe skupnosti mikroalg v prvih fazah razvoja biofilma smo proučili s konfokalno mikroskopijo, ki omogoča 3D prikaz debeline in sestave biofilma. Zaradi omejene površine, ki jo lahko opazujemo glede na obseg vzorca, lahko s tovrstno

preiskavo izvedemo sicer le kakovostno oceno. Kvantitativno oceno številčnosti skupnosti mikroalg pa lahko opravimo s pomočjo optične mikroskopije. Najprej smo mehansko odstranili (odgrnili) en košček biofilma (2 cm^2 , približno 1/10 celotne površine lesenega vzorca) in ga ustrezno razredčili. Pridobljeni vzorec smo opazili z invertnim optičnim mikroskopom (dokončna povečava 320x), da bi identificirali mikroalge z uporabo posebnih taksonomskih ključev. Z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) pa smo natančno ocenili obseg prekritosti in velikosti celic pritrjenih mikroalg. Rezultate, pridobljene z različnimi mikroskopskimi tehnikami, smo združili in tako ocenili učinke različnih obdelav na številčnost in sestavo mikrobnih skupnosti, prisotnih v biofilmu.

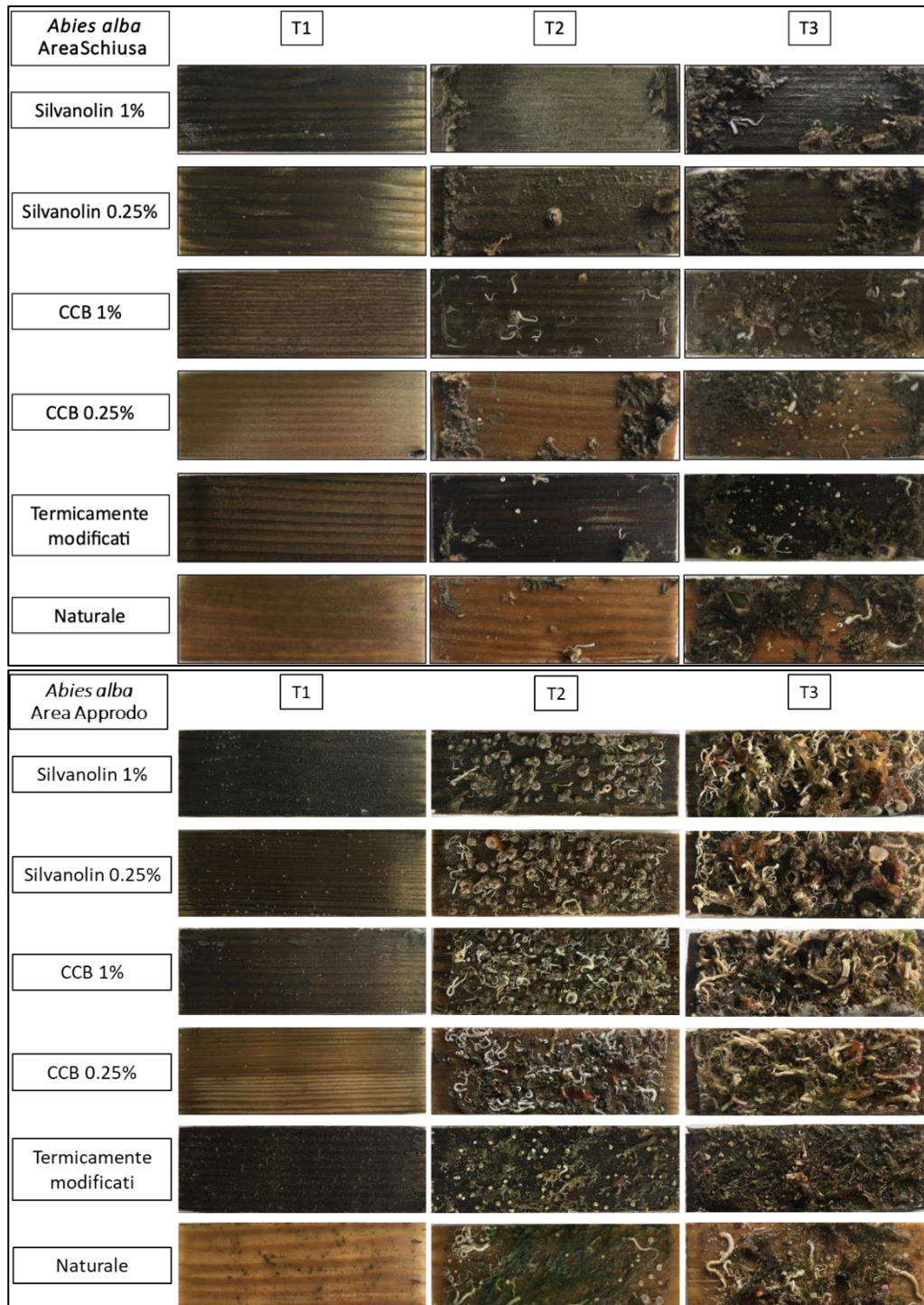
Na vzorce, kjer zaradi prekritosti z obrastjo ni bilo mogoče analizirati sestave biofilma, smo opravili kvantitativno in kvalitativno oceno obrasti z organizmi (macrofouling). To dodatno preiskavo smo opravili izključno na vzorce lesne vrste *Abies alba* za naslednji testni časovni obdobji in območji: območje Approdo pri T2 in T3, območje Schiusa pri T3. Pri tem smo ocenili obe strani vzorcev (2 ponovitvi na vzorec).



Slika 2.1 Preiskovalno območje v Gradeško-maranski laguni (A), detajl obeh območij, izbranih za namene preizkušanja (B): 1 - »območje Schiusa« in 2 - »območje Approdo«.

3 REZULTATI

Fotografske tabele (Slika 3.1) makroskopsko prikazujejo postopno naseljevanje organizmov, in sicer od faze nastanka biofilma po 6 dneh do izrazitega razraščanja po 40 dneh.



Slika 3.1 Fotografске tabele različnih lesenih vzorcev (*Abies alba*), ki so bili odvzeti iz Gradeške lagune po raznih testnih časovnih obdobjih.

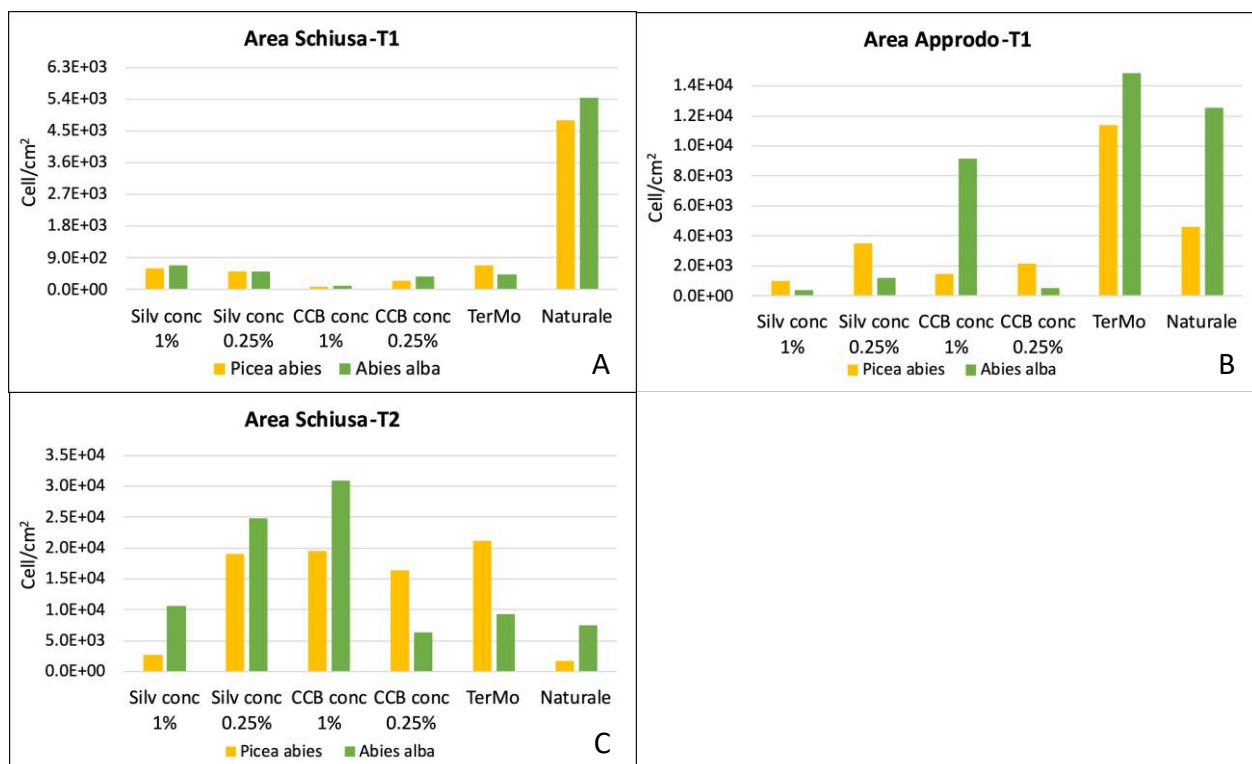
Že iz te prve primerjave je mogoče ugotoviti pomembna razlika med območjema. Na območju Approdo z manjšo hidrodinamiko je že pri T2 (po 20 dneh) obrast skoraj v celoti prekrila površino lesenega vzorca, na območju Schiusa pa je večja hidrodinamika upočasnila postopek tvorbe biofilma, kakor tudi naseljevanja živalskih organizmov (slika 3.1).

Te rezultate potrjuje gostota mikroalg, prisotnih na različnih lesenih vzorcih, ki je bila ocenjena na podlagi štetja z optično mikroskopijo; tudi v tem primeru je bila ugotovljena razlika med obema območjema. Na splošno je bila celična številčnost na območju Approdo za eno stopnjo večja v primerjavi z območjem Schiusa, kjer so močnejši vodni tokovi zavirali postopek razraščanja (slika 3.2 A-C).

Pri T1 je bil na območju Schiusa beležen večji inhibitorski učinek impregnacijskih sredstev, kot dokazuje zlasti celična številčnost na lesenih vzorcih, obdelanih z raztopinoma CCB 1 % in CCB 0,25 % (slika 3.2 A). Tudi pri lesenih vzorcih, obdelanih s Silvanolinom 1 % in Silvanolinom 0,25 %, je bil v primerjavi z neobdelanim vzorcem namreč opazen inhibitorski učinek na razvoj mikroalg, kot sicer jasno dokazujejo analize, opravljene s sožariščnim mikroskopom (LCSM) in vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (slika 3.3). V primerjavi z neobdelanim vzorcem, kjer so bili ugotovljeni večja gostota in večje velikosti celic, je bilo opaženih zelo malo celic na površinah, obdelanih s sredstvom Silvanolin in CCB (slika 3.3 a-d). Kljub temu so bile vrednosti številčnosti celic na vzorcu, obdelanemu s Silvanolinom 1 %, 7 do 8 krat večje od tistih, izmerjenih pri vzorcu, obdelanemu s sredstvom CCB 1 %. Prav tako je bila številčnost, izmerjena na termično modificiranem lesu, primerljiva s tisto, ugotovljeno na vzorcu, zaščitenem s Silvanolinom.

Pri T1 pa je bila na območju Approdo opažena večja številčnost celic na vseh lesenih vzorcih v primerjavi s stanjem na območju Schiusa (slika 3.2 A,B), kar je po vsej verjetnosti mogoče pripisati večjemu razmnoževanju mikroalg zaradi manjše hidrodinamike. Številčnost mikroalg na termično modificiranem vzorcu je bila primerljiva s stanjem, opaženem na neobdelanem vzorcu. V primerjavi z omenjenima pogojevma so leseni vzorci, zaščiteni z impregnacijskim sredstvom, beležili manjšo razraščanost, kot sicer dokazujejo slikanja s LCSM in SEM (Fig.3.4). Vrednosti celične številčnosti na lesenih vzorcih, zaščitenih s Silvanolinom 1 %, so bile do 33-krat nižje od tistih, ki so bile ocenjene na neobdelanih lesenih vzorcih, vrednosti na vzorcih, obdelanih s sredstvom CCB 0,25 %, pa so bile za 25-krat nižje kot na referenčnih vzorcih. Nekatere celice mikroalg, opažene tako z optičnim mikroskopom kot s SEM mikroskopom, so pogosto imele celične okvare, to je upognjene konice ali druge okvare kremenaste lupinice (frustula) diatomej, kot je mogoče videti na sliki 3.4 b. Velja izpostaviti tudi dejstvo, da je bila vrednost celične gostote na vzorcu vrste *Abies alba*, obdelanem z raztopino CCB 1 % (slika 3.2 B), znatno višja glede na druge vrste obdelave, kar nekako nakazuje na stanje, ugotovljeno na območju Schiusa pri T2 (slika 3.2 C).

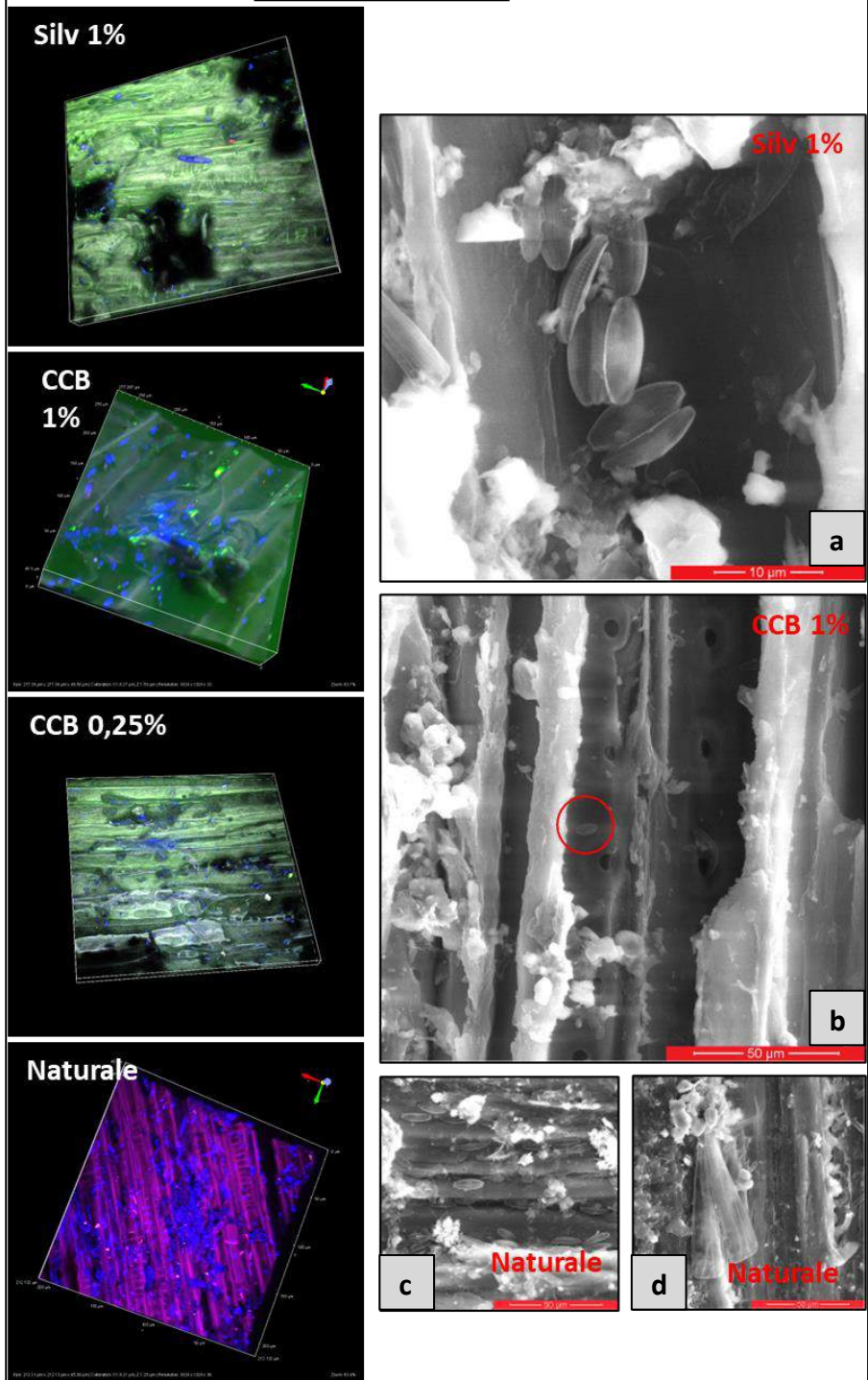
Na območju Schiusa je bilo pri T2 ugotovljeno popolnoma različno stanje od tistega, opaženega na istem območju pri T1: višjo gostoto celic smo sicer opazili pri vzorcih, obdelanih z impregnacijskimi sredstvi, zlasti na vzorcu vrste *Abies alba*, zaščitenem z raztopino CCB 1% in Silvanolinom 0,25% (slika 3.2 C). Na podlagi navedenega lahko sklepamo, da so po 20 dneh morski tokovi izprali impregnacijsko sredstvo z vzorcev ter odnesli presežne težke kovine, kar je posledično zmanjšalo njegovo inhibitorno delovanje. Vzporedno sta bakterijski razkroj etanolamina, prisotnega v Silvanolinu, v amonijev ion in druge dušikove spojine (glej rezultate Aktivnosti 16), ter razkroj drugih organskih snovi, prisotnih v teh impregnacijskih sredstvih, pospešila razmnoževanje mikroalg. Samo pri večjih koncentracijah Silvanolina 1 % so ravni težkih kovin, beleženih v vzorcu, baje zavirale spodbujevalni učinek anorganskih hranil, ki so se sproščale iz vzorcev. Zanimivo je, da je celična gostota v biofilmu, ki je nastal na vzorcih, obdelanih s Silvanolinom 1 %, primerljiva s tisto, opaženo na neobdelanih lesenih vzorcih, ki so izmed vseh proučenih obdelav beležili najnižjo številčnost mikroalg.



Slika 3.2 Skupna številčnost skupnosti mikroalg, prisotnih na različnih lesenih vzorcih na območjih »Schiusa« (A) in »Approdo« (B) pri T1, in na območju »Schiusa« pri T2 (C).

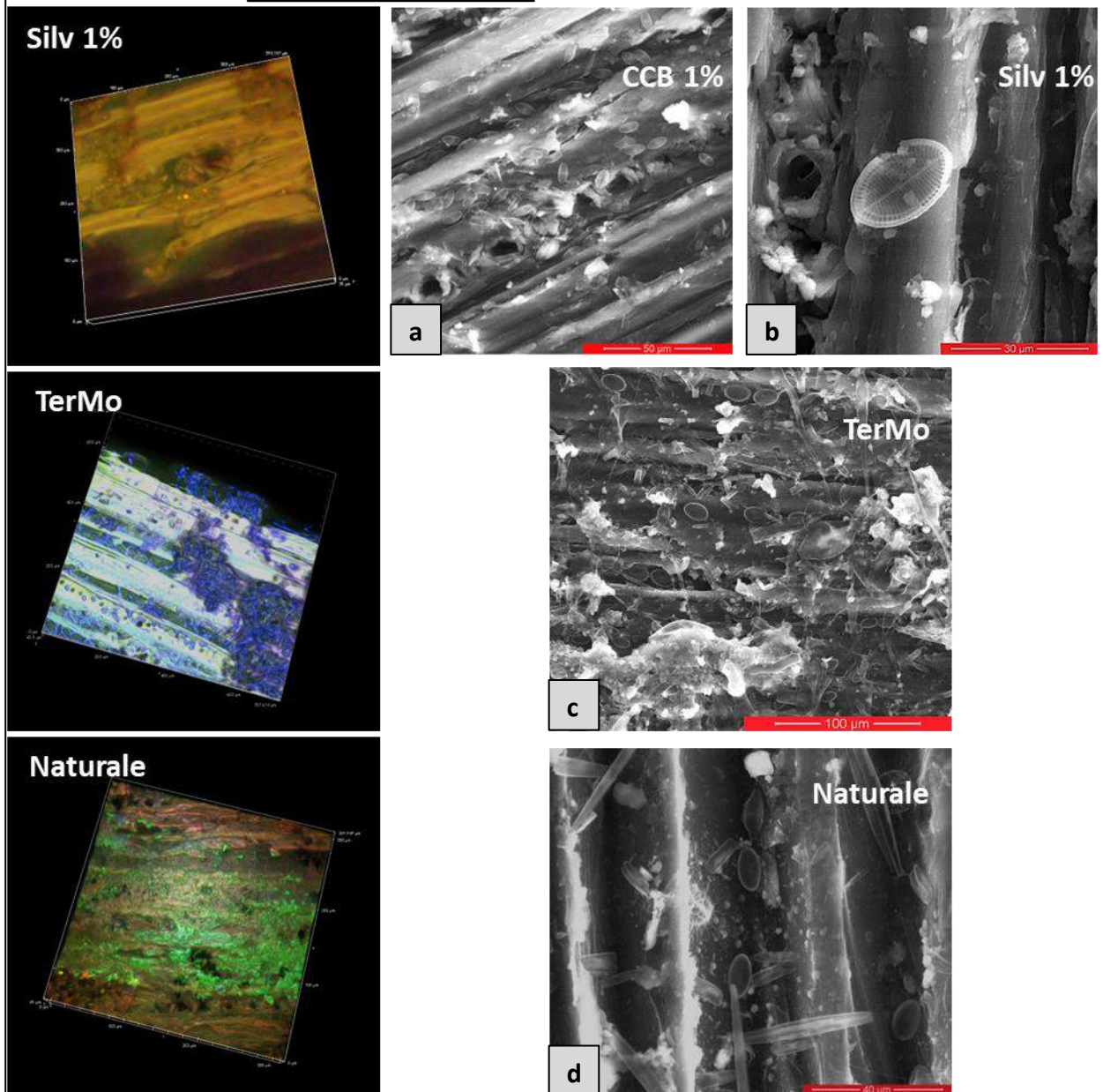
Slika 3.3 Fotografije, posnete z lasersko konfokalno skenirno mikroskopijo (LSCM, celice mikroalg so obarvane v modri barvi) in vrstično elektronsko mikroskopijo nekaterih lesenih vzorcev, ki so bili odvzeti iz

Area Schiusa

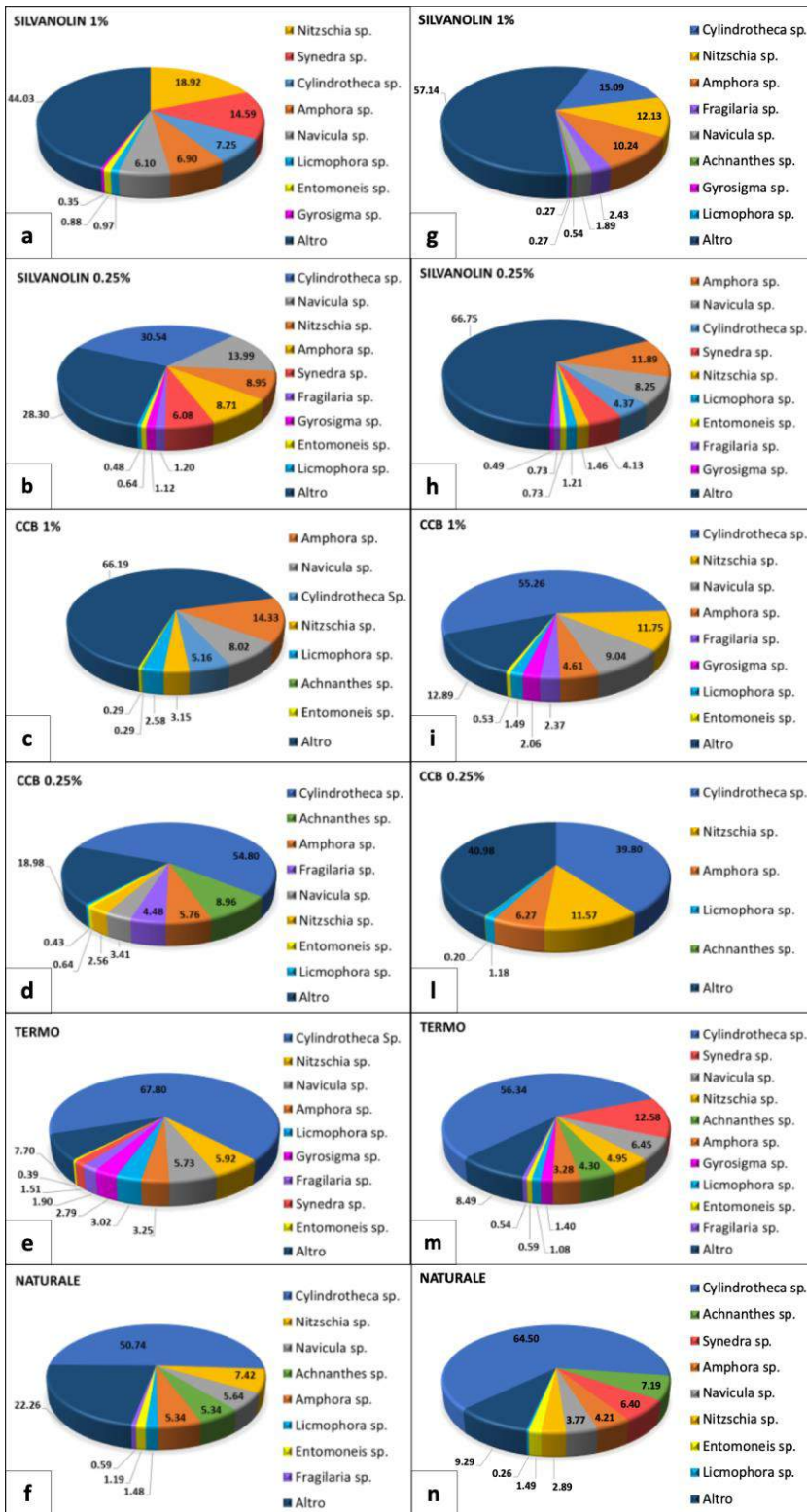


območja »Schiusa« v Gradoški laguni pri T1. LSCM posnetki predstavljajo predel lesenega vzorca, velik približno 300 µm². Velikosti merila na posnetkih SEM sta 10 µm (a) in 50 µm (b-d).

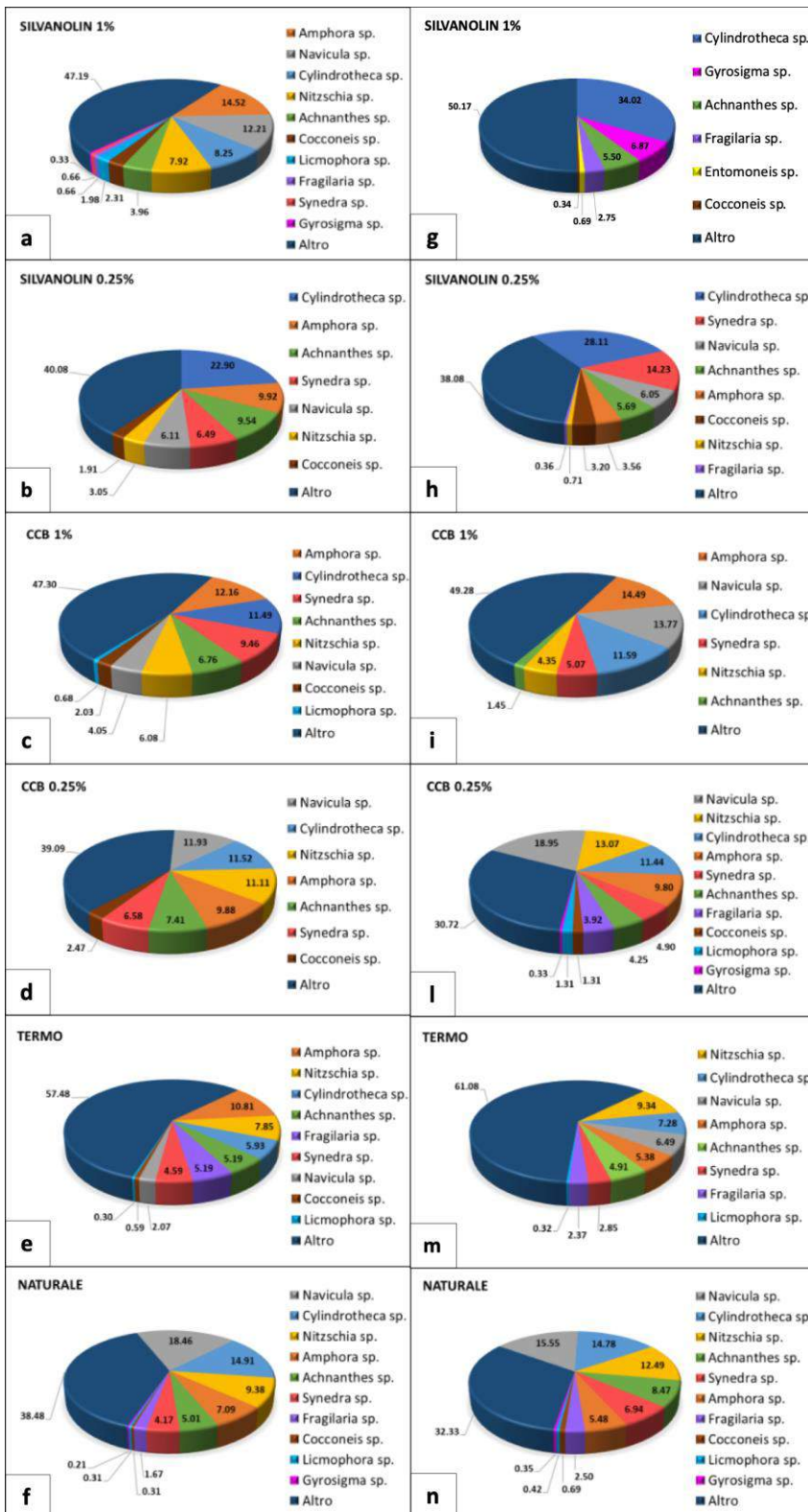
Area Approdo



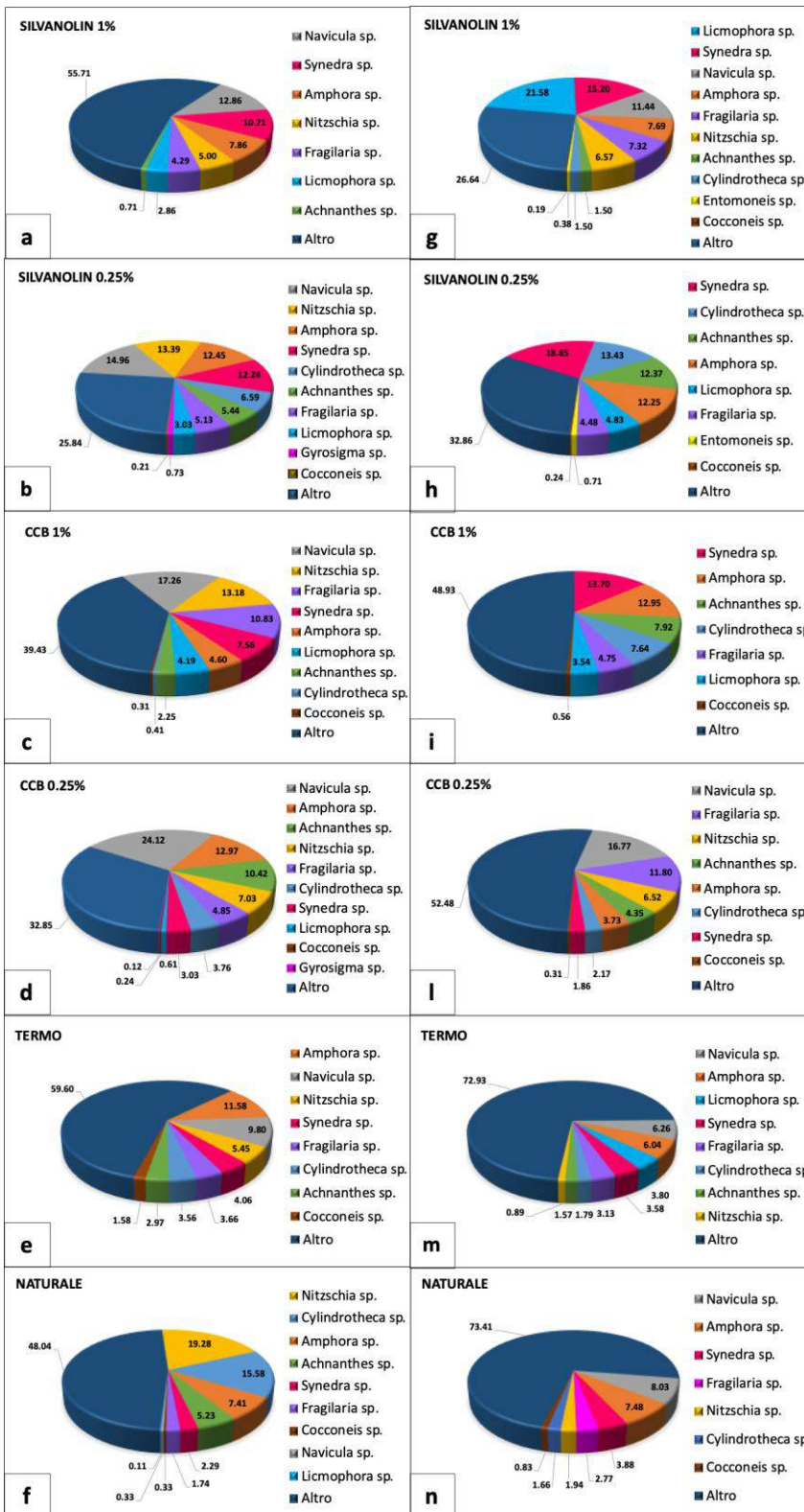
Slika 3.4 Fotografije, posnete z lasersko konfokalno skenirno mikroskopijo (LSCM, celice mikroalg so obarvane v modri ali zeleni barvi) in presevno elektronsko mikroskopijo (SEM) nekaterih lesenih vzorcev, ki so bili odvzeti iz območja »Approdo« v Gradeški laguni pri T1. LSCM posnetki predstavljajo predel lesenega vzorca, velikosti približno $400 \mu\text{m}^2$ (Silv 1 %), $700 \mu\text{m}^2$ (TerMo) in $300 \mu\text{m}^2$ (neobdelan). Velikosti merila na posnetkih SEM so $50 \mu\text{m}$ (a), $30 \mu\text{m}$ (b), $100 \mu\text{m}$ (c) in $40 \mu\text{m}$ (d).



Slika 3.5 Tortni grafikon relative številčnosti rodov v skupnosti mikroalg pri T1, prisotnih na vzorcih lesne vrste *Picea abies* (a-f) in *Abies alba* (g-n), na območju »Approdo«.



Slika 3.6 Tortni grafikon relativne številčnosti rodov v skupnosti mikroalg pri T1, prisotnih na vzorcih lesne vrste *Picea abies* (a-f) in *Abies alba* (g-n), na območju »Schiusa«.



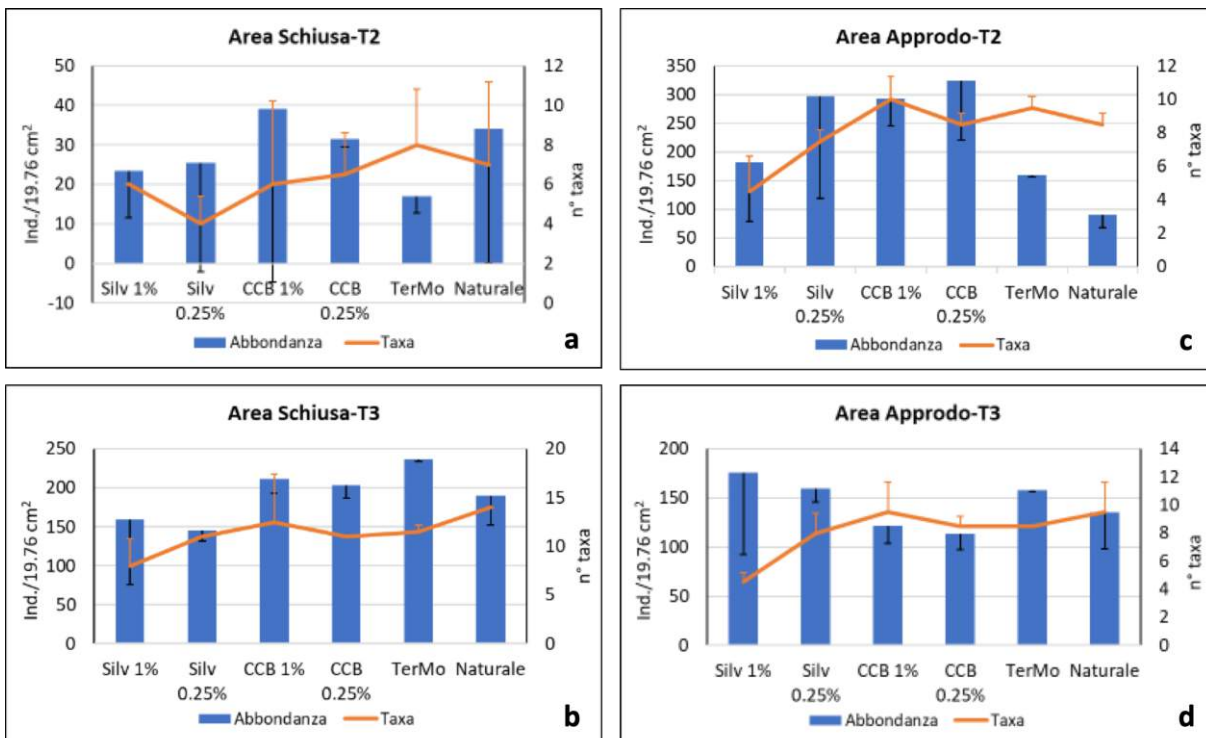
Slika 3.7 Tortni grafikon relative številčnosti rodov v skupnosti mikroalg pri T2, prisotnih na vzorcih lesne vrste *Picea abies* (a-f) in *Abies alba* (g-n), na območju »Schiusa«.

Pri podrobni analizi sestave skupnosti mikroalg z optično mikroskopijo je mogoče opaziti variacije relativne številčnosti (AR) glavnih vrst diatomej, prisotnih v različnih vzorcih. V številnih vzorcih en del skupnosti sestavljajo žal penatne diatomeje manjših velikosti (<10 µm), ki jih je težko zaznati z optično mikroskopijo, za njihovo identifikacijo pa je potrebno opraviti natančnejše preiskave z uporabo drugih mikroskopskih tehnik.

Kar zadeva območje Approdo, smo pri T1 beležili rahlo različne rezultate glede na vrsto proučenega lesa, t.j. *Abies* ali *Picea* (slika 3.5). Prevladujoči rod na neobdelanih vzorcih je bil *Cylindrotheca*, čigar AR je bila nižja pri obdelavah z impregnacijskimi sredstvi, predvsem s Silvanolinom 0,25 % (na *Abies*, slika 3.5h) in CCB 1 % (na *Picea*, slika 3.5c). Drugi rodovi so se sicer izkazali bolj tolerantni, kot na primer *Nitzschia*, ki je svojo celično gostoto povečal na obeh vzorcih, obdelanih s Silvanolinom 1 % (slika 3.5 a,g), kakor tudi na tistih, obdelanih s sredstvom CCB 1 % in CCB 0,25 % (na *Abies*, slika 3.5 i,l). Tudi rod *Amphora* je bil številčnejši tako pri obdelanih vzorcih, kakor pri neobdelanih. Nekatero diatomejo, kot je *Achnanthes*, so sicer v celoti izginile pri impregniranih vzorcih obeh lesnih vrst.

Na območju Schiusa je bila sestava skupnosti mikroalg precej podobna med obema vrstama lesa (slika 3.6). Rod *Navicula*, ki je bil prevladujoči na neobdelanem lesu, je ohranil visoke vrednosti RA tudi v obdelavah s sredstvom CCB in Silvanolin v večjih koncentracijah (slika 3.6 a,c,i). Na splošno je bil rod *Cylindrotheca* zaradi večje hidrodinamike, pri kateri se ta diatomeja manj tesno oprime podlage in zato v glavnem lebdi v vodi, številčno manj prisoten na neobdelanih vzorcih v primerjavi z območjem Approdo. AR tega taksona se je povečala pri obdelavi s Silvanolinom 0,25 % (slika 3.6 b,h), medtem ko se je znižala pri obdelavi s sredstvom CCB, kjer so bili podatki povsem primerljivi med vrstama obdelave in lesa. Tako kot je bilo že ugotovljeno na območju Approdo, tudi tu je rod *Amphora* številčno zrasel pri obdelavi s sredstvom CCB 0,25 %, še zlasti s sredstvom CCB 1 % (slika 3.6 c,i), kar potrjuje njegovo toleranco na težke kovine.

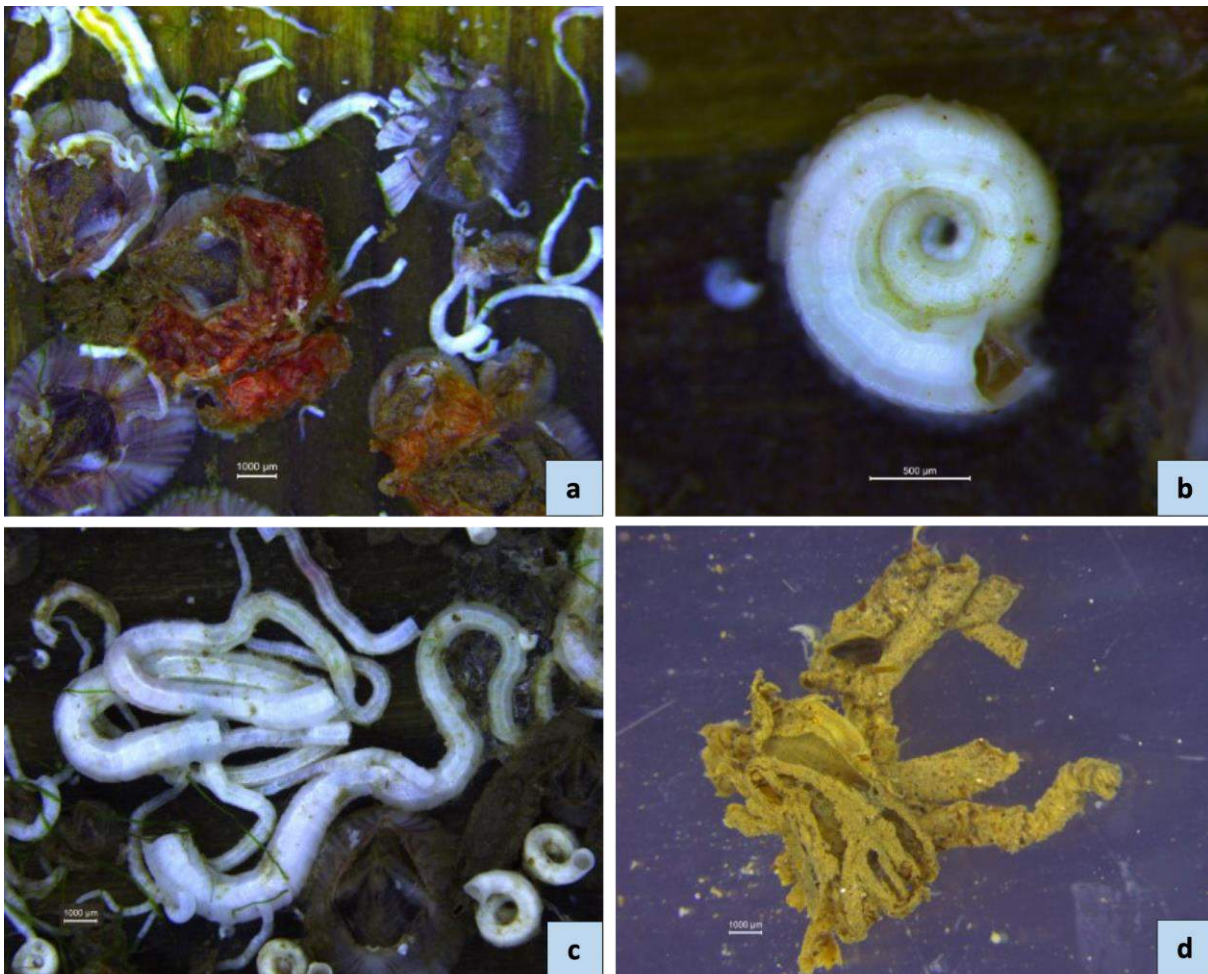
Pri T2, proučenem izključno na območju Schiusa, kjer vzorce niso še razraščale živali, smo zaznali spremembo v sestavi skupnosti mikroalg (slika 3.7). Skratka, se je prisotnost diatomej - te predstavljajo prve naseljevalce trdnega substrata (npr. *Cocconeis*, *Cylindrotheca*) - močno zmanjšala oz. so te alge izginile, prevladale pa so tiste vrste, ki se substratu oprijemajo preko lepilne plošče ali sluznega stebelca in tvorijo kompleksne tridimenzionalne zgradbe v obliki pahljače ali drugih oblik, značilnih za precej zreli biofilm (npr. *Licmophora*, *Synedra*, ampak tudi *Fragilaria* in *Achnanthes*). Ta način oprijema ima dve prednosti: 1. omogoča približanje viru svetlobe s premagovanjem vrst, ki so po celotni dolžini celice oprijete na substratu; hkrati pa 2. zagotavlja oddaljitev od vira kontaminacije. Ker se alge oprijemajo le s ploščami ali stebelci, se strupeni učinek celic, prisotnih v sluzni združbi, posledično zmanjša. To dokazuje dejstvo, da te diatomeje, predvsem *Synedra*, niso bile zastopane na neobdelanih ali termično modificiranih vzorcih, medtem ko so postale prevladujoče na vzorcih, obdelanih s impregnacijskimi sredstvi (glej sliko 3.7 g,h,i).



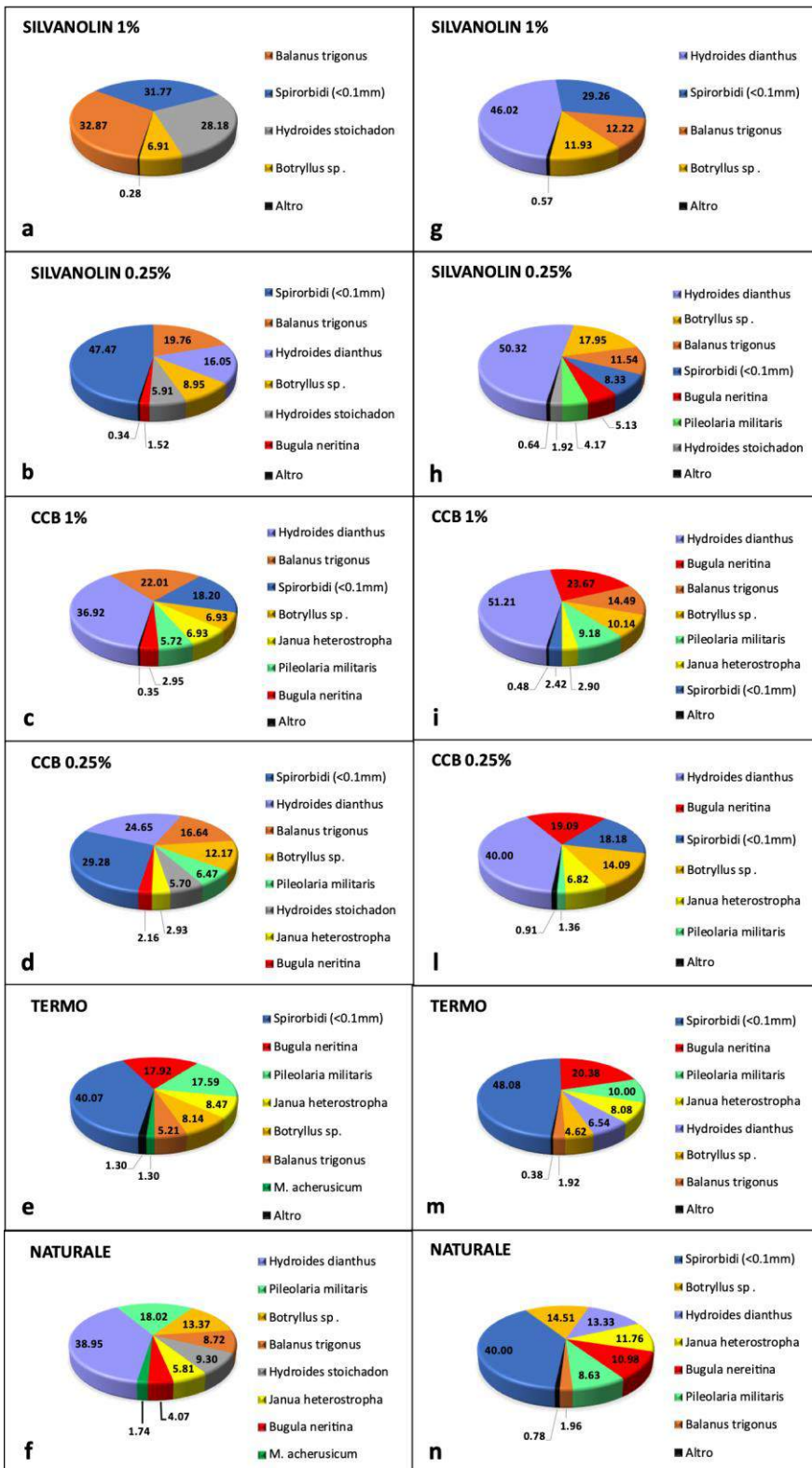
Slika 3.8 Skupne številčnosti in število taksonov biološke obrasti, prisotne na različnih lesenih vzorcih na območjih »Schiusa« (a-b) in »Approdo« (c-d) pri T2 in T3. Merske lestvice številčnosti in števila taksonov se v primerjavi z grafikoni o T3 razlikujejo pri območjih Schiusa-T2 in Approdo-T2.

Opravili smo tudi kvalitativno in kvantitativno oceno biološke obrasti (slika 3.8). Pri T2 je bilo skupno število osebkov, opaženih na območju Approdo, večje od števila osebkov, ugotovljenih na območju Schiusa (slika 3.8 a,c). To visoko številčnost bi lahko pripisali debelejši prekritosti biofilma, ki je tako pospešil oprijem višjih organizmov. Glede biotske raznovrstnosti je bilo opaženih malo prevladujočih vrst in taksonov, predvsem *Balanus trigonus* (slika 3.9 a), *Hydroides dianthus* (slika 3.9 c) in *Pileolaria militaris*. Ko izhaja iz fotografskih tabel (slika 3.1), na območju Approdo pri T2 je bila številčnost obrastka na vzorcih, obdelanih z impregnacijskimi sredstvi, več kot trikrat večja od ocenjene vrednosti pri kontrolnih vzorcih; to bi verjetno pripisali sproščanju hranilnih snovi, ki so pospešile tvorbo biofilma mikroalg, kar predstavlja ugoden substrat za nadaljnji oprijem živali. Samo pri obdelavi s Silvanolinom 1 % je bila obrast primerljiva tisti, opaženi pri termični modifikaciji (slika 3.8 c). Nasprotno, se je na območju Schiusa pri T2 samo termični postopek izkazal za učinkovitega pri zaviranju razmnoževanja živali (slika 3.8 a). Povsem različno stanje je bilo ugotovljeno po 40 dneh. Pri T3 na območju Schiusa (slika 3.8 b) sta obe obdelavi s Silvanolinom rahlo inhibirali kolonizacijo večjih organizmov (macrofouling), še posebej obdelava 1 % je sicer zmanjšala biotsko raznolikost živalskih vrst (slika 3.11); preostale zaščitne obdelave pa so beležile rahlo večjo številčnost organizmov v obrastku glede na kontrolni pogoj. Ugotavlja se, da bi termična modifikacija največ pospešila razvoj in gostoto biološkega obrastka. Velja izpostaviti, da so bile na območju Approdo vrednosti skupne številčnosti pri T3 nižje od tistih, beleženih pri T2 (slika 3.8 c). Silvanolin 1 %, ki bi po 20 dneh ohranil

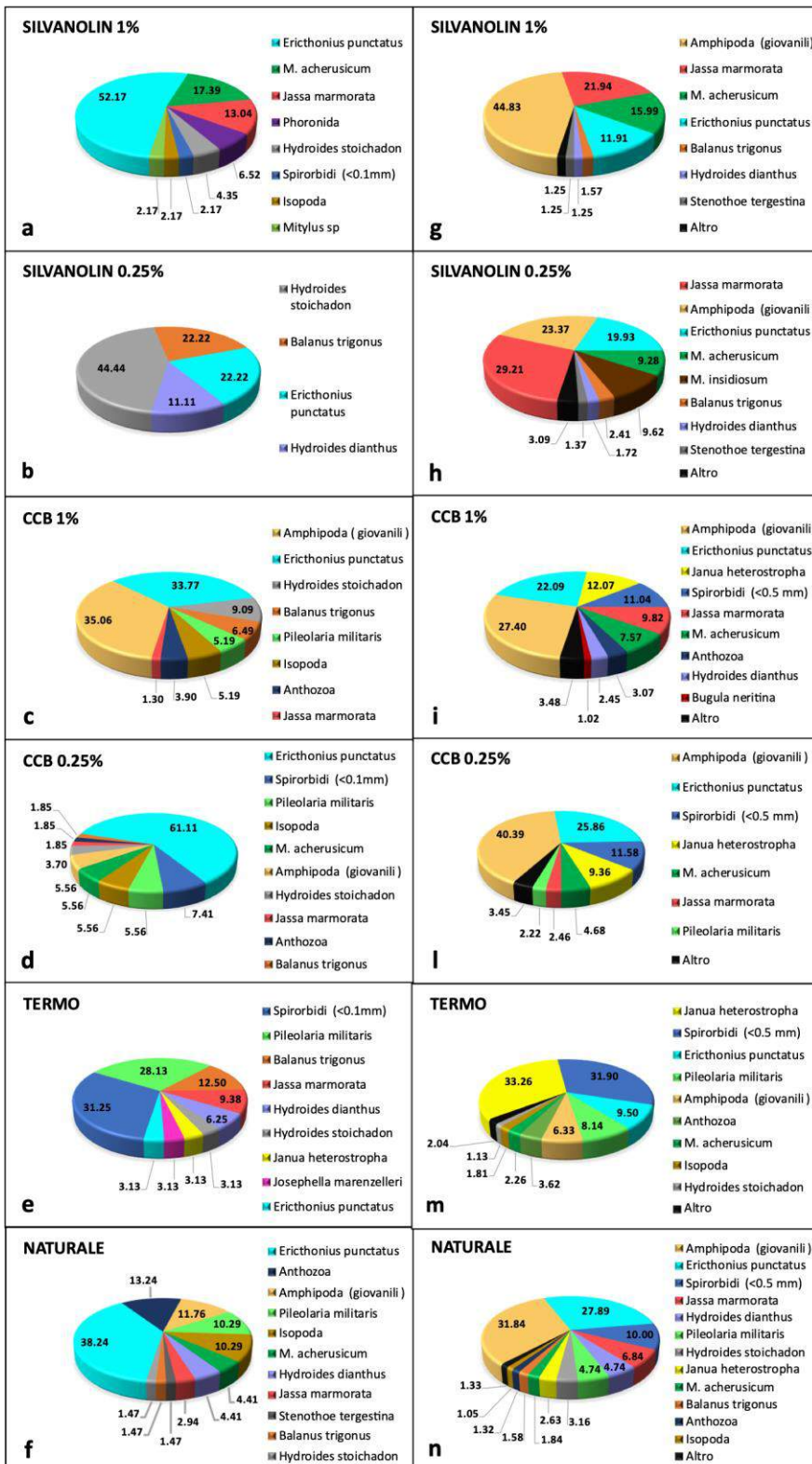
svojo inhibitorno učinkovitost, je imel po preteku 40 dni največjo gostoto živali a najnižje število vrst (slika 3.10 g), obdelave CCB pa so beležile rahlo nižjo številčnost od neobdelanega vzorca (slika 3.8 d). Velja sicer poudariti, da so bile razlike v gostoti pri obeh primerih (Silvanolin in CCB) v primerjavi z neobdelanim pogojem nepomembne.



Slika 3.9 Posnetki biološke obrasti, najbolj pogosto prisotne na lesenih vzorcih *Abies alba*: a) *Balanus trigonus* in kozolnjaki, ki pripadajo rodu *Botryllus* (merilo:1000 µm); b) mnogoščetinci *Janua heterostropha* (merilo:500 µm); c) mnogoščetinci, ki pripadajo rodu *Hydroides* (merilo:1000 µm); d) združba cevi, ki so jih obdelale postranice (merilo:1000 µm).



Slika 3.10 Tortni grafikonki relativne številčnosti taksonov biološke obrasti pri T2 (a-f) in T3 (g-n), prisotne na lesenih vzorcih na območju »Approdo«.



Slika 3.11 Tortni grafikonu relative številčnosti taksonov biološke obrasti pri T2 (a-f) in T3 (g-n), prisotne na lesenih vzorcih na območju »Schiusa«.

4 ZAKLJUČKI

Že pri prvi makroskopski analizi je mogoče opaziti razliko med tipologijo pokritosti z biofilmom in biološko obrastjo, ki sta se razvila na raziskanih območjih in se razlikujeta zaradi jakosti prisotnih vodnih tokov. Ne glede na vrsto nanese obdelave je manjša hidrodinamika pospešila postopek kolonizacije, najprej z biofilmon mikroalg, kasneje z biološko obrastjo.

Preizkušana impregnacijska sredstva so povzročila različne spremembe v skupnosti mikroalg, kjer so bile opažene celice manjših velikosti, z deformirano frustulo. Izbrali smo tudi vrste diatomej, ki tvorijo muljaste tridimenzionalne združbe, s pomočjo katerih se alge lahko oddaljijo od vira onesnaževanja in posledično zmanjšajo strupeni učinek.

Kratkoročni inhibitorni učinek (6 dni) impregnacijskih sredstev je bil učinkovitejši na območju z večjo hidrodinamiko, to velja predvsem za obdelavo s sredstvom CCB 1 % in CCB 0,25 %, kakor tudi z obema različicama Silvanolina.

Če izvzamemo obdelavo s Silvanolinom 1 %, se je učinkovitost zaviranja razvoja biofilma drugih tehnik obdelave na območju z večjo hidrodinamiko zmanjšala po 20 dneh, kar bi lahko pripisali izpiranju težkih kovin ali sproščanju hranilnih snovi, ki so pospešile cvetenje mikroalg. Prav tako na istem območju in pri istem testnem časovnem obdobju ni nobena testirana obdelava, razen za Silvanolin 0,25 %, učinkovito zmanjšala biotske raznovrstnosti biološke obrasti.

Na območju z manjšo hidrodinamiko ni nobena obdelava srednjeročno (20 dni) upočasnila obraščanje organizmov, dolgoročno (40 dni) pa je samo raztopina Silvanolin 1 % zmanjšala raznolikost živalskih organizmov, ki so bili dokaj številčni a vrstno manj raznoliki.

Enako velja za 40-dnevno izpostavljenost na območju z večjo hidrodinamiko, kjer sta le obdelavi s Silvanolinom rahlo upočasnili obraščanje organizmov; še posebej je 1 % raztopina zmanjšala število taksonov prisotnih živali v primerjavi s kontrolnim pogojem. Termična modifikacija pa naj bi dolgoročno pospešila obraščanje z živalmi.

Na podlagi navedenih rezultatov lahko sklepamo, da hidrodinamika igra ključno vlogo pri oprijemu organizmov (macrofouling). Ugotovljeno je bilo, da so na obeh območjih in ob različnih hidrodinamičnih pogojih le obdelave s Silvanolinom 1 % zavirale pritrditev raznih živalskih taksonov s posledičnim zmanjšanjem živalske raznolikosti; kljub navedenemu to sicer ni preprečilo, da se nekaj vrst v pogojih nizke hidrodinamike ne bi močno razmnožilo in v celoti prekrilo vzorce.

Pri AKT17 je sodelovalo naslednje osebje, zaposleno pri OGS-u: Elena Di Poi, Edvino Cociancich, Gianluca Zazo, Federica Nasi, Federica Camisa.

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 Evropske Organa upravljanja »Programa sodelovanja Interreg V-A Italija-Slovenija 2014 - 2020«. Za vsebine so odgovorni avtorji.